

Marcelo Teruyuki Matsumoto

**“TIPAGEM MOLECULAR, PERFIS DE
SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE
TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS
DURANTE A INFECÇÃO DE *Cryptococcus neoformans*”**

Araraquara

2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



Marcelo Teruyuki Matsumoto

**“TIPAGEM MOLECULAR, PERFIS DE
SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE
TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS
DURANTE A INFECÇÃO DE *Cryptococcus neoformans*”**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Análises Clínicas da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” - Campus
de Araraquara, como pré-requisito
para obtenção do título de Doutor.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara

2006

Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

- M434t** Matsumoto, Marcelo Teruyuki
Tipagem molecular, perfis de sensibilidade e caracterização de transcritos diferencialmente expressos durante a infecção de *Cryptococcus neoformans* / Marcelo Teruyuki Matsumoto. – Araraquara, 2006.
144 f.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas.
Orientadora: Maria José Soares Mendes Gianinni.
1. *Cryptococcus neoformans* – Tipagem molecular. 2. *Cryptococcus neoformans* – Perfis de sensibilidade . 3. *RDA*. I. Gianinni, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

CDD: 616.075

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo), da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Dalai Lama disse...

“...se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior. Estas atitudes se refletirão em mudanças positivas no seu ambiente familiar. Deste ponto em diante, as mudanças se expandirão em proporções cada vez maiores. Tudo o que fazemos produz efeito, causa algum impacto...”

“...determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los, mas independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho...”

DEDICATÓRIA

À minha família querida!!!

Aos meus avós, pelo amor, carinho, atenção...

Aos meus pais, pelos exemplos de luta, perseverança, honestidade, bondade, dedicação, zelo, carinho, amor...

Aos meus irmãos, pelos exemplos de companheirismo, união, carinho...

À minha noiva, companheira, amiga, incentivadora...

Admiração!

Respeito!

Inspiração!

A vocês, páginas e páginas de elogios seriam
insuficientes para expressar o que realmente eu sinto...

AMO MUITO VOCÊS!!!

ORAÇÃO PARA DEUS

Deus, meu bom amado Senhor.

Aquietai a minha mente.

Ajudai-me a encontrar a paz.

Alimentai minha vida de fé.

Levai-me ao teu encontro.

Esvaziai minha mente.

Me faça sentir suas mais belas leis.

Me ajude a me expandir,

para que possa ir além de mim,

para que eu possa estar em Ti.

Me ajude, Senhor,

a largar de todo orgulho e egoísmo.

Traga paz ao meu coração,

me ajude a me libertar dos desejos

que me acorrentam à angústia.

Me deixe adorá-lo.

Deixe com que eu te viva em mim.

Me faça manso de coração

e uma fortaleza de compaixão.

E quando eu me desesperar me acalente

e quando eu me alegrar ria ao meu lado.

Deus, meu bom amado Senhor.

Aquietai a minha mente.

Ajudai-me a encontrar a paz.

“Obrigado Senhor, por me conceder esta oportunidade de renovação”

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, pelo exemplo de liderança, luta, perseverança e idealismo. Obrigado por exigir e cobrar sempre o melhor. Obrigado pela orientação e oportunidade de crescimento.

Às amigas Rô e Elaine, pela paciência e pelo valioso convívio. Vocês me ensinaram muito (em todos os sentidos).

Às amigas Lillian e Marisa, pelas preciosas ajudas nos momentos de dificuldades e dúvidas.

Às amigas da “Célula”, Patrícia, Juliana e Julhiany, obrigado pelo apoio e amizade.

Às amigas Rosana, Fabiana e Susana, pela paciência, compreensão e pelas animadas conversas que resultaram em ótima convivência no laboratório.

Às amigas Tirene e Eliana, obrigado pela disponibilidade nas vezes que precisei de ajuda.

Às amigas Liliana e Tatiane, pela preciosa amizade e momentos agradáveis de convivência.

Aos amigos da UFRGS, em especial, a Livia, Josiane, Letícia e Juli pela paciência, receptividade e contribuição científica que me permitiram concluir este trabalho. Muito obrigado!

À Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein pela valiosa colaboração científica e oportunidade de crescimento, contribuindo de forma única para a conclusão deste trabalho.

Às Profas., Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem e Dra. Rosely Maria Zancoppe Oliveira pela ajuda na obtenção das amostras de *C. neoformans*.

À CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

ORAÇÃO PELOS AMIGOS

Pai, eu lhe peço que abençoe meus amigos
que estiverem lendo esta mensagem.
Faça-lhes uma nova revelação de Seu amor e poder.
Espírito Santo, peço-lhe que ministre
o espírito deles neste momento.
Onde houver dor,
conceda-lhes Sua paz e misericórdia.
Onde houver dúvida,
renove-lhes a confiança na Sua
capacidade de operar através deles.
Onde houver cansaço ou exaustão,
peço-lhe que lhes dê compreensão,
paciência e força enquanto
aprendem a se submeter a Sua direção.
Onde houver estagnação espiritual,
peço-lhe que os renove revelando.
Sua proximidade e atraindo-os
para maior intimidade com o Senhor.
Onde houver medo, revele Seu amor
e incuta-lhes Sua coragem.
Onde houver o obstáculo de algum pecado,
revele-o e quebre o poder
que estiver exercendo sobre a vida deles.
Abençoe suas finanças,
conceda-lhes maior visão, levante líderes
e amigos para dar-lhes apoio e encoraje-os.
Dê a cada um discernimento para
reconhecer as forças negativas que os rodeiam
e revele-lhes o poder que tem no Senhor para derrotá-las.
Peço-lhe que faça todas essas coisas em nome de Jesus.
No amor cristão.

RESUMO

Cryptococcus neoformans é patógeno importante, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A principal porta de entrada deste patógeno é pela via respiratória, disseminando-se posteriormente e atingindo principalmente o sistema nervoso central, provocando a meningite criptocócica. A primeira parte deste estudo teve como objetivos determinar, nos 106 isolados clínicos de *C. neoformans* obtidos de dois Estados (São Paulo e Rio de Janeiro), (1) as variedades e (2) os *mating-types* por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), (3) analisar a diversidade genética por PCR-*fingerprinting* com a sequência iniciadora específica para regiões microssatélite (GACA)₄, (4) por RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) com o iniciador 6 e (5) por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene da fosfolipase B (PLB1) digerido com a enzima de restrição *Ava*I e (6) determinar a sensibilidade a quatro antifúngicos (fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B) seguindo o método de referência (documento M27-A2) do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). A segunda parte teve como objetivo, analisar transcritos diferencialmente expressos durante a infecção pulmonar de *C. neoformans*, pela técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*). Entre os 106 isolados, 104 foram identificados como *C. neoformans* e apenas dois foram *C. gattii* (= *C. neoformans* var. *gattii*), todos MAT α . O tipo molecular VNI (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A) foi o mais prevalente entre os isolados (97/106), seguido do tipo VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A) (7/106) e VGII (*C. gattii*, sorotipos B ou C) (2/106) quando analisados por PCR-*fingerprinting* e PCR-RFLP. Homogeneidade alta foi obtida com o iniciador (GACA)₄, com a maioria dos isolados apresentando correlação em torno de 0,9. Os resultados do RAPD, por sua vez, revelaram maior heterogeneidade com número maior de perfis moleculares. A análise dos perfis de sensibilidade mostrou que a maioria dos isolados foram sensíveis aos azóis, enquanto número expressivo de isolados intermediários e resistentes para 5-fluorocitosina e com CIM (Concentração inibitória mínima) $\geq 1\mu\text{g/mL}$ foi encontrado para anfotericina B. Em relação ao RDA, oito transcritos foram identificados na condição de infecção, sendo que quatro deles apresentaram maior redundância (transportador de zinco, transportador de cálcio, chaperona e piruvato decarboxilase). Entre os que apresentaram maior redundância, três estão possivelmente relacionados ao estresse e/ou a fatores de virulência conhecidos. A epidemiologia, bem como, a interação fungo-hospedeiro durante a infecção criptocócica é bastante complexa e os dados obtidos neste estudo contribuem para o melhor entendimento da biologia de *C. neoformans*.

Palavras chave: *Cryptococcus neoformans*; Tipagem Molecular; Perfis de Sensibilidade; RDA.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an important pathogen, mainly in immunocompromised patients. The pathogen penetrates mainly by respiratory way, disseminate afterward and reach specially the central nervous system causing the cryptococcal meningitis. The first part of this study had the objective to determine, in the 106 clinical isolates of *C. neoformans* obtained from São Paulo and Rio de Janeiro State, (1) the varieties and (2) mating-types by PCR (*Polymerase Chain Reaction*), (3) analyze the genetic diversity by PCR-*fingerprinting* with specific primer to microsatellite regions (GACA)₄, (4) by RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) with primer 6 and (5) by PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) of the phospholipase B gene (PLB1) digested with restriction enzyme *Ava*I and (6) to determine the susceptibility to four antifungal (fluconazole, itraconazole, 5-flucytosine and amphotericin B) following the reference method (document M27-A2) from CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*). The second part had the goal to analyze differentially expressed transcription during pulmonary infection of *C. neoformans*, by RDA (*Representational Difference Analysis*) technique. Among 106 isolates, 104 were identified as *C. neoformans* and only two were *C. gattii* (= *C. neoformans* var. *gattii*), all MAT α . The molecular type VNI (*C. neoformans* var. *grubii*, serotype A) was the most prevalent among the isolates (97/106), followed by VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, serotype A) (7/106) and VGII (*C. gattii*, serotypes B ou C) (2/106) when analyzed by PCR-*fingerprinting* and PCR-RFLP. High homogeneity was obtained with the primer (GACA)₄, with most of the isolates showing correlation around 0.9. By contrast, the RAPD analysis revealed more heterogeneous with more numbers of molecular profiles. The susceptibilities analysis showed that most of the isolates were susceptible to azoles while expressive number of isolates were intermediate and resistant to 5-flucytosine and showed MIC (Minimal Inhibitory Concentration) $\geq 1\mu\text{g/ml}$ to amphotericin B. Regarding the RDA results, eight transcripts were identified in the infection condition, and four of them presented larger redundancy (zinc transporter, calcium transporter, chaperone and pyruvate decarboxylase). Among these proteins that showed larger redundancy, three of them are possibly related to stress and/or well-known virulence factors. The epidemiology, as well as, the interaction yeast-host during cryptococcal infection is very complex and the data obtained in this study contribute to elucidate the biology of *C. neoformans*.

Key words: *Cryptococcus neoformans*; Molecular Typing; Susceptibility Profiles; RDA.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	X
	ABSTRACT.....	XI
	LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	XIV
	LISTA DE FIGURAS.....	XVII
	LISTA DE TABELAS.....	XVIII
	LISTA DE ANEXOS.....	XIX
1.	INTRODUÇÃO.....	1
	Histórico.....	1
	Taxonomia.....	2
	Ecologia.....	4
	Epidemiologia.....	8
	Tipagem molecular.....	11
	Drogas antifúngicas e teste de sensibilidade.....	14
	Fatores de virulência.....	16
	Patologia da criptococose.....	20
	RDA (<i>Representational Difference Analysis</i>).....	21
2.	OBJETIVOS.....	22
3.	METODOLOGIA.....	23
3.1.	Seleção dos isolados.....	23
3.2.	Identificação de <i>C. neoformans</i>	23
3.2.1.	Exame direto.....	23
3.2.2.	Identificação genérica e específica.....	23
3.3.	Metodologia de extração do DNA genômico de <i>C. neoformans</i>	24
3.4.	Reação de PCR para determinação das variedades.....	25
3.5.	Reação de PCR utilizando os iniciadores para <i>mating type</i> α e <i>a</i>	26
3.6.	Reação de PCR- <i>fingerprinting</i> utilizando a região microsatélite (GACA) ₄ ...	26
3.7.	Reação de RAPD utilizando a sequência iniciadora 6.....	26
3.8.	Análise de polimorfismo do RAPD e PCR- <i>fingerprinting</i>	27
3.9.	Reação de PCR-RFLP do gene da fosfolipase B (PLB1).....	27
3.10.	Cepas de referência.....	28
3.11.	Testes de sensibilidade.....	28
3.12.	Cultivo de <i>C. neoformans</i> – ativação/repressão gênica.....	30
3.13.	Extração de RNA total (adaptação de Sokolovsky <i>et al.</i> , 1990).....	30
3.14.	Reação de RDA.....	30

3.14.1.	Síntese de cDNA fita simples.....	31
3.14.2.	Síntese de cDNA fita dupla.....	31
3.14.3.	Digestão com <i>Sau3AI</i>	31
3.14.4.	Anelamento do primeiro par de adaptadores.....	31
3.14.5.	Ligação do primeiro par de adaptadores.....	32
3.14.6.	Teste de ligação do primeiro par de adaptadores.....	32
3.14.7.	Primeira amplificação.....	32
3.14.8.	Primeira subtração.....	33
3.14.9.	Segunda amplificação.....	33
3.14.10.	Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem.....	33
3.14.11.	Preparo de células competentes para transformação por eletroporação.....	34
3.14.12.	Transformação de células de <i>E. coli</i> por eletroporação.....	34
3.14.13.	Extração de DNA plasmidial em microplaca.....	34
3.14.14.	Seqüenciamento.....	35
3.14.15.	Análise das seqüências.....	35
3.14.16.	Confirmação dos resultados por RT-PCR.....	35
4.	RESULTADOS	37
4.1.	Seleção das amostras.....	37
4.2.	Determinação das variedades por PCR.....	42
4.3.	Determinação dos <i>mating-type</i> por PCR.....	44
4.4.	RAPD e PCR- <i>fingerprinting</i>	46
4.5.	PCR-RFLP do gene da fosfolipase B (PLB1).....	51
4.6.	Avaliação do perfil de sensibilidade de <i>C. neoformans</i> por microdiluição....	54
4.7.	Expressão diferencial de genes de <i>C. neoformans</i> durante infecção em animais de laboratório.....	59
4.8.	Caracterização e função hipotética dos cDNAs obtidos de <i>C. neoformans</i> após infecção experimental.....	61
4.9.	Confirmação da expressão diferencial por RT-PCR.....	63
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	TERMO DE CONSENTIMENTO DO COMITÊ DE ÉTICA	100
	TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	101
8.	ANEXOS	119

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

α	=	Alfa
Ω	=	Ohm
μg	=	Micrograma
μL	=	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	=	Graus Celsius
Aids	=	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	=	<i>American type culture collection</i>
ATP	=	Adenosina trifosfato
BHI	=	<i>Brain heart infusion</i> (= Caldo infuso de cérebro-coração)
C-	=	Controle negativo
C+	=	Controle positivo
CES	=	Citrato de sódio - EDTA - sorbitol
CGB	=	Canavanina - glicina - azul de bromotimol
CIM	=	Concentração inibitória mínima
CIM ₅₀	=	50% de inibição
CIM ₅₀	=	Concentração inibitória mínima para 50% dos isolados
CIM ₉₀	=	90% de inibição
CIM ₉₀	=	Concentração inibitória mínima para 90% dos isolados
CLSI	=	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTAB	=	brometo de cetiltrimetilamônio
DEPC	=	Dietil Pirocarbonato
DNA	=	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	=	Desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)
ddNTP	=	Didesoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)
D.O.	=	Densidade óptica
DTT	=	Ditiotreitol
EDTA	=	Ácido etileno diamianino tetracético
EE	=	EPPS - EDTA
EPPS	=	<i>[N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-3-propanesulfonic acid]</i>
EST	=	<i>Expressed Sequence Tags</i> (= Etiqueta de sequência expressa)
g	=	Grama
x g	=	Força da gravidade
GTE	=	Glicose - Tris-HCl - EDTA
HIV	=	Vírus da imunodeficiência humana

I	=	Intermediário
IPTG	=	isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
Kb	=	Quilobases
L	=	Litro
LB	=	Luria - Bertani
M	=	Molar
meio C	=	Meio livre de fontes de carbono
meio N	=	Meio livre de fontes de nitrogênio
mg	=	Miligrama
mL	=	Mililitro
mM	=	Milimolar
mm	=	Milímetro
MOPS	=	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
mV	=	Milivolt
ng	=	Nanograma
nm	=	Nanômetro
pb	=	Pares de bases
PCR	=	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (= Reação em cadeia da polimerase)
pH	=	Potencial hidrogeniônico
PLB1	=	Gene fosfolipase B
pmol	=	Picomol
R	=	Resistente
RAPD	=	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> (= Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso)
RDA	=	<i>Representational Difference Analysis</i> (= Análise de diferença representacional)
RFLP	=	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (= Polimorfismos de fragmentos de restrição)
RNA	=	Ácido ribonucléico
RT	=	Transcrição reversa
S	=	Sensível
SDD	=	Sensível dependente de dose
SDS	=	Dodecilsulfato de sódio
TBE	=	Tris-base - ácido bórico - EDTA
TE	=	Tris-base - EDTA

Tris	=	2-amino-2-hidroximetilpropano
U	=	Unidades
UFC	=	Unidade formadora de colônia
UPGMA	=	<i>Unweighted pair group method, arithmetic averages</i> (= método não ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas)
var.	=	Variedade
X-gal	=	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
YEPD	=	Extrato de levedura - peptona - dextrose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel representativo a 1,5% dos produtos de PCR de isolados de <i>C. neoformans</i> obtidos com os iniciadores para determinação das variedades.....	43
Figura 2. Gel representativo dos produtos de PCR de isolados de <i>C. neoformans</i> do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro obtidos com os iniciadores para mating-type α e a.....	45
Figura 3. Perfis de PCR- <i>fingerprinting</i> com o iniciador (GACA) ₄ de <i>C. neoformans</i> do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro (gel a 2%).....	47
Figura 4. Perfis de RAPD com o iniciador 6 do kit Ready to go de <i>C. neoformans</i> do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro (gel a 2%).....	48
Figura 5. Dendrograma dos isolados de <i>C. neoformans</i> do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro utilizando a sequência iniciadora (GACA) ₄	49
Figura 6. Dendrograma dos isolados de <i>C. neoformans</i> do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro utilizando a sequência iniciadora 6 do Kit Ready to Go.....	50
Figura 7. Perfis de PCR-RFLP de <i>C. neoformans</i> do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro (gel a 3%).....	52
Figura 8. Prevalência dos tipos genéticos de <i>C. neoformans</i> dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro.....	53
Figura 9. Distribuição dos valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B de isolados clínicos de <i>C. neoformans</i> de São Paulo e Rio de Janeiro.....	57
Figura 10. Prevalência de isolados sensíveis, sensíveis dependente de dose, intermediários e resistentes de <i>C. neoformans</i> dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro.....	58
Figura 11. Produtos diferencialmente expressos de <i>C. neoformans</i> mantidos em meio de cultura e recuperados de tecido pulmonar.....	60
Figura 12. Confirmação dos resultados do RDA pela técnica de RT-PCR.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A. Dados e resultados dos isolados de <i>Cryptococcus</i> sp do Estado de São Paulo avaliados quanto à espécie, variedade, <i>mating type</i> , tipo molecular e sensibilidade a quatro antifúngicos (fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B).....	38
Tabela 1B. Dados e resultados dos isolados de <i>Cryptococcus</i> sp do Estado do Rio de Janeiro avaliados quanto à espécie, variedade, <i>mating type</i> , tipo molecular e sensibilidade a quatro antifúngicos (fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B).....	40
Tabela 2. Variações das CIM (µg/mL) para fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B para 106 isolados de <i>C. neoformans</i> de São Paulo e Rio de Janeiro.....	55
Tabela 3. CIM50 e CIM90 de fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B de isolados de <i>C. neoformans</i> de São Paulo e Rio de Janeiro.....	56
Tabela 4. Análise dos clones seqüenciados obtidos de <i>C. neoformans</i> da condição de infecção, após aplicação da técnica de RDA.....	62

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Perfis representativos de RAPD de cinco isolados de <i>C. neoformans</i> obtidos com os iniciadores 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do Kit Ready to Go (gel a 2%).....	119
Anexo 2. Esquema de diluição das drogas solúveis e insolúveis em água. M27-A2, 2002 – CLSI.....	120
Anexo 3A. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B de isolados <i>C. neoformans</i> do Estado de São Paulo.....	121
Anexo 3B. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B de isolados <i>C. neoformans</i> do Estado do Rio de Janeiro.....	123
Anexo 4. Esquema representativo da via de glicólise e neoglicogênese de <i>C. neoformans</i> (http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?cne00010+CNJ00950).....	125

1. INTRODUÇÃO

Histórico

A criptococose, micose causada pela levedura capsulada *Cryptococcus neoformans* é importante infecção oportunista, principalmente em pacientes imunossuprimidos causando a neurocriptococose. A doença foi descrita pela primeira vez por Otto Busse e Abraham Buschke em 1894, quando isolaram uma levedura capsulada de lesão de tíbia de uma mulher de 31 anos. Busse na ocasião denominou-a *Saccharomyces hominis* e a infecção *Saccharomycosis hominis*. No mesmo ano, Sanfelice, na Itália, isolou uma levedura capsulada de suco de pêssgo e no ano seguinte demonstrou sua patogenicidade em animais de laboratório, denominando-a *Saccharomyces neoformans* devido a sua tendência de causar lesões semelhantes a tumores cancerígenos nestes animais (LITTMAN e ZIMMERMAN, 1956 apud CASADEVALL e PERFECT, 1998). Curtis, em 1895, relatou na França o segundo caso de criptococose, isolando a levedura de uma lesão de quadril, denominando-a *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*. Vuillemin, em 1901 reclassificou os isolados de Busse, Bushcke e Sanfelice colocando-os no gênero *Cryptococcus* e diferenciando-os do gênero *Saccharomyces* por não formar ascósporos e não fermentar açúcares. Em 1905, Von Hansemann relatou o primeiro caso de meningite criptocócica (DROUHET, 1997 apud CASADEVALL e PERFECT, 1998).

A primeira metade do século XX marcou a consolidação de *C. neoformans* como levedura patogênica. *S. neoformans*, *Blastomyces neoformans*, *Cryptococcus hominis* e *Torula histolytica* foram alguns dos nomes utilizados para designar a levedura (MITCHELL e PERFECT, 1995). Em 1935, Benham estudando vários isolados recuperados de humanos, incluindo aqueles obtidos por Busse, Curtis e Sanfelice, agrupou-os dentro do gênero *Cryptococcus* e em 1950, a própria autora propôs a denominação *Cryptococcus neoformans* para se referir a forma imperfeita da levedura, permanecendo a mesma terminologia após estudos realizados por Kurtzman e Fell, (1998).

Números crescentes da doença são relatados, devido em parte ao maior conhecimento sobre o agente, e principalmente pelo aumento de indivíduos imunocomprometidos, como os submetidos à terapia imunossupressiva anti-neoplásica, transplantes de órgãos e outras condições de imunossupressão (CASADEVALL e PERFECT, 1998). Nas últimas décadas, a importância médica da criptococose aumentou dramaticamente em consequência da epidemia de Aids (Síndrome da imunodeficiência adquirida). As taxas de letalidade descritas na literatura mundial (KOVACS et al., 1985; ZUGER et al., 1986; CHUCK et al., 1989) variam entre 10 e 20% e expressam a importância da doença como um dos grandes desafios à sobrevivência dos pacientes imunossuprimidos.

Taxonomia

Membros do gênero *Cryptococcus* compreendem espécies produtoras de urease, assimiladoras de inositol e de D-glucuronato, sem metabolismo fermentativo. Pelo menos 38 espécies não *neoformans* já foram identificadas. São encontradas em vários ambientes e climas sobrevivendo a condições extremamente desfavoráveis (CASADEVALL e PERFECT, 1998). Apesar das outras espécies terem também grande capacidade de adaptação, a única espécie de interesse médico como agente da criptococose é *C. neoformans*. Os relatos de criptococose causados por outras espécies como *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus curvatus* e *Cryptococcus albidus* são raros, provavelmente devido à incapacidade destas em sobreviver em temperatura corporal relativamente alta e resistir ao sistema imune do hospedeiro. Lee et al. (2004) isolaram *C. albidus* de um indivíduo transplantado renal que desenvolveu síndrome respiratória aguda, choque séptico e máculas nos membros inferiores.

Os estudos de caracterização antigênica, iniciados por Benham em 1935, foram também de grande importância para o reconhecimento de diferentes sorotipos, tornando-se uma importante ferramenta em trabalhos epidemiológicos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1984; NISHIKAWA et al., 2003). Cerca de 90% da cápsula é composta de carboidrato e glucuroxilomanana é o seu principal polissacarídeo produzido *in vitro* e *in vivo*. *C. neoformans* é separado em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) de acordo com as diferenças nesta estrutura (IKEDA et al., 1982; BHATTACHARJEE et al., 1984; CHERNIAK e SUNDSTROM, 1994).

De acordo com Kurtzman e Fell (1998), *C. neoformans* em sua forma anamorfa pertence ao Reino Fungi; Phylum: Eumycota; Subdivisão: Deuteromycota; Classe: Blastomycetes; Família: Cryptococcaceae; Gênero: *Cryptococcus*; Espécie: *neoformans*; Variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. A forma teleomorfa foi classificada como *Filobasidiella neoformans*, pertencente ao Reino Fungi; Phylum: Basidiomycota; Classe: Heterobasidiomycetes; Ordem: Filobasidiales; Família: Filobasidiaceae; Gênero: *Filobasidiella*; Espécie: *F. neoformans*; Variedades: *F. neoformans* var. *neoformans* e *F. neoformans* var. *bacillispora*.

Franzot et al. (1999) analisaram diferenças genotípicas entre os sorotipos A e D da variedade *neoformans*, pela distinção dos padrões de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) obtidos pela hibridização com sonda CNRE-1 de DNA genômico e pela observação das diferenças nas seqüências do gene URA5. Os autores sugeriram que o número grande de diferenças encontradas, entre os dois sorotipos, seria suficiente para colocar o sorotipo A em uma nova variedade, denominada *grubii*.

O nome *C. neoformans* var. *gattii* foi proposto por Vanbreusegum e Takashio em 1970, quando células alongadas atípicas foram observadas em líquido céfalo-raquidiano de um menino africano com meningite (SORREL, 2001).

A variedade *neoformans/grubii* difere da variedade *gattii* em vários aspectos, como nos padrões de cariótipo eletroforético (WICKES et al., 1994; BOEKHOUT et al., 1997), no RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (BOEKHOUT et al., 1997), no DNA-fingerprinting (VARMA et al., 1995; MEYER et al., 1993, 1999 e 2003); nas seqüências espaçadoras de DNA ribossômico (DIAZ et al., 2000); nas características fisiológicas e bioquímicas (BENNETT et al., 1978; POLACHECK e KWON-CHUNG, 1980; DUFAIT et al., 1987; KWON-CHUNG et al., 1987; CHERNICKAK e SUNDSTROM, 1994); na suscetibilidade a toxina killer de *C. laurentii* (BOEKHOUT e SCORZETTI, 1997), nos habitats e na distribuição geográfica (KWON-CHUNG e BENNETT, 1984; CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Boekhout et al., (2001), em estudos de genotipagem por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), verificaram uma clara distinção entre as variedades *neoformans/grubii* e a *gattii* propondo a existência de duas espécies distintas: *C. neoformans* com as variedades *neoformans* e *grubii* e o correspondente teleomórfico *F. neoformans* e *C. bacillisporus* com o correspondente teleomórfico *F. bacillispora*. KWON-CHUNG et al., 2002, comparando as seqüências de vários genes (URA5, CNLAC1, CAP59, CAP64, IGS e ITS de rRNA) de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* obtiveram uma árvore filogenética com formação de *clusters* claramente divergentes. Estes resultados, somados à análise genética da progênie, após o cruzamento entre cepas da var. *neoformans* e *gattii*, e os dados de tipagem molecular foram suficientes para que uma nova espécie fosse proposta, *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2002). Recentemente, três isolados atípicos foram obtidos de dois pacientes. Após análise por métodos fenotípicos, moleculares e por citometria, estes foram identificados como *mating type*/sorotipo α B/aD (BOVERS et al., 2006).

O estágio sexual de *Filobasidiella neoformans* é similar a de outros basidiomicetos heterotálicos bipolares. Células de *mating type* opostos (α e a) se fundem para formar um heterocarion que logo se desenvolve para formar hifas dicarióticas. Hifas com núcleos não fundidos e grampos de conexão típicos de basidiomicetos são então formados, seguido de divisões dos núcleos de forma sincronizada até a formação do basídio na extremidade da hifa. Ocorre então, a cariogamia seguida de meiose e esporogênese no ápice do basídio. Os quatro núcleos originados durante a meiose permanecem no basídio, enquanto mitoses repetidas pós-meiose geram quatro cadeias longas de até 40 esporos. Ao contrário de outros basidiomicetos, os esporos MAT α e MATa são distribuídos randomicamente entre as quatro cadeias, na razão de 1:1 (KWON-CHUNG, 1975).

Estudos têm revelado que a migração nuclear durante o cruzamento não acontece de forma aleatória e sim organizada e unidirecional do MAT α para o MATa e que o DNA mitocondrial presente nos basidiósporos foi oriundo de um único tipo, MATa. Estes achados levaram os autores a proporem que células MAT α e MATa, embora morfologicamente indistinguíveis, possuem genes

com funções distintas durante o cruzamento, com o MAT α exercendo papel de doador genético e o MATa de acceptor genético (XU et al., 2000; McCLELLAND et al., 2004).

C. neoformans, na fase assexuada, apresenta-se como célula de forma globosa, ovalada ou alongada, com ou sem blastoconídios com a cápsula polissacarídica característica que é facilmente observada em preparações com tinta da China ou nigrosina. Vários meios de cultura podem ser utilizados para o cultivo desta levedura, dada a sua baixa exigência nutricional, necessitando de fontes simples de carbono e nitrogênio. Ágar Sabouraud e ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) acrescido de antibacterianos são alguns dos meios mais utilizados para o seu cultivo em laboratório de rotina. Meios presuntivos como ágar Niger e ágar L-dopa ou dopamina são utilizados na identificação prévia do agente. *C. neoformans* possui a enzima fenoloxidase, que oxida o ácido cafeico presente no ágar Níger, resultando na formação de substâncias semelhantes à melanina, deixando as colônias de cor marrom (LACAZ et al., 2002).

Na identificação desta levedura, são observadas características como a presença de blastoconídios isolados ou múltiplos, presença de cápsula, assimilação de inositol, produção de urease e fenoloxidase. Para a identificação das espécies, devem-se utilizar provas de assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio. A assimilação do inositol e de D-glucuronato caracteriza o gênero e provas de fermentação não são realizadas, pela inabilidade da levedura em fermentar carboidratos (KURTZMAN e FELL, 1998).

Aspectos fenotípicos, habitat, epidemiologia, manifestações clínicas e resposta a terapia antifúngica são alguns dos vários pontos em que *C. neoformans* var. *neoformans* difere de *C. neoformans* var. *gattii*. *C. neoformans* var. *gattii* assimila D-prolina, D-triptofano e ácido málico, utiliza creatina como fonte de carbono e nitrogênio, ao contrário de *C. neoformans* var. *neoformans*. A identificação dessas duas variedades *in vitro* pode ser feita em ágar canavanina, glicina, azul de bromotimol (CGB) e neste meio apenas a var. *gattii* é resistente a canavanina e capaz de utilizar a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio. O meio é alcalinizado devido à liberação de amônia, o que é revelado pela mudança de cor (KWON-CHUNG et al., 1992; SORRELL, 2001).

Ecologia

C. neoformans é levedura cosmopolita com grande capacidade de adaptação, sobrevivendo ao frio congelante da Antártida, a elevadas altitudes do Himalaia e a salinidade dos mares (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Atualmente, é grande o número de trabalhos publicados sobre a ecologia de *C. neoformans*, em busca do maior entendimento de sua biologia, epidemiologia e patogenicidade.

O primeiro isolamento de fontes ambientais foi de suco de pêssego por Sanfelice, em 1894. A pesquisa de fontes naturais de *C. neoformans* e sua relação com o meio ambiente só foi

intensificada nos anos 50 com os trabalhos pioneiros de Emmons (EMMONS, 1951 e 1955 apud CASADEVALL e PERFECT, 1998). Este autor conseguiu isolar *C. neoformans* de solos contaminados com fezes de aves, propondo uma possível relação entre o fungo e excrementos de pássaros, principalmente de pombos (*Columbia livia*). Esta associação foi logo consolidada, quando o mesmo autor verificou a presença da levedura em 14 de 127 amostras, sendo 10 oriundas de locais frequentados por pássaros (EMMONS, 1955). Ajello (1958), alguns anos mais tarde, isolou a levedura em 71% das amostras de solos contaminados com fezes de pombos e outras aves. Mais recentemente, 331 amostras coletadas da cloaca de pombos foram investigadas para presença da levedura. *Cryptococcus* spp foi isolado em 26 (7,85%) amostras, sendo 11 *Cryptococcus uniguttulatus*, seis *C. laurentii*, seis *C. neoformans* var. *neoformans* e três *C. albidus* (ROSARIO et al., 2005)

A associação de *C. neoformans* var. *neoformans* com excretas de aves tem sido atribuída a uma série de adaptações bioquímicas que permitiriam a sobrevivência e crescimento neste nicho. Kwon-Chung, (1991), analisando fezes de pombos, verificou que a alta concentração de creatinina exercia uma função seletiva contra bactérias e fungos saprobias. Além disso, a autora verificou que *C. neoformans* possuía uma deaminase que catalizava a conversão da creatinina a metil hidantoína e amônia (POLACHECK e KWON-CHUNG, 1980; KWON-CHUNG, 1991). Um fato interessante é que a variedade *gattii* não está associada a fezes de pombos, apesar de também possuir esta enzima, provavelmente devido a uma diferença na regulação de sua via (KWON-CHUNG, 1976; POLACHECK e KWON-CHUNG et al., 1980). A associação de *C. neoformans* com excrementos de outras espécies aviárias foi também descrita, incluindo canários, papagaios e frangos (STAIB, 1962; STAIB et al., 1984; BAWENS et al., 1986; SWINNE et al., 1986; SWINNE et al., 1989; CASADEVALL et al., 1992; GRISEO et al., 1995; LOPEZ-MARTINEZ et al., 1995; ABEGG et al., 2006).

Em Bujunbura, Burundi, na África Central, *C. neoformans* var. *neoformans* foi isolado de poeira doméstica em 35% das residências de pacientes aidéticos que mantinham contato com aves (SWINNE et al., 1989; SWINNE et al., 1994). Pal (1997) analisou 28 amostras de fezes de pombos coletados em Kathmandu, Nepal e sete foram positivas (25%) para *C. neoformans* var. *neoformans*. Na região da Apulia (Itália), foram encontrados *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. laurentii* e *C. albidus* em três cavernas de interesse arqueológico, em fezes de morcegos, de pombos, de raposas e em amostras de solo (MONTAGNA et al., 2003). Na região de Madras, Índia, 887 amostras de fezes de diferentes aves foram analisadas, sendo 106 positivas para *C. neoformans* (12%). Um fato novo e de grande importância foi o isolamento de *C. neoformans* de excrementos de corvos, ave ubíqua na Índia (GOKULSHANKAR et al., 2004). Em outro estudo, *C. neoformans* sorotipo A foi isolado de fezes de galinha em 36 de 150 casas (24%), durante a estação seca e em seis (4,0%), na

chuvosa no subúrbio da Tailândia, o resultado levou os autores a sugerirem que este seria a razão da alta incidência de meningite criptocócica em pacientes HIV positivos (KUROKI et al., 2004). *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) também foi isolado de *Eucalyptus camaldulensis* em regiões de solo com elevada alcalinidade, na região do Mediterrâneo (ERGIN et al., 2004) e em diversas espécies de árvores usadas para enfeitar jaulas num zoológico, na Bélgica (BAUWENS et al., 2004). Mais recentemente, 762 isolados ambientais coletados de três regiões dos EUA foram analisados. *C. neoformans* sorotipo A foi o mais prevalente (85,3%) seguido do sorotipo D (7,6%) e AD (7,1%), nenhum sorotipo B ou C foi encontrado e todos foram *mating type* α (LITVINTSEVA et al., 2005). Na Malásia, de 544 excretas de aves coletadas de zoológico, *pet shops* e áreas públicas, 20 foram positivas para *C. neoformans*. Todos foram sorotipo A, MAT α e sensíveis para anfotericina B, fluconazol e itraconazol (TAY et al., 2005).

O nicho ecológico da variedade *gattii* foi descoberta em 1990 por Ellis e Pfeiffer, quando identificaram o primeiro habitat natural da variedade, associando-a com *E. camaldulensis*, e relacionando a distribuição deste eucalipto com a da criptococose causada por esta variedade. Os autores postularam uma teoria de exportação em que esta poderia ter associação biotrófica específica com *E. camaldulensis* e, uma vez presente nestes, seriam exportados com as mudas ou sementes, da Austrália para outros países. Um reforço desta teoria foi obtido por Pfeiffer e Ellis, em 1991, ao relatarem o primeiro isolamento, fora da Austrália, da variedade *gattii*, de *E. camaldulensis*.

C. neoformans var. *gattii* foi isolada a partir de *Eucalyptus tereticornis*, na Costa do Ouro, Queensland por Pfeiffer e Ellis, (1992) e na Cidade do México por Licea et al., (1996). Mais tarde Pfeiffer e Ellis, (1997) reconheceram mais três espécies de eucaliptos, *Eucalyptus rudis*, *Eucalyptus gomphocephala* e *Eucalyptus blakelyi* como hospedeiros naturais de *C. neoformans* var. *gattii*, na Austrália. Os relatos de isolamento de *C. neoformans* de árvores e madeiras em decomposição levantaram a questão sobre a possibilidade destas fontes, serem as naturais para a levedura (LAZERA et al., 1993, 1996, 1998 e 2000; RANDHAWA et al., 2001). Os basidiomicetos, grupo em que se inclui *C. neoformans* possuem a lacase e fenoloxidase que fazem parte de um complexo enzimático, com capacidade de degradar lignina presente em troncos (EGGERT et al., 1996). No Uruguai, a presença desta variedade foi relatada em ninho de vespa (*Polybia accidentalis*) por Gezuele et al., (1993). Mais recentemente, dois tipos moleculares de *C. neoformans* var. *gattii* (VGI e VGII) foram isolados de insetos (ordem Lepidoptera; família Oecophoridae) presentes em uma única cavidade em árvores da espécie *E. tereticornis* (KIDD et al., 2003).

Embora a ocorrência da variedade *gattii* tenha sido sempre associada a espécies de eucaliptos, Lazera et al., (1998) isolaram esta variedade repetidamente de um oco de outra espécie de árvore (*Moquilea tomentosa*). Na região nordeste do Brasil, Lazera et al., (2000) isolaram ambas

as variedades de *C. neoformans* de ocos de árvores de gêneros diferentes, inclusive compartilhando o mesmo oco, sugerindo ser este o nicho ecológico primário da levedura. Vilcins et al., (2002) e Davel et al., (2003) também relataram o isolamento desta variedade a partir de outras espécies de árvores. Na Índia, *C. neoformans* var. *gattii* foi isolada de flores de *E. tereticornis* enquanto a variedade *grubii* foi isolada de cascas de *E. camaldulensis* em duas ocasiões diferentes, mas possuíam o mesmo genótipo e foram *mating type* α (GUGNANI et al., 2005)

No Brasil, a variedade *gattii* foi também isolada de excretas de morcego no sótão de uma casa velha no Rio de Janeiro (LAZERA et al., 1993). Nesta cidade, Passoni et al., (1998) isolaram *C. neoformans* var. *neoformans* de poeira doméstica e de excretas de aves de cativeiro, como canários, periquitos e outros psitacídeos. Índices elevados de poeira domiciliar e de amostras do peridomicílio (13 a 50%) apresentaram contaminação com esta levedura. Na cidade de São Paulo, 38 locais da região central foram escolhidos para coletar amostras de fezes de pombos e fragmentos de árvores e em 10 locais (26,3%) foram isolados *C. neoformans* var. *neoformans*. Ainda no mesmo trabalho, amostras de 12 árvores do gênero *Eucalyptus* spp foram coletadas mensalmente durante dois anos e *C. neoformans* var. *gattii* foi isolado da mesma árvore no parque do Ibirapuera em duas ocasiões diferentes (novembro de 1996 e 1997). *C. neoformans* var. *neoformans* também foi isolado neste e no Parque da Aclimação, mostrando que as duas variedades estão presentes em áreas urbanas onde há grande trânsito de pessoas (MONTENEGRO e PAULA, 2000). Fortes et al., (2001) isolaram *C. neoformans* var. *gattii* de ocos de *Guettarda acreana*, na floresta amazônica em áreas inexploradas pelo homem, no norte do país. Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, foi realizado um estudo utilizando excretas de várias espécies de aves tais como canário belga (*Serinus canaria*), canário do reino (*Cordiulis cocullatos*), canário da terra (*Sicalis flaveola brasiliensis*), periquito australiano (*Melopsittacus unolulatus*), *Colopsitas* (*Psittacidae*), agapora (*Psittacidae*), mandarim (*Psittacidae*), pomba rabo de leque (*Columba* sp), pombo africano (*Columba* sp) e papagaio (*Psittacidae*). As amostras de fezes foram obtidas de lojas de aves, escolas, domicílios e de solos em ambientes abertos. Concentrações elevadas de *C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo A, de até 46000 propágulos viáveis por grama de material seco foram encontradas, refletindo a existência de fontes ambientais na forma de microfocos (FILIÚ et al., 2002). Na cidade de Araraquara, no interior de São Paulo, foram estudadas as características fenotípicas e genotípicas de isolados de *C. neoformans* coletados de fezes de pombos em dois focos, 1º e 5º andar, de um prédio do centro da cidade. Os isolados do primeiro andar foram mais heterogêneos quando comparados com os do quinto, sugerindo que a fonte e/ou o habitat que os pombos se expuseram foram distintos (ANDRADE, 2003). Raso et al., (2004) relataram um surto de criptococose em psitacídeos de um aviário em São Paulo. Sete aves morreram de criptococose disseminada e *C. neoformans* var. *gattii* foi isolada, identificada com base em testes bioquímicos, fisiológicos e sorológicos e a

concentração inibitória mínima foi determinada para fluconazol (64µg/mL), mostrando resistência a esta droga. Em Goiânia, 290 amostras de fezes de aves, solos, plantas ornamentais e outros materiais associados a eucaliptos foram analisadas e a sensibilidade a fluconazol, itraconazol e anfotericina B foi determinada. *C. neoformans* var. *grubii* foi isolado em 20,3% (36/177) das amostras de fezes de pombos e em 14,3% (5/35) das de eucaliptos, mas nenhum apresentou resistência às três drogas testadas (KOBAYASHI et al., 2005). Da mesma forma, na cidade de Santos foram analisadas 116 amostras, sendo 79 de fezes de pombos e 37 do ar atmosférico do mesmo ambiente. Além de *C. neoformans* sorotipo A, isolado em 11 amostras (13,9%), outras espécies foram encontradas como *C. albidus* (12,6%) e *C. laurentii* (8,9%), e uma cepa de *C. neoformans* foi resistente a fluconazol (SOARES et al., 2005). Recentemente, excretas de 59 espécies de aves mantidas em cativeiro foram verificadas para presença de *C. neoformans*. Trinta e oito isolados de *C. neoformans* foram obtidos sendo 33 (87%) identificados como *C. neoformans* var. *grubii* e os cinco restantes (13%) como *C. gattii* (ABEGG et al., 2006). Baroni et. al. (2006), analisaram amostras coletadas de várias igrejas do Rio de Janeiro, incluindo fezes de pombos, amostras do ar e do solo e também de insetos. *C. neoformans* foi isolado em 37,8% das amostras de fezes (83/219) e em 4,93% (15/304) das amostras de ar, todos sorotipo A.

Epidemiologia

A criptococose é importante infecção oportunista que acomete indivíduos saudáveis e imunossuprimidos, principalmente aqueles com Aids (MITCHELL e PERFECT, 1995). *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A tem distribuição mundial e é a principal variedade associada a pacientes aids, mesmo em áreas onde anteriormente prevalecia a variedade *gattii* (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998). Na África Central, 47 isolados de *C. neoformans* (sete entre 1951 e 1969 e 40 após este período) foram analisados. Entre 1951 e 1969, seis dos sete isolados pertenciam à variedade *gattii*, enquanto os 40 isolados obtidos após 1969 foram da variedade *neoformans* (SWINNE et al., 1986). A variedade *neoformans*, sorotipo D tem distribuição mais limitada com prevalência significativa na Europa (DROMER et al., 1996). *C. gattii* (= *C. neoformans* var. *gattii*) sorotipos B e C, por sua vez, tem distribuição limitada a regiões tropicais e subtropicais, comportando-se como patógeno primário, acometendo com frequência, indivíduos imunocompetentes (SORREL, 2001). Em regiões da Austrália, Brasil, Camboja, Havaí, Sul da Califórnia, mais de 35% dos isolados pertenciam a esta espécie (KWON-CHUNG e BENNETT, 1984). Todos foram sorotipados como B, exceto no Sul da Califórnia onde 11 de 35 isolados foram do tipo C. Na Austrália, Ellis verificou que 50% dos casos de criptococose eram causados por *C. gattii* (ELLIS, 1987). Em Papua, na Nova Guiné, esta espécie foi responsável por cinco de seis casos (CURRIE et al., 1990).

Infecção por HIV ainda é o principal fator de risco para criptococose e estima-se que 6-8% dos pacientes com Aids desenvolvem em algum momento, infecção criptocócica (FERNANDES et al., 2000; MARTINEZ et al., 2001; COLOM et al., 2001; TINTELNOT et al., 2004). A incidência de criptococose em pacientes com Aids no mundo varia em torno de 5 a 30% e as maiores incidências ocorrem no sudeste dos Estados Unidos e África Equatorial (MITCHELL e PERFECT, 1995). Destes pacientes, 10 a 25% morrem no início da terapia e 30 a 60% dentro de 12 meses (POWDERLY et al., 1992; KNUDSEN et al., 1997; ROBINSON et al., 1999) e em algumas regiões atinge 100% de mortalidade (MWABA et al., 2001). Louie et al., (2004) avaliaram a prevalência de infecções oportunistas em 100 pacientes HIV positivos hospitalizados na cidade de Ho Cho Minh, no Vietnã e a criptococose teve frequência de 9%. Dromer et al., (2004) revisaram 1644 casos de criptococose associados a pacientes HIV positivos na França, após a introdução da terapia antiretroviral. Foi verificada uma queda de 46% na incidência da criptococose, após a introdução desta terapia (292 casos, 1997-2001), comparado aos anos que a antecederam (1352 casos, 1985-1996). Origem africana, idade, infecção por HIV, demora no diagnóstico e no estabelecimento da síndrome foram alguns dos fatores demográficos associados ao aumento de risco da criptococose no período pós HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*). Na região da Carolina do Norte, Estados Unidos, a incidência de criptococose entre 1981-2000 foi de 19 novos casos/10⁶ indivíduos/ano entre os homens com um pico de incidência de 44,8 em 1992 e entre a população feminina foi de 2,6 novos casos/10⁶ indivíduos/ano com um pico de 5,6 em 1997. Em ambos os grupos, uma nítida influência da epidemia da Aids foi observado na incidência da criptococose e da mesma forma, uma queda acentuada ocorreu após a metade da década de 1990, quando a terapia antiretroviral foi implantada (FRIEDMAN et al., 2005). Na Tailândia foram avaliados 37 pacientes HIV negativos, de 1987 a 2003, que tiveram cultura positiva para *C. neoformans*. Dentre estes, 24 tinham outras condições de imunossupressão associadas, sendo as mais frequentes: tratamento com drogas imunossupressoras (41%), lupus eritematoso (16%), câncer (16%) e diabetes mellitus (14%). Vinte e três pacientes tiveram criptococose disseminada e o índice de mortalidade atingiu 27% (KIERTIBURANAKUL et al., 2006). No Brasil, de 1980 a 2005, 371.827 casos de Aids foram relatados e estima-se que 5 a 10% destes pacientes são acometidos por esta micose (BRASIL, 2005).

Na Espanha, a incidência da criptococose foi de 88,4% em homens contra 11,6% em mulheres, com prevalência de 100% de *C. neoformans* var. *grubii/neoformans* e 45,5% dos isolados foram sorotipados como A, 22,7% como D e 22,7%, como AD (COLOM et al., 2001). Na Colômbia, 370 isolados clínicos foram estudados quanto às variedades e sorotipos. Entre os isolados, 95,2% foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii/neoformans* e 4,8% como *C.*

neoformans var *gattii* (= *C. gattii*), sendo 4,5% sorotipo B e 0,3% sorotipo C (ORDONEZ e CASTAÑEDA, 2001).

Tintelnot et al., (2004), em continuação a pesquisa iniciada pela Confederação Européia de Micologia Médica (ECMM) em 1997, avaliaram 129 isolados clínicos provenientes da Áustria, Alemanha e Suíça. Foi encontrada prevalência de 74,5% (Áustria e Alemanha) e de 52% (Suíça) de *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), por outro lado, *C. neoformans* sorotipo AD e *C. neoformans* var *neoformans* sorotipo D foram encontrados em 26% e 22% dos isolados da Suíça, contra 8 e 17,5% da Alemanha e Áustria.

Um estudo retrospectivo foi feito no Centro de Saúde e Hospital de Vancouver em que vinte e seis casos de criptococose, 15 em pacientes HIV positivos e 11 em HIV negativos foram diagnosticados no período de junho de 1997 a dezembro de 2002. A variedade *grubii* foi isolada de 13 pacientes dos quais 10 eram HIV positivos, enquanto as variedades *gattii* e *neoformans* foram isoladas de três e dois pacientes, respectivamente. *C. laurentii* foi isolado de um paciente e em sete casos, o diagnóstico foi baseado apenas em observações histopatológicas. Ainda no mesmo trabalho, foi verificado que a maioria (10/15) dos pacientes HIV positivos desenvolveu doença sistêmica, enquanto os HIV negativos (8/11) apresentaram criptococose pulmonar (HOANG et al., 2004).

Na Índia, a maior parte dos 45 isolados de 36 pacientes com criptococose pertencia ao sorotipo A (87%), 11% (cinco isolados) ao B e um não foi tipável. Ainda no mesmo trabalho, pela primeira vez, foi reportado o isolamento de dois sorotipos, A e B, de um mesmo paciente aparentemente imunocompetente, isolados simultaneamente de pulmão e de abscesso no couro cabeludo (BANERJEE et al., 2004). Litvintseva et al. (2005) analisaram 176 isolados de *C. gattii* obtidos de pacientes africanos com Aids, dentre os quais, 22 (13,7%) de 161 isolados de Bostswana e 2 (13,3%) de 15 de Malawi foram sorotipo C.

No Brasil, no período de 1992 a 1998, 19 de 78 pacientes com criptococose, internados em hospital universitário, em Belém, Pará, foram crianças menores de 13 anos de idade. Dentre estes, cinco foram a óbito em três meses, apesar do tratamento com anfotericina B (associado com fluconazol ou 5-fluorocitosina). *C. neoformans* var. *gattii* (= *C. gattii*) foi isolado em nove crianças (CORREA et al., 1999). Na Bahia, 104 prontuários de pacientes diagnosticados com meningite criptocócica entre 1972 e 1996 foram avaliados e foi verificado que 1/3 dos casos ocorreram em indivíduos com idade inferior a 15 anos e sem fatores predisponentes aparentes (DARZÉ et al., 2000).

No hospital São José, centro de referência de pacientes com Aids em Fortaleza, no Ceará, 54 amostras de líquido cefalorraquidiano foram avaliadas, no período de 1 de Janeiro a 31 de Dezembro de 2000, dentre estas, cinco foram positivas (9,25%) (MENEZES et al., 2002). Em São

Paulo, 84 isolados de *C. neoformans* obtidos de 61 pacientes com Aids e de 23 sem a síndrome foram avaliados quanto ao sorotipo e *mating type*. Entre os isolados de pacientes aidéticos, 60 pertenciam a var. *grubii* (sorotipo A) e apenas um var. *gattii*. Por outro lado, 15 dos 23 isolados de pacientes sem a síndrome foram classificados como var. *grubii* e os oito restantes como var. *gattii*. Setenta e três de 75 isolados sorotipo A foram MAT α e os outros dois, assim como os isolados da var. *gattii* não foram determinados (OHKUSU et al., 2002).

Nishikawa et al., (2003) realizaram a sorotipagem de 467 isolados (387 clínicos e 80 ambientais) obtidos de várias regiões do Brasil. Foi observada prevalência do sorotipo A (77,95%), seguido pelo sorotipo B (18,2%), AD (1,3%), D (0,4%), C (0,2%) e ainda os não tipáveis (1,93%). As prevalências de tipos da região sul e sudeste reproduziram o quadro observado mundialmente, ao contrário da região nordeste, em que prevaleceu o sorotipo B, ocorrendo igualmente em indivíduos saudáveis, tanto do sexo masculino quanto do feminino. Vidotto et al., 2005 verificaram que entre 151 isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo, 97,35% foram sorotipo A e 2,65% AD.

Tipagem Molecular

A tipagem molecular é potencialmente útil em determinar casos de recidiva ou reinfecção, demonstrando os graus de relação entre os isolados no início e em infecções posteriores de um mesmo paciente. Várias técnicas moleculares têm sido empregadas na caracterização de agentes patogênicos e dentre estas, o PCR-*fingerprinting* e RAPD são freqüentemente usados com sucesso para tipagem de leveduras como *C. neoformans* (MEYER et al., 1999 e 2003; HORTA et al., 2002; CASALI et al., 2003; IGREJA et al., 2004; NGAMWONGSATIT et al., 2005), *Candida* sp (ROBERT et al., 1995, RUHNKE et al., 1999; LEPHART et al., 2004, MARAIS et al., 2004), *Paracoccidioides brasiliensis* (SOARES et al., 1995; MOTTA et al., 2002; HAHN et al., 2003) dentre outros.

A técnica de RAPD consiste basicamente na amplificação de fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando iniciadores aleatórios a uma temperatura baixa de anelamento gerando fragmentos de vários tamanhos que são separados e caracterizados por eletroforese em gel de agarose (WILLIAMS et al., 1990 e 1991).

Em relação à *C. neoformans*, um dos primeiros trabalhos usando RAPD foi realizado por Crampin et al (1993), com 12 isolados, sendo nove provenientes de diferentes países, um de origem ambiental e dois oriundos de laboratórios. O DNA amplificado produziu um padrão de 4 a 12 bandas com tamanho de aproximadamente 100 a 1500 pares de base. A análise dos resultados demonstrou que cada isolado gerou um padrão diferente de *fingerprinting*, que parece não estar relacionado ao sorotipo. Devido a sua simplicidade técnica, o RAPD apresenta facilidade de uso em

larga escala para estudos epidemiológicos, ajudando na identificação de possíveis origens de infecção, na diferenciação entre recidivas e reinfeção e até mesmo para identificar falha no tratamento.

Na região de Nagasaki, isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) foram examinados por RAPD, utilizando três iniciadores randômicos (R28, OPH-02 e OPH-20). Os perfis obtidos revelaram seis padrões entre 21 isolados clínicos e três padrões entre oito isolados ambientais. O padrão I foi o mais comum (18 entre 29 isolados) e foi encontrado em toda a região de Nagasaki. Os padrões I, III e IV foram encontrados tanto entre os isolados clínicos como nos ambientais. Os padrões I e IV tiveram uma distribuição característica e em particular o padrão IV foi isolado quase exclusivamente (cinco entre seis isolados) na cidade de Nagasaki. Dois isolados ambientais revelaram padrões de RAPD idênticos (padrões I e IV) aos dos pacientes, sugerindo que isolados clínicos e ambientais pertenciam ao mesmo *pool* de isolados de *C. neoformans* (YAMAMOTO et al., 1995).

A relação genética de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* foi também estudada por Lo Passo et al. (1997) nas Ilhas Maltesas, através da técnica de RAPD, utilizando quatro iniciadores, (GTG)₅, (GACA)₄, M13 e GCGGACGG. As amostras clínicas, isoladas durante um ano de pacientes com Aids mostraram grande homogeneidade, apresentando padrões de DNA *fingerprinting* idênticos. Os isolados ambientais, ao contrário, mostraram variabilidade genética ampla e nenhuma correlação entre o tipo molecular e o local de isolamento.

Estudo foi realizado com 97 isolados de *C. neoformans*, de origem clínica e ambiental, através da técnica de RAPD com o iniciador M13, com o objetivo de comparar cepas do Brasil e da Austrália e verificar se ocos de árvores poderiam ser também fontes infectantes humanas. Foram observadas semelhanças entre os isolados brasileiros e diferenças acentuadas entre os brasileiros, australianos e cepas-padrões. Os achados sugeriram que ocos de árvores representavam fontes potenciais de infecção humana (TRILLES et al., 1998). Em outro estudo, 27 isolados clínicos e 10 ambientais foram caracterizados e sua diversidade genética foi investigada por RAPD. Vinte e dois iniciadores aleatórios foram testados, dos quais oito confirmaram o polimorfismo, enquanto três agruparam a maioria dos isolados clínicos dentro de um único subgrupo (HORTA et al., 2002).

Meyer et al., (1999 e 2003), em um estudo multicêntrico global, utilizaram a técnica de PCR-*fingerprinting* com o intuito de avaliar a estrutura genética de *C. neoformans* em mais de 400 isolados clínicos e ambientais. Oito grupos principais foram encontrados; VNI e VNII (*C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (var. *neoformans* sorotipo D) e VGI-VGIV (*C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B e C). Mais tarde, Meyer et al., (2003) estenderam o trabalho para outras partes do mundo aplicando além do PCR-*fingerprinting*, a técnica de RFLP

utilizando o gene URA-5. Ambas as técnicas agruparam os isolados nos mesmos oito grupos previamente estabelecidos e o tipo VNI mostrou-se mais prevalente entre os isolados.

No Brasil, 124 isolados (105 clínicos e 19 ambientais) da região sul foram estudados quanto à morfologia, bioquímica, tipos moleculares e sorotipos. A maioria dos isolados clínicos e ambientais pertencia a *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A (89,5 e 52,6%, respectivamente) e foram classificados como *mating type* α (98,1 e 94,7%, respectivamente). A tipagem molecular com os iniciadores minissatélites M13 e microssatélite (GACA)₄ agrupou a maioria dos isolados no grupo VNI, concordando com dados anteriores em que foi estabelecido que a maioria dos isolados de *C. neoformans* pertencia a este grupo (CASALI et al., 2003). Ainda no sul, 38 isolados ambientais foram tipados pelas técnicas de PCR-*fingerprinting* (M13 e (GACA)₄) e cariotipagem eletroforética. Trinta e três dos 38 isolados foram identificados como VNI (*C. neoformans* var. *grubii*) e os cinco restantes como VGI (*C. gattii*) (ABEGG et al., 2006).

Em estudos de genotipagem com a técnica de AFLP, Boekhout et al., (2001) avaliaram 207 isolados de *C. neoformans* de origem clínica, veterinária e ambiental, de vários continentes. Seis *clusters* principais foram identificados, três abrangendo isolados de *C. neoformans* var. *neoformans/grubii* (sorotipo A e D) e os três restantes abrangendo a variedade *gattii* (sorotipo B e C).

No Brasil, Trilles et al., (2003) analisaram padrões por AFLP de isolados clínicos e ambientais obtidos de fragmentos de árvores e verificaram grau alto de relação entre os isolados. A ocorrência do genótipo 6 (= VGII de W. Meyer) entre os isolados clínicos e ambientais tem chamado a atenção por atingir pacientes imunocompetentes e mais recentemente por estar implicado em um surto no Hospital em Vancouver Island, Canadá (TRILLES et al., 2003; BARRETO de OLIVEIRA et al., 2004; HOANG et al., 2004).

Isolados de *C. neoformans* de dois grupos de pacientes aidéticos com criptococose, provenientes do Rio de Janeiro foram analisados por PCR-*fingerprinting* e RAPD. O primeiro grupo com 60 isolados sequenciais de 19 pacientes foi analisado para verificar se a cepa era persistente ou se ocorria reinfecção por uma nova cepa. O segundo grupo, constituído de 11 pacientes, cada um com dois isolados de sangue e líquido céfalo-raquiano e antes ou logo após o início do tratamento, foram analisados para determinar se o paciente foi infectado por diferentes cepas, simultaneamente. Todos os isolados foram tipados por PCR-*fingerprinting*, utilizando iniciadores minissatélites (M13) e microssatélites (GACA)₄ e (GTG)₅ e por RAPD empregando 5SOR e CN1. Exceto em dois casos, todos os isolados obtidos do mesmo paciente apresentaram perfis idênticos independente da data ou do sítio de isolamento, confirmando que infecções persistentes foram causadas mais por relapsos do que por reinfecção (IGREJA et al., 2004).

Drogas antifúngicas e teste de sensibilidade

Antes da descoberta dos antibióticos poliênicos que deu início a uma nova era de sucesso na terapia da criptococose, várias estratégias terapêuticas foram avaliadas, a maioria sem sucesso. Entre estas, podemos citar o uso de antibióticos como penicilina, tetraciclina e estreptomicina; metais pesados; vacinas autógenas e terapia hormonal. A utilização de estrógenos no tratamento da criptococose foi baseada na observação de que tanto em humanos quanto em animais, os machos eram mais suscetíveis a criptococose quando comparados às fêmeas. Estratégias utilizando métodos físicos como radioterapia e uso de extratos de plantas que apresentavam atividade anticriptocócica foram também experimentadas, sem ou quase nenhum sucesso (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Em 1956, uma mulher diabética de 46 anos, com diagnóstico de meningite criptocócica, foi tratada com um novo antibiótico poliênico, a anfotericina B que apresentava atividade fungicida *in vitro*. Foi administrada intravenosamente, 100mg da droga ressuspensa em 500mL de salina contendo 5% de dextrose por 6 horas; durante 12 dias. Seguido de mais cinco semanas de administração em dias alternados. Uma disfunção renal transitória foi observada durante o tratamento, mas no final de sete semanas a paciente estava recuperada e com a cultura do líquido negativa. A introdução da anfotericina B na terapia da criptococose propiciou uma nova perspectiva, aumentando o nível de cura em mais de 50% dos casos (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Anfotericina B tem atividade fungicida de amplo espectro e mesmo apresentando nefrotoxicidade associada em 50% dos pacientes, é o fármaco de escolha nos tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas (WHITE et al., 1998; BARQUIST et al., 1999). A droga liga-se ao ergosterol presente na membrana plasmática do fungo formando um canal pelo qual saem componentes celulares, principalmente íons potássio provocando desequilíbrio do gradiente iônico, conseqüentemente a morte do fungo (WHITE et al., 1998). Mais recentemente, o efeito da droga na morfologia do fungo foi examinado, durante a infecção em murinos e redução da cápsula polissacarídica e diminuição do antígeno polissacarídico no soro foram observadas, sugerindo um mecanismo de ação adicional para esta droga (ZARAGOZA et al., 2005)

A ocorrência de isolados de *C. neoformans* com resistência primária ou secundária a anfotericina B são relativamente raros e relacionados geralmente com alteração na composição do ergosterol que é o principal esterol presente na membrana dos fungos (KELLY et al., 1994; JOSEPH-HORNE et al., 1996; RODRIGUES-TUDELA, 1997). Casadevall et al., (1993) analisaram a sensibilidade de isolados sequenciais de *C. neoformans* a anfotericina B e fluconazol de cinco pacientes com meningite criptocócica recorrente. Não foi verificada diminuição da suscetibilidade em relação ao primeiro isolado de cada paciente, demonstrando que a recorrência

não foi devido à resistência. De forma semelhante, Brandt et al., (1996) analisaram isolados sequenciais de 33 pacientes HIV positivos para verificar se ocorria reinfecção por uma nova cepa ou persistência da mesma com aquisição de resistência. Os isolados foram tipados por MEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), EK (*Electrophoretic Karyotyping*), RAPD e hibridização com CNRE-1, e determinada a concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina. A análise da tipagem demonstrou muito pouca variação nos perfis genotípicos, independente da técnica utilizada e da mesma forma, praticamente não houve variação da CIM. Os autores sugeriram que a persistência da infecção criptocócica foi devida principalmente a falha no regime do tratamento ou do sistema imunológico do paciente e não por reinfecção ou aquisição de resistência à droga. Em Goiânia, 70 isolados clínicos e 40 ambientais foram avaliados quanto à sensibilidade a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Todos os isolados foram sensíveis às quatro drogas mostrando o mesmo padrão de sensibilidade, independente da origem clínica ou ambiental (SOUZA et al., 2005).

A droga 5-fluorocitosina pertence à classe de fármacos análogos da pirimidina, que interfere na síntese de DNA por inibir timidilato sintetase, e na síntese protéica por se incorporar ao RNA. Resistência primária à droga é comum em certas leveduras e bolores como em espécies de *Candida* não *albicans*, *Aspergillus* spp, *C. neoformans* e em fungos dimórficos. Resistência secundária também é comum, limitando seu uso clínico a terapias combinadas (WHITE et al., 1998). Bennet et al., (1979) em estudo multicêntrico, compararam os tratamentos, utilizando-se anfotericina B em monoterapia e com esta associada à 5-fluorocitosina. Quando as duas drogas foram utilizadas em associação, 67% dos pacientes apresentaram cura ou melhora do quadro, contra 41% dos pacientes tratados apenas com anfotericina-B. Além disso, nefrotoxicidade menor foi observada, bem como número menor de recaídas no grupo que recebeu 5-fluorocitosina.

O surgimento de derivados azólicos com biodisponibilidade alta e toxicidade baixa, como fluconazol e itraconazol, abriu perspectivas a novos esquemas terapêuticos, sendo usado para fins profiláticos, manutenção da terapia e em uso combinado a anfotericina B. Os azóis são drogas fungistáticas e agem inibindo uma enzima P-450 da via biossintética do ergosterol, a lanosterol 14 α -demetilase, codificada pelo gene ERG-11, interrompendo ou levando a produção insuficiente do ergosterol e conseqüente formação de membranas defeituosas. Espécies de *Mucor* são intrínsecamente resistentes aos azóis, *Candida krusei* e *Aspergillus fumigatus* apresentam resistência primária somente a fluconazol e cetoconazol, sendo normalmente sensíveis a itraconazol e voriconazol (WHITE et al., 1998). O uso abusivo dos derivados azólicos tem levado segundo alguns pesquisadores, ao aparecimento de isolados multirresistentes (GRAYBILL et al., 1998). Na Espanha, 317 isolados clínicos de *C. neoformans* foram avaliados frente à anfotericina B, fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina, voriconazol e ravuconazol. Apenas 53,4% dos isolados

foram sensíveis a fluconazol sendo comum a ocorrência de resistência cruzada a itraconazol (33,8%). A resistência a anfotericina B foi observada em 5,3% dos isolados e em 0,9% e 3,1% para voriconazol e ravuconazol, respectivamente (PERKINS et al., 2005). Pfaller et al., (2005a) avaliaram a atividade *in vitro* do itraconazol em 1615 isolados de *C. neoformans*. A droga foi ativa em apenas 80% dos isolados.

Brouwer et al., (2004) compararam a atividade fungicida da anfotericina B em monoterapia, combinada a 5-fluorocitosina, a fluconazol e ao uso concomitante dos três. O uso combinado de 5-fluorocitosina mostrou melhor eficiência na eliminação do fungo. Larsen et al., (2004) verificaram melhor atividade quando anfotericina B foi administrada em combinação a fluconazol. Na Argentina, um estudo avaliou a atividade antifúngica *in vitro* da anfotericina B, fluconazol e rifampicina sozinhas e combinadas. Resistência a anfotericina B foi comprovada, bem como sinergismo entre anfotericina B + 5-fluorocitosina e entre anfotericina B + rifampicina. Associação de fluconazol com 5-fluorocitosina não apresentou qualquer atividade inibitória nos isolados em estudo (RODERO et al., 2000). Ao contrário, Abdel-Salam, (2005) obteve sinergismo e atividade maior com esta combinação de drogas (fluconazol + 5-fluorocitosina) comparada a fluconazol + anfotericina B.

Mais recentemente, novos esquemas terapêuticos foram utilizados no tratamento da criptococose. Preparações de anfotericina B em forma lipossomal têm mostrado boa resposta, com negativização do líquido mais rápida e com nefrotoxicidade menor (KOTWANI et al., 2001; CHEN et al., 2002, KHAN et al., 2005). Da mesma forma, os novos azóis, posaconazol e voriconazol também mostraram ser mais ativos e com espectro de ação maior do que fluconazol e itraconazol (PFALLER, 2001; VAN-DUIN, 2004; PFALLER et al., 2004). Atividade *in vitro* de posaconazol, voriconazol e fluconazol foram avaliados em 237 isolados de *C. neoformans* coletados entre 2001 e 2002. Os dois primeiros mostraram mais eficiência do que fluconazol, apresentando CIM $\leq$ a 1µg/mL em 98-100% dos isolados de *C. neoformans* (PFALLER et al., 2004). Barchiesi et al., (2001) verificaram que a conjugação de posaconazol e 5-fluorocitosina em 15 isolados de *C. neoformans* foi significativamente mais ativa comparada ao seu uso isoladamente, e não foi observado nenhum antagonismo entre estas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Recentemente, voriconazol, posaconazol e ravuconazol foram testados em 1811 isolados clínicos de *C. neoformans*, coletados entre 1990 a 2004. Em 99% dos isolados a concentração inibitória mínima foi igual ou menor a 1µg/mL (PFALLER et al., 2005b).

Fatores de virulência

Vários fatores de virulência têm sido identificados como importantes para a patogenia de *C. neoformans*, dentre estes, podemos citar a capacidade de crescimento a 37°C, produção de

melanina, cápsula polissacarídica, *mating type*, enzimas e moléculas de sinalização celular (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CLANCY et al., 2006).

Cápsula polissacarídica

C. neoformans possui uma cápsula polissacarídica que tem como componente principal a glucuroxilomanana (BHATTACHARJEE et al., 1984). A cápsula parece exercer papel importante na proteção da levedura contra a dessecação e ingestão por amebas do solo (NIELSON et al., 1978; STEENBERGEN et al., 2001; CASADEVALL et al., 2003). A observação de que cepas capsuladas foram capazes de sobreviver à fagocitose e de se replicar em *Acanthamoeba castellanii*, ao contrário de sua mutante, levaram os autores a sugerirem que a virulência de *C. neoformans* foi resultante de adaptações contra predadores do meio ambiente, presentes no solo e em vegetações (STEENBERGEN et al., 2001; CASADEVALL et al., 2003).

Cepas acapsuladas, obtidas naturalmente ou por mutagênese, foram menos virulentas quando comparadas as capsuladas (KOZEL et al., 1971; FROMTLING et al., 1982; JACOBSON et al., 1982; KWON-CHUNG et al., 1986; CHANG e KWON-CHUNG, 1994). Chang e Kwon-Chung, (1994) em estudos de clonagem, identificaram um gene (CAP 59) envolvido na formação da cápsula e verificaram que sua deleção levava a formação de um fenótipo acapsulado e também avirulento quando testados em camundongos. A importância da cápsula foi comprovada, após a reintrodução do gene que veio acompanhado pelo restabelecimento da condição de virulência. Dando continuidade ao trabalho, outros genes (CAP 64, CAP 60 e CAP 10) foram identificados e clonados mostrando-se igualmente importantes (CHANG et al., 1996; CHANG e KWON-CHUNG, 1998; CHANG e KWON-CHUNG, 1999).

Melanina e fenoloxidase (lacase)

A melanina é um conjunto de substâncias com propriedades similares (BUTLER et al., 2001). O interesse pela produção de melanina em células fúngicas vem de longa data e vários modelos de microorganismos foram usados para seu estudo, incluindo *Neurospora crassa* (FLING et al., 1963; LERCH, 1978), *Podospora anserina* (ESSER, 1963), *Aspergillus nidulans* (PIRT e ROWLEY, 1969; BULL e CARTER, 1973), *Aspergillus oryzae* (ICHISHIMA et al., 1984) e também em fungos patogênicos como *C. neoformans* (STAIB, 1962).

A lacase catalisa a reação de oxidação da L-DOPA, formando um composto intermediário altamente reativo, a dopaquinona. Esta, na ausência de grupos tióis, forma o leucodopacromo, que é então oxidado a dopacromo. Na etapa seguinte, ocorrem hidroxilação e decarboxilação formando a melanina (OZEKI et al., 1997a; OZEKI et al., 1997b; WILLIAMSON et al., 1998). Desde os trabalhos pioneiros de Staib (1962), vários outros foram desenvolvidos com o objetivo de esclarecer

a biossíntese da melanina e sua relação com a patogenicidade de *C. neoformans*. Kwon-Chung et al., (1982), utilizando cepas mutantes não produtoras de melanina, verificaram que estas foram menos virulentas em infecção experimental (KWON-CHUNG et al., 1982; WANG e CASADEVALL, 1994; WANG et al., 1995). Wang et al., (1995) demonstraram que pequenas quantidades de melanina foram suficientes para proteger as células de *C. neoformans* de espécies reativas de nitrogênio, bem como de espécies reativas de oxigênio. Outras pesquisas verificaram um papel importante da melanina na proteção contra lise enzimática e microbiana (BLOOMFIELD e ALEXANDER, 1967; ROSAS e CASADEVALL, 2001), na proteção da célula fúngica contra a ação deletéria de radicais livres (HILL, 1992) e de agentes oxidantes como hipocloritos e peróxidos de oxigênio (JACOBSON e TINNELL, 1993, WANG et al., 1995) e na diminuição da suscetibilidade a anfotericina B e caspofungina (VAN DUIN et al., 2002). Outra função proposta é a mudança de carga na superfície celular, levando a interferência na fagocitose (WANG et al., 1995). Huffnagle et al., (1995) verificaram que cepas que produziam grandes quantidades de melanina inibiam a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α), que é uma das principais moléculas sinalizadoras na resposta inflamatória mediada por células T, envolvida no recrutamento e ativação de neutrófilos. Mais recentemente, uma cepa produtora de melanina e sua mutante foram comparadas e diferenças significativas foram encontradas quanto à capacidade de disseminação a partir dos alvéolos pulmonares para outros tecidos, demonstrando a importância da melanina tanto no início da infecção quanto na sua disseminação para outros tecidos (NOVERR et al., 2004).

Mating type

C. neoformans é um fungo heterotálico possuindo dois *mating types* (α e a). Cepas de *C. neoformans* sorotipo D que diferiam apenas em seu *mating type* foram comparadas e verificou-se que tanto as cepas parentais quanto as progênes *mating type* α eram mais virulentas do que as *mating type* a (KWON-CHUNG et al., 1992).

Dados de sequenciamento de cepas congênicas de *C. neoformans* sorotipo D revelaram que o comprimento do locus MAT α é superior a 100Kb enquanto de MATa é em torno de 120Kb. Ambos codificam mais de 20 genes, incluindo vários que são sabidamente essenciais em *Saccharomyces cerevisiae* (KAROS et al., 2000; LENGELER et al., 2002; McCLELLAND et al., 2004). Nesta levedura, o gene STE12 (ativador de transcrição) é um membro da cascata de transdução de sinal da MAP quinase (*Mitose Activate Protein*) envolvido nos cruzamentos, desenvolvimento de pseudo-hifa e frutificação haplóide (ROBERTS e FINK, 1994; HERSKOWITZ, 1995). Em *C. neoformans*, cepas mutantes com ausência do fator transcricional STE 12 α permaneceram férteis, mas foram menos virulentas do que as não mutadas (CHANG et al., 2000; McCLELLAND et al., 2004). Chang et al., (2003) verificaram que cepas MATa mutantes com deleção do gene CPRa, que

codifica para receptor de feromônio, produziam cápsulas menores em cérebros de camundongos e apresentavam-se com virulência significativamente reduzida. Nielsen e colaboradores (2005) compararam a virulência de cepas congênicas de *C. neoformans* var. *grubii* α e α . Nenhuma diferença foi observada na taxa de sobrevivência quando cultivadas com ameba, nematódeos e macrófagos, assim como não houve diferença da virulência em camundongos infectados com as cepas isoladamente. Entretanto, durante uma coinfeção, as cepas α mostraram maior predileção pelo sistema nervoso central.

Enzimas

Diversas enzimas podem estar associadas à virulência de *C. neoformans*. Fosfolipases têm sido consideradas importantes fatores de virulência, em diversas espécies de fungos (GHANNOUM, 2000). Em *C. neoformans*, a fosfolipase parece exercer papel importante no escape da resposta imune do hospedeiro, na destruição de tecido pulmonar e na proteção do fungo contra ação de macrófagos (COX et al., 2001; NOVERR et al., 2003). Estudos têm verificado que esta proteção pode estar associada à produção de eicosanóides pelo fungo, modulando negativamente a função dos macrófagos (NOVERR et al., 2003).

Urease é uma metaloenzima que cataliza a hidrólise de uréia a amônia e carbamato. A importância da urease como fator de virulência foi demonstrado em outros microorganismos como *Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis* (COX et al., 2000). Estes mesmos autores compararam cepas de *C. neoformans* urease positiva e sua mutante e observaram diferenças significativas na sobrevivência dos animais e nas contagens da levedura. Os camundongos murinos infectados intratraquealmente com cepas mutantes (urease negativa) tinham uma sobrevivência maior e uma contagem menor de colônias em amostras do cérebro. Além disso, nos exames histológicos do pulmão foi verificada uma resposta inflamatória mais intensa, naqueles animais infectados com cepas urease positiva sugerindo que a urease desempenha um papel importante na virulência de *C. neoformans*. Mais recentemente, foi demonstrado em infecção experimental que a urease exerce um papel importante na disseminação sistêmica de *C. neoformans*, contribuindo para invasão do sistema nervoso central por aumentar o seqüestro da levedura para o interior de microcapilares (OLSZEWSKI et al., 2004).

Proteases são importantes fatores de virulência para diferentes patógenos. Em *C. neoformans*, as proteases podem contribuir para a virulência, destruindo proteínas da membrana celular do hospedeiro e inativando proteínas do sistema complemento, auxiliando na penetração tecidual e no escape dos mecanismos de defesa (CHEN et al., 1996; RUMA-HAYNES et al., 2000). Degradação da fibronectina foi observada por uma serinoprotease de *C. neoformans*, bem como, hidrólise de laminina e de colágeno tipo IV por uma protease de massa molecular igual a

75kDa, indicando que este fungo produz enzimas extracelulares que podem ajudar na invasão do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2003).

Espécies reativas de oxigênio tais como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio e radical hidroxil ($OH^\cdot$) são tóxicas para a célula e resultantes de metabolismo oxidativo e de *burst* oxidativo durante processo infeccioso. As principais enzimas envolvidas na detoxificação da célula são a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (NARASIPURA et al., 2005). As superóxido dismutases (SOD) são metalo-enzimas que convertem radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Em *C. neoformans*, a superóxido-dismutase citosólica (Cu/Zn dependente - SOD1) tem sido estudada e cepas mutantes que tiveram o gene SOD1 deletado apresentaram virulência diminuída *in vivo*, maior suscetibilidade a neutrófilos *in vitro* e alteração da expressão de outros fatores de virulência como lacase, urease e fosfolipase (COX et al., 2003; NARASIPURA et al., 2003). Recentemente, a superóxido-dismutase mitocondrial (Mn dependente – SOD2) foi também caracterizada e assim como SOD1, cepas mutantes apresentaram virulência diminuída *in vivo*, mas não apresentaram alterações na suscetibilidade a neutrófilos, sugerindo que SOD1 e SOD2 apresentam papéis diferentes na biologia e virulência de *C. neoformans* (NARASIPURA et al., 2005). Missall e colaboradores (2005) identificaram e estudaram duas enzimas glutathione peroxidases (Gpx1 e Gpx2); cepas mutantes para um ou ambos os genes foram sensíveis a estresse peroxidativo e a macrófagos *in vitro*, mas não apresentaram diferenças de virulência em infecção experimental (MISSALL et al., 2005).

A calcineurina é uma fosfatase específica para serina e treonina, constituída de duas subunidades (A, catalítico e B, regulatório) e ativadas por Ca^{+2} /calmodulina. A atividade desta enzima parece ser crítica para o crescimento de *C. neoformans* a 37°C, filamentação durante o cruzamento ou frutificação haplóide e virulência em modelos animais (ODOM et al., 1997; CRUZ et al., 2000; FOX et al., 2001; CRUZ et al., 2001; FOX et al., 2003; KRAUS e HEITMAN, 2003; KRAUS et al., 2005). Cepas mutantes para subunidades A e B têm sido geradas e utilizadas em infecção experimental, mostrando-se avirulentas e sugerindo papel importante da calcineurina na patogenicidade de *C. neoformans* (ODOM et al., 1997; CRUZ et al., 2000; FOX et al., 2001).

Recentemente, Rittershaus et al., 2006 observaram que glicosíngolípide glucosilceramida de *C. neoformans* é um fator de virulência chave na criptococose com importantes implicações para o desenvolvimento de drogas.

Patologia da criptococose

A criptococose é uma infecção fúngica causada pela levedura capsulada *C. neoformans* (LACAZ et al., 2002). A porta de entrada no organismo é predominantemente pela via aérea superior, em que o fungo pode disseminar-se, dependendo do estado de defesa imunológica do

hospedeiro. Normalmente, as formas extrapulmonares da criptococose ocorrem em indivíduos imunossuprimidos por diversas condições, dentre as quais: Aids, colagenoses (uso de corticosteróides e outros agentes imunossupressores), diabéticos, portadores de neoplasias malignas e transplantados (em uso de imunossupressores). As localizações mais freqüentes são rins, ossos, sistema nervoso central e pele, sendo esta última acometida em 6 a 16% dos casos. Existem, contudo, relatos de casos de criptococose extrapulmonar em pacientes aparentemente imunocompetentes e o agente etiológico mais freqüentemente encontrado nestes casos é *C. gattii*, tido como fungo patógeno primário (CASADEVAl e PERFECT, 1998).

RDA (*Representational Difference Analysis*)

A interação fungo-hospedeiro durante a infecção criptocócica é extremamente complexa e estudos moleculares associados a modelos de infecção *in vivo* são essenciais para identificar prováveis genes responsáveis pela manutenção e proliferação do agente no hospedeiro. Este dado ainda não foi explorado suficientemente na literatura, embora já se conheça o genoma deste fungo (LOFTUS et al., 2005).

Nos últimos anos, algumas técnicas têm sido desenvolvidas com o propósito de avaliar a expressão diferencial de genes em um organismo ou célula e identificá-los (LIANG et al., 1994; WADA et al., 1997). Estas técnicas são ferramentas poderosas, que permitem detectar mudanças na expressão dos RNAs mensageiros (RNAm) sem qualquer conhecimento prévio dos genes em questão (PASTORIAN et al., 2000). Os métodos mais comumente usados para detectar genes diferencialmente expressos, são: RDA (HUBANK e SCHATZ, 1994), DD (*Differential Display*) (LIANG e PARDEE, 1992) e SH (*Subtractive Hybridization*) (DIATCHENKO et al., 1996). Basicamente, todos estes métodos foram desenvolvidos para amplificar e isolar seqüências de ácido nucléico, presentes em uma amostra e ausentes (ou expressos em menor extensão) em outra.

O RDA em sua forma original foi designado para identificar diferenças entre populações de DNA genômico (LISITSYN et al., 1995). Esta metodologia foi subsequenteiramente modificada para permitir a análise de populações de RNAm, sendo uma técnica poderosa e sensível para identificação de genes expressos diferencialmente (HUBANK e SCHATZ 1999), permitindo o isolamento de seqüências mais e menos expressas em duas diferentes populações de cDNAs (PASTORIAN et al., 2000). Mais recentemente, populações de cDNAs foram caracterizadas pela técnica de RDA para identificar possíveis genes envolvidos no processo de infecção de *Metarhizium anisopliae* em carrapatos *Boophilus microplus* (DUTRA et al., 2004).

A meningite criptocócica ainda é problemática em pacientes imunossuprimidos e estudando-se o seu agente etiológico e a porta de entrada do fungo poder-se-á compreender melhor os mecanismos de interação iniciais entre ele e o hospedeiro.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

- Caracterização de isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro por métodos fenotípicos e moleculares.
- Identificação de genes de *C. neoformans* com expressão diferencial em condição de infecção pulmonar em modelo animal.

2.2. Específicos

- Determinar as variedades por PCR, utilizando seqüências iniciadoras específicas.
- Determinar os tipos sexuais (*mating type* α e *a*) por PCR.
- Determinar os perfis genotípicos de *C. neoformans*, por PCR-*fingerprinting* com o iniciador microssatélite (GACA)₄.
- Determinar os perfis genotípicos de *C. neoformans*, por RAPD com a seqüência iniciadora 6 e compará-los com os perfis obtidos com (GACA)₄.
- Determinar os perfis genotípicos de *C. neoformans* por PCR-RFLP do gene da fosfolipase B (PLB1) utilizando a enzima de restrição *Ava I*.
- Determinar os perfis de sensibilidade aos antifúngicos: fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B.
- Caracterizar transcritos diferencialmente expressos durante a infecção de *C. neoformans*, através da metodologia de RDA, após a recuperação da cepa de tecido pulmonar de camundongo.

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção dos isolados.

Os 106 isolados de *C. neoformans* foram previamente identificados e estavam estocados nas micotecas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, capital e da rede particular de laboratórios (Laboratório Diagnóstico da América), Rio de Janeiro. Quarenta e sete isolados do Estado de São Paulo e 59 do Rio de Janeiro foram selecionados e estes, foram reidentificados no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara e mantidos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol a -20°C .

3.2. Identificação de *C. neoformans*.

3.2.1. Exame direto.

As colônias isoladas foram observadas em preparações microscópicas com tinta da China para observação de cápsula.

3.2.2. Identificação genérica e específica.

Os isolados foram identificados em gênero através dos seguintes critérios, segundo Kurtzman e Fell (1998) e Kwon-Chung et al. (1992).

1. Prova de urease: uma alçada microbiológica do cultivo da levedura de 48 a 72 horas de crescimento foi semeada em ágar uréia de Christensen e incubada a 37°C para observar produção de urease, evidenciado pela mudança de cor do meio (rosa).
2. Presença de enzima fenoloxidase: realizada em ágar Niger a partir da cultura obtida em ágar Sabouraud, com 24 a 48 horas de crescimento. As culturas foram incubadas a 25°C e observadas diariamente até o 10° para verificar a produção de pigmentos de coloração marrom.
3. Assimilação de inositol: realizada através de prova de assimilação de fontes de carbono a partir de cultivos prévios em placas de ágar Sabouraud de 24 a 48 horas de crescimento.

A determinação das espécies foi executada com base em provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (KURTZMAN e FELL et al., 1998), a partir de cultivos prévios em placas de ágar Sabouraud de 24 a 48 horas de crescimento. Os açúcares glicose, galactose, lactose, melibiose, sacarose, maltose e celobiose foram utilizados como fontes de carbono e nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.

Os inóculos foram preparados a partir de suspensões de 10^8 células/mL (escala 1 de McFarland), os quais foram adicionados aos meios (C e N, fundidos previamente e separadamente) na proporção de 1/20. Após a solidificação, as fontes de carbono e nitrogênio foram distribuídas

equidistantemente nas placas contendo os meios C e N, respectivamente, incubada a 25°C e lidas após 48 a 72 horas.

A diferenciação das espécies *gattii* e *neoformans* foi realizada pelo crescimento seletivo em meio glicina, canavanina e azul de bromotimol (CGB) e por assimilação de D-prolina, segundo Kwon-Chung et al. (1982). Leveduras com 24 a 48 horas de crescimento em ágar Sabouraud foram semeadas em tubos contendo ágar CGB e incubadas a 25°C. O cultivo foi observado diariamente até o quinto dia para a verificação de crescimento e alteração da cor.

A assimilação de D-prolina foi realizada através da prova de assimilação de fontes de nitrogênio em meio N (KWON-CHUNG et al., 1982).

3.3. Metodologia de extração do DNA genômico de *C. neoformans*.

As culturas para extração de DNA foram realizadas a partir de uma colônia semeada em ágar Sabouraud acrescido de 0,25g/L de cloranfenicol a 30°C durante 48 horas e em seguida em caldo YEPD acrescido de 2,9% de NaCl (10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona, 20g/L de dextrose e 29g/L de NaCl) a 30°C por 16 horas ou *overnight* sob agitação constante.

As culturas foram transferidas para tubos de 50mL (tipo falcon) e centrifugadas a 1620 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas, duas vezes, com 2mL de EDTA 0,05M. As leveduras foram transferidas numa quantidade de 300µL para Erlenmeyer contendo 4mL de tampão CES (citrate de sódio 20mM, pH 5,6; EDTA 50 mM, pH 8,0 e sorbitol 0,9M) e 200mg de Novozyme 234 (concentração final de 50mg/mL). A suspensão de células foi incubada a 37°C durante 3 horas, sob agitação constante, transferida para tubo de 15mL e submetida a leve centrifugação (45 x g/5 segundos, 180 x g/5 segundos, 400 x g/5 segundos, 180 x g/5 segundos e 45 x g/5 segundos) para separação de restos celulares. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 1620 x g por 10 minutos. Os protoplastos foram lavados duas vezes com 2mL de tampão CES, centrifugados a 1620 x g por 10 minutos e transferidos para *ependorf* para seguir-se o protocolo de extração de DNA, segundo DEL SAL et al., (1989). A lise dos protoplastos foi realizada pela adição de 500µL de tampão de lise (Tris-base 100mM, EDTA 10mM pH 8,0, SDS 1%) e proteinase K numa concentração final de aproximadamente 100 µg/mL. Esta suspensão foi agitada gentilmente e incubada a 56°C por 1 hora para inativação de DNases. Após, foram adicionados 200µL de NaCl 5M com incubação a 65°C por 10 minutos e uma nova incubação de 20 minutos foi realizada após a adição de 100µL de uma solução de CTAB a 10% (brometo de cetiltrimetilamônio). Em seguida, foi adicionado 5µL de uma solução estoque de RNase A a 20mg/mL e incubada por 1 hora a 37°C, para remoção de RNA. A extração de DNA foi realizada pela adição, volume a volume, de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) seguida de centrifugação a 15400 x g, a 4°C durante 10 minutos. A fase superior foi

transferida para outro Eppendorf e extrações adicionais foram feitas quando quantidades grandes de proteínas foram visíveis na interface. Isopropanol foi adicionado volume a volume à suspensão para precipitar o DNA e incubada a -20°C por 30 minutos. O precipitado foi centrifugado a $15400 \times g$ por 10 minutos a 4°C e em seguida, lavado com etanol 70% e centrifugado a $15400 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo DNA foi invertido em um papel de filtro para secagem e após, adicionados 30 a $50\mu\text{L}$ de TE (Tris-base 40mM, EDTA 2mM pH8,0) para ressuspender e solubilizar o mesmo. A nova solução foi incubada a 37°C por uma hora, quantificado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm. (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e estocado a -20°C . A pureza foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm e 280nm e analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (Tris-base 90mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) durante 1 hora e 30 minutos a 80 volts. O gel foi corado pelo brometo de etídio e observado em luz ultravioleta.

3.4. Reação de PCR para determinação das variedades.

A reação de PCR para determinação das variedades foi realizada utilizando-se as seguintes seqüências iniciadoras (D' SOUZA et al, 2004).

Sorotipo A ou AD: JOHE-7777 5'TTCAACCACGAATATGTA3' e JOHE-7779 5'AAGCCTCTCATCCATATCTT3'.

Sorotipos A ou AD ou D: JOHE-7830 5'TTTCTGCTTTTCACCCATT3' e JOHE-7833 5'TGAACAAATACATCATGC3'

Sorotipos B ou C: JOHE-7773 5'GATCCTCACGCCATTACG3' e JOHE-7775 5'GAATGATGCGCTTAGTTGGA3'.

Foram utilizadas concentrações de 25pmol de cada seqüência iniciadora e 25ng de DNA genômico num tubo contendo uma mistura de deoxinucleotídeos (0.22mM de cada dNTP), tampão (1,65mM MgCl_2 , 55mM KCl, Tris-HCl 22mM pH 8,4) e DNA polimerase termoestável fornecidos pelo Kit PCR Supermix (Invitrogen-life technologies). O volume final na reação de amplificação foi de $25\mu\text{L}$ sendo utilizada água Milli-Q estéril.

A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de $94^{\circ}\text{C}/5$ minutos, seguido de 30 ciclos de $94^{\circ}\text{C}/30$ segundos, $52^{\circ}\text{C}/30$ segundos, $72^{\circ}\text{C}/1,5$ minutos e um ciclo final a $72^{\circ}\text{C}/7$ minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1x, durante 2 horas a 100 volts, corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

3.5. Reação de PCR utilizando os iniciadores para *mating type* α e *a*.

Foram utilizadas as seqüências iniciadoras para *mating type* α : 5'CTTCACTGCCATCTTCACCA3' e 5'GACACAAAGGGTCATGCCA3', e para *mating type* *a*, a seqüência 5'CGCCTTCACTGCTACCTTCT3' e 5'AACGCAAGAGTAAGTCGGGC3' (CHATURVEDI et al., 2000). Foram utilizadas concentrações de 25pmol de cada seqüência iniciadora e 25ng de DNA genômico num tubo contendo uma mistura de deoxinucleotídeos (0,22mM de cada dNTP), tampão (1,65mM MgCl₂, 55mM KCl, Tris-HCl 22mM pH 8,4) e DNA polimerase termoestável fornecidos pelo Kit PCR Supermix (Invitrogen-life technologies). A quantidade final na reação de amplificação foi de 25µL sendo utilizada água Milli-Q estéril.

A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 95°C/3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C/1 minuto, 57,5°C/1 minuto, 72°C/1 minuto e um ciclo final a 72°C/7 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado em gel de agarose 2%, em tampão TBE 1x, durante 2 horas a 100 volts, corado com brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

3.6. Reação de PCR-*fingerprinting* utilizando a região microsatélite (GACA)₄.

A reação foi realizada com concentrações de 25pmol de seqüência iniciadora [(GACA)₄ = 5'GACAGACAGACAGACA3' (MEYER et al., 1999)] e 25ng de DNA genômico num tubo contendo uma mistura liofilizada de deoxinucleotídeos (0,4mM de cada dNTP); tampão (3mM MgCl₂, 30mM KCl, Tris 10mM pH 8,3) e DNA polimerase termoestável, fornecidos pelo Kit Ready to Go (Pharmacia). O volume final na reação de amplificação foi de 25µL sendo utilizada água Milli-Q estéril. A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 94°C/5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/20 segundos, 50°C/1 minuto, 72°C/20 segundos, e um ciclo final a 72°C/6 minutos (MEYER et al., 1999), utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x durante 2 horas e 30 minutos a 150 volts. Os produtos de amplificação foram então corados com brometo de etídio e observados à luz ultra-violeta.

3.7. Reação de RAPD utilizando a seqüência iniciadora 6.

A escolha do iniciador 6 para este trabalho foi baseada em estudos anteriores realizados em nosso laboratório por Rezende (2002) e Vivaldini (2003). Nestes, seis seqüências iniciadoras randômicas (1, 2, 3, 4, 5 e 6), fornecidas pelo Kit Ready-to-Go (Pharmacia), foram avaliadas buscando selecionar uma que apresentasse perfil de bandas claras e definidas, e maior poder discriminatório entre os isolados. A partir da análise dos perfis genéticos obtidos com as seqüências

iniciadoras, a 6 de sequência 5'CCCGTCAGCA3' foi a que gerou maior polimorfismo e por isso foi a escolhida (Anexo 1).

A reação foi realizada com concentrações de 25pmol de sequência iniciadora 6 e 25ng de DNA genômico num microtubo contendo uma mistura liofilizada de deoxinucleotídeos (0,4mM de cada dNTP); tampão (3mM MgCl₂, 30mM KCl, Tris 10mM pH 8,3) e DNA polimerase termoestável, fornecidos pelo Kit Ready to Go (Pharmacia). O volume final na reação de amplificação foi de 25μL sendo utilizada água Milli-Q estéril.

A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 95°C/5 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C/1 minuto, 36°C/1 minuto, 72°C/2 minutos, e 1 ciclo final a 72°C/10 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x durante 2 horas e 30 minutos a 150 volts. Os amplicons no gel foram então corados com brometo de etídio e observados à luz ultravioleta.

3.8. Análise de polimorfismo do RAPD e PCR-*fingerprinting*.

As imagens dos géis foram capturadas pelo aparelho ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech). Os dados obtidos por PCR-*fingerprinting* e RAPD foram analisados pelo programa GelCompar II, versão 2.0, utilizando coeficiente de similaridade Dice. As matrizes geradas foram analisadas pelo coeficiente de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Averages) originando um dendrograma.

3.9. Reação de PCR-RFLP do gene da fosfolipase B (PLB1).

Foram utilizados os iniciadores para o gene PLB1: IDPLB1 (5'TGAGCTTCAGGCGGAGAGAGGTTTGG3') e IDPLB1R (5'AGGCTGGGTGGTGTGTCGTCACC3') (LATOUCHE et al., 2003).

Foram utilizadas concentrações de 50 pmol de cada sequência iniciadora e 25ng de DNA genômico num tubo contendo uma mistura de deoxinucleotídeos (0.22mM de cada dNTP), tampão (1,65mM MgCl₂, 55mM KCl, Tris-HCl 22mM pH 8,4) e DNA polimerase termoestável fornecidos pelo Kit PCR Supermix (Invitrogen-life technologies). A quantidade final na reação de amplificação foi de 50μL sendo utilizada água Milli-Q estéril.

A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 94°C/3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/45 segundos, 62°C/45 segundos, 72°C/1 minuto e um ciclo final a 72°C/7 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*.

O produto amplificado foi digerido com enzima de restrição *Ava I* por 3 horas ou *overnight* e os produtos, separados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1x durante 5 horas e 30 minutos a 100 volts, corados com brometo de etídio e observados à luz ultravioleta.

3.10. Cepas de referência.

Foram utilizadas neste trabalho, as seguintes cepas de referência: WM148 (VNI - sorotipo A), WM626 (VNII - sorotipo A), WM628 (VNIII - sorotipo AD), WM629 (VNIV - sorotipo D), WM179 (VGI - sorotipo B), WM178 (VGII - sorotipo B), WM161 (VGIII - sorotipo B), WM779 (VGIV - sorotipo C) (MEYER et al., 2003) e ATCC 28957 (sorotipo D, MAT α) e ATCC 28958 (sorotipo D, MATa).

3.11. Testes de sensibilidade.

Os perfis de sensibilidade dos isolados foram estudados frente à anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol, segundo o documento M27-A2 (2002) do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) com modificações. Foi utilizado o meio RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol), tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] pH 7,0 acrescido de 2% de glicose e incubação a 35°C, sob agitação constante, durante 72 horas, utilizando placas estéreis com 96 poços de fundo plano. A leitura para determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi realizada através de espectrofotometria em 490nm. A interpretação dos resultados foi baseada em 50% de inibição do crescimento, comparada com o controle positivo, para os azóis e 5-fluorocitosina e 90% de inibição para anfotericina B. Foi utilizada como controle dos testes uma cepa padrão ATCC 90012 de *Cryptococcus neoformans*, gentilmente cedida pelo Dr. Juan Luis Rodriguez Tudela, da Unidade de Micologia – Centro Nacional de Microbiologia – Instituto de Salud Carlos III – Madrid – Espanha.

As drogas antifúngicas foram obtidas diretamente dos fabricantes na forma de pó e calculadas, quanto às suas potências seguindo recomendações do documento. Anfotericina-B e itraconazol foram dissolvidas, cada uma, em dimetilsulfóxido para obtenção de uma solução estoque a 3200 μ g/mL. As soluções-estoques de fluconazol e 5-fluorocitosina foram preparadas, cada uma, em água destilada estéril e ajustadas para 10240 μ g/mL. A partir destas concentrações foram preparadas 10 soluções intermediárias seguindo o esquema de diluição do anexo 2. As concentrações intermediárias variaram de 3200 a 6,25 μ g/mL (diluição 1/2) para anfotericina B e itraconazol e de 1280 a 2,5 μ g/mL (diluição 1/2) para fluconazol e 5-fluorocitosina.

O meio líquido utilizado para a diluição das drogas e para ajuste do inóculo foi o RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) na concentração de

10,4g/L acrescido de 2% de glicose e tampão MOPS 0,165M, pH 7,0, esterilizado através de filtração e conservado em refrigerador a 4°C.

As soluções intermediárias das drogas foram diluídas 1:100 para anfotericina B e itraconazol e 1:10 para fluconazol e 5-fluorocitosina para se obter uma solução de trabalho de 32 a 0,0625µg/mL para anfotericina-B e itraconazol e de 128 a 0,25µg/mL para as drogas 5-fluorocitosina e fluconazol que foram dispensadas (volume de 100µL) nos poços da coluna 2 a 11. A fileira 2 contendo a maior e a 11 a menor concentração da droga, respectivamente. As placas foram estocadas a -70°C ou quando utilizadas no dia seguinte, permaneceram entre 4 a 6°C.

Foram utilizadas culturas recentes de 48 horas de crescimento em meio de ágar Sabouraud a 30°C. Colônias isoladas foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,85% e homogeneizadas em aparelho Vortex por 15 segundos. A concentração dos inóculos foi ajustada até se obter uma transmitância equivalente a escala 0,5 de McFarland, correspondente a uma concentração na ordem de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, os inóculos foram diluídos (1/100) em meio RPMI 1640, para obtenção de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL. Esta última foi dispensada nos poços de 02 a 11 (volume de 100 µL) começando da fileira 2 que continha 100µL da maior concentração de droga até a 11 com a menor concentração. Este passo diluiu o inóculo ($0,5 \times 10^4$ UFC/mL) e a concentração das drogas à metade (16 a 0,0313µg/mL para anfotericina-B e itraconazol e de 64 a 0,125µg/mL para as drogas 5-fluorocitosina e fluconazol). O controle de crescimento consistiu de 100µL de meio livre de droga (C+), e 100 µL da suspensão de levedura (poço 12). O poço da fileira 01 não continha suspensão de levedura, apenas meio livre de droga (200µL), funcionando como controle de esterilidade ou branco para leitura espectrofotométrica (C-).

As placas foram incubadas a 35°C, sob agitação constante, e a leitura foi realizada após 72 horas, através de leitor automatizado para placas de microdiluição a 490nm.

A determinação dos valores da CIM para anfotericina B foi feita pela inibição de 90% do crescimento, quando comparada ao controle positivo (meio livre de droga + suspensão de levedura) e inibição de 50% para 5-fluorocitosina e os azóis.

De acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI, para fluconazol, cepas com valores de $CIM_{50} \leq 8,0\mu\text{g/mL}$ foram consideradas sensíveis, entre 16-32µg/mL sensíveis dependente de dose e $\geq 64\mu\text{g/mL}$ resistentes. Para itraconazol $CIM_{50} \geq 1,0\mu\text{g/mL}$ foram consideradas resistentes, $\leq 0,125\mu\text{g/mL}$ sensíveis e entre 0,25-0,5µg/mL sensíveis dependente de dose e para 5-FC, $CIM_{50} \geq 32\mu\text{g/mL}$ resistentes, entre 8-16µg/mL intermediário e $\leq 4,0\mu\text{g/mL}$ sensíveis. Por fim, a norma M27 A2, não define claramente os limites para identificação de isolados sensíveis e resistentes à anfotericina B.

3.12. Cultivo de *C. neoformans* – ativação/repressão gênica.

Foi utilizada uma cepa padrão de *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A, tipo molecular VNI (WM148). A extração de RNA foi realizada de duas situações: a primeira, referida como *driver* foi realizada a partir de culturas de 48 horas de crescimento, cultivadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol a 30°C. A segunda extração, referida como *tester*, foi realizada a partir de culturas recuperadas de tecido pulmonar de camundongo BALBc após infecção experimental. Para isso, foi preparada uma suspensão de 10⁹ leveduras em salina estéril que foi inoculada por via intranasal, em camundongos com idade de 30 dias, estes foram sacrificados após 12 dias de infecção. O pulmão foi assepticamente retirado e após maceração, plaqueado em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e feito incubação a 30°C. Colônias isoladas foram submetidas a exame direto em tinta da China para verificar presença de cápsula e cultivados em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol por mais 24 horas a 30°C.

3.13. Extração de RNA total (adaptação de Sokolovsky *et al.*, 1990).

O crescimento celular formado, após a incubação, foi lavado com água destilada estéril três vezes para posterior extração de RNA. As células de *C. neoformans* foram maceradas com nitrogênio líquido e rapidamente transferidas para um tubo (tipo falcon) contendo 3,5mL de Trizol e pérolas de vidro. A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 minutos e após, centrifugadas a 1620 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado de 0,2mL de clorofórmio para cada 0,75mL de trizol recuperado, agitado vigorosamente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o repouso, a amostra foi centrifugada a 1620 x g por 15 minutos e a fase aquosa, transferida para um novo tubo. Foi acrescentada 0,25mL de isopropanol e 0,25mL de solução de citrato de sódio 0,4M e cloreto de sódio 0,8M para cada 0,75mL de trizol recuperado inicialmente, agitado gentilmente e deixado em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 1620 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol a 75%. Nova centrifugação foi realizada a 1620 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi ressuspenso em 30µL de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) 0.01% e armazenado a -70 °C.

3.14. Reação de RDA.

Foi seguido o protocolo descrito por Pastorian *et al.*, (2000) modificado por Dutra *et al.*, (2004).

3.14.1. Síntese de cDNA fita simples.

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1µg de RNA total, 10pmol/µL da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C. Em seguida foi acrescentado 10pmol/µL do oligo dT modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁N, onde N=A, C, G ou T; N₁=A, G ou C), 2µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2µL de RNaseOUT (40U/µL) (Invitrogen), 0,4µL de DTT (100mM), 1,2µL de cloreto de magnésio (50mM), 2µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL) (RT Superscript II - Invitrogen) e 4µL de tampão 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl₂ 15mM). Esta reação foi aquecida durante 1 hora e trinta minutos a 42°C. Após este período foi adicionado 80µL de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0) e aquecida por mais 7 minutos a 72°C.

3.14.2. Síntese de cDNA fita dupla.

Para síntese da segunda fita de cDNA foi utilizado 3µL da primeira fita, 10pmol/µL da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), 10µL de tampão 10X (Tris-SO₄ 600mM pH 8,9, (NH₄)₂SO₄ 180mM), 2µL de uma mistura de dNTPs (10mM), 2µL de sulfato de magnésio (50mM), 2µL de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e água milli-Q estéril tratada com DEPC 0,01% para volume final de 100µL. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial por 1 minuto a 95°C, seguido por 20 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 55°C, e extensão por 5 minutos a 68°C e um ciclo final de extensão por 7 minutos a 68°C.

3.14.3. Digestão com *Sau3AI*.

1µg da fita dupla de cDNA de ambos *tester* e *driver* foi digerido com 1µL da enzima *Sau3AI* (10U/µL) (Promega), 5µL de tampão B (Tris-HCl 60mM pH 7,5; NaCl 500mM; MgCl₂ 60mM; DTT 10mM), e água milli-Q estéril para volume final de 50µL durante 3 horas e trinta minutos a 37°C. Posteriormente, a reação foi purificada através do kit QIAquick (Qiagen) e quantificados a 260nm.

3.14.4. Anelamento do primeiro par de adaptadores.

Os produtos da digestão das amostras *tester* e *driver* (300ng) foram ligados ao primeiro par de adaptadores RBam12 (5'-GATCCGTTTCATG-3') e RBam24 (5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACG-3') (500pmol/µL), nas seguintes condições: 55°C/20 minutos; 54°C/10 minutos; 53°C/1 minuto; 52°C/1 minuto; 50°C/1 minuto; 45°C/5 minutos; 40°C/5

minutos; 30°C/5 minutos; 25°C/5 minutos; 20°C/3 minutos; 15°C/5 minutos; 10°C/5 minutos; 4°C/30 minutos.

3.14.5. Ligação do primeiro par de adaptadores.

Após anelamento foi adicionado 1µL de ligase (5U/µL) (Fermentas), 3µL de tampão ligação 10X (Tris-HCl 400mM; MgCl₂ 100mM; DTT 100mM; ATP 5mM) e 3µL de ATP (10 mM) (Invitrogen), por 18 horas a 16°C em seguida a reação foi purificada através do kit QIAquick (Qiagen).

3.14.6. Teste de ligação do primeiro par de adaptadores.

Para confirmar a ligação dos adaptadores, foi feito o teste utilizando-se: 0,5µL da reação de ligação, 5µL de uma mistura de dNTPs (1mM), 2,5µL de tampão 10X (Tris-SO₄ 600mM pH 8,9; (NH₄)₂SO₄ 180mM), 2µL de cloreto de magnésio (50mM), 0,5µL de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e água milli-Q estéril para volume final de 25µL, nas seguintes condições: um ciclo inicial por 1 minuto/95°C, seguido por 25 ciclos de desnaturação por 45 segundos/95°C e extensão por 4 minutos/72°C e um ciclo final por 10 minutos/72°C. A reação foi visualizada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio (0,5µg/mL) e observado à luz ultra-violeta.

3.14.7. Primeira amplificação.

Foi feito um *mix* contendo 10,4µL de tampão 10X (Tris-SO₄ 600 mM pH 8,9; (NH₄)₂SO₄ 180 mM), 8,3µL de cloreto de magnésio (50mM), 5,2µL de uma mistura de dNTPs e água milli-Q estéril para volume final de 93,4µL. Foram retirados 10µL desta mistura e adicionado 0,5µL de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e reservado, ao restante foi adicionado 0,1µL da sequência iniciadora RBam24 e 6µL do produto de ligação, esta foi aquecida durante 2 minutos a 72°C, em seguida foi adicionado o restante do *mix* e aquecido por mais 5 minutos a 72°C, seguido de: 1 ciclo inicial de 1 minuto/95°C, seguido por 7 ciclos de 45 segundos/95°C; 4 minutos/72°C e um ciclo final de 10 minutos/72°C.

Posteriormente foi realizada uma nova PCR, onde 6µL da primeira foi utilizado como *amplicon* para uma segunda reação realizada nas mesmas condições da anterior, entretanto esta foi amplificada 30 vezes. Como controle negativo foi utilizado a mesma mistura exceto o produto de ligação. A reação foi visualizada em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

O produto final foi purificado e digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* para remoção dos adaptadores e uma nova purificação foi feita. A segunda ligação foi feita usando-se os adaptadores NBam12 (5'-GATCCTCCCTCG-3') e NBam24 (5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG-3')

que foram anelados e ligados apenas aos produtos de amplificação da condição *tester*. Para isso, foram utilizadas as mesmas condições da primeira reação de anelamento e ligação (itens 3.14.4. e 3.14.5.) e depois, purificada novamente antes da primeira subtração.

3.14.8. Primeira subtração.

Para primeira subtração, o *tester* (cDNA digerido e ligado aos adaptadores) e o *driver* (cDNA digerido sem os adaptadores) foram misturados na proporção de 1:10, acrescido de 50µL de acetato de amônio 7,5M e 375µL de etanol absoluto, a reação foi incubada por 3 horas à -20°C. Posteriormente, esta foi centrifugada a 20800 x g por 30 minutos e lavada com etanol 70%. O *pellet* foi ressuspensionado em 4µL de tampão EE 3X (EPPS 30 mM (Sigma) pH 8,0; EDTA 3 mM), aquecido por 95°C/2 minutos. Em seguida, esta foi transferida para um tubo contendo 1,5µL de NaCl 5M, coberta com óleo mineral e incubada nas seguintes condições: 95°C/3 minutos; 67°C/24 horas. Após este período foi adicionado 40µL de água milli-Q estéril.

3.14.9. Segunda amplificação.

Após a primeira subtração, os produtos foram amplificados nas mesmas condições do item 3.14.7., porém, utilizando o iniciador NBam24.

O produto amplificado foi purificado e digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* e a terceira ligação foi feita usando-se os adaptadores JBam12 (5'-GATCCGTTTCATG -3') e JBam24 (5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACG-3') que foram anelados e ligados apenas aos produtos da condição *tester* conforme os itens 3.14.4. e 3.14.5. e depois, purificado novamente antes da segunda subtração. Esta foi realizada de acordo com o item 3.14.8., porém na proporção de 1:100 de *tester* (produtos da terceira ligação) e *driver*. A amplificação foi feita com o iniciador JBam24, seguindo-se o protocolo descrito no item 3.14.7, após purificação, esta foi clivada com a enzima de restrição *Sau3AI* para remoção dos adaptadores, novamente purificados e, por fim, verificados em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X corado pelo brometo de etídio, observado à luz ultra-violeta e em seguida foi feita a clonagem.

3.14.10. Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem.

Os fragmentos de interesse foram ligados ao vetor de clonagem pUC 18, na proporção de 1:5 (vetor / inserto). A reação de ligação foi efetuada em 1µL de tampão ligase (1X), 1µL de T4 DNA ligase, 1µL de ATP num volume final de 10 µL. Após incubação a 16°C/18horas, este foi precipitado e a transformação foi realizada em células de *Escherichia coli*.

3.14.11. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação.

Uma colônia de *E. coli* XL1 *blue* foi inoculada em 10mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido por 18 horas a 37°C. Em seguida, foi inoculado 5mL deste pré-inóculo em 500mL de meio LB, incubado a 37°C sob agitação até atingir uma D.O. de 0,35-0,4 em comprimento de onda de 550nm. A cultura foi então resfriada em banho de gelo por 30 minutos e centrifugada a 4500 x g por 15 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 450mL de água milli-Q estéril gelada, centrifugadas 4500 x g por 15 minutos a 4°C e ressuspensas em 200mL de água gelada e submetidas a uma nova centrifugação. Em seguida as células foram ressuspensas em 10mL de glicerol 10% gelado e centrifugadas. O precipitado foi ressuspenso em aproximadamente 2mL de glicerol 10% (3×10^{10} células/mL), em seguida estas foram aliquotadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

3.14.12. Transformação de células de *E. coli* por eletroporação.

Uma alíquota de 20μL de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de 1μL do sistema de ligação (item 3.14.9.). Esta mistura foi então colocada em uma cubeta de 0,2cm previamente gelada. A cubeta foi colocada no aparelho de eletroporação com os seguintes parâmetros: 2,5mV e 125Ω. Após o pulso as células foram recolhidas com 1mL de meio SOC (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e incubadas por 1 hora a 37°C. A suspensão foi plaqueada em ágar LB acrescido de 100μg/mL de ampicilina, IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo), nas concentrações de 0,1mM e 30μg/mL, respectivamente, e incubada por 18 horas a 37°C para a seleção de clones recombinantes.

3.14.13. Extração de DNA plasmidial em microplaca.

As colônias positivas foram crescidas em 1mL de meio LB contendo 50μg/mL de ampicilina em microplacas tipo *deep well*, por 18 horas (*overnight*), a 37°C sob agitação constante. Após este período 100μL dos clones cultivados foram transferidos para placas tipo ELISA, adicionado v/v de glicerol 50% e estocadas a -80°C. O restante do crescimento foi centrifugado a 2250 x g por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e 250μL de solução GTE (glicose 50mM; Tris-HCl 25mM pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi submetida a agitação em vortex e novamente centrifugada a 2250 x g por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 80μL de solução GTE foram adicionados a cada poço. Após agitação em vortex as suspensões foram transferidas para uma placa tipo ELISA (fundo redondo) contendo 2μL de RNase (10mg/mL). Em seguida, 80μL de NaOH 0,2N; SDS 1% foram adicionados a cada poço, a placa foi homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. 80μL de acetato de

potássio 3M foram adicionados a cada poço. Após homogeneização por inversão a reação foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, as placas foram incubadas a 90°C por 30 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo e centrifugada a 2250 x g por 9 minutos. A reação foi transferida para um sistema contendo uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma placa tipo ELISA (fundo cônico) o qual foi centrifugado a 2250 x g por 6 minutos. O sistema foi desmontado, e a etapa seguinte consistiu na precipitação do DNA. Para tanto, 100µL de isopropanol foram adicionados ao filtrado, e a placa centrifugada a 2250 x g por 45 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em água milli-Q estéril.

3.14.14. Seqüenciamento.

O seqüenciamento foi realizado pelo método de Sanger et al., (1977) utilizando o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). As reações foram realizadas com o kit *DYEnamic ET* e *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante, utilizando o oligonucleotídeo M13 *forward* onde se utilizou um ciclo inicial por 95°C/2 minutos seguido de 35 ciclos a 95°C/20 segundos, 50°C/20 segundos, 60°C/1 minuto. A seqüência nucleotídica foi determinada através da incorporação de dideoxinucleotídeos (ddNTP) terminadores e foram analisadas e avaliadas automaticamente através dos cromatogramas gerados e interpretados pelo software MegaBACE 1000 sequencer convertidos em seqüência de DNA.

3.14.15. Análise das seqüências.

Inicialmente, as ESTs foram processadas utilizando o programa Phred (EWING et al., 1998). Somente as seqüências com mais de 100 nucleotídeos e com qualidade Phred maior ou igual a 20 foram selecionadas. A retirada de seqüências contaminantes de vetor foi realizada, utilizando-se o programa Crossmatch (GREEN, 1996) e para a montagem dos *contigs* foi utilizado o programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). Finalmente, as ESTs resultantes foram comparadas com o banco de dados não redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando-se o programa BLASTx (ALTSCHUL, et al., 1997).

3.14.16. Confirmação dos resultados por RT-PCR.

Para confirmação dos resultados por RT-PCR, foram desenhados iniciadores específicos para as ESTs que apresentaram maior redundância, entre elas: piruvato decarboxilase (571pb, F 5'CCGAAACTATCCGAGTGTCCCC3' e R 5'CCAACAATGTGAAGGACGGGG3'), transportador de zinco (555pb, F 5'TCCAGTTCCGGTAATTATCGCG3' e R 5'ATCATAGTCCTCCCATGCGCC3'), transportador de cálcio (981pb, F

5'AGTTCTTACAAGACTACACCGC 3' e R 5'GATAGGCGTAGTGATAAGCGG3') e regulador de chaperona (625pb, F 5'TCTCCATTTATATTCGGACGCC3' e R 5'AGGCTTAATGATTTCTCCCGG3'). Foi utilizado nas reações, o mesmo RNA usado para o RDA e a síntese da primeira fita foi realizada conforme o item 3.14.1. Iniciadores para o gene da actina foram utilizados como controle da reação e para ajuste de concentração de cDNA.

As reações foram realizadas utilizando-se concentrações de 25pmol de cada sequência iniciadora e cDNA num tubo contendo uma mistura de deoxinucleotídeos (0,2mM de cada dNTP), tampão (2,0mM MgCl₂, 50mM KCl, 20mM(NH₄)₂SO₄, Tris-HCl 75mM pH 9,0) e DNA polimerase termoestável (Biotools). O volume final na reação de amplificação foi de 25µL sendo utilizada água Milli-Q estéril. As reações de amplificação foram realizadas com temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 1 minuto; a temperatura de anelamento foi ajustada de acordo com os iniciadores variando de 45 a 55°C por 2 minutos, 72°C por 1,5 minuto e um ciclo final a 72°C por sete minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X, durante 1,5 hora a 100 volts, corados com brometo de etídio e observados à luz ultra-violeta.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção das amostras.

Foram estudados 106 isolados de 58 pacientes com doença associada ou não a Aids, de dois Estados (47 isolados de São Paulo e 59 do Rio de Janeiro), que tiveram episódios de infecção durante o período de 1993 a 2000, dentre estes, 27 (46,6%) possuíam isolados sequenciais e 31 (53,4%) únicos. Cento e quatro isolados foram identificados como *C. neoformans* var *grubii*, sorotipo A e apenas dois pertencentes ao Estado do Rio de Janeiro foram identificados como *C. gattii* (= *C. neoformans* var *gattii*). Os dados dos isolados avaliados neste estudo estão resumidos nas tabelas 1A e 1B.

Tabela 1A. Dados e resultados dos isolados de *Cryptococcus* sp do Estado de São Paulo avaliados quanto à espécie, variedade, *mating type*, tipo molecular e sensibilidade a quatro antifúngicos (fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B).

Paciente	Isolado	Ano	Estado	Espécie	Variedade	Mating Type	Tipo Molecular	Fluconazol	Itraconazol	5-Fluorocitosina	Anfotericina B
1	481	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	S	<1 μ g/mL
1	482	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
2	540	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	S	<1 μ g/mL
2	541	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	S	<1 μ g/mL
2	14	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	S	<1 μ g/mL
3	13	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	S	<1 μ g/mL
3	49	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	S	<1 μ g/mL
4	98	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
4	14	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
5	221	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
5	18	97	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
6	222	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
6	65	97	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
7	62	97	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
7	66	97	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
7	67	97	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
8	377	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	S	<1 μ g/mL
9	379	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	S	<1 μ g/mL
10	387	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
11	382	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNII	S	S	S	<1 μ g/mL
11	384	95	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNII	S	S	I	<1 μ g/mL
12	71	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	S	<1 μ g/mL
13	169	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	S	<1 μ g/mL
14	72	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
15	141	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
16	175	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
17	32	97	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
18	196	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
18	192	96	SP	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL

19	2177	99	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	<1 μ g/mL
20	1950	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	<1 μ g/mL
21	1920	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	<1 μ g/mL
22	1870	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	S	$\geq$ 1 μ g/mL
23	1850	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	S	$\geq$ 1 μ g/mL
23	1830	97	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
24	141	96	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	S	<1 μ g/mL
25	85	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
26	35	99	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	S	<1 μ g/mL
27	110	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	S	<1 μ g/mL
28	34	99	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	<1 μ g/mL
29	26	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	S	$\geq$ 1 μ g/mL
30	142	96	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
31	1269	93	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	<1 μ g/mL
32	11	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	S	<1 μ g/mL
33	31	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	<1 μ g/mL
34	6	99	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	<1 μ g/mL
35	34	98	SP	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	<1 μ g/mL

SP = São Paulo

S = sensível

SDD = sensível dependente de dose

I = intermediário

R = resistente

Critérios de classificação estabelecidos pelo CLSI, documento M-27 A2.

Tabela 1B. Dados e resultados dos isolados de *Cryptococcus* sp do Estado do Rio de Janeiro avaliados quanto à espécie, variedade, *mating type*, tipo molecular e sensibilidade a quatro antifúngicos (fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B).

Paciente	Isolado	Ano	Estado	Espécie	Variedade	Mating Type	Tipo Molecular	Fluconazol	Itraconazol	5-Fluorocitosina	Anfotericina B
1	4	95	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
1	7	95	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
1	8	95	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
1	9	95	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
2	2	95	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	R	$\geq$ 1 μ g/mL
2	6	95	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNII	SDD	S	I	$\geq$ 1 μ g/mL
3	26	96	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	SDD	S	R	$\geq$ 1 μ g/mL
3	27	96	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	$\geq$ 1 μ g/mL
3	28	96	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	R	$\geq$ 1 μ g/mL
3	30	96	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	R	S	I	$\geq$ 1 μ g/mL
4	33	96	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
4	34	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	SDD	S	R	<1 μ g/mL
5	41	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
5	42	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
6	39	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNII	S	S	I	<1 μ g/mL
6	40	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNII	SDD	SDD	R	<1 μ g/mL
7	43	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
7	44	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
7	45	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
7	47	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
8	32	96	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
9	46	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
9	38	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
9	1	95	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
10	35	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNII	S	S	I	<1 μ g/mL
11	49	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
11	50	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
12	52	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
12	54	97	RJ	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL

12	55	97	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
13	60	97	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
13	61	97	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
13	62	97	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
14	63	98	RJ	<i>C. gattii</i>	α	VGII	S	SDD	I	<1 μ g/mL
14	64	98	RJ	<i>C. gattii</i>	α	VGII	S	SDD	I	<1 μ g/mL
15	70	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	R	$\geq$ 1 μ g/mL
15	53	97	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	R	<1 μ g/mL
16	71	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	R	$\geq$ 1 μ g/mL
16	74	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
16	67	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
17	76	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	S	I	<1 μ g/mL
18	80	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	R	<1 μ g/mL
18	81	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	R	<1 μ g/mL
18	82	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	$\geq$ 1 μ g/mL
18	83	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
18	84	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	R	$\geq$ 1 μ g/mL
18	85	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
18	86	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	I	<1 μ g/mL
19	87	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	SDD	SDD	I	$\geq$ 1 μ g/mL
20	88	98	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	R	I	$\geq$ 1 μ g/mL
21	89	99	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNII	S	S	I	<1 μ g/mL
22	90	99	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	R	$\geq$ 1 μ g/mL
22	93	99	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	I	$\geq$ 1 μ g/mL
22	111	00	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	R	$\geq$ 1 μ g/mL
22	112	00	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	R	$\geq$ 1 μ g/mL
22	101	99	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
23	103	00	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	<1 μ g/mL
23	104	00	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	S	R	<1 μ g/mL
23	105	00	RJ	<i>C. neoformans grubii</i>	α	VNI	S	SDD	I	$\geq$ 1 μ g/mL

RJ = Rio de Janeiro

S = sensível

SDD = sensível dependente de dose

I = intermediário

R = resistente

Critérios de classificação estabelecidos pelo CLSI, documento M-27 A2.

4.2. Determinação das variedades por PCR.

A determinação das variedades foi realizada por métodos clássicos em meio CGB (Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol) e confirmado por PCR utilizando seqüências iniciadoras específicas. Houve 100% de concordância entre os métodos e fragmentos em torno de 1000pb para sorotipo A/AD foram obtidos em 104 (98,1%) isolados (*C. neoformans* var *grubii*) e para os sorotipos B/C (*C. gattii* = *C. neoformans* var *gattii*), em dois (1,9%) (Figura 1).

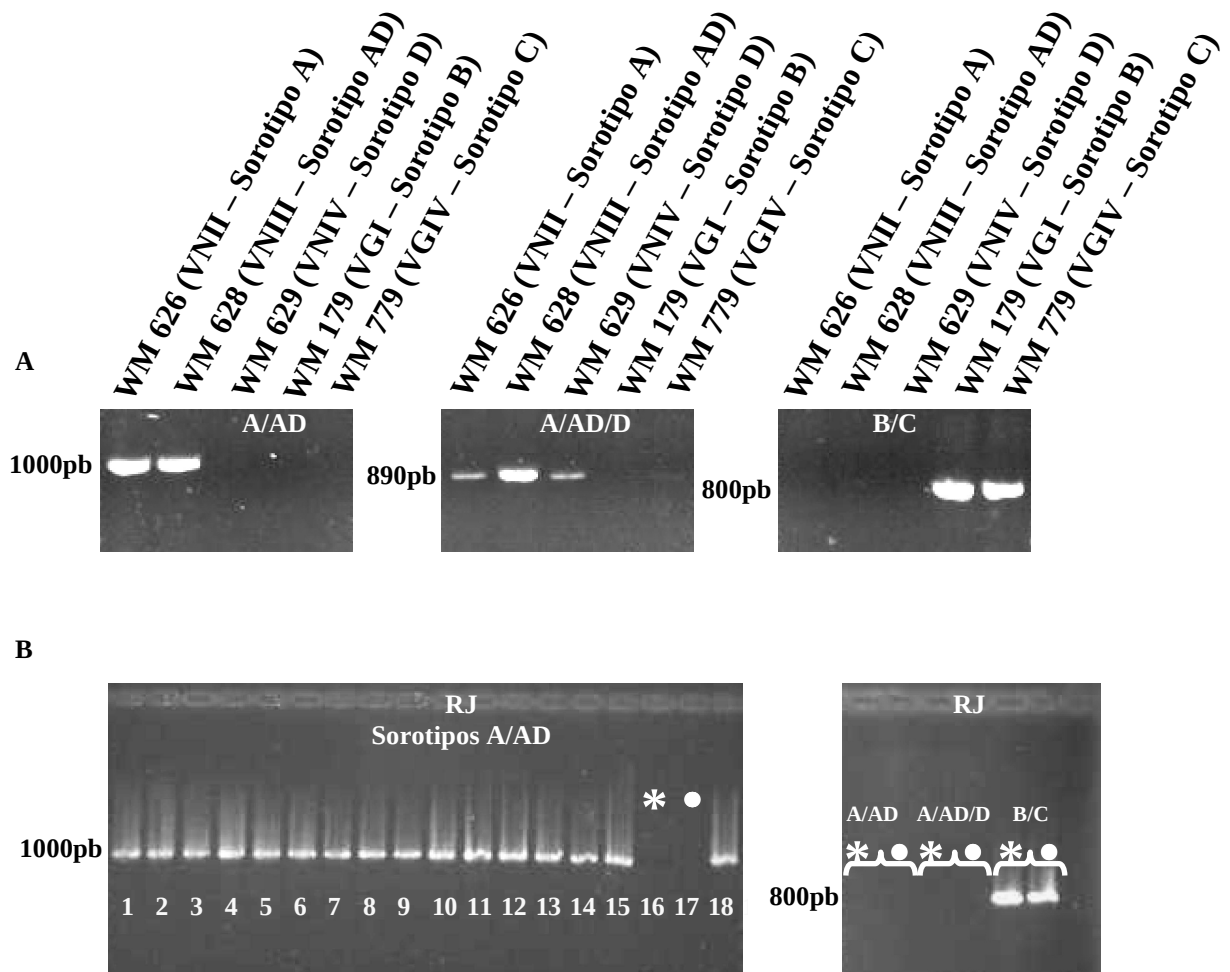


Figura 1. Gel representativo a 1,5% dos produtos de PCR de isolados de *C. neoformans* obtidos com os iniciadores para determinação das variedades.

A – Cepas de referência, marcador de tamanho molecular 100pb (Promega).

B – Isolados de *C. neoformans* do Estado do Rio de Janeiro.

1 - Paciente (P) 7, Isolado (I) 45; 2 - P-7, I-47; 3 - P-8, I-32; 4 - P-9, I-46; 5 - P-9, I-38; 6 - P-9, I-1; 7 - P-10, I-35; 8 - P-11, I-49; 9 - P-11, I-50; 10 – P-12, I-52; 11 - P-12, I-54; 12 - P-12, I-55; 13 - P-13, I-60; 14 - P-13, I-61; 15 - P-13, I-62; 16 - P-14, I-63; 17 - P-14, I-64; 18 - P-15, I-70.

*- Paciente 14, isolado 63 do Estado do Rio de Janeiro.

● - Paciente 14, isolado 64 do Estado do Rio de Janeiro.

4.3. Determinação dos *mating type* por PCR.

Os iniciadores específicos, para determinação dos tipos MAT α e MATa dos 106 isolados de *C. neoformans* dos dois Estados, foram utilizados para amplificar fragmentos específicos de 101pb e 117pb, respectivamente. As cepas ATCC 28957 (sorotipo D, MAT α) e ATCC 28958 (sorotipo D, MATa) foram usadas como controles positivos. A análise epidemiológica dos *mating type* mostrou prevalência de 100% de MAT α (Figura 2).

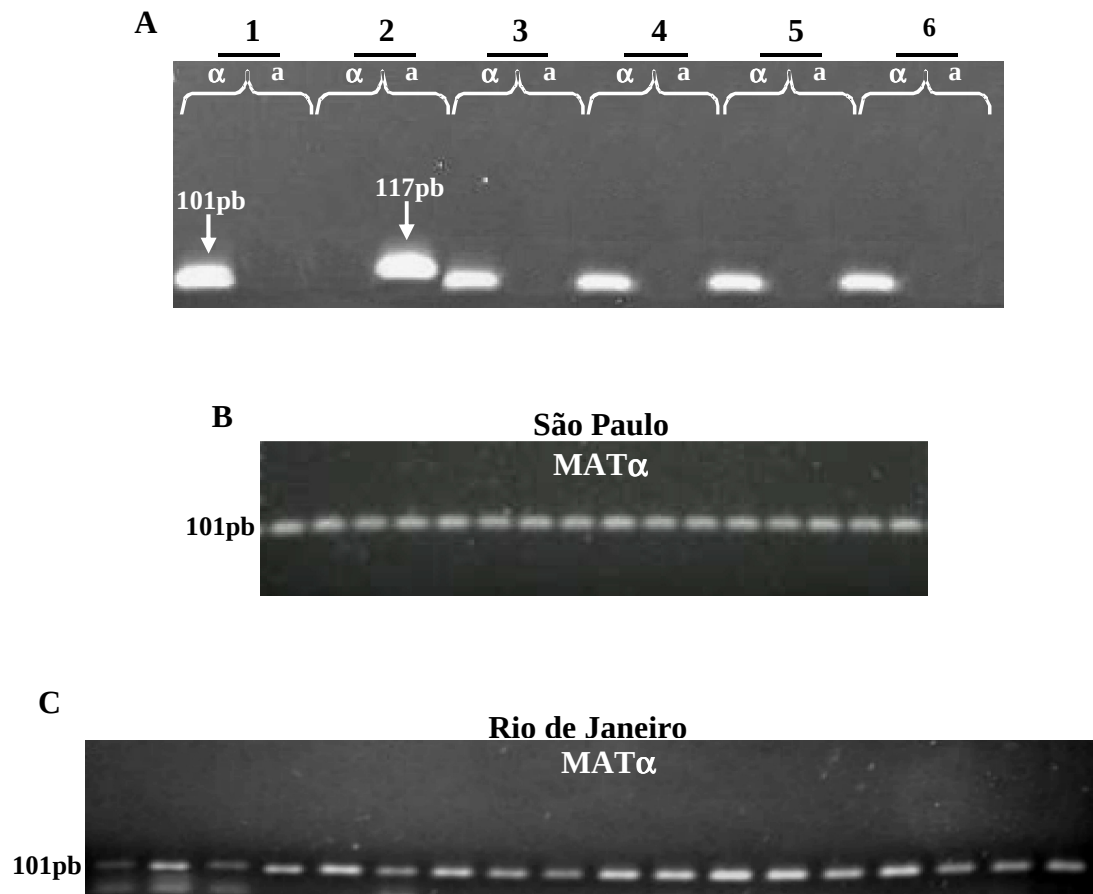


Figura 2. Gel representativo dos produtos de PCR de isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro obtidos com os iniciadores para mating-type α e a.

A - 1, ATCC 28957 (MAT α); 2, ATCC 28958 (MATa); 3-6, isolados clínicos.

B – Isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo.

C - Isolados de *C. neoformans* do Estado do Rio de Janeiro.

4.4. RAPD e PCR-*fingerprinting*.

O iniciador 6 do Kit Ready to Go e o iniciador microssatélite específico (GACA)₄ foram utilizados para amplificar o DNA genômico dos 106 isolados de *C. neoformans* dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Os perfis de RAPD e PCR-*fingerprinting* foram analisados de acordo com a presença ou ausência de bandas claras e definidas, por meio de imagens digitalizadas capturadas dos géis (Figuras 3 e 4) e utilizadas para confecção dos dendrogramas.

Cepas padrões foram utilizadas na técnica de PCR-*fingerprinting* com iniciador (GACA)₄ para separar os isolados nos oito tipos moleculares previamente descritos (Figura 3A). O dendrograma obtido com (GACA)₄ mostrou alta homogeneidade entre os isolados. A média do coeficiente de similaridade foi de $0,93 \pm 0,1$. Os isolados foram distribuídos em quatro grupos principais. O grupo I, formado pelo tipo molecular VNI, englobou a maioria dos isolados (93/106 ou 87,7%) e foram distribuídos em dois subgrupos IA e IB com 0,86 de similaridade. O subgrupo IA continha 88 isolados em quatro *clusters*, apresentando similaridade maior que 0,9 e o subgrupo IB com cinco isolados em um cluster de 1,0. O grupo II agrupou sete isolados VNII (6,6%) com similaridade em torno de 0,9, distribuídos em três *clusters* e correlacionado em 0,85 com o grupo I. Quatro isolados sequenciais (grupo III), obtidos de um paciente do Rio de Janeiro, apresentaram similaridade de 1,0 e correlacionaram em 0,7 com o grupo I e II. Finalmente, o grupo IV com apenas dois isolados de *C. gattii* (VGII) apresentou similaridade $< 0,6$ quando comparada aos grupos I, II e III (Figura 5).

A análise do dendrograma obtido com iniciador 6 mostrou maior heterogeneidade, comparada com o obtido com (GACA)₄. A média do coeficiente de similaridade foi de $0,81 \pm 0,1$. Foram formados vinte e cinco clusters com quatro grupos principais. O grupo I, com os subgrupos IA e IB, englobou 84 isolados VNI com similaridade em torno de 0,78. Destes, 83 pertenciam ao subgrupo IA e apresentaram similaridade de 0,85 entre si. O grupo II, contendo 12 isolados, correlacionou-se em 0,72 com o grupo I e dividiu-se em dois subgrupos (IIA e IIB), correlacionados entre si em 0,84. O subgrupo IIA englobou sete isolados VNII e o subgrupo IIB, cinco VNI. O grupo III, formado apenas por isolados VNI, agrupou oito isolados correlacionados entre si em 0,8 e com similaridade de 0,65 em relação aos grupos I e II. Por último o grupo IV, apresentando a menor relação ($< 0,5$), continha os dois isolados VGII (Figura 6).

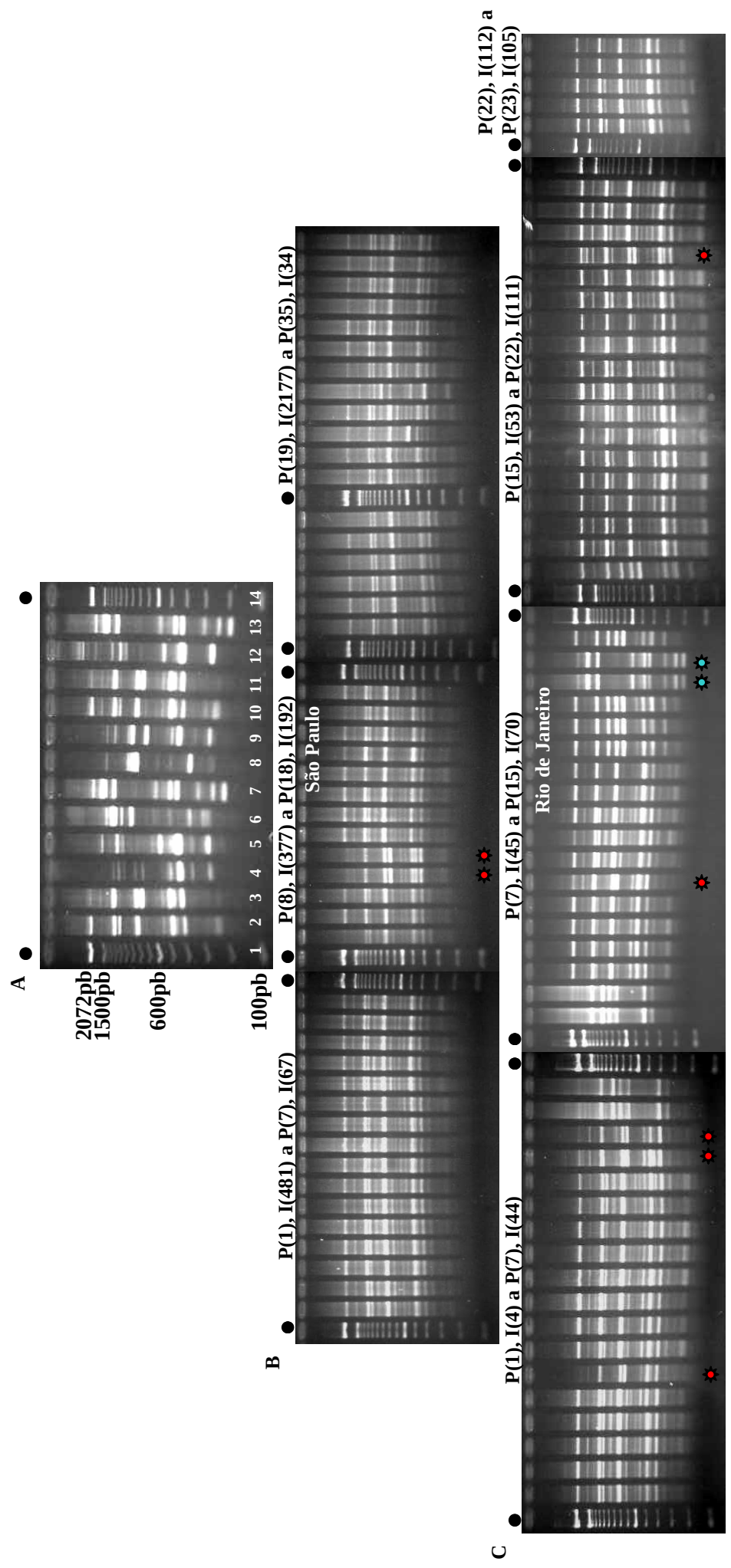


Figura 3. Perfis de PCR-fingerprinting com o iniciador (GACA)₄ de *C. neoformans* do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro (gel a 2%).

A – Gel representativo das cepas de referência de *C. neoformans* dos principais tipos moleculares. **1** – Marcador de tamanho molecular 100pb (Invitrogen); **2** – WM148 (VNI – sorotipo A); **3** – WM626 (VNII – sorotipo A); **4** – WM628 (VNIII – sorotipo AD); **5** – WM629 (VNIV – sorotipo D); **6** – WM179 (VGI – sorotipo B); **7** – WM178 (VGII – sorotipo B); **8** – WM161 (VGIII – sorotipo B); **9** – WM779 (VGIV – sorotipo C); **10-11** – Isolados clínicos; **12** – Cepa ATCC 28958 (sorotipo D); **13** – Isolado clínico; **14** – Tamanho molecular 100pb (Invitrogen).

B – Isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo (ordem = tabela 1A; P = número do paciente, I = número do isolado).

C – Isolados de *C. neoformans* do Estado do Rio de Janeiro (ordem = tabela 1B; P = número do paciente, I = número do isolado).

● - Marcador de tamanho molecular 100pb (Invitrogen).

★ - Tipo molecular VNII. ★ - Tipo molecular VGII.

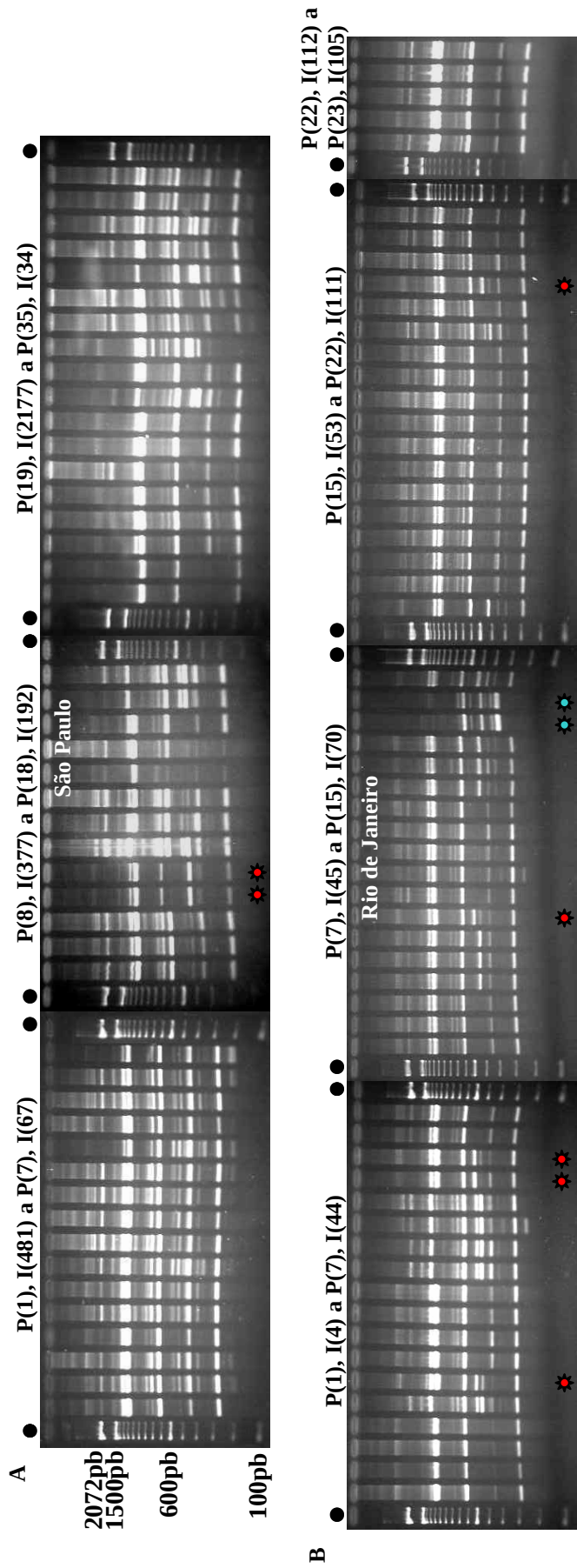


Figura 4. Perfis de RAPD com o iniciador 6 do kit Ready to go de *C. neoformans* do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro (gel a 2%).

A – Isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo (ordem = tabela 1A; P = número do paciente, I = número do isolado).

B - Isolados de *C. neoformans* do Estado do Rio de Janeiro (ordem = tabela 1B; P = número do paciente, I = número do isolado).

● - Marcador de tamanho molecular 100pb (Invitrogen).

★ - Tipo molecular VNII.★ - Tipo molecular VGII.

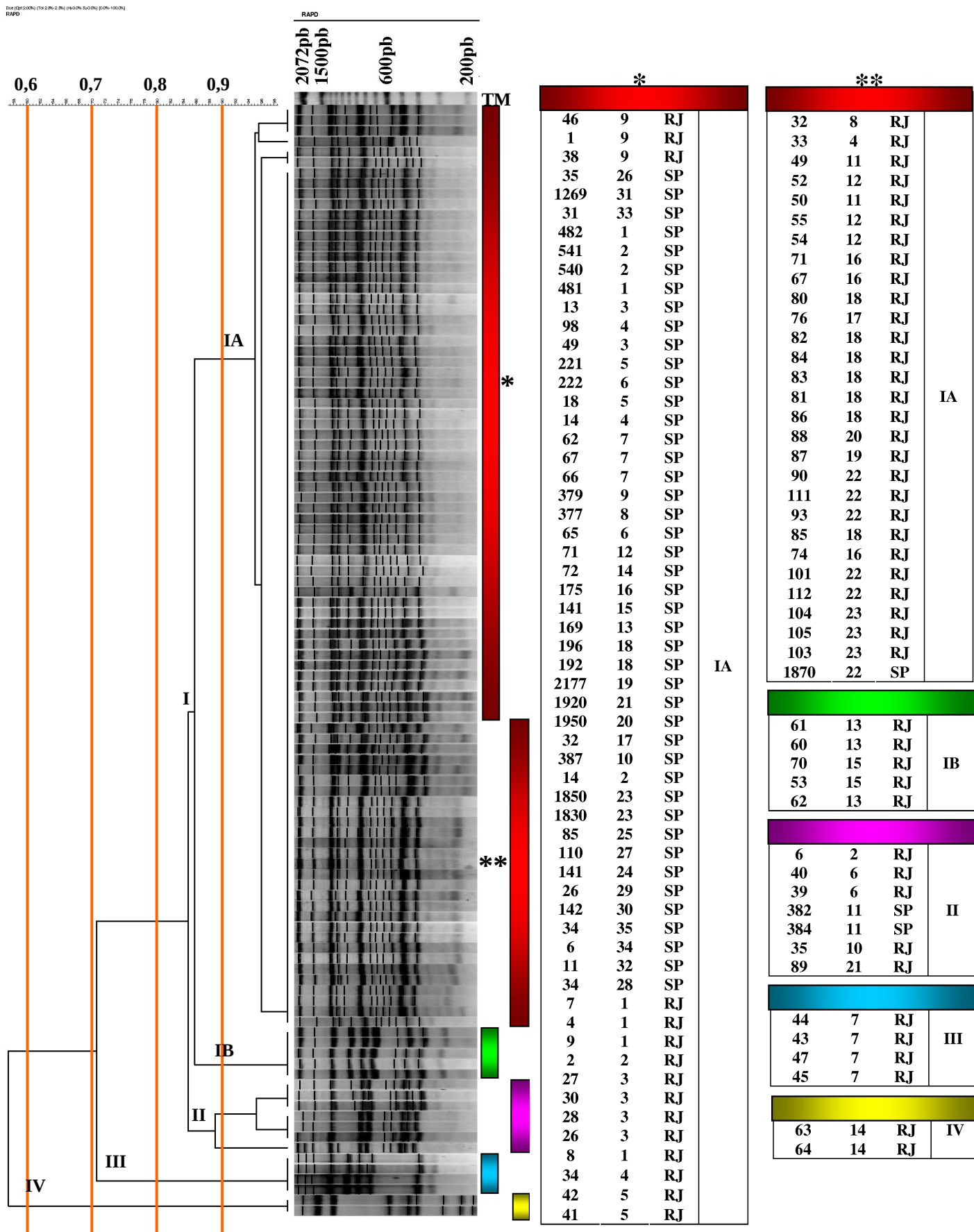


Figura 5. Dendrograma dos isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro utilizando a sequência iniciadora (GACA)₄. Marcador de tamanho molecular 100pb (Invitrogen). Tipo Molecular VNI = IA, IB e III; VNII = II; VGII = IV.

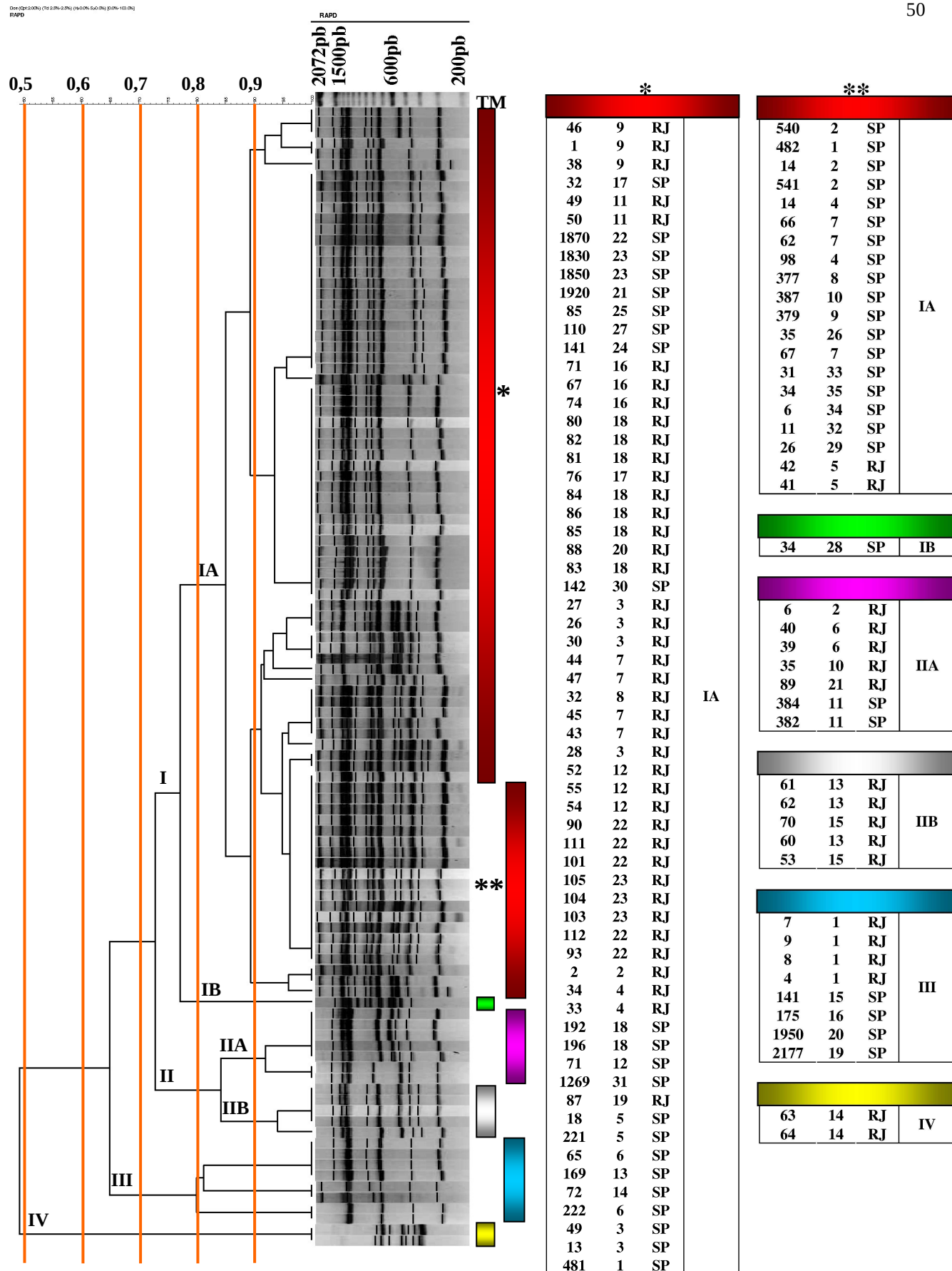


Figura 6. Dendrograma dos isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro utilizando a sequência iniciadora 6 do Kit Ready to Go. Marcador de tamanho molecular 100pb (Invitrogen). Tipo molecular VNI = IA, IB, IIB e III; VNII = IIA; VGII = IV.

4.5. PCR-RFLP do gene da fosfolipase B (PLB1).

A técnica de PCR-RFLP do gene PLB1 foi realizada para confirmar os perfis genéticos encontrados por PCR-*fingerprinting* com o iniciador (GACA)₄ nos oito tipos moleculares principais. Os perfis de PCR-RFLP confirmaram os perfis de PCR-*fingerprinting* e mostraram prevalência de 91,5% (97/106) do tipo molecular VNI, seguido de 6,6% (7/106) de VNII e 1,9% (2/106) de VGII (Figura 7 e 8).

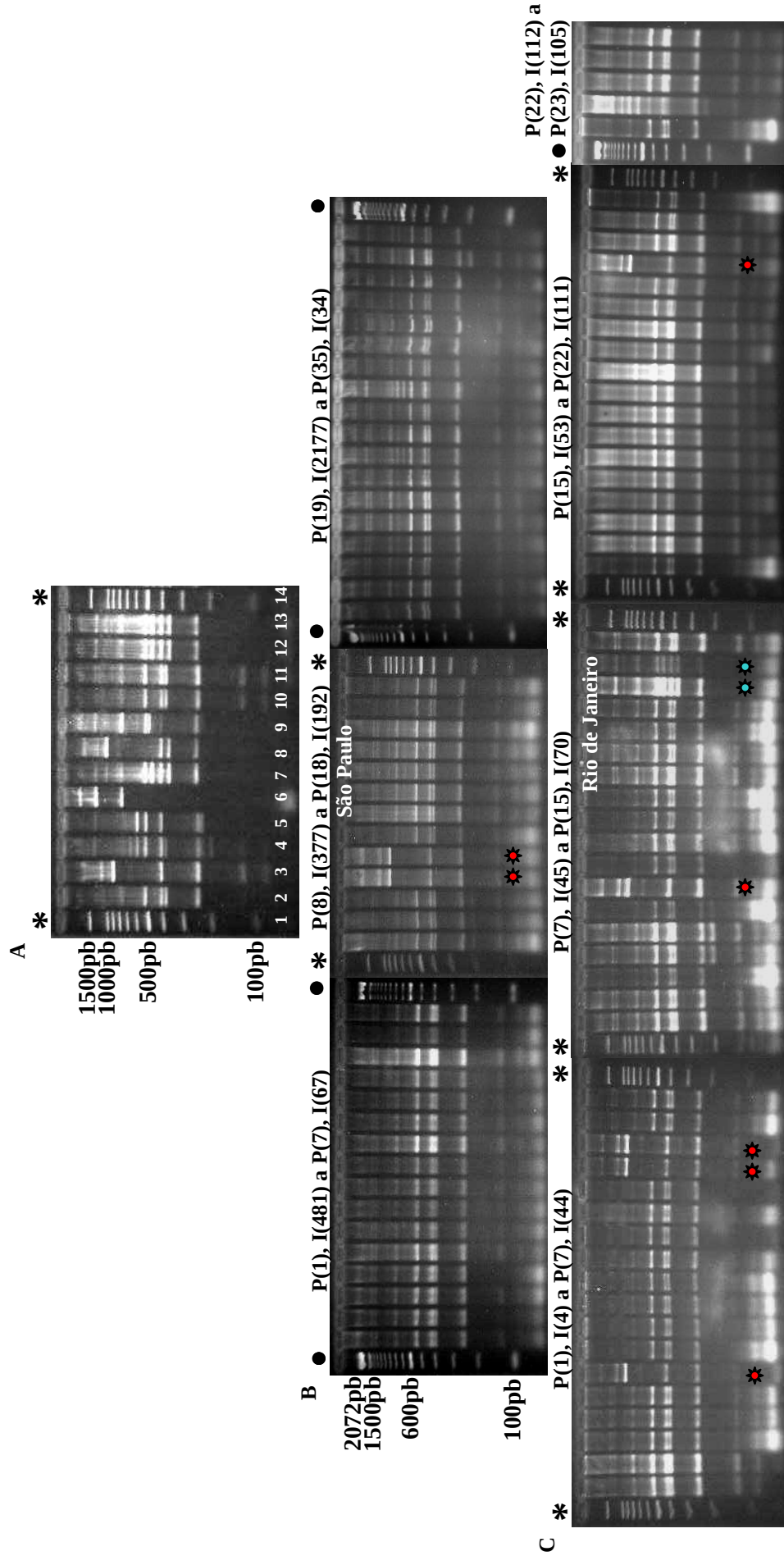


Figura 7. Perfis de PCR-RFLP de *C. neoformans* do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro (gel a 3%).

A – Gel representativo das cepas de referência de *C. neoformans* dos principais tipos moleculares. **1** – Marcador de tamanho molecular 100pb (Promega); **2** – WM148 (VNI – sorotipo A); **3** – WM626 (VNII – sorotipo A); **4** – WM628 (VNIII – sorotipo AD); **5** – WM629 (VNIV – sorotipo D); **6** – WM179 (VGI – sorotipo B); **7** – WM178 (VGII – sorotipo B); **8** – WM161 (VGIII – sorotipo B); **9** – WM779 (VGIV – sorotipo C); **10-13** – Isolados clínicos; **14** – Marcador de tamanho molecular 100pb (Promega).

B – Isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo (ordem = tabela 1A; P = número do paciente, I = número do isolado).

C - Isolados de *C. neoformans* do Estado do Rio de Janeiro (ordem = tabela 1B; P = número do paciente, I = número do isolado).

* - Marcador de tamanho molecular 100pb (Promega). ● - Marcador de tamanho molecular 100pb (Invitrogen).

* - Tipo molecular VNII. * - Tipo molecular VGII.

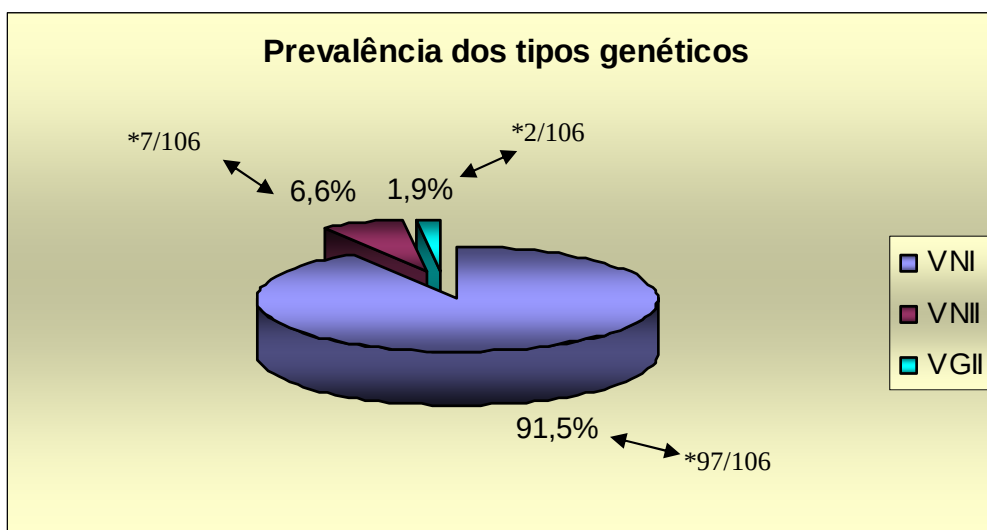


Figura 8. Prevalência dos tipos genéticos de *C. neoformans* dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. * = número de isolados.

4.6. Avaliação do perfil de sensibilidade de *C. neoformans* por microdiluição.

As concentrações inibitórias dos 106 isolados de *C. neoformans* foram avaliadas pelas leituras dos controles positivo e negativo em cada placa e também com base nas leituras da cepa de *C. neoformans* - ATCC 90012. A variação da concentração inibitória mínima, bem como, os valores da CIM₅₀ e CIM₉₀ (concentração inibitória mínima para 50 e 90% dos isolados), para fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B estão representados nas Tabelas 2 e 3.

O perfil de sensibilidade ao fluconazol mostrou que 83,1% dos isolados foram sensíveis a esta droga, pois apresentaram valores de CIM₅₀ entre 4 e 8µg/mL. Dezesete isolados (16,0%) foram sensíveis dependente de dose (SDD) e apenas um (Paciente 3, isolado 30) do Rio de Janeiro (0,9%) apresentou resistência (CIM₅₀ ≥ 64µg/mL). Com itraconazol, 45 isolados (42,4%) foram SDD e um (0,9%) resistente com CIM₅₀ de 2,0µg/mL (Paciente 19, isolado 88). Em contraste aos azóis, o perfil de sensibilidade a 5-fluorocitosina mostrou alta frequência de isolados resistentes com 30,2% apresentando CIM₅₀ ≥ 32µg/mL e 52,8% com o perfil de intermediário. Quanto a anfotericina B, 20 isolados (18,9%) apresentaram CIM ≥ 1µg/mL. A análise estatística, dos perfis de sensibilidade a 5-fluorocitosina e anfotericina B, mostrou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os dois Estados. Todos isolados resistentes a 5-fluorocitosina encontrados neste trabalho, pertenceram ao Estado do Rio de Janeiro, com prevalência de 54,2% (32 de 59 isolados). Apenas três dos 47 isolados (6,4%) de São Paulo apresentaram CIM₉₀ ≥ 1µg/mL para anfotericina B, enquanto para o Rio de Janeiro, a prevalência foi de 28,8% (17 de 59 isolados) (Figuras 9 e 10). Os valores da concentração inibitória mínima para cada um dos isolados estão representados no anexo 3.

Tabela 2. Variações das CIM ($\mu\text{g/mL}$) para fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B para 106 isolados de *C. neoformans* de São Paulo e Rio de Janeiro.

Estados	Fluconazol	Itraconazol	5-fluorocitosina	Anfotericina B
	CIM ₅₀ [*]	CIM ₅₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀ ^{**}
São Paulo	2 - 32	0,0625 - 0,5	2 - 16	0,0313 - 1
Rio de Janeiro	0,5 - 64	0,0313 - 2	8 - 64	0,313 - 2
SP + RJ	0,5 - 64	0,0313 - 2	2 - 64	0,0313 - 2

^{*}CIM₅₀ = 50% de inibição do crescimento.

^{**}CIM₉₀ = 90% de inibição do crescimento.

Tabela 3. CIM50* e CIM90** de fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B de isolados de *C. neoformans* de São Paulo e Rio de Janeiro.

Estados	Fluconazol		Itraconazol		5-Fluorocitosina		Anfotericina-B	
	CIM		CIM		CIM		CIM	
	50	90	50	90	50	90	50	90
SP	4***	16	0,25	0,25	8	16	0,25	0,5
RJ	4	16	0,125	0,25	16	64	0,5	1,0
SP + RJ	4	16	0,125	0,25	16	64	0,5	1,0

* CIM50 = Concentração inibitória mínima para 50% dos isolados

** CIM90 = Concentração inibitória mínima para 90% dos isolados

*** µg/mL

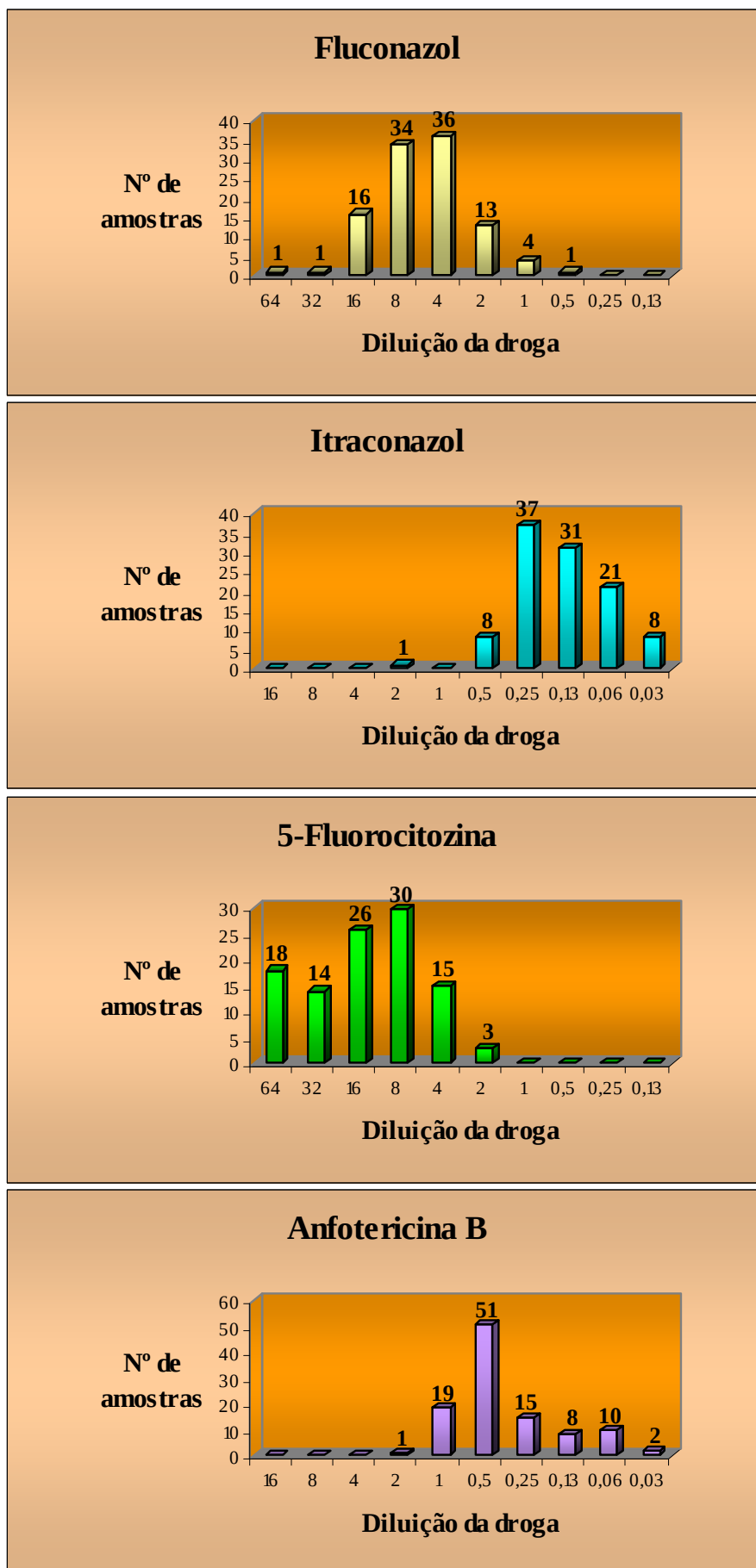
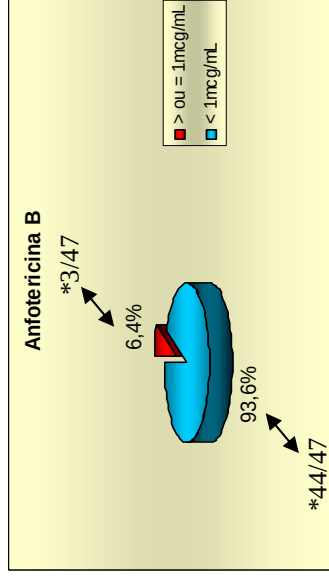
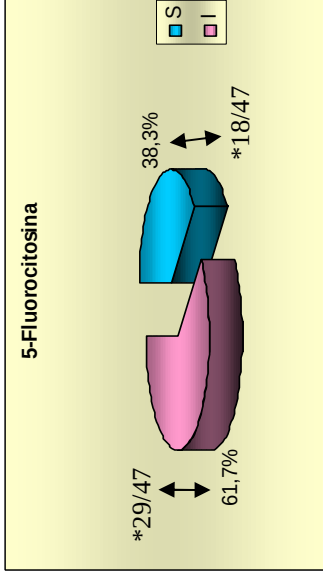
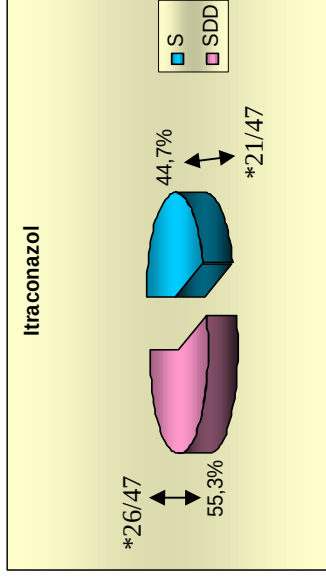
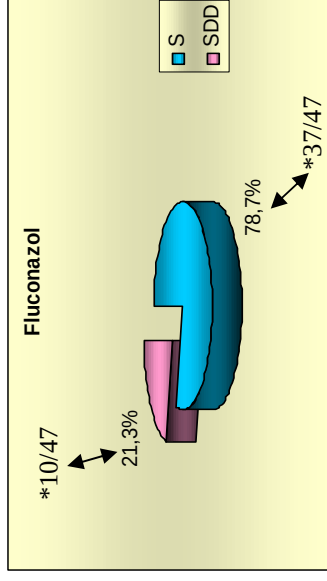
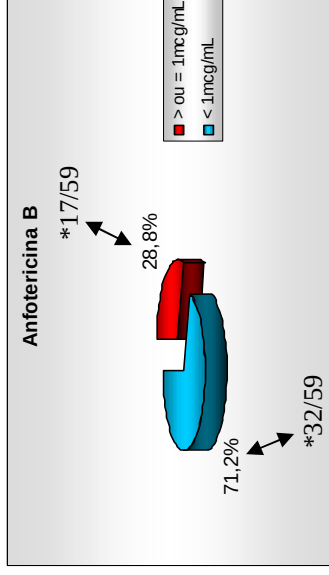
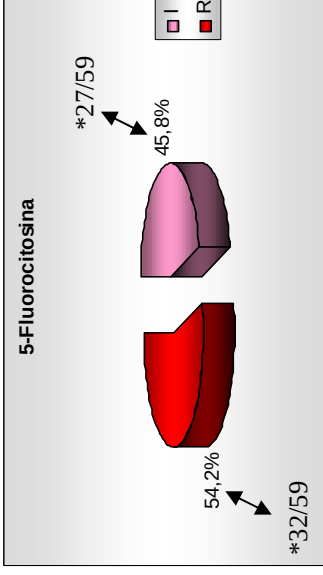
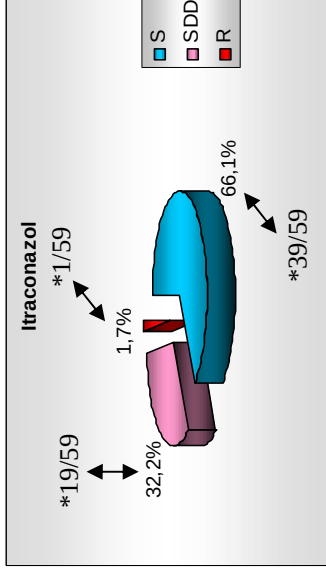
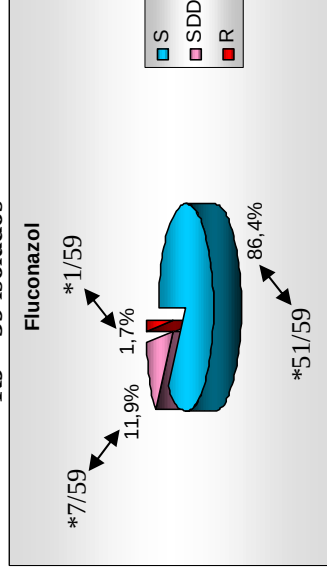


Figura 9. Distribuição dos valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B de isolados clínicos de *C. neoformans* de São Paulo e Rio de Janeiro.

SP – 47 isolados



RJ – 59 isolados



SP + RJ – 106 isolados

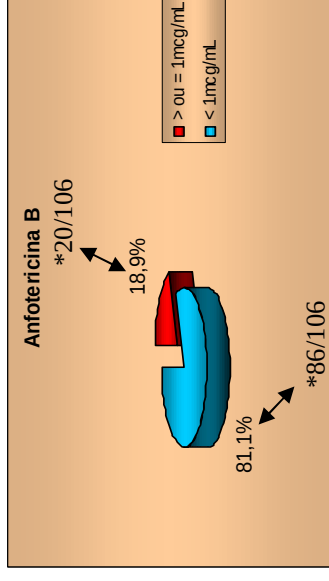
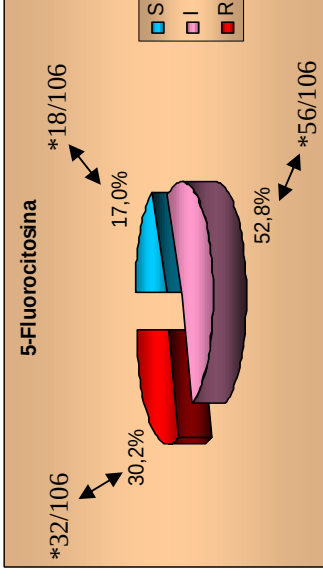
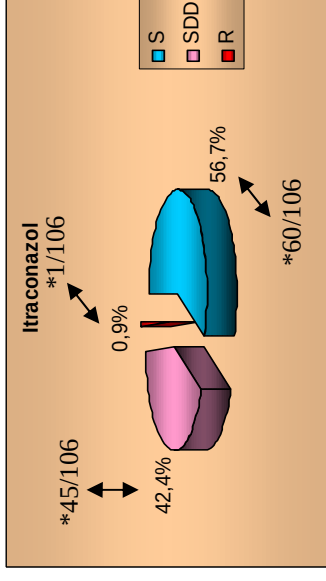
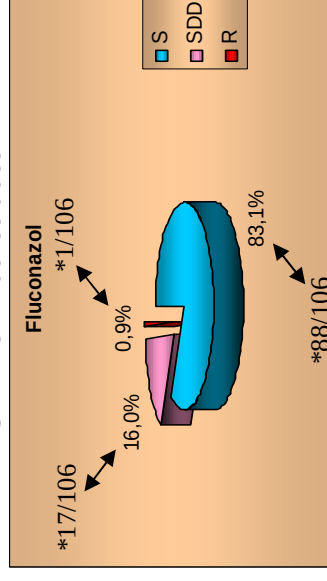


Figura 10. Prevalência de isolados sensíveis, sensíveis de dose, intermediários e resistentes de *C. neoformans* dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. * Número de isolados. S = sensível, SDD = sensível dependente de dose, I = intermediário, R = resistente.

4.7. Expressão diferencial de genes de *C. neoformans* durante infecção em animais de laboratório.

Para o estudo foi utilizada uma cepa padrão de *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A e tipo molecular VNI (WM148). A extração de RNA foi realizada em duas situações: a primeira, referida como *driver*, foi feita a partir de culturas de 48 horas de crescimento em ágar Sabouraud dextrose. A segunda extração, referida como *tester*, a partir de culturas recuperadas de tecido pulmonar em camundongo BALBc na tentativa de identificar genes com expressão diferencial durante a infecção. Para isso, foram realizadas duas hibridizações subtrativas nas proporções de 1:10 e 1:100 de *tester* e *driver* respectivamente, com excesso de *driver* para remoção das seqüências idênticas nas duas condições. Os produtos diferencialmente expressos das duas situações foram amplificados, resultando em padrões distintos (figura 11).

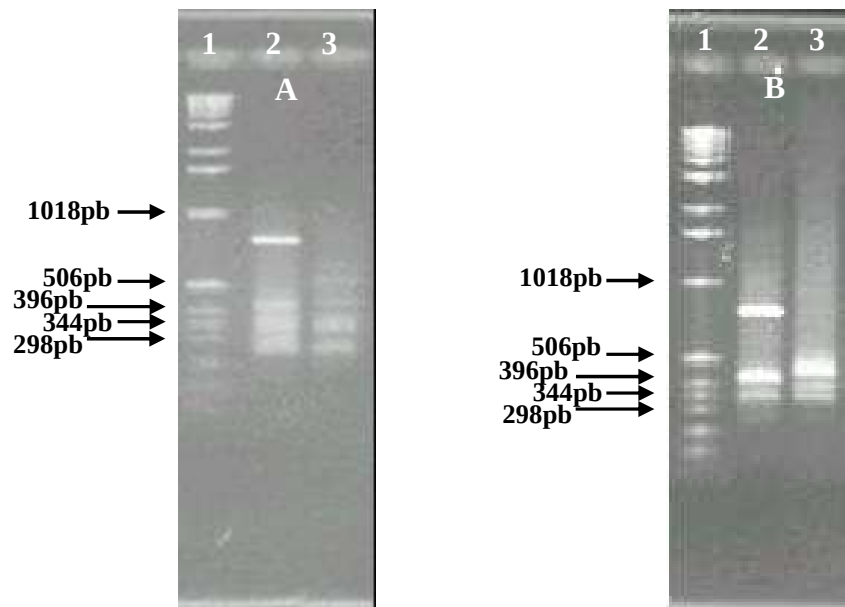


Figura 11. Produtos diferencialmente expressos de *C. neoformans* mantidos em meio de cultura e recuperados de tecido pulmonar. 1, Marcador de tamanho molecular 1Kb (Invitrogen); 2, Produtos diferencialmente expressos (*tester* = pulmão; *driver* = meio de cultura); 3- Produtos diferencialmente expressos (*tester* = meio de cultura; *driver* = pulmão).

A = 1ª subtração (1/10)

B = 2ª subtração (1/100)

4.8. Caracterização e função hipotética dos cDNAs obtidos de *C. neoformans* após infecção experimental.

Os produtos diferencialmente expressos da condição de infecção por *C. neoformans* foi submetido ao seqüenciamento automático. Um total de 192 clones foi seqüenciado e destes, 148 foram de boa qualidade. Estes foram analisados e agrupados em oito *clusters*, com cinco *contigs* e três *singlets*. As seqüências (*contigs* e *singlets*) apresentaram homologia a oito proteínas que estão representadas na tabela 4.

Tabela 4. Análise dos clones sequenciados obtidos de *C. neoformans* da condição de infecção, após aplicação da técnica de RDA.

Contig	Blastx	e-value	Número de cópias	Número de acesso *
1	pyruvate decarboxylase (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21)	2e-30	35	XP_567475
2	low-affinity zinc ion transporter (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21)	2e-52	58	XP_570392
3	calcium ion transporter (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21)	6e-40	34	XP_567812
4	chaperone regulator (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21)	5e-25	16	XP_568298
5	Hypothetical protein CNM01150 (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21)	4e-13	2	XP_568404

Singlet	Blastx	e-value	Número de cópias	Número de acesso *
1	Hypothetical protein SNOG 04077 (<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15)	1e-10	1	EAT89282
2	DNA binding protein Ncp1 (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21)	6e-40	1	XP_567812
3	Hypothetical protein CNBM0020 (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> B-3501A)	4e-29	1	EAL17618

* Número de acesso do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.9. Confirmação da expressão diferencial por RT-PCR.

Para confirmação dos resultados por RT-PCR, foram desenhados iniciadores específicos para as ESTs que apresentaram maior redundância, entre elas: piruvato decarboxilase (35 ESTs), transportador de zinco (58 ESTs), transportador de cálcio (34 ESTs) e chaperona (16 ESTs). Após a amplificação dos produtos das duas condições (meio de cultura e recuperado de pulmão), foi possível comprovar a regulação aumentada dos transcritos na situação onde a levedura foi recuperada de tecido pulmonar em relação ao mantido em meio de cultura, para três dos quatro genes testados (transportador de zinco, transportador de cálcio e chaperona) (Figura 12). Os iniciadores para piruvato decarboxilase não amplificou em nenhuma das situações.

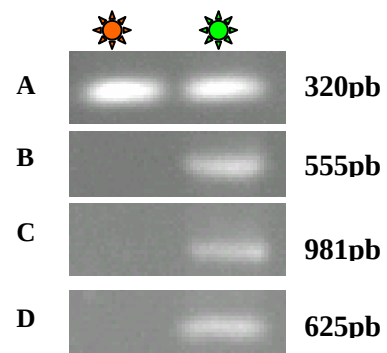


Figura 12. Confirmação dos resultados do RDA pela técnica de RT-PCR. **A** – Controle (actina); **B** - transportador de zinco; **C** - transportador de cálcio; **D** – regulador de chaperona.

☀ Meio de cultura

☀ Pulmão

5. DISCUSSÃO

A criptococose é doença fúngica importante que vem despertando interesse cada vez maior entre os pesquisadores devido a sua associação com os pacientes imunocomprometidos, em especial aqueles com Aids. Segundo o boletim, HIV/Aids das Nações Unidas e Organização Mundial da Saúde (<http://www.unaids.org/en/>), mais de 40 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo vírus HIV e cerca de três milhões morrem todos os anos. Considerado como um dos critérios para estabelecer o diagnóstico de Aids, a meningite criptocócica é a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central e a terceira complicação neurológica mais frequente entre os pacientes com a síndrome (DEL VALLE E PINA-OVIEDO, 2006). No Brasil, de 1980 a 2005, 371.827 casos de Aids foram relatados e estima-se que 5 a 10% destes pacientes são acometidos por esta micose (BRASIL, 2005).

A primeira parte de nosso estudo preocupou-se em verificar a prevalência dos principais tipos moleculares, *mating type* e sorotipos de isolados de *C. neoformans* do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro. Neste estudo, 106 isolados foram obtidos de 58 pacientes com doença associada ou não a Aids. Destes, 104 foram identificados como *C. neoformans var grubii*, sorotipo A e apenas dois pertencentes ao Estado do Rio de Janeiro foram identificados como *C. gattii*, consistente com a literatura mundial e também a nacional, de que *C. neoformans var grubii*, sorotipo A é prevalente entre os pacientes imunossuprimidos, principalmente os HIV positivos (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998; CASALI et al., 2003; NISHIKAWA et al., 2003; BARRETO de OLIVEIRA et al., 2004). A determinação das variedades foi realizada por métodos clássicos em meio CGB e confirmado por PCR utilizando seqüências iniciadoras específicas. Tradicionalmente, a identificação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* pode ser realizada em meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) em que só a espécie *C. gattii* é resistente a canavanina e é capaz de utilizar a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, levando a alcalinização do meio e sua mudança de cor. O aparecimento de isolados *C. neoformans* CGB falsos positivos (ou negativos) tem levado os pesquisadores a buscar métodos mais específicos para identificação dos isolados. As técnicas baseadas na PCR vem sendo uma ótima alternativa, mostrando-se, mais sensíveis, específicas e rápidas e sofrendo menos influência de fatores externos do que os métodos tradicionais baseados em aspectos fenotípicos (AOKI et al., 1999; LENGELER et al., 2001; D'SOUZA et al., 2004; LEAL, 2006). Em nosso estudo, a concordância entre os métodos clássicos e moleculares foi de 100%, ao contrário de Leal (2006) que encontrou discordância em seis (4,55%) de 132 isolados analisados, sendo os métodos moleculares mais específicos.

C. neoformans é basidiomiceto heterotático possuindo dois *mating types* opostos (α e *a*). O cruzamento envolve a fusão de células haplóides α e *a* e a formação de hifas dicarióticas e basídios

com quatro cadeias de basidiósporos (KWON-CHUNG, 1975). Apesar dos basidiósporos serem produzidos, na proporção de um α , para um a , o que se observa, tanto em isolados ambientais, quanto em isolados clínicos, é uma predominância quase absoluta do tipo α , em torno de 98-99,9% (LIN e HEITMAN, 2006). Em nosso estudo, a análise epidemiológica dos *mating types*, determinadas por PCR, mostrou prevalência de 100% de MAT α , quadro semelhante ao encontrado na literatura mundial e nacional (CASALI et al., 2003; TRILLES et al., 2003; LIN e HEITMAN, 2006; ABEGG et al., 2006). O motivo desta predominância não está bem claro. Estudos têm mostrado que a frutificação haplóide, nome que se dá a passagem da forma assexuada para a forma sexuada sem haver o encontro dos *mating types* opostos, ocorre predominantemente em cepas MAT α (WICKES et al., 1996; LIN e HEITMAN, 2006). Lin et al. (2005) verificaram que cepas do mesmo *mating type* (α) foram capazes de se fundirem e formarem hifas, basídios e basidiósporos, em um processo semelhante a frutificação haplóide, mas com meiose e, conseqüentemente, troca de material genético, característico de reprodução sexuada. Por fim, o tipo sexual parece exercer papel importante na virulência de *C. neoformans*, cepas que diferiam apenas em seu *mating type* foram comparadas em infecção experimental e as cepas MAT α foram mais virulentas do que as MAT a (KWON-CHUNG et al., 1992). Além disso, foi demonstrado que cepas MAT α invadem o sistema nervoso central com mais eficiência do que as MAT a , durante uma coinfeção (NIELSEN et al., 2005).

Neste estudo, os 106 isolados foram tipados por RAPD e PCR-*fingerprinting* com o iniciador (GACA)₄ e ainda confirmado por RFLP do gene PLB1. O tipo molecular VNI foi o mais prevalente entre os isolados (91,5% = 97/106), seguido pelo VNII (6,6% = 7/106) e por último o VGII com apenas dois isolados (1,9%). A tipagem molecular por RAPD, ao contrário do PCR-*fingerprinting*, mostrou maior polimorfismo, comprovada pela média de similaridade menor ($0,81 \pm 0,1$) comparada ao PCR-*fingerprinting* ($0,93 \pm 0,1$) e formação de maior número de clusters como observado no dendrograma. Além disso, foi observada a formação de um grupo (II) contendo isolados do tipo VNI junto com VNII e formação de grupos com isolados similares por PCR-*fingerprinting* e com baixa correlação por RAPD e vice versa (isolados do grupo III). Estudos epidemiológicos são essenciais para o entendimento da biologia e da estrutura populacional de um microorganismo. Vários métodos de tipagem molecular vêm sendo utilizados em análise epidemiológica de *C. neoformans*, como por exemplo, cariotipagem, PCR-*fingerprinting*, RAPD, RFLP e AFLP (BOEKHOUT et al., 1997; GARCIA-HERMOSO et al., 1999; BOEKHOUT et al., 2001; CALVO et al., 2001; CASALI et al., 2003; MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2003; BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004; IGREJA et al., 2004; DELGADO et al., 2005). As técnicas de PCR-*fingerprinting* com iniciadores mini (M13) ou microsatélite (GACA)₄ específicos e RFLP

dos genes PLB1 e URA5 vem sendo utilizados em levantamentos globais, dividindo os isolados em oito tipos moleculares principais, denominados VNI e VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A), VNIII (*C. neoformans*, sorotipo AD), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo D) e VGI a VGIV (*C. gattii*, sorotipos B e C) (MEYER et al., 1999; LATOUCHE et al., 2003; MEYER et al., 2003). Vários estudos têm verificado uma predominância do tipo molecular VNI tanto em isolados ambientais quanto em clínicos. Um estudo Iberoamericano realizado com cepas de nove países, incluindo o Brasil, mostrou prevalência do tipo VNI entre os 340 isolados tipados. Mais especificamente, 66 isolados do Brasil foram incluídos, sendo 44 da região sudeste, 11 da região sul e 11 da região nordeste, dentre estes, o tipo VNI foi predominante com 82,3% seguido do VGII (13,6%) e VNII (3,0%) (MEYER et al., 2003). Casali et al. (2003), em importante estudo na região sul do Brasil, investigaram 105 isolados clínicos e 19 ambientais e também verificaram predominância do VNI. Mais recentemente, Escandon et al. (2006) analisaram 425 isolados (178 clínicos e 247 ambientais) de *C. neoformans* da Colômbia, dentre estes, os mais predominantes foram o VNI (269 isolados), seguido do VGII (119) e com menor número de isolados, VGIII (22), VGIV (10), VNII (3) e VGI (1). Em nosso estudo, apenas dois isolados sequenciais de um paciente foram identificados como *C. gattii*, tipo molecular VGII. O tipo VGII tem chamado a atenção dos pesquisadores devido a um surto de criptococose causado por cepas hipervirulentas, acometendo humanos e também animais, em zonas temperadas, como em Vancouver Island, Canadá (STEPHEN et al., 2002; KIDD et al., 2004). A questão sobre a origem geográfica destas cepas e como elas chegaram ao Canadá é motivo de discussão. Quando um dos isolados, obtido durante o surto, foi comparado a dois dos EUA e um do Brasil pela técnica de *multilocus sequence typing* (MLST), mostrou-se 100% idêntico aos dos EUA e diferente em apenas um locus dos 30 analisados, quando comparado ao isolado brasileiro, abrindo a possibilidade de isolados da América do sul ser a origem do surto (FRASER et al., 2005). No presente trabalho, quatro isolados sequenciais de um paciente do Rio de Janeiro que formaram um terceiro grupo (III) e correlacionaram em 0,7 com os grupos I (VNI) e II (VNII), foram tipados como VNI por RFLP. Subpopulações de *C. neoformans*, em particular da variedade *grubii*, apresentando perfis genotípicos distintos e/ou limitados a uma região geográfica vem sendo relatados. Litvintseva et al., 2005, pela técnica de MLST, separaram mais de 1000 isolados de *C. neoformans* var. *grubii* em três grupos principais sendo que um destes grupos foram formados por isolados unicamente de Botswana, África. Em outro, Barreto de Oliveira et al. (2004), pela técnica de AFLP, encontraram grande diversidade genética entre os isolados brasileiros, incluindo um subgrupo novo entre os isolados da var. *grubii*. A estrutura genética de *C. neoformans* é bastante complexa e o emprego de novos iniciadores, bem como, outras técnicas moleculares são importantes e necessários para elucidar sua epidemiologia. No Estado do Rio Grande do Sul, a variabilidade genética de isolados

clínicos e ambientais foi testada por 22 iniciadores aleatórios, dentre estes, oito comprovaram o polimorfismo (HORTA et al., 2002). Em outro estudo, IGREJA et al. (2004) identificaram numerosos subtipos entre isolados sequenciais recuperados de pacientes com Aids. Recentemente, 83 isolados de várias regiões do Estado de São Paulo foram tipados por cariotipagem eletroforética e RAPD, 22 e 15 perfis foram encontrados, respectivamente (ALMEIDA et al., 2006).

A tipagem molecular é potencialmente útil em esclarecer casos de recidivas por persistência da cepa ou reinfecção por uma nova cepa, demonstrando os graus de relação entre os isolados no início e em infecções posteriores de um mesmo paciente. Vinte e sete dos 58 pacientes selecionados para este estudo, possuíam isolados sequenciais. Destes, apenas cinco tiveram mudanças no perfil genético. No entanto, com exceção de um paciente, o qual foi infectado pelos tipos moleculares VNI e VNII, os quatro restantes apresentaram coeficiente de similaridade alta $> 0,9$. Estes resultados sugerem que a persistência da cepa seja a maior responsável pelas recaídas dos pacientes, mais do que a reinfecção por uma nova cepa. No Brasil, isolados seriais de *C. neoformans*, recuperados em diferentes intervalos de tempo e também de sítios diferentes (sangue e líquido), foram analisados por PCR-*fingerprinting* e RAPD, para verificar se ocorre persistência ou reinfecção por uma nova cepa e se ocorre coinfeção por duas cepas diferentes. Os resultados sugeriram que a persistência da cepa é a maior responsável pelos relapsos e que em alguns casos, podem ocorrer coinfeção por cepas diferentes (IGREJA et al., 2004). A identificação de pequenas mudanças no perfil genético é de grande importância, pois pode ser indicativo de microevolução, que por sua vez, pode traduzir em mudanças fenotípicas como, por exemplo, na virulência, na resistência a antifúngicos ou na alteração à resposta imune do hospedeiro (JAIN et al., 2005). Fries e Casadevall (1998), comparando isolados sequenciais que apresentaram mudança no perfil de cariótipo, verificaram diferenças na virulência em animais de laboratório, bem como, na capacidade de crescimento a 37°C e na produção da cápsula. Em outro, uma cepa padrão, mantida *in vitro* por longo período de tempo em seis laboratórios diferentes, da mesma forma, apresentaram diferenças nos perfis de cariótipo associados às mudanças de virulência, na morfologia colonial, na produção de cápsula, na melanização e na produção de proteinases extracelulares (FRANZOT et al., 1998). Mais recentemente, Jain et al. (2005) pelas técnicas de cariotipagem eletroforética e RFLP e Almeida et al., (2006) por cariotipagem e RAPD, verificaram entre isolados sequenciais, evidências de microevolução associados à diminuição da sensibilidade a antifúngicos e também de coinfeção por duas cepas diferentes.

A meningite criptocócica é a forma clínica mais comum e a mais importante da doença, apresentando alto índice de letalidade, se tratada tardiamente (CASADEVALL e PERFECT, 1998). O tratamento dos pacientes HIV+ com a terapia antiretroviral provocou uma queda no índice de

criptococose, no entanto, a doença pode se manifestar mesmo durante este tratamento e o prognóstico continua a ser desfavorável (DROMER et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2005). O tratamento de escolha para esta infecção, consiste na terapia primária com anfotericina B conjugada ou não a 5-fluorocitosina, seguida de manutenção com fluconazol por tempos prolongados (SAAG et al., 2000). Entretanto, a taxa de letalidade continua consideravelmente alta, em torno de 9,4% (VAN Der HOST et al., 1997). Por outro lado, taxas altas de persistência e freqüentes recidivas da doença têm causado uma preocupação crescente entre os clínicos a respeito do potencial para o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos (BERG et al., 1998; BRANDT et al., 1996). Em vista disto, pretendeu-se determinar os perfis de sensibilidade a quatro drogas antifúngicas por métodos padronizados de microdiluição (CLSI) portaria M27A-2. Valores de CIM relativamente altos foram encontrados entre os isolados clínicos testados neste estudo, provenientes do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro, podendo ser verificada pelos percentuais de isolados, com perfis de sensibilidade dose-dependente (azóis) e intermediários (5-fluorocitosina). Além disso, um percentual significativo de isolados com CIM $\geq 1\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B foi encontrado (18,9%), no entanto, o ponto de corte para esta droga ainda não foi estabelecido. Trabalhos anteriores têm considerado o ponto de corte $\geq 2\mu\text{g/mL}$ como o de isolados resistentes (NGUYEN e YU, 1998; LOZANO-CHIU et al., 1998; PFALLER et al., 2005b). Assim, se levarmos em conta apenas àqueles isolados que apresentaram CIM $\geq 2\mu\text{g/mL}$, tivemos em nosso trabalho, apenas um (1) isolado resistente (0,9% - paciente 22, isolado 93), concordando com o trabalho realizado por Pfaller et al. (2005b), em que analisaram 1811 isolados clínicos provenientes de cinco regiões globais no período de 1990 a 2004 e verificaram que menos de 1% dos isolados, foram resistentes a fluconazol ($\geq 64\mu\text{g/mL}$) e anfotericina B ($\geq 2\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, a prevalência de isolados resistentes a 5-fluorocitosina observado neste trabalho (30,2%), foi discordante do trabalho anterior, porém concordante aos trabalhos de Pappalardo et al. (1998) e Pedroso et al. (2006). Recentemente, 16 isolados ambientais de *C. neoformans*, 17 de *C. albidus*, 14 de *C. laurentii*, e 3 de *C. uniguttulatus*, obtidos na região de Ribeirão Preto, foram avaliados com as mesmas quatro drogas testadas neste trabalho, sendo que a 5-fluorocitosina foi a que apresentou maior índice de resistência, independente da espécie avaliada (PEDROSO et al., 2006). Quanto aos azóis, muitos estudos apontam que a maioria dos isolados humanos de *C. neoformans* é suscetível *in vitro* ao fluconazol e ao itraconazol (DATTA et al., 2003; PAPPALARDO e MELHEM, 2003; KOBAYASHI et al., 2005; SOUZA et al., 2005; PFALLER et al., 2005; TAY et al., 2006). Na Índia, 84,1% e 93,2% dos 44 isolados obtidos no Centro de Ciências Médicas foram sensíveis ao fluconazol e itraconazol, respectivamente (DATTA et al., 2003). Tay et al., (2006) na Malásia, determinaram a CIM por e-test para cinco drogas (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e 5-fluorocitosina) em 48 isolados (30 *C. neoformans* e 18 *C. gattii*). Nenhum isolado

foi resistente a anfotericina B e cetoconazol, mas para 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol, foram encontrados resistência em 4 (8.3%), 2 (4.2%) e 1 isolado (2.1%), respectivamente. No Brasil, de acordo com Pappalardo (2003), a maioria dos isolados são sensíveis a fluconazol e itraconazol, por outro lado, o índice de resistência a 5-fluorocitosina pode atingir até 50%. Kobayashi et al. (2005) testaram a sensibilidade a anfotericina B, itraconazol e fluconazol em 36 isolados ambientais de *C. neoformans* e não encontraram nenhuma cepa resistente. Souza et al. (2005), da mesma forma, não encontraram resistência entre os 110 isolados testados (70 clínicos e 40 ambientais) com anfotericina B, itraconazol, fluconazol e ravuconazol, entretanto, foram observadas CIMs maiores entre os isolados clínicos comparado aos ambientais. Em nosso estudo, apenas o paciente 3 do Rio de Janeiro apresentou variação significativa de CIM para fluconazol de 2 para 64 µg/mL, dentre os 27 pacientes com isolados sequenciais neste estudo. Todos os isolados pertenciam ao mesmo tipo molecular, sugerindo que pode ter ocorrido adaptação da cepa durante a terapia, resultando em aumento da resistência à droga, como já relatado em trabalhos anteriores (FRIESE et al., 2001; RODERO et al., 2003). A epidemiologia de *C. neoformans* é bastante complexa e tem sido amplamente estudada no mundo inteiro dado a sua importância como um dos principais patógenos associados a pacientes imunocomprometidos. No Brasil, a população de pessoas HIV⁺ é grande (>300.000), entretanto, os dados epidemiológicos sobre a criptococose e seu agente etiológico, associada a este grupo de pessoas, ainda são escassos e insuficientes. Assim, cremos que neste estudo trouxemos informações importantes sobre a epidemiologia de *C. neoformans*, enriquecendo os dados epidemiológicos nacionais existentes.

Mais recentemente, vários fatores de virulência foram identificados como importantes para a patogenia de *C. neoformans*, dentre estes, os três mais estudados são a capacidade de crescimento a 37°C, a produção de melanina e a cápsula polissacarídica, além de *mating type*, enzimas e moléculas de sinalização celular (CASADEVALL e PERFECT, 1998; IDNURM et al., 2005). *C. neoformans* é levedura de distribuição ubiquitária com grande capacidade de adaptação. A exposição aos esporos ou células com pouca cápsula leva a um quadro de infecção que pode ser assintomático e rapidamente curado ou permanecer latente no pulmão por longo período de tempo na forma de granuloma. Em pacientes imunocomprometidos, o fungo pode disseminar dos pulmões para outros órgãos, atingindo principalmente, o sistema nervoso central causando a meningoencefalite que é fatal se não tratada (IDNURM et al., 2005). Por outro lado, a forma pulmonar é pouco descrita e esta fase pode ser pouco percebida e mesmo não diagnosticada. Portanto, o estudo dos prováveis genes envolvidos durante a infecção pulmonar é de grande importância para compreender os mecanismos de interação iniciais entre a levedura e o hospedeiro. A meningite criptocócica ainda é problemática neste grupo de pessoas e esta identificação poderá redundar em novas abordagens para circunscrever o processo de

disseminação. A técnica de RDA foi empregada neste estudo, buscando caracterizar cDNA diferencialmente expressos durante a infecção de *C. neoformans*, após recuperação da cepa de tecido pulmonar. Esta metodologia foi empregada com sucesso para estudar a interação parasito-hospedeiro em outros fungos como *Paracoccidioides brasiliensis* (BAILÃO et al., 2006), mas em *C. neoformans*, até o momento, não temos conhecimento de trabalho algum, enfocando esta interação inicial. Neste estudo, oito transcritos foram identificados na condição de infecção, sendo que quatro delas apresentaram maior redundância (transportador de zinco, transportador de cálcio, chaperona e piruvato decarboxilase).

O zinco é importante nutriente que, embora em pequena quantidade, é necessário para a proliferação celular (LULLOFF et al., 2004). Por outro lado, a disponibilidade deste nutriente em condição de infecção, é grandemente diminuída por ação de neutrófilos que apresentam em seu citoplasma, uma proteína com atividade antimicrobiana que se liga ao zinco, privando a sua utilização pelo microorganismo (MAMBULA et al., 2000; LULLOFF et al., 2004). Steen et al. (2003), utilizando a técnica de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) para caracterizar expressão de genes de *C. neoformans* recuperados do sistema nervoso central de coelhos, verificou expressão aumentada de transportadores de zinco, sugerindo um papel importante para a sua sobrevivência no hospedeiro. O transporte de metais, tais como, ferro, cobre e zinco, são importantes para a função de muitas proteínas, pois eles estabilizam a estrutura protéica e facilitam as reações de oxiredução (RADISKY e KAPLAN, 1999). Neste sentido, embora, em nosso estudo, não tenhamos encontrado nenhuma enzima relacionada à detoxificação celular, é possível que indiretamente, a expressão aumentada de transportador de zinco, seja reflexo, de uma maior necessidade de enzimas que eliminem espécies reativas de oxigênio, tais como a superóxido dismutase citosólica que é uma enzima Cu/Zn dependente importante para detoxificação da célula durante o metabolismo oxidativo e o *burst* respiratório na resposta imune e ainda considerado como um fator de virulência em potencial (COX et al., 2003; NARASIPURA et al., 2003; NARASIPURA et al., 2005; DIAS et al., 2006).

Outro transportador encontrado em nosso estudo que apresentou alta redundância foi o de cálcio. Assim como o transportador de zinco, é possível que outras moléculas dependentes de cálcio estejam envolvidas, como por exemplo, a calcineurina que é uma fosfatase ativada por Ca^{+2} /calmodulina. Vários estudos têm demonstrado que a atividade de calcineurina e o influxo de cálcio na célula são interrelacionados e rigorosamente controlados para que possam exercer suas funções na adaptação do fungo frente a mudanças do ambiente, na regulação da morfogênese e na patogenicidade (FOX e HEITMAN, 2002). Em *C. neoformans*, a enzima parece ter papel fundamental para o crescimento a 37°C, para a filamentação e para a virulência em animais de laboratório (ODOM et al., 1997; CRUZ et al., 2000; FOX et al., 2001; CRUZ et al., 2001; FOX et al., 2003;

KRAUS e HEITMAN, 2003; KRAUS et al., 2005). Kraus et al. (2003), verificaram que cepas que tiveram a atividade da calcineurina rompida (por mutação ou por uso de inibidor), apresentaram mudanças na expressão de genes envolvidos em biossíntese de parede, sugerindo papel importante da calcineurina para manutenção da integridade da parede celular.

Outra proteína com alta redundância encontrada em nosso trabalho, foi o regulador de chaperona (= *heat shock protein*) que regula a atividade de um grupo de proteínas *Heat shock protein* (HSP) com massa molecular em torno de 70KDa. As HSP são produzidas pelas próprias células em resposta a condições de estresse, permitindo a sobrevivência do microrganismo em ambientes ou em situações hostis (GARRIDO et al., 2001; PARCELLIER et al., 2003). Estas , coordenam o armazenamento e liberação de proteínas, a degradação de proteínas instáveis, auxiliam na prevenção de agregação protéica e também no transporte interno das mesmas (STEEN et al., 2003). Em *C. neoformans*, as HSP70 parecem ser altamente imunogênicas (Kakeya et al., 1999; Burnier et al., 2006). Kakeya et al. (1997 e 1999), analisando a resposta imune em murinos e em humanos com criptococose pulmonar, verificaram que as HSP70 eram os principais alvos da resposta humoral. Steen et al. (2003), avaliando a expressão de genes em coelhos com meningite criptocócica, também verificaram regulação aumentada de HSP70. Um fato interessante é que, ao contrário do teste *in vivo*, *in vitro* não houve expressão aumentada quando cultivado a 37°C, não só da HSP70, mas também das HSP60 e HSP90 (STEEN et al., 2002), sugerindo a existência de outros fatores de estresse que estimulem uma maior transcrição destes genes. Ainda no mesmo trabalho, foi verificado que outro fator poderia ser a privação de ferro que ocorre durante a infecção no hospedeiro. Esta privação pode, por sua vez, ser resultante da ação de neutrófilos num mecanismo de ação semelhante ao da privação de zinco (LULLOFF et al., 2004).

Por fim, foi encontrada alta redundância para a enzima piruvato decarboxilase, cuja função está relacionada ao metabolismo de carboidratos. Em *C. neoformans*, especificamente, esta enzima faz parte da via de neoglicogênese, produzindo 2-(alfa-hidroxietil) tiamina difosfato (= 2-hidroxietil-ThPP) e acetaldeído (anexo 4). A expressão aumentada de piruvato decarboxilase vem sendo relatada, não só em condição de infecção ou estresse, mas também em condições ideais de crescimento (STEEN et al., 2002 e 2003; LIAN et al., 2005). O fato dos produtos 2-hidroxietil-ThPP e acetaldeído serem, por sua vez, substratos para uma ampla variedade de enzimas pertencentes a outras vias metabólicas, explicaria em parte esta questão, porém maiores investigações são necessárias para se estabelecer, com mais exatidão, quais fatores estimulam a expressão deste gene. Ao contrário de trabalhos realizados por Dutra et al., 2004, por Bailão et al. (2006) e recentemente por Baeza (2006), neste trabalho foi encontrada uma variabilidade menor de proteínas (oito tipo de proteínas), após a pesquisa no banco de dados (BLASTx). Este fato inesperado pode ter ocorrido devido à passagem da cepa (recuperada do pulmão) pelo meio de

cultura ou talvez pelo número relativamente baixo de seqüências analisadas. A interação fungo-hospedeiro durante a infecção criptocócica é extremamente complexa e ainda não foi suficientemente explorada. Neste sentido, os dados obtidos neste trabalho podem contribuir para um melhor entendimento desta interação.

6. CONCLUSÕES

1. A maioria dos isolados (104/106 = 98,1%) foi identificado por PCR como *C. neoformans* var. *grubii*.
2. A técnica de RAPD com o iniciador 6 foi mais discriminatória do que o PCR-*fingerprinting* com (GACA)₄.
3. O tipo molecular VNI (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A) foi o mais prevalente entre os isolados (91,5%), seguido do VNII (6,6%) e VGII (1,9%), identificados por PCR-RFLP do gene PLB1 e PCR-*fingerprinting* com (GACA)₄.
4. O tipo sexual MAT α foi 100% prevalente entre os isolados estudados.
5. Os azóis foram eficazes contra os isolados de *C. neoformans*. Apenas dois isolados foram resistentes (um para fluconazol e um para itraconazol).
6. 5-fluorocitosina, ao contrário dos azóis, mostrou menor atividade com alta prevalência de isolados intermediários e resistentes.
7. Número expressivo de isolados (20 isolados) com CIM $\geq 1\mu\text{g/mL}$ a anfotericina B foi observado.
8. Houve diferenças significativas dos perfis de sensibilidade a 5-fluorocitosina e anfotericina B entre os Estados de São Paulo e Rio de Janeiro.
9. Foi observada transcrição aumentada de genes, possivelmente, relacionados aos fatores de virulência ou a mecanismos de sobrevivência no hospedeiro (transportadores de cálcio e de zinco).
10. Transcrição aumentada foi também observada em genes relacionados a estresse (chaperona), bem como, a neoglicogênense.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL SALAM, H.A. In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Egypt to seven antifungal drugs. **Mycoses**, v. 48, p. 327-332, 2005.
- ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, p. 83-91, 2006.
- AJELLO, L. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. **Am. J. Hyg.**, v. 67, p. 72-77, 1958.
- ALMEIDA, A.M.F.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C.; DE OLIVEIRA E SILVA, R.B.; KLEINER, A.A.P.; MELHEM, M.S.C.; MENDES GIANNINI, M.J.S. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Res.**, 2006 (*in press*).
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, G.A. **Comparação entre isolados ambientais e clínicos e *Cryptococcus neoformans* do Estado de São Paulo quanto aos aspectos genotípicos e de patogenicidade**. 2003. 97f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2003.
- 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, p. 315-320, 1999.
- BAEZA, L.C. **Análise de genes diferencialmente expressos por *Trichophyton rubrum* na presença de queratina e tipagem molecular**. 2006. 81f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2006.
- BAILAO, A.M.; SCHRANK, A.; BORGES, C.L.; DUTRA, V.; WALQUIRIA INES MOLINARI MADLUM, E.E.; SOARES FELIPE, M.S.; SOARES MENDES-GIANNINI, M.J.; MARTINS, W.S.; PEREIRA, M.; MARIA DE ALMEIDA SOARES, C. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect.**, 2006 (*in press*).
- BANERJEE, U.; DATTA, K.; CASADEVALL, A. Serotype distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients in a tertiary care center in India. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 181-186, 2004.
- BARCHIESI, F.; SCHIMIZZI, A.M.; NAJVAR, L.K.; BOCANEGRA, R.; CASELLI, F.; DI CESARE, S.; GIANNINI, D.; DI FRANCESCO, L.F.; GIACOMETTI, A.; CARLE, F.; SCALISE,

- G.; GRAYBILL, J.R. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 1355-1359, 2001.
- BARONI, F.D.E.A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.; OLIVEIRA, M.T.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 482, p. 71-75, 2006.
- BARQUIST, E.; FEIN, E.; SHADICK, D.; JOHNSON, J.; CLARK, J.; SHATZ, D.A. Randomized prospective trial of amphotericin B lipid emulsion versus dextrose colloidal solution in critically ill patients. **J. Trauma**, v. 47, p. 336-340, 1999.
- 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, p. 1356-1359, 2004.
- BAUWENS, L.; VERCAMMEN, F.; WUYTACK, C.; VAN LOOVEREN, K.; SWINNE, D. Isolation of *Cryptococcus neoformans* in Antwerp Zoo's nocturnal house. **Mycoses**, v. 47, p. 292-296, 2004.
- BAWENS, L.; SWUINNE, D.; DEVROEY, C.; MEURICHY, D. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. **Mykosen**, v. 29, p. 292-294, 1986.
- BENHAM, R.W. Cryptococci-their identification by morphology and by serology. **J. Infect. Dis.**, v. 57, p. 255-274, 1935.
- BENHAM, R.W. Cryptococcosis and blastomycosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci. USA**, v. 50, p. 1299-1314, 1950.
- BENNETT, J.E.; DISMUKES, W.E.; DUMA, R.J.; MEDOFF, G.; SANDE, M.A.; GALLIS, H.; LEONARD, J.; FIELDS, B.T.; BRADSHAW, M.; HAYWOOD, H.; MCGEE, Z.A.; CATE, T.R.; COBS, C.G.; WARNER, J.F.; ALLING, D.W. A Comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 301, p. 126-131, 1979.
- BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J.; THEODORE, T.S. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia**, v. 16, p. 167-174, 1978.
- BERG, J.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, 186-187, 1998.
- BHARTTACHARJEE, A.K.; BENNETT, J.E.; GLAUDEMANS, C. P. J. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, p. 619-624, 1984.
- BLOOMFIELD, B.J.; ALEXANDER, M. Melanins and resistance of fungi to lysis. **J. Bacteriol.**, v. 93, p. 1276-1280, 1967.

- BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 147-149, 1997.
- BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J.W.; HOP, W.C.J.; ALBERTIN, E.C.A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hibrid genotypes in pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, p. 891-907, 2001.
- BOEKHOUT, T.; VAN BELKUM, A. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. **Curr. Genet.**, v. 32, p. 203-208, 1997.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E.E.; DIAZ, M.R.; SPANJAARD, L.; DROMER, F.; HOOGVELD, H.L.; BOEKHOUT, T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast. Res.**, v. 6, p. 599-607, 2006.
- BRANDT, M.E.; HUTWAGENER, L.C.; KLUG, L.A.; BAUGHMAN, W.S.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E.D.; HAMILL, R.J.; THOMAS, C.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; PINNER, R.W. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. **J. Clin. Microb.**, v. 34, p. 912-917, 1996.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e Aids**. 2005. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>. Acesso em: 6 set. 2006.
- 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. 263, p. 1764-1767, 2004.
- BULL, A.T.; CARTER, B.L. The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans*, Its kinetic and molecular properties and some consideration of its activity in vivo. **J. Gen. Microbiol.**, v. 75, p. 61-73, 1973.
- BURNIER, J.P.; CARTER, T.L.; HODGETTS, S.J.; MATTHEWS, R.C. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 30, p. 53-88, 2006.
- BUTLER, M.J.; DAY, A.W.; HENSON, J.M.; MONEY, N.P. Pathogenic properties of fungal melanins. **Mycologia**, v. 93, p. 1-8, 2001.
- CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI BRANCHINI, L. Antifungal susceptibilities, varieties and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2348-2350, 2001.
- CASADEVALL, A.; FREUNDLICH, L.; MARSH, L.; SCHARFF, M.D. Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1080-1084, 1992.

- CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1998. 541p.
- CASADEVALL, A.; SPITZER, E.; WEEB, D.; RINALDI, M. Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to anfotericin B and fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 1383-1386, 1993.
- 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, p. 332-337, 2003.
- CASALI, A.K.; GOULART, L.; SILVA, L.K.R.; RIBEIRO, A.M.; AMARAL, A.A.; ALVES, S.H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res.**, v. 3, p. 405-415, 2003.
- CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol. Cel. Biol.**, v. 14, p. 4912-4919, 1994.
- 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, 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, 1999.
- CHANG, Y.C.; MILLER, G.F.; KWON-CHUNG, K.J. Importance of a developmentally regulated pheromone receptor of *Cryptococcus neoformans* for virulence. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4953-4960, 2003.
- 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, p. 1977–1983, 1996.
- 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.
- CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; MCCLELLAND, C.M.; WICKES, B.L.; CHATURVEDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MATa pheromone to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2007-2009, 2000.
- CHEN, L.C.; BLANK, E.S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 3, p. 570-574, 1996.
- CHEN, S.C. Cryptococcosis in Australasia and the treatment of cryptococcal and other fungal infections with liposomal amphotericin B. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, p. 57-61, 2002.

CHERNIAK, R.; SUDSTROM, J.B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1507-1512, 1994.

CHUCK, S.L.; SANDE, M.A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, p. 794-799, 1989.

CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H.; ALANDOERFFER, R.; CHENG, S.; ICZKOWSKI, K.; RICHARDSON, M.; GRAYBILL, J.R. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors. **Microbiology**, v. 152, p. 2247-2255, 2006.

CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras**: Norma aprovada. 2. ed. Brasília, DF, 2002. p. 1-51. (CLSI Documento M27-A2. v. 22, n. 15)

COLOM, M.F.; FRASES, S.; FERRER, C.; MARTIN MAZUELOS, E.; HERMOSO DE MENDOZA, M.; TORRES RODRIGUEZ, J.M.; QUINDOS, G. Epidemiological study of cryptococcosis in Spain: first results. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, p. 99-104, 2001.

CORRÊA, M.P.S.C.; OLIVEIRA, E.C.; DUARTE, R.R.B.S.; PARDAL, P.P.O.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 505-508, 1999.

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, p. 166-175, 2001.

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

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, p. 173-180, 2003.

CRAMPIN, A.C.; MATTHEWA, R.C.; HALL, D.; EVANS, G.V. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 463-465, 1993.

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, p. 1020-1032, 2001.

- CRUZ, M.C.; SIA, R.A.; OLSON, M.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 982-985, 2000.
- CURRIE, B.; VIGUS, T.; LEACH, G.; DWYER, B. *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. **Lancet.**, v. 336, p. 1442, 1990.
- CURTIS, F. Note sur un nouveau parasite humain, megalococcus myxoides, trouvé dans un neoplasme de la région inquino-crucole. **C. R. Soc. Biol. (Paris)**, p. 715-718, 1895.
- DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, p. 21-26, 2000.
- DATTA, K.; JAIN, N.; SETHI, S.; RATTAN, A.; CASADAVELL, A.; BANERJEE, U. Fluconazole and itraconazole susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* at a tertiary care center in India: a need for care. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 683-686, 2003.
- DAVEL, G.; ABRANTES, R.; BRUDNY, M.; CORDOBA, S.; RODERO, L.; CANTEROS, C.E.; PERROTTA, D. 1st environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 35, p. 110-112, 2003.
- DEL SAL, G.; MANFIOLETTI, G.; SCHNEIDER, C. The CTAB-DNA precipitation method: A common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. **BioTechniques**, v. 7, p. 514-519, 1989.
- DEL VALLE, L.; PINA OVIEDO, S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. **Front. Biosci.**, v. 11, p. 718-732, 2006.
- DELGADO, A.C.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M.C.; MORETTI, M.L. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, v. 159, p. 7-11, 2005.
- DIAS, A.L.; BRIGAGAO, M.R.; COLEPICOLA, P.; SIQUEIRA, A.M.; SILVA, E.G.; PAULA, C.R. Superoxide dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubii*, and *neoformans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 107-109, 2006.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, p. 6025-6030, 1996.
- DIAZ, M.R.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; FELL, J.W. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 535-545, 2000.
- DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; BRUGIERE, O.; LETENNEUR, L.; THE FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. Comparison of the efficacy of amphotericin B

- and fluconazole in the treatment of cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients: Retrospective analysis of 83 cases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 154-160, 1996.
- DROMER, F.; MATHOULIN PELISSIER, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B.; LORTHOLARY, O.; FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. **AIDS.**, v. 20, p. 555-562, 2004.
- DROUHET, E. Milestones in the history of cryptococcus and cryptococosis. **J. Mycol. Med.**, v. 7, p. 10-27, 1997.
- 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, p. 92-102, 2004.
- DUFAIT, R.; VELHO, R.; DE VROEY, C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. **Mycoses**, v. 30, p. 483, 1987.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SILVEIRA SCHRANK, I.; HENNING VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 245-51, 2004.
- EGGERT, C.; TEMP, U.; ERICKSSON, K.E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1151-1158, 1996.
- ELLIS, D.H. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 430-431, 1987.
- ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 1642-1644, 1990.
- EMMONS, C.W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **J. Bacteriol.**, v. 62, p. 685-690, 1951.
- EMMONS, C.W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **Am. J. Hyg.**, v. 62, p. 227-232, 1955.
- ERGIN, C.; ILKIT, M.; HILMIOGLU, S.; KALELI, I.; GULBABA, A.G.; DEMIRCI, M.; KAYA, S. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from eucalyptus trees in South Aegean and Mediterranean Regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. **Mycopathologia**, v. 158, p. 43-47, 2004.
- ESCANDON, P.; SANCHEZ, A.; MARTINEZ, M.; MEYER, W.; CASTANEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species

- complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 625-635, 2006.
- ESSER, K. Phenoloxidases in the ascomycete *Podospira anserine*. The identification of laccase and tyrosinase in the wild strain. **Arch. Mikrobiol.**, v. 46, p. 217-226, 1963.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDI, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using PHRED, I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FERNANDES, O.F.; COSTA, T.R; COSTA, M.R; SOARES, A,J.; PEREIRA, A.J.; SILVA, Mdo R. *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, p. 75-78, 2000.
- FILIÚ, W.F.O.; MACEDO, C.L.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 591-595, 2002.
- FLING, M.; HOROWITZ, N.H.; HEINEMANN, S.F. The isolation and properties of crystalline tyrosinase from *Neurospora*. **J. Biol. Chem.**, v. 238, p. 2045-2053, 1963.
- FORTES, S.T.; LAZERA, M.S.; NISHIKAWA, M.M.; MACEDO, R.C.L.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, v. 44, p. 137-140, 2001.
- FOX, D.S.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Phospholipid-binding protein Cts1 controls septation and functions coordinately with calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot. Cell**, v. 2, p. 1025-1035, 2003.
- FOX, D.S.; CRUZ, M.C.; SIA, R.A.; KE, H.; COX, G.M.; CARDENAS, M.E.; HEITMAN, J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 835-849, 2001.
- FOX, D.S.; HEITMAN, J. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. **Bioassays**, v. 24, p. 894-903, 2002.
- 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, 1999.
- FRANZOT, S.P.; MUKHERJEE, J.; CHERNIAK, R.; CHEN, L.C.; HANDAM, J.S.; CASADEVALL, A. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 89-97, 1998.
- FRASER, J.A.; GILES, S.S.; WENINK, E.C.; GEUNES BOYER, S.G.; WRIGHT, J.R.; DIEZMANN, S.; ALLEN, A.; STAJICH, J.E.; DIETRICH, F.S.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 27, p. 1360-1364, 2005.

- FRIEDMAN, G.D.; JEFFREY FESSEL, W.; UDALTSOVA, N.V.; HURLEY, L.B. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. **Mycoses**, v. 48, p. 122-125, 2005.
- FRIES, B.C.; CASADEVALL, A. Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. **J. Infect. Dis.**, v. 178, p. 1761-1766, 1998.
- FRIESE, G.; DISCHER, T.; FUSSLE, R.; SCHMALRECK, A.; LOHMEYER, J. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. **AIDS**, v. 15, p. 2344-2345, 2001.
- FROMTLING, R.A.; SHADOMY, H.J.; JACOBSON, E.S. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 23, p. 23-29, 1982.
- GARCIA HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3204-3209, 1999.
- GARRIDO, C.; GURBUXANI, S.; RAVAGNAN, L.; KROEMER, G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 286, p. 433-442, 2001.
- GEZUELLE, E.; CALEGARI, L.; SANABRIA, D.; DAVEL, G.; CIVILA, E. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis* **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 10, p. 5-6, 1993.
- GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 122-143, 2000.
- GOKULSHANKAR, S.; RANGANATHAN, S.; RANJITH, M.S.; RANJITHSINGH, A.J. Prevalence, serotypes and mating patterns of *Cryptococcus neoformans* in the pellets of different avifauna in Madras, India. **Mycoses**, v. 47, p. 310-314, 2004.
- GRAYBILL, J.R.; MONTALBO, E.; KIRKPATRICK, W.R.; LUTHER, M.F.; REVANKAR, S.G.; PATTERSON, T.F. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 2938-2942, 1998.
- GREEN, P. PHRAP Documentation. University of Washington, Seattle, WA, USA. [<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>]. Accessed March 2001.
- GRISEO, G.; BOLIGNANO, M.S.; DE LEO, F.; STAIB, F. Evidence of canary droppings as an important reservoir *Cryptococcus neoformans*. **Zentralbl. Bakteriell.**, v. 282, p. 244-254, 1995.
- GUGNANI, H.C.; MITCHELL, T.G.; LITVINTSEVA, A.P.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J.; KUMAR, A.; BASU, S.; PALIWAL JOSHI, A. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of eucalyptus trees in India. **Med. Mycol.**, v. 43, p. 565-569, 2005.

- HAHN, R.C.; MACEDO, A.M.; FONTES, C.J.; BATISTA, R.D.; SANTOS, N.L.; HAMDAN, J.S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2849-2854, 2003.
- HERSKOWITZ, I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. **Cell**, v. 80, p. 187-197, 1995.
- HILL, Z.H. The function of melanin or six blind people examine an elephant. **Bioassays**, v. 14, p. 49-56, 1992.
- HOANG, L.M.; MAGUIRE, J.A.; DOYLE, P.; FYFE, M.; ROSCOE, D.L. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): Epidemiology, microbiology and histopathology. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 935-940, 2004.
- 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, p. 565-571, 2002.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, v. 9, p. 868-877, 1999.
- HUBANK, M.; SCHATZ, D.G. cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. **Methods Enzymol.**, v. 303, p. 325-349, 1999.
- HUBANK, M.; SCHATZ, D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic. Acids Res.**, v. 22, p. 5640-5648, 1994.
- HUFFNAGLE, G.B.; CHEN, G.H.; CURTIS, J.L.; MACDONALD, 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. 155, p. 3507-3516, 1995.
- ICHISHIMA, E.; MAEBA, H.; AMIKURA, T.; SAKATA, H. Multiple forms of protyrosinase from *Aspergillus oryzae* and their mode of activation at pH 3.0. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 786, p. 25-31, 1984.
- IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 753-764, 2005.
- IGREJA, R.P.; LAZERA, M.S.; WANKE, B.; GALHARDO, M.C.; KIDD, S.E.; MEYER, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 229-238, 2004.

- 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, p. 22-29, 1982.
- JACOBSON, E.S.; AYERS, D.J.; HARREL, A.C.; NICHOLAS, C.C. Genetic and phenotypes characterization of capsule mutants of *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.**, v. 150, p. 1292-1296, 1982.
- JACOBSON, E.S.; TINNELL, S.B. Antioxidant function of fungal melanin. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7102-7104, 1993.
- JAIN, N.; WICKES, B.L.; KELLER, S.M.; FU, J.; CASADEVALL, A.; JAIN, P.; RAGAN, M.A.; BANERJEE, U.; FRIES, B.C. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5733-5742, 2005.
- JOSEPH HORNE, T.; LOEFFLER, R.S.T.; HOLLOMON, D.W.; KELLY, S.L. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34, p. 223-225, 1996.
- KAKEYA, H.; UDONO, H.; IKUNO, N.; YAMAMOTO, Y.; MITSUTAKE, K.; MIYAZAKI, T.; TOMONO, K.; KOGA, H.; TASHIRO, T.; NAKAYAMA, E.; KOHNO, S. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1653-1658, 1997.
- KAKEYA, H.; UDONO, H.; MAESAKI, S.; SASAKI, E.; KAWAMURA, S.; HOSSAIN, M.A.; YAMAMOTO, Y.; SAWAI, T.; FUKUDA, M.; MITSUTAKE, K.; MIYAZAKI, Y.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; NAKAYAMA, E.; KOHNO, S. Heat shock protein 70 (hsp70) as a major target of the antibody response in patients with pulmonary cryptococcosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 115, p. 485-490, 1999.
- KAROS, M.; CHANG, Y.C.; MCCLELLAND, C.M.; CLARKE, D.L.; FU, J.; WICKES, B.L.; KWON-CHUNG, K.J. Mapping of the *Cryptococcus neoformans* MAT α locus: presence of mating type-specific mitogen-activated protein kinase cascade homologs. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6222-6227, 2000.
- KELLY, S.; LAMB, D.C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A.; BALDWIN, B.; POWDERLY, W.G. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol - 8 $\rightarrow$ 7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from na AIDS patient. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 122, p. 39-42, 1994.
- KHAN, M.A.; NASTI, T.H.; OWAIS, M. Incorporation of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes showed enhanced efficacy against systemic cryptococcosis in leucopenic mice. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, p. 726-731, 2005.

- KIDD, S.E.; SORRELL, T.C.; MEYER, W. Isolation of two molecular types of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from insect frass. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 171-176, 2003.
- 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, p. 17258-17263, 2004.
- KIERTIBURANAKUL, S.; WIROJTANANUGOON, S.; PRACHARKTAM, R.; SUNGKANUPARPH, S. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 10, p. 72-78, 2006.
- KNUDSEN, J.D.; JENSEN, L.; SORENSEN, T.L.; JENSEN, T.; KJERSEM, H.; STENDERUP, J.; PEDERSEN, C. Cryptococcosis in Denmark: an analysis of 28 cases in 1988-1993. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 29, p. 51-55, 1997.
- KOBAYASHI, C.C.; SOUZA, L.K.; FERNANDES ODE, F.; BRITO, S.C.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.D.O.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiania, Goias State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 47, p. 203-207, 2005.
- 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. **J. Assoc. Physicians India**, v. 49, p. 1086-1090, 2001.
- KOVACS, J.A.; KOVACS, A.A.; POLIS, M.; WRIGHT, W.C.; GILL, V.J.; TUAZON, C.U.; GELMANN, E.P.; LANE, H.C.; LONGFIELD, R.; OVERTURE, G. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Intern. Med.**, v. 103, p. 533-538, 1985.
- KOZEL, T.R.; CAZIN, J.Jr. An unencapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 3, p. 287-294, 1971.
- KRAUS, P.R.; HEITMAN, J. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 311, p. 1151-1157, 2003.
- KRAUS, P.R.; NICHOLS, C.B.; HEITMAN, J. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. **Eukaryot. Cell**, v. 4, p. 1079-1087, 2005.
- KRAUS, P.R.; FOX, D.S.; COX, G.M.; HEITMAN, J. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1377-1387, 2003.
- KUROKI, M.; PHICHAICHUMPON, C.; YASUOKA, A.; CHIRANAIKUL, P.; CHOSA, T.; SIRINIRUND, P.; MIYAZAKI, T.; KAKEYA, H.; HIGASHIYAMA, Y.; MIYAZAKI, Y.;

- ISHIDA, Y.; KOHNO, S. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from an endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand. **Yeast**, v. 21, p. 809-812, 2004.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 1998. 1055p.
- 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. 942-946, 1976.
- KWON-CHUNG, K.J. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans* and subsequent work on the characterization of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Zentralbl. Bakteriolog.**, v. 275, p. 390-393, 1991.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Epidemiol.**, v. 120, p. 123-130, 1984.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E.; RHODES, J.C. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 48, p. 25-38, 1982.
- KWON-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, p. 804-806, 2002.
- KWON-CHUNG, K.J.; RHODES, J.C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 51, p. 218-223, 1986.
- KWON-CHUNG, K.J.; WICKES, B.L.; BOOTH, J.L.; VISHNIAC, H.S.; BENNETT, J.E. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 1751-1754, 1987.
- KWON-CHUNG, K.J.; WICKES, B.L.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.D.; ELLIS, D.; HOWARD, D.H. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1869-1874, 1992.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1082p.
- LARSEN, R.A.; BAUER, M.; THOMAS, A.M.; GRAYBILL, J.R. Amphotericin B and fluconazole, a potent combination therapy for cryptococcal meningitis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 985-991, 2004.
- LATOUCHE, G.N.; HUYNH, M.; SORRELL, T.C.; MEYER, W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B gene (PLB1) for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **App. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2080-2086, 2003.

- LAZERA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans* **Med. Mycol.**, v. 38, p. 379-383, 2000.
- LAZERA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S.; TRILLER, 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, p. 119-122, 1998.
- LAZERA, M.S.; PIRES, F.D.A.; CAMILO-COURA, L.; NISHIKAWA, M.M.; BEZERRA, C.C.F.; 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, p. 127-131, 1996.
- LAZERA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 449-454, 1993.
- LEAL, A.L. **Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico dos pacientes com meningite criptocócica no Estado do Rio Grande do Sul.** 2006. 100f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Centro de biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, 2006.
- LEE, Y.A.; KIM, H.J.; LEE, T.W.; KIM, M.J.; LEE, M.H.; LEE, J.H.; IHM, C.G. First report of *Cryptococcus albidus*-induced disseminated cryptococcosis in a renal transplant recipient. **Korean J. Intern. Med.**, v. 19, p. 53-57, 2004.
- LENGELER, K.B.; FOX, D.S.; FRASER, J.A.; ALLEN, A.; FORRESTER, K.; DIETRICH, F.S.; HEITMAN, J. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. **Eukaryot. Cell.**, v. 1, p. 704-718, 2002.
- LEPHART, P.; FERRIERI, P.; VAN BURIK, J.A. Reservoir of *Candida albicans* infection in a vascular bypass graft demonstrates a stable karyotype over six months. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 255-260, 2004.
- LERCH, K. Amino acid sequence of tyrosinase from *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 75, p. 3635-3639, 1978.
- LIAN, T.; SIMMER, M.I.; D'SOUZA, C.A.; STEEN, B.R.; ZUYDERDUYN, S.D.; JONES, S.J.; MARRA, M.A.; KRONSTAD, J.W. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 1452-1472, 2005.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1992.
- LIANG, P.; ZHU, W.; ZHANG, X.; GUO, Z.; O'CONNELL, R.P.; AVERBOUKH, L.; WANG, F.; PARDEE, A.B. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. **Nucleic. Acids Res.**, v. 22, p. 5763-5764, 1994.

- LICEA, B.A.; GARZA, D.G.; ZÚÑIGA, M.T. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucaliptus tereticornis*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 13, p. 27-28, 1996.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69–105, 2006.
- LIN, X.; HULL, C.M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, p. 1017-1021, 2005.
- LISITSYN, N.A.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. **Science**, v. 11, p. 303-307, 1995.
- LITTMAN, M.L.; ZIMMERMAN, L.E. **Cryptococcosis: Torulosis or european blastomycosis**. New York: Grune and Stratton., 1956. p. 38-46.
- 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, p. 556-564, 2005.
- LO PASSO, C.; PERNICE, I.; GALLO, M.; BARBARA, C.; LUCK, F.T.; CRISEO, G.; PERNICE, A. Genetic relatedness and diversity of *Cryptococcus neoformans* strains in the Maltese Islands. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 751-755, 1997.
- LOFTUS, B.J.; FUNG, E.; RONCAGLIA, P.; ROWLEY, D.; AMEDEO, P.; BRUNO, D.; VAMATHEVAN, J.; MIRANDA, M.; ANDERSON, I.J.; FRASER, J.A.; ALLEN, J.E.; BOSDET, I.E.; BRENT, M.R.; CHIU, R.; DOERING, T.L.; DONLIN, M.J.; D'SOUZA, C.A.; FOX, D.S.; GRINBERG, V.; FU, J.; FUKUSHIMA, M.; HAAS, B.J.; HUANG, J.C.; JANBON, G.; JONES, S.J.; KOO, H.L.; KRZYWINSKI, M.I.; KWON-CHUNG, J.K.; LENGELER, K.B.; MAITI, R.; MARRA, M.A.; MARRA, R.E.; MATHEWSON, C.A.; MITCHELL, T.G.; PERTEA, M.; RIGGS, F.R.; SALZBERG, S.L.; SCHEIN, J.E.; SHVARTSBEYN, A.; SHIN, H.; SHUMWAY, M.; SPECHT, C.A.; SUH, B.B.; TENNEY, A.; UTTERBACK, T.R.; WICKES, B.L.; WORTMAN, J.R.; WYE, N.H.; KRONSTAD, J.W.; LODGE, J.K.; HEITMAN, J.; DAVIS, R.W.; FRASER, C.M.; HYMAN, R.W. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science.**, v. 25, p. 1321-1324, 2005.
- LOPES-MARTINEZ, R.; CASTANON-OLIVARES, L.R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. **Mycopathologia**, v. 129, p. 25-28. 1995.
- LOUIE, J.K.; CHI, N.H.; THAO LE, T.T.; QUANG, V.M.; CAMPBELL, J.; CHAU, N.V.; RUTHERFORD, G.W.; FARRAR, J.J.; PARRY, C.M. Opportunistic infections in hospitalized HIV-infected adults in Ho Chi Minh City, Vietnam: a cross-sectional study. **Int. J. STD. AIDS**, v. 15, p. 758-761, 2004.

- LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.L.; GHANNOUM, M.A.; REX, J.H. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2817–2822, 1998.
- LULLOFF, S.J.; HAHN, B.L.; SOHNLE, P.G. Fungal susceptibility to zinc deprivation. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 144, p. 208-214, 2004.
- MAMBULA, S.S.; SIMONS, E.R.; HASTEY, R.; SELSTED, M.E.; LEVITZ, S.M. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6257-6264, 2000.
- MARAIS, E.; STEWART, R.; DUSE, A.G.; ROSEKILLY, I.C.; DE JONG, G.; AITHMA, N. *Candida parapsilosis* detected in TPN using the BacT/Alert system and characterized by randomly amplified polymorphic DNA. **J. Hosp. Infect.**, v. 56, p. 291-296, 2004.
- MARTINEZ, L.R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3365-3367, 2001.
- MCCLELLAND, C.M.; CHANG, Y.C.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, v. 12, p. 208-212, 2004.
- MENEZES, E.A.; MONTEIRO, M.N.; ANGELO, M.R.; SANTOS, C.D.; FREIRE, C.C.; CUNHA, F.A. *Cryptococcus neoformans* causing meningitis in AIDS patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 537-539, 2002.
- MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; IBERO AMERICAN CRYPTOCOCAL STUDY GROUP. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 189-195, 2003.
- MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M.A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M.A.; ELLIS, D.H.; SORREL, 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, p. 1790-1799, 1999.
- MEYER, W.; MITCHELL, T.G.; FREEDMAN, E.Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2274-2280, 1993.
- MISSALL, T.A.; CHERRY-HARRIS, J.F.; LODGE, J.K. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. **Microbiology**, v. 151, p. 2573-2581, 2005.

- MITCHELL, T.G.; PERFECT, J. Cryptococcosis in the era of Aids – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 515-548, 1995.
- MONTAGNA, M.T.; SANTACROCE, M.P.; CAGGIANO, G.; TATO, D.; AJELLO, L. Cavernicolous habitats harbouring *Cryptococcus neoformans*: results of a speleological survey in Apulia, Italy, 1999-2000. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 451-455, 2003.
- MONTENEGRO, H.; PAULA, C.R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in São Paulo city, Brazil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 385-390, 2000.
- MOTTA, T.R.; MOREIRA-FILHO, C.A.; MENDES, R.P.; SOUZA, L.R.; SUGIZAK, M.F.; BAUEB, S.; CALICH, V.L.; VAZ, C.A. Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 33, p. 151-157, 2002.
- MWABA, P.; MWABA, J.; CHINTU, C.; POBEE, J.; SCARBOROUGH, M.; PORTSMOUTH, S.; ZUMLA, A. Clinical presentation, natural history, and cumulative death rates of 230 adults with primary cryptococcal meningitis in Zambian AIDS patients treated under local conditions. **Postgrad. Med. J.**, v. 77, p. 769-773, 2001.
- NARASIPURA, S.D.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 1782-800, 2005.
- NARASIPURA, S.D.; AULT, J.G.; BEHR, M.J.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (*SOD1*) gene knockout mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 47, p. 1681-1694, 2003.
- NGAMWONGSATT, P.; SUKROONGREUNG, S.; NILAKUL, C.; PRACHAYASITTIKUL, V.; TANTIMAVANICH, S. Electrophoretic karyotypes of *C. neoformans* serotype A recovered from Thai patients with AIDS. **Mycopathologia**, v. 159, p. 189-197, 2005.
- NGUYEN, M.H.; YU, C.Y. In vitro comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 471-472, 1998.
- NIELSEN, K.; COX, G.M.; LITVINTSEVA, A.P.; MYLONAKIS, E.; MALLIARIS, S.D.; BENJAMIN, D.K.J.R.; GILES, S.S.; MITCHELL, T.G.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4922-4933, 2005.
- NIELSON, J.B.; IVEY, M.H.; BULMER, G.S. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. **Infect. Immun.**, v. 20, p. 262-266, 1978.

- 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, 2003.
- NOVERR, M.C.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 1538-1547, 2003.
- NOVERR, M.C.; WILLIAMSON, P.R.; FAJARDO, R.S.; HUFFNAGLE, G.B. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1693-1699, 2004.
- ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D.L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J.**, v. 16, p. 2576-2589, 1997.
- OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K. Serotyping, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 44, p. 299-302, 2002.
- OLSZEWSKI, M.A.; NOVERR, M.C.; CHEN, G.H.; TOEWS, G.B.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am. J. Pathol.**, v. 164, p. 1761-1771, 2004.
- ORDONEZ, N.; CASTANEDA, E. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, p. 128-130, 2001.
- OZEKI, H.; ITO, S.; WAKAMATSU, K.; ISHIGURO, I. Chemical characterization of pheomelanogenesis starting from dihydroxyphenylalanine or tyrosine and cysteine. Effects of tyrosinase and cysteine concentrations and reaction time. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1336, p. 539-548, 1997a.
- OZEKI, H.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; ISHIGURO, I. Chemical characterization of eumelanins with special emphasis on 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid content and molecular size. **Anal. Biochem.**, v. 248, p. 149-157, 1997b.
- PAL, M. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14, p. 181-183, 1997.
- PAPPALARDO, M.C.S.; GRADIN, P.E.G.; MELHEM, M.S.C.; SANT'ANNA, J.V.; PASCHOAL, R.C.; LONGO, L.C. Perfis de susceptibilidade antifúngica "in vitro" de 40 amostras seriadas de *C. neoformans* isoladas de oito pacientes com SIDA e neurocriptococose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 1998, Rio de Janeiro. **Temas Livres**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Micologia, 1998. p. 97.

- PAPPALARDO, M.C.S.M; MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, p. 299-305, 2003.
- PARCELLIER, A.; GURBUXANI, S.; SCHMITT, E.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 304, p. 505–512, 2003.
- PASSONI, L.F.C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro: an analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 305-311, 1998.
- PASTORIAN, K.; HAWEL, L.; BYUS, C.V. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. **Anal. Biochem.**, v. 283, p. 89-98, 2000.
- PEDROSO, R.S.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 239-243, 2006.
- PERKINS, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Rates of antifungal resistance among spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, p. 1144-1147, 2005.
- 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, p. 3807-3810, 2005a.
- PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DOERN, G.V.; DIEKEMA, D.J. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2163-2167, 2005b.
- PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 48, p. 201-205, 2004.
- PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. In vitro activities of posaconazole (Sch 56592) compared with those of itraconazole and fluconazole against 3,685 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 2862-2864, 2001.
- PFEIFFER, T.; ELLIS, D. Additional eucalipt hosts for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL

- MYCOLOGY, 13th, 1997, Parma, Italy. **Abstract** North Adelaide, Australia: International Society for Human and Animal Mycology, 1997. p.106.
- PFEIFFER, T.; ELLIS, D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 929-930, 1991.
- PFEIFFER, T.J.; ELLIS, D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tireticornis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 407-408, 1992.
- PIRT, S.J.; ROWLEY, B.I. Melanin production in *Aspergillus nidulans*. **Biochem. J.**, v. 114, p. 9-10, 1969.
- POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. **J. Bacteriol.**, v. 142, p. 15-20, 1980.
- POWDERLY, W.G.; KEATH, E.J.; SOKOL-ANDERSON, M. Amphotericin B resistant *Cryptococcus neoformans* in a patient with AIDS. **Infect. Dis. Clin. Prac.**, v. 1, p. 314-316, 1992.
- RADISKY, D.; KAPLAN, J. Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 4481-4484, 1999.
- RANDHAWA, H.S.; MUSSA, A.Y.; KHAN, Z.U. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. **Mycopathologia**, v. 151, p. 63-69, 2001.
- RASO, T.F.; WERTHER, K.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 355-362, 2004.
- REZENDE, C. **Aspectos fenotípicos e moleculares de amostras de *Cryptococcus neoformans* da região de Araraquara e Ribeirão Preto relacionados aos perfis de suscetibilidade**. 2002. 166f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2002.
- RITTERSHAUS, P.C.; KECHICHIAN, T.B.; ALLEGOOD, J.C.; MERRILL, A.H.J.R.; HENNIG, M.; LUBERTO, C.; DEL POETA, M. Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 1651-1659, 2006.
- ROBERT, F.; LEBRETON, F.; BOUGNOUX, M.E.; PAUGAM, A.; WASSERMANN, D.; SCHLOTTERER, M.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2366-2371, 1995.
- ROBERTS, R.L.; FINK, G.R. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. **Genes Dev.**, v. 8, p. 2974-2985, 1994.
- ROBINSON, P.A.; BAUER, M.; LEAL, M.A.; EVANS, S.G.; HOLTOM, P.D.; DIAMOND, D.A.; LEEDOM, J.M.; LARSEN, R.A. Early mycological treatment failure in AIDS-associated cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 82-92, 1999.

- RODERO, L.; CÓRDOBA, S.; CAHN, P.; HOCHENFELLNER, F.; DAVEL, G.; CANTEROS, C.; KAUFMAN, S.; GUELFAND. *In vitro* susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with clinical response to amphotericin B therapy. **J. Antimicrobiol. Chemoth.**, v. 45, p. 239-242, 2000.
- RODERO, L.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ, A.C.; SALVE, A.; GUELFAND, L.; CAHN, P.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DAVEL, G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (*ERG11*) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolated. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 3653-3656, 2003.
- RODRIGUES, M.L.; REIS, F.C.G.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; ALVIANO, C.S. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. **Microb. Pathog.**, v. 34, p. 65-71, 2003.
- RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. The resistance of opportunistic fungi to antifungals. **Rev. Clin. Esp.**, v. 197, p. 67-74, 1997.
- RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; BERENGUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; SANCHEZ, R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Macrodilution Method M27-P for *in vitro* susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 40, p. 1998-2003, 1996.
- ROSARIO, I.; HERMOSO DE MENDOZA, M.; DENIZ, S.; SORO, G.; ALAMO, I.; ACOSTA, B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. **Mycoses**, v. 48, p. 421-424, 2005.
- ROSAS, A.L.; CASADEVAL, A. Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. **Mycopathologia**, v. 151, p. 53-56, 2001.
- RUHNKE, M.; GROSCH-WORNER, I.; LISCHESKI, A.; NEUBAUER, A.; STEINMULLER, A.; TRAUTMANN, M.; MORSCHHAUSER, J. Genotypic relatedness of yeast isolates from women infected with human immunodeficiency virus and their children. **Mycoses**, v. 42, p. 385-394, 1999.
- RUMA-HAYNES, P.; BROWNLEE, A.G.; SORREL, T.C. A rapid method for detecting extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 733-737, 2000.
- SAAG, M.S.; GRAYBILL, R.J.; LARSEN, R.A.; PAPPAS, P.G.; PERFECT, J.R.; POWDERLY, W.; SOBEL, J.D.; DISMUKES, W.E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 710-718, 2000.

- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999p.
- SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia blastomiceti che si wihppana nei succhi di alcunifrutti. **Ann. Ing.**, v. 4, p. 463-465, 1894.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SOARES, M.C.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.; CASEIRO, M.M.; COSTA, S.O. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 47, p. 31-36, 2005.
- SOARES, C.M.; MADLUN, E.E.; DA SILVA, S.P.; PEREIRA, M.; FELIPE, M.S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 505-507, 1995.
- SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V.E.A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newsl.**, v. 37, p. 41-43, 1990.
- SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, **Med. Mycol.**, v. 39, p. 155-168, 2001.
- SOUZA, L.K.; FERNANDES ODE, F.; KOBAYASHI, C.C.; PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; LEMOS, J.A.; SOUZA-JUNIOR, A.H.; SILVA, M.D.O.R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiania city, Goias, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 47, p. 253-256, 2005.
- STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (Sn. G. ollifera). **Z. Hyg. Infektionskr.**, v. 148, p. 466-475, 1962.
- STAIB, F.; SCHULZ-DIETRICH, J.M. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages control of *Cryptococcus neoformans* habitats. **Zentrallb. Baketeriol. Mikrobiol. Hyg.**, v. 179, p. 179-186, 1984.
- STEEN, B.R.; LIAN, T.; ZUYDERDUYN, S.; MACDONALD, W.K.; MARRA, M.; JONES, S.J.; KRONSTAD, J.W. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Genome Res.**, v. 12, p. 1386-1400, 2002.
- STEEN, B.R.; ZUYDERDUYN, S.; TOFFALETTI, D.L.; MARRA, M.; JONES, S.J.; PERFECT, J.R.; KRONSTAD, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. **Eukaryot. Cell.**, v. 2, p. 1336-1349, 2003.
- STEENBERGEN, J.N.; SHUMAN, H.A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoeba suggest an explanation for its virulence and intracelular pathogenic strategy in macrophages. **Microbiology**, v. 98, p. 15245-15250, 2001.

- STEPHEN, C.; LESTER, S.; BLACK, W.; FYFE, M.; RAVERTY, S.; Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **Can. Vet. J.**, v. 43, p. 792-794, 2002.
- SWINNE, D.; DEPPNER, M.; LAROCHE, R.; FLOCH, J.J.; KADENDE, P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). **AIDS**, v. 3, p. 389-390, 1989.
- SWINNE, D.; NKURIKIYINFURA, J.B.; MUYEMBE, T.L. Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Zaire. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v. 5, p. 50-51, 1986.
- SWINNE, D.; Taelman, H.; BATUNGWANAYO, J.; BIGIRANKANA, A.; BOGAERTS, J. Ecology of *Cryptococcus neoformans* in Central Africa. **Med. Trop. (Madr)**, v. 54, p. 53-55, 1994.
- TAY, S.T.; CHAI, H.C.; NA, S.L.; HAMIMAH, H.; ROHANI, M.Y.; SOO-HOO, T.S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. **Mycopathologia**, v. 159, p. 509-513, 2005.
- TAY, S.T.; TANTY HARYANTY, T.; NG, K.P.; ROHANI, M.Y.; HAMIMAH, H. In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. **Mycoses**, v. 49, p. 324-330, 2006.
- TINTELNOT, K.; LEMMER, K.; LOSERT, H.; SCHAR, G.; POLAK, A. Follow-up of epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates. **Mycoses**, v. 47, p. 455-464, 2004.
- TRILLES, L.; LAZERA, M.; WANKE, B.; CAMARGO, Z.P.; GOMES, G.; BEZERRA, C.F.; MACEDO, R.; NISHIKAWA, M.M.; CAVALCANTI, M.A. Epidemiologia molecular de *Cryptococcus neoformans* no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 1998, Rio de Janeiro. **Anais Rio de Janeiro: Congresso Brasileiro de Micologia**, 1998. p. 61.
- 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. 41, p. 383-390, 2003.
- 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. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p. 15-21, 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, p. 3394-3400, 2002.

- VAN DUIN, D.; CLEARE, W.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 2014-2020, 2004.
- VANBREUSEGUEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Sanfallice) Vuilemin 1894, part II – *Cryptococcus neoformans* var *gattii* var. nov. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.**, v. 50, p. 695-702, 1970.
- VARMA, A.; SWINNE, D.; STAIB, F.; BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J. Diversity of DNA fingerprints in *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1807-1814, 1995.
- VIDOTTO, V.; MELHEM, M.; PUKINSKAS, S.; AOKI, S.; CARRARA, C.; PUGLIESE, A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, p. 29-33, 2005.
- VILCINS, I.; KROCKENBERGER, M.; AGUS, H.; CARTER, D. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 53-60, 2002.
- VIVALDINI, S.M. **Tipagem molecular de isolados sequenciais de *C. neoformans* de pacientes da região de São José do Rio Preto – SP e correlação com sensibilidade à drogas antifúngicas.** 2003. 107f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.
- VUILLEMIN, P. Les Blastomycetes pathogenes. **Gen. Aci. Pures Appl.**, v. 12, p. 732-751, 1901.
- WADA, J.; KUMAR, A.; OTA, K.; WALLNER, E.I.; BATLLE, D.C.; KANWAR, Y.S. Representational difference analysis of cDNA of genes expressed in embryonic kidney. **Kidney Int.**, v. 51, p. 1629-1638, 1997.
- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3131-3136, 1995.
- WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3004-3007, 1994.
- WHITE, T.C.; KIEREN, A.M.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 382-402, 1998.
- WICKES, B.L.; MOORE, T.D.E.; KWON-CHUNG, K.J. Comparison of the electrophoretic kariotypes and chromosomal location of *tem* genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 140, p. 543-550, 1994.
- WICKES, B.L.; MAYORGA, M.E.; EDMAN, U.; EDMAN, J.C. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 7327–7331, 1996.

- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; RAFALSKY, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis with RAPD markers. In: BENNETT, J.W.; LAZUR, L.L. (Eds.). **More gene manipulations in fungi**. New York: Academic Press, 1991. p. 431-439.
- WILLIAMSOM, P.R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin Biosystemthesis in *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1570-1572, 1998.
- XU, J.; ALI, R.Y.; GREGORY, D.A.; AMICK, D.; LAMBERT, S.E.; YOELL, H.J.; VILGALYS, R.J.; MITCHELL, T.G. Uniparental mitochondrial transmission in sexual crosses in *Cryptococcus neoformans*. **Curr. Microbiol.**, v. 40, p. 269-273, 2000.
- YAMAMOTO, Y.; KOHNO, S.; KOGA, H.; KAKEYA, H.; TOMANO, K.; KAKU, M.; YAMAZAKI, T.; ARISAWA, M.; HARA, K. Random Amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 3328-3332, 1995.
- ZARAGOZA, O.; MIHU, C.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 4358-4361, 2005.
- ZUGER, A.; LOUIE, E.; HOLZMAN, R.S.; SIMBERKOFF, M.S.; RAHAL, J.J. *Cryptococcal* disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: diagnostic features and outcome of treatment. **Ann. Intern. Med.**, v. 104, p. 234-240, 1986.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 29/2005 – Animais em Pesquisa

Interessado: MARCELO TERUYUKI MATSUMOTO

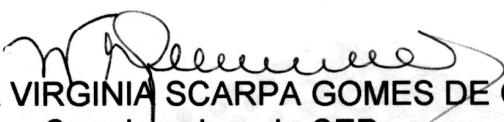
Orientador: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Projeto: Tipagem molecular, perfis de suscetibilidade e caracterização de cDNA diferencialmente expressos durante a infecção de *Cryptococcus neoformans*

Parecer nº 34/2005 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Tipagem molecular, perfis de suscetibilidade e caracterização de cDNA diferencialmente expressos durante a infecção de *Cryptococcus neoformans*", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 3 de novembro de 2005.


Prof^a. Dr^a. MARIA VIRGINIA SCARPA GOMES DE OLIVEIRA
Coordenadora do CEP



REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
(JOURNAL OF THE S. PAULO INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470.

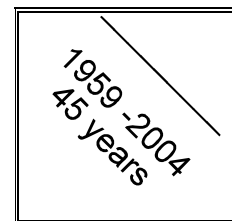
05403-000 São Paulo, SP, Brasil

Fone: 55.11.3066-7005

Fax/Fone: 55.11.3062-2174

e-mail: revimts@edu.usp.br

<http://www.scielo.br/rimts>



OF. RIMTSP 169/06

São Paulo, 16 de agosto de 2006

Prezado(a) Prof(a) Dr(a) Maria Josén Soares Mendes-Giannini

Temos o prazer de comunicar que seu trabalho:

MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; BAEZA, L.C.; MELHEM, M.S.C. & MENDES-GIANNINI, M.J.S. – Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. reg.45/06 (12/05/2006)

foi **aprovado para publicação** na REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO.

O preço de cada separata será informado quando enviarmos as provas tipográficas para correção.

Atenciosamente

Prof. Dr. Thales de Brito
 Editor, Revista do Instituto de
 Medicina Tropical de São Paulo

Nota importante: caso o seu trabalho possua foto(s) colorida(s), o(s) fotolito(s) e a impressão desta(s) foto(s) serão cobrados à parte.

GENOTYPING, SEROTYPING AND DETERMINATION OF MATING-TYPE OF

Cryptococcus neoformans CLINICAL ISOLATES FROM SÃO PAULO STATE, BRAZIL

Marcelo Teruyuki MATSUMOTO (1), Ana Marisa FUSCO-ALMEIDA (1), Lilian Cristiane BAEZA (1), Márcia de Souza Carvalho MELHEM (2) & Maria José Soares MENDES-GIANNINI (1)

SUMMARY

The basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans* is an important fungal pathogen mainly in immunocompromised patients. In this study, 47 clinical isolates of *C. neoformans* from regions of São Paulo State were studied serologically by using the Crypto Check Iatron RM 304-K kit, their genetic diversity was estimated by PCR-fingerprinting with a microsatellite-specific sequence (GACA)₄, RAPD with primer 6 (Amersham Pharmacia Biotech), PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the phospholipase B gene (PLB1) digested with *AvaI* and mating type analysis by PCR. All 47 strains isolated from HIV positive patients included in this study were serotype A and MAT α . The majority of the isolates (45/47) were VNI and only two were VNII by PCR-fingerprinting and PCR-RFLP analysis. High degree of homogeneity was observed when (GACA)₄ was used with the almost all isolates being highly correlated (>0.9). In contrast, the RAPD analysis showed more heterogeneous with more number of molecular profiles. By PCR-RFLP, none new molecular type was found, enhancing the suggestion that the differences based on conserved gene as PLB1, can be resultant of ongoing divergent evolution within the *C. neoformans* complex, into the current eight subtypes. Our results furnish new information on the molecular epidemiology of *C. neoformans* in the southeast region of Brazil.

KEY WORDS: *Cryptococcus*; Epidemiology; Mating type; RAPD; PCR fingerprinting; RFLP

(1) Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Análises Clínicas. Disciplina de Micologia Clínica-Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

(2) Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to: Maria José Soares Mendes Giannini

R. Expedicionários do Brasil, 1621, 14801-192 - Cx Postal 502

Fax: +55-16-3301.6547, E-mail: giannini@fcfar.unesp.br

INTRODUCTION

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast agent of human and animal cryptococcosis^{30,31}. This opportunistic fungal pathogen has a worldwide distribution and is responsible for life-threatening infections of the central nervous system, mainly in patients with AIDS^{11,39}. Two distinct species have been recognized: *C. neoformans* with two varieties, var. *grubii* (serotype A), var. *neoformans* (serotype D) and the hybrid serotype AD and *C. gattii*, including serotypes B and C^{20,28}.

Human infection is acquired by inhalation of infectious propagules such as desiccated yeast cells or maybe basidiospores from environment sources^{21,35,44}. *C. neoformans* is a heterothallic basidiomycete that exists as two mating types, α and a, being determined by single locus MAT, with two alleles²⁴. One of the most interesting features of *C. neoformans* is the imbalance between mating-types prevalence in the environmental as well as clinical isolates. Almost all isolates have been found to be mating-type α ²⁷. However, some rare isolates identified as MATa/ α are considered to be occasional diploid or aneuploid strains^{13,34}.

Most infections, in immunocompromised hosts, are caused by *C. neoformans* var. *grubii*^{11,39}. In contrast, *C. neoformans* var. *gattii* generally affects immunocompetent hosts⁴³. The incidence of cryptococcosis varies according to the population, the region and the period studied. In Brazil, from 1980 to 2002, 215,810 AIDS patients were registered, among whom 6% had cryptococcosis at the time of diagnosis⁹ and São Paulo is the state with the highest rate of this disease. The majority of the brazilian clinical and environmental isolates have shown to be serotype A with exception in north and northeastern regions where the serotype B is endemic^{1,4,41,46}.

Epidemiological studies on cryptococcosis are essential to understand the biology of this fungus so as to improved current therapy against this infection. Several molecular typing methods have been used in epidemiological analyses of clinical and/or environmental isolates of *C. neoformans*, including karyotyping, PCR fingerprinting, random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and amplified fragment length polymorphism (AFLP)^{5,7,8,10,12,16,22,26,37,45}. PCR-fingerprinting using mini (M13) or microsatellite [(GACA)₄] specific sequences as single primers and RFLP (PLB1 and URA5 genes) methods have grouped global isolates of *C. neoformans* into eight major molecular types^{32,37,38}. Likely, BOEKHOUT *et al.* using AFLP analysis grouped into six major AFLP groups⁸. FRANZOT *et al.* using CNRE-1 RFLP analysis and URA5 sequencing found low genetic diversity among Brazilian isolates¹⁹; conversely, HORTA *et al.* have found great differences in RAPD profiles²³. On the other hand, ALMEIDA *et al* showed the presence of 22 EK and 15 RAPD profiles that were highly related².

Phospholipases are found in a wide range of organisms, including both pathogenic and nonpathogenic species of yeasts and moulds^{6,15,33,36}. The phospholipase B (*PLB1*) gene of *C. neoformans* has been described as important virulence factor in a mouse and rabbit and as interesting target for molecular typing of *C. neoformans* via PCR-RFLP analysis^{15,32}. However until the present moment, there are not available data about the molecular epidemiology of *C. neoformans* using PLB1-RFLP method in Brazil.

Even though *C. neoformans* is a leading cause of life-threatening mycotic infection among AIDS patients in Brazil, a small amount of works have studied this molecular epidemiology. In light of this, we analyzed clinical isolates of *C. neoformans* from several regions of São Paulo State to evaluate serotypes, genetic variability using PCR-fingerprinting with (GACA)₄ oligonucleotide, RAPD with primer 6, PLB1-RFLP and mating type analysis by PCR.

MATERIAL AND METHODS

Fungal isolates.

Forty-seven strains of *C. neoformans* were isolated at intervals; from thirty-five AIDS patients from São José do Rio Preto, Santos, Araraquara and Ribeirão Preto, from various geographic areas of São Paulo state, Brazil, during the pre-highly active antiretroviral therapy (HAART) period. These isolates were maintained in the Culture Collection of the Instituto Adolfo Lutz laboratory, a Public Health National Reference Center, located in six different cities in São Paulo State. The *C. neoformans* cultures were grown at 30°C on Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol. The isolates were identified by conventional methods to genus, species and variety. Serotyping was performed by slide agglutination (Crypto Check Iatron kit, Tokyo, Japan), following the manufacturer's instructions.

DNA isolation

Genomic DNA was extracted and purified by a slight modification of the method of DEL SAL *et al.*¹⁷. Briefly, *C. neoformans* isolates were grown on Sabouraud's dextrose agar at 30°C for 48 hours and two loopfuls of cells from the culture were suspended in YEPD medium with 2.9% NaCl and then incubated at 30°C overnight. Cells were harvested and suspended in CES (20mmol l⁻¹ sodium citrate; 50 mmol l⁻¹ EDTA pH 8.0; 0.9 mol l⁻¹ sorbitol) containing Novozym 234 (NovoNordisk, from *Trichoderma harzianum*, Denmark). The suspension was incubated at 37°C for 3 hours, and spheroplasts were collected by centrifugation. DNA was isolated by lysing the spheroplasts in TEN buffer with 1% SDS (1 mol l⁻¹ Tris-base; 0.5 mol l⁻¹ EDTA; 1 mol l⁻¹ NaCl; 1% SDS). Chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was then added, shaken and centrifuged for 13 minutes at 12000rpm and the aqueous phase was transferred to a new tube. To precipitate the DNA,

isopropanol (1:1) was added and incubated at -20°C for 30 minutes. The DNA pellet was washed with 70% ethanol, centrifuged and air-dried. Finally, the DNA was resuspended in 80 μl TE (40 mmol l^{-1} Tris-base, 2 mmol l^{-1} EDTA).

RAPD and PCR-fingerprinting

Oligonucleotides of the microsatellite-specific sequence (GACA)₄ were used as single primers in the PCR, as described by MEYER *et al.*³⁸. The amplification reactions were performed in a volume of 25 μl , using the Ready-to-Go RAPD Kit according to the manufacturer's instructions. PCR was performed for 35 cycles in a Perkin-Elmer Thermal cycler (model *GeneAmp PCR System 9700*), each consisting of with 20 seconds of denaturation at 94°C , 1 minute annealing at 50°C , and 20 seconds extension at 72°C , followed by a final extension cycle for 6 minutes at 72°C . Amplification products were separated by electrophoresis on 2% agarose gels in 1X TBE buffer (Tris-borate-EDTA) at 150V for 2.5 hours, stained with ethidium bromide and then visualized under UV light.

The RAPD analysis was carried out using primer six (5'CCCGTCAGCA-3'; Amersham Pharmacia Biotech) in a volume of 25 μl , using the Ready-to-Go RAPD Kit according to the manufacturer's instructions. The following cycle conditions were used: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 36°C for 1 minute and amplification at 72°C for 2 minutes, and a final extension at 72°C for 10 minutes. Amplification products were separated by electrophoresis, on 2% agarose gels in 1X TBE buffer at 150V for 2.5 hours and stained with ethidium bromide and then visualized under UV light.

PCR-RFLP analysis of the PLB1 gene.

The PLB1 fragment was amplified by PCR, in a final volume of 50 μl , digested with *AvaI* in accordance with LATOUCHE *et al.*³² and was separated by electrophoresis on 3% agarose gel at 100V for 5.5 hours.

Determination of mating type.

Mating type was established by PCR using two primer pairs, specific for mating-type α and **a**, in accordance with CHATURVEDI *et al.*¹³. Initial denaturation was done at 95°C for 3 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 57.5°C for 1 minute, amplification at 72°C for 1 minute, and a final extension at 72°C for 7 minutes, in a *GeneAmp PCR System 9700* (Perkin-Elmer). Amplification products were separated by electrophoresis on 2% agarose gels in 1X TBE buffer at 120V for 2 hours stained with ethidium bromide and then visualized under UV light.

Reference strains

The following *C. neoformans* standard reference strains representing each major molecular type were used in PCR fingerprinting and PCR-RFLP: WM148 (VNI - serotype A), WM626 (VNII - serotype A), WM628 (VNIII - serotype AD), WM629 (VNIV - serotype D), WM179 (VGI - serotype B), WM178 (VGII - serotype B), WM161 (VGIII - serotype B), WM779 (VGIV - serotype C)³⁷.

The *C. neoformans* strains ATCC 28957 (serotype D, MAT α) and ATCC 28958 (serotype D, MATa) were used as positive control for determination of mating type by PCR.

Statistical Analysis

The computer software GelCompar II (Applied Maths, Version 2.0, Belgium) was used to determine the genetic relatedness of the isolates. Similarity coefficients were calculated by using the Dice Algorithm and cluster analysis was performed by the UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) tree method.

RESULTS

Fungal isolates

A total of 47 cryptococcal isolates from four São Paulo State districts were recovered from 35 HIV-positive patients, among whom nine (25%) had more than one sample taken at the time of diagnosis and during the treatment and 27 (75%) provided single samples. All isolates were identified as *C. neoformans* var *grubii*, serotype A.

Determination of Mating Type by PCR

The MAT α and MATa specific primers pair was used to amplify specific fragments of 101bp and 117bp, respectively. Epidemiological analysis of the mating type showed 100% prevalence of MAT α in all four regions (Figure 1).

PLB1-RFLP, PCR-fingerprinting and RAPD analysis.

The PLB1-RFLP and (GACA)₄-PCR fingerprinting analysis were carried out to separate the strains of *C. neoformans* into eight major molecular types (Figure 2A).

The RFLP profiles generated showed prevalence of 95.7% (45/47) of the molecular type VNI and only two VNII (4.3%) (Figure 2B).

Random primer 6 and a single primer specific to microsatellite repeats (GACA)₄ were used to amplify DNA polymorphisms within the cryptococcal genome. RAPD profiles and PCR fingerprinting types were assigned according to the major bands. For both (GACA)₄ and random primer 6, all visible and well-defined bands identified visually and confirmed by the software were included in the analysis (Fig. 2B). Similarity dendrogram analysis obtained with (GACA)₄ showed a high overall homogeneity among the 47 isolates from São Paulo State. The mean coefficient similarity value of the strains was 0.98 ± 0.04 . Two major groups were formed. The group I, corresponding *C. neoformans* var. *grubii* (VNI type strains), was clustered 45 isolates (95.7%) in three profiles with similarity around 0.94. The second minor group (II) with only two VNII type strains was formed showing correlation of 0.84 with the VNI group (Fig. 3). In contrast, the dendrogram based on RAPD profiles with primer 6 showed more heterogeneous profile. The mean coefficient similarity of the strains was 0.84 ± 0.15 . A total of 14 profiles were distributed in three major groups that showed similarity around 0.55. The group I had approximately 0.8 of similarity and clustered 41 strains (87.2%) in 11 profiles, all molecular type VNI. The two strains VNII were grouped in a distinct cluster (group II) as obtained with (GACA)₄ showing correlation around 0.7 with the group I. Finally, the group III containing four isolates and two profiles included strains from Santos and Araraquara districts that had 100% similarity with PCR fingerprinting but when compared with RAPD showed a low similarity coefficient (< 0.6) with the other two groups (Fig. 4).

DISCUSSION

The epidemiology of *C. neoformans* complex has been extensively explored worldwide but in Brazil, specially in São Paulo State, the data on molecular epidemiology remain scarce and more information would be helpful to elucidate the distribution of the major molecular types among Brazilian isolates. The genetic structure of *C. neoformans* is very complex and the employment of new primers in RAPD, as well as other molecular tools, such as the PCR-RFLP method based on PLB1 gene in this work, are interesting and important for elucidate your epidemiology. All isolates included in this study were recovered from HIV-positive patients and identified as *C. neoformans* var *grubii*, serotype A. This finding is consistent with previous studies showing that the majority of the cases of cryptococcosis in immunocompromised hosts, mainly patients with AIDS, in Brazil as well as worldwide, are caused by serotype A^{11,12,39,41}. NISHIKAWA *et al* serotyped 467 *C. neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil. Serotype A was more prevalence mainly in southern and southeast regions while the serotype B was predominant in north and northeastern region⁴¹.

Several typing approaches have been used in epidemiological studies to characterize and investigate the genetic structure of *C. neoformans* isolates. All *C. neoformans* isolates were grouped into one major molecular type VNI (var. *grubii*, serotype A) with (GACA)₄-PCR fingerprinting and confirmed by PLB1-RFLP, with exception of two strains that were identified as VNII, from Santos district. Our results are similar to previous studies that found VNI type strains as the commonest molecular type. An IberoAmerican study performed with strains from nine countries including Brazil showed prevalence of VNI among 340 *C. neoformans* strains. Specifically, 66 Brazilian strains were included revealing only three molecular types being VNI more predominant with 82.3% followed by VGII (13.6%) and VNII (3.0 %) ³⁷. CASALI *et al.*, in an important survey of Brazilian cryptococcal isolates from the southern region of the country, investigated 105 clinical and 19 environmental isolates and also verified a predominance of *C. neoformans* var. *grubii* molecular type VNI ¹². Although with low number of strains, the RAPD analysis showed notable heterogeneity. While the (GACA)₄ PCR fingerprinting yielded four profiles distributed in two major groups with mean similarity value of 0.98 ± 0.04 , the primer 6 RAPD yielded 14 profiles in three major groups with mean similarity of 0.84 ± 0.15 value. Moreover, four isolates that were high similar with PCR-fingerprinting showed low correlation with primer 6. These results can have occurred because the primer probably hybridizes with less conserved regions of the genomic DNA generating more polymorphisms ³. In a previous study, twenty two arbitrary polymerase chain reaction primers were tested in clinical and environmental isolates from the Brazilian state Rio Grande do Sul among them eight confirmed the genetic polymorphism ²³. In another, numerous distinguishable subtypes were identified among strains recovered from AIDS patients ²⁶.

Nine patients investigated in this study had more than one sample taken at the time of diagnosis and during the treatment. Almost all serial isolates showed identical genotypes independent of the time of isolation. Only one patient with two serial isolates had genotype variety with primer 6 but not with (GACA)₄. However the value of coefficient similarity was >0.9 suggesting that microevolution probably occurred.

The PCR-RFLP method based on PLB1 gene is of great importance because highlights differences based on partial sequence of a single virulence gene, while PCR-fingerprinting, on the other hand, amplifies mostly noncoding DNA sequences across the whole genome ^{14,32}. In our knowledge, there are not reports evolving Brazilian samples using this method. The PLB1-RFLP was applied associated with PCR-fingerprinting to differentiate the strains into eight molecular types previously described as well as verify the possible existence of a new molecular subtype. In the present work, VNI was prevalent in 45/47 isolates (95.7%) while VNII was 2/47 (4.3%), none new molecular subtype was found. Our results enhance previous data that suggest the differences based on more conserved genes as PLB1 or URA-5 by PCR-RFLP can be resultant of ongoing

divergent evolution within the *C. neoformans* complex, into the current eight subtypes and not only coincidental³².

Mating type **α**-specific primer was used here and yielded a 101bp MAT**α** fragment in all cases, showing that all *C. neoformans* isolates were MAT**α**, consistently with a previous study showing that MAT**α** is more frequent than MAT**a** among clinical as well as environmental isolates^{12,25,27,42}. Information about the mating-types of *C. neoformans* strains is important for an understanding of their ecology and virulence. It has been reported that MAT**α** is more virulent than the opposite type MAT**a**²⁹. Moreover, in coinfection with both mating types, the MAT**α** strains more likely disseminate to the central nervous systems which might explain the prevalence among the clinical isolates⁴⁰.

In conclusion, the results obtained in this study add new information to the available data on molecular epidemiology of *C. neoformans* in the southeast region of Brazil.

**GENOTIPAGEM, SOROTIPAGEM E DETERMINAÇÃO DE MATING-TYPE DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* DO ESTADO DE SÃO PAULO,
BRASIL**

RESUMO

Cryptococcus neoformans, pertencente à classe dos basidiomicetos, é um importante patógeno, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Neste estudo, 47 isolados clínicos de *C. neoformans* de várias regiões do Estado de São Paulo foram avaliados quanto aos sorotipos e o mating-type por PCR. A diversidade genética foi analisada por PCR-fingerprinting com a sequência iniciadora específica para regiões microssatélite (GACA)₄, RAPD com o iniciador 6 (Amersham Pharmacia Biotech) e por RFLP do gene PLB1 digerido com *Ava*I. Todos os isolados foram obtidos de pacientes HIV positivos e identificados como sorotipo A e MAT α . A maioria dos isolados pertenceram ao tipo molecular VNI (45/47) e apenas dois foram VNII quando analisados por PCR-fingerprinting e PCR-RFLP. Homogeneidade alta foi obtida com o iniciador (GACA)₄, com a maioria dos isolados apresentando correlação alta (>0.9). Os resultados do RAPD, por sua vez, revelaram maior heterogeneidade com número maior de perfis moleculares. Por PCR-RFLP, nenhum tipo molecular novo foi encontrado, realçando a idéia de que em genes conservados como PLB1, as diferenças podem ser resultantes de divergências evolutivas dentro do complexo *C. neoformans*, separando os isolados nos oito subtipos moleculares já estabelecidos. Nossos resultados fornecem novas informações sobre a epidemiologia molecular de *C. neoformans* na região sudeste do Brasil.

ACKNOWLEDGMENT

This work was financial supported by PADC-FCF-UNESP, CNPq and FAPESP.

REFERENCES

1. ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J. *et al.* - *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, **161**: 83-91, 2006.
2. ALMEIDA, A.M.F.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C. *et al.* - Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Res.**, 2006 (*in press*).
3. BAEZA, L.C.; MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. & MENDES-GIANNINI M.J.S. - Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of ribosomal DNA non transcribed spacer. **J. med. Microbiol.**, **55**: 429-436, 2006.
4. BARONI, F. de A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G. *et al.* - *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, **48**: 71-75, 2006
5. BARRETO DE OLIVEIRA, M.T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B. *et al.* - *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **J. clin. Microbiol.**, **42**: 1356-1359, 2004.
6. BIRCH, M.; ROBSON, G.; LAW, D. & DENNING, D.W. - Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. **Infect. Immun.**, **64**: 751-755, 1996.
7. BOEKHOUT, T.; VAN BELKUM, A.; LEENDERS, A.C. *et al.* - Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. **Int. J. Syst. Bact.**, **47**: 432-442, 1997.
8. BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M. *et al.* - Hibrid genotypes in patogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, **147**: 891-907, 2001.
9. BRASIL - Ministério da Saúde. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Brasília, Coordenação do Programa Nacional de DST/AIDS, 2002. (Site: www.aids.gov.br)
10. CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O. *et al.* - Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **J. clin. Microbiol.**, **39**: 2348-2350, 2001.
11. CASADEVALL, A. & PERFECT, J.R. - *Cryptococcus neoformans*. Washington, ASM Press, 1998.

12. CASALI, A.K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA, L.K. *et al.* - Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian State Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res.**, **3**: 405-415, 2003.
13. CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J. *et al.* - Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α pheromone to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **J. clin. Microbiol.**, **38**: 2007-2009, 2000.
14. COGLIATI, M.; HALLARÍA, 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.**, **38**: 97-103, 2000.
15. COX, G.M.; McDADE, H.C.; CHEN, S.C.A. *et al.* - Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molec. Microbiol.**, **39**: 166-175, 2001.
16. DELGADO, A.C.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y. *et al.* - Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, **1**: 7-11, 2005.
17. DEL SAL, G.; MANFIOLETTI, G. & SCHNEIDER, C. - The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. **BioTechniques**, **7**: 514-520, 1989.
18. ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; HAJJEH, R.A. *et al.* - Epidemiology: surveillance of fungal infections. **Med. Mycol.**, **38** (suppl 1): 173-182, 2000.
19. 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.**, **35**: 2243-2251, 1997.
20. FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F. & CASADEVALL, A. - *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A Isolates. **J. clin. Microbiol.**, **37**: 838-840, 1999.
21. FRASER, J.A.; SUBARAN, R.L.; NICHOLS, C.B. & HEITMAN, J. - Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryot. Cell**, **2**: 1036-1045, 2003.
22. GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G. & DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **J. clin. Microbiol.**, **37**: 3204-3209, 1999.

23. HORTA, J.A.; STAATS, C.C.; CASALI, A.K. *et al.* - Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian State Rio Grande do Sul. **Med. Mycol.**, **40**: 565-571, 2002.
24. HULL, C.M. & HEITMAN, J. - Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annu. Rev. Genet.**, **36**: 557– 615, 2002
25. IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K. *et al.* - Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Rev. Microbiol.**, **3**: 753-64, 2005.
26. IGREJA, R.P.; LAZERA, M.S.; WANKE, B. *et al.* - Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med. Mycol.**, **42**: 229-238, 2004.
27. KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E. - Distribution of α and a mating-types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. **Amer. J. Epidemiol.**, **108**: 337-340, 1978.
28. KWON-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W. & DIAZ, M. - Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, **51**: 804-806, 2002.
29. KWON-CHUNG, K.J.; WICKES, B.L.; STOCKMAN, L. *et al.* - Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Infect. Immun.**, **60**: 1869-1874, 1992.
30. KWON-CHUNG, K.J. - A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, **67**: 1197-1200, 1975.
31. KWON-CHUNG, K.J. - A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia** **68**: 943-946, 1976.
32. LATOUCHE, G.N.; HUYNH, M.; SORRELL, T.C. & MEYER, W. - PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B gene (PLB1) for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **Appl. environ. Microbiol.**, **69**: 2080-2086, 2003.
33. LEE, K.S.; PATTON, J.L.; FIDO, M. *et al.* - The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. **J. biol. Chem.**, **269**: 19725-19730, 1994.
34. LENGELER, K.B.; COX, G.M. & HETMAN, J. - Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating type locus. **Infect. Immun.**, **69**: 115-122, 2001.

35. LIN, X. & HEITMAN, J. - The Biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, **60**, 2006.
36. MASUDA, N.; KITAMURA, N. & SAITO, K. - Primary structure of protein moiety of *Penicillium notatum* phospholipase B deduced from the cDNA. **Europ. J. Biochem.**, **202**: 783-787, 1991.
37. MEYER, W.; CASTANEDA, A.; JACKSON, S. *et al.* - Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. infect. Dis.**, **9**: 189-195, 2003.
38. MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M. *et al.* - Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, **20**: 1790-1799, 1999.
39. MITCHELL, T.G. & PERFECT, J. - Cryptococcosis in the era of Aids – 100 Years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8**: 515-548, 1995.
40. NIELSEN, K.; COX, G.M.; LITVINTSEVA, A.P. *et al.* - *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. **Infect. Immun.**, **73**: 4922-4933, 2005
41. NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G. *et al.* - 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, 2003.
42. OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K. *et al.* - Serotyping, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, **44**: 299-302, 2002.
43. SORREL, T.C. - *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii*. **Med. Mycol.**, **39**: 155-168, 2001.
44. SUKROONGREUNG, S.; KITINIYOM, K.; NILAKUL, C. & TANTIMAVANICH, S. - Pathogenicity of basidiospores of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. **Med. Mycol.**, **36**: 419-424, 1998.
45. TRILLES, L.; LAZERA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B. & BOEKOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **J. clin. Microbiol.**, **41**: 383-390, 2003.
46. VIDOTTO, V.; MELHEM, M.; PUKINSKAS, S. *et al.* - Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, **22**: 29-33, 2005.

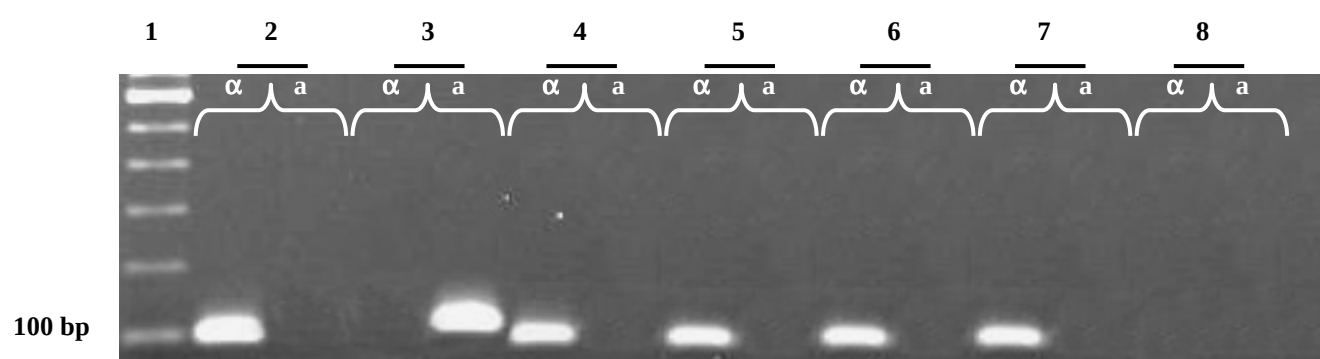


Figure 1. PCR amplification of *C. neoformans* isolates for determination of mating type. Lane 1, molecular weight marker (Gibco 100bp); 2, ATCC 28957 (MAT α); 3, ATCC 28958 (MAT a); 4-7, clinical isolates; 8, negative control.

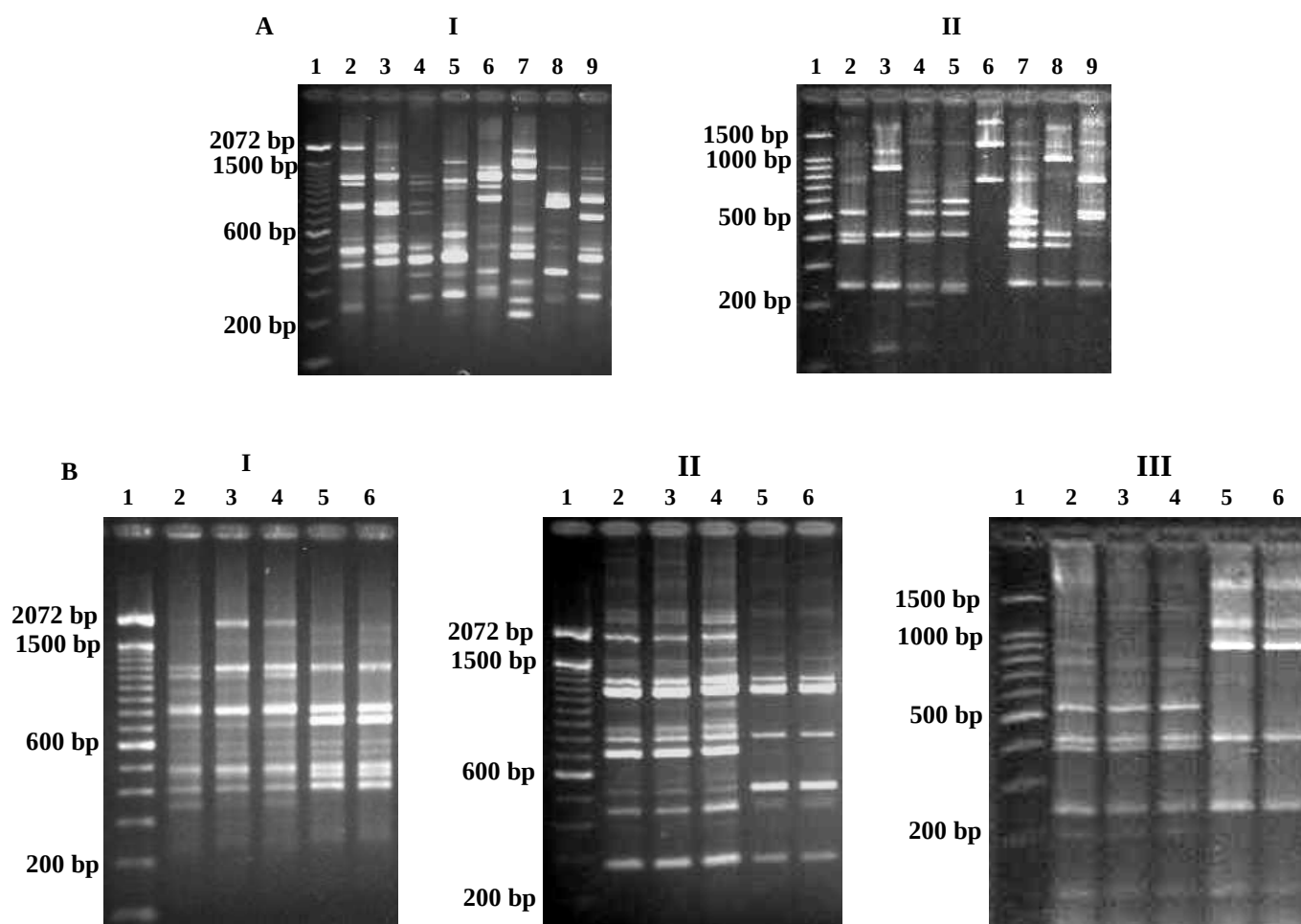


Figure 2.

2A. PCR fingerprinting with primer (GACA)₄ (AI) and PLB1-RFLP with *AvaI* (AII) patterns of *C. neoformans*. Lane 1*, molecular weight marker; 2-5, molecular types VNI, VNII, VNIII, VNIV; 6-9, molecular types VGI, VGII, VGIII, VGIV

2B. Representative gel of (GACA)₄-PCR fingerprinting (BI), Primer 6-RAPD (BII) and PLB1-RFLP (BIII) from clinical isolates of *C. neoformans*. Lane 1*, molecular weight marker; 2-4, clinical isolates 377, 379 and 387 (molecular type VNI, serotype A); 5-6, clinical isolates 382 and 384 (molecular type VNII, serotype A).

* Molecular weight marker (Gibco 100bp) to the (GACA)₄-PCR fingerprinting (AI and BI) and Primer 6-RAPD (BII).

Molecular weight marker (Promega 100bp) to the PLB1-RFLP (AII and BIII).

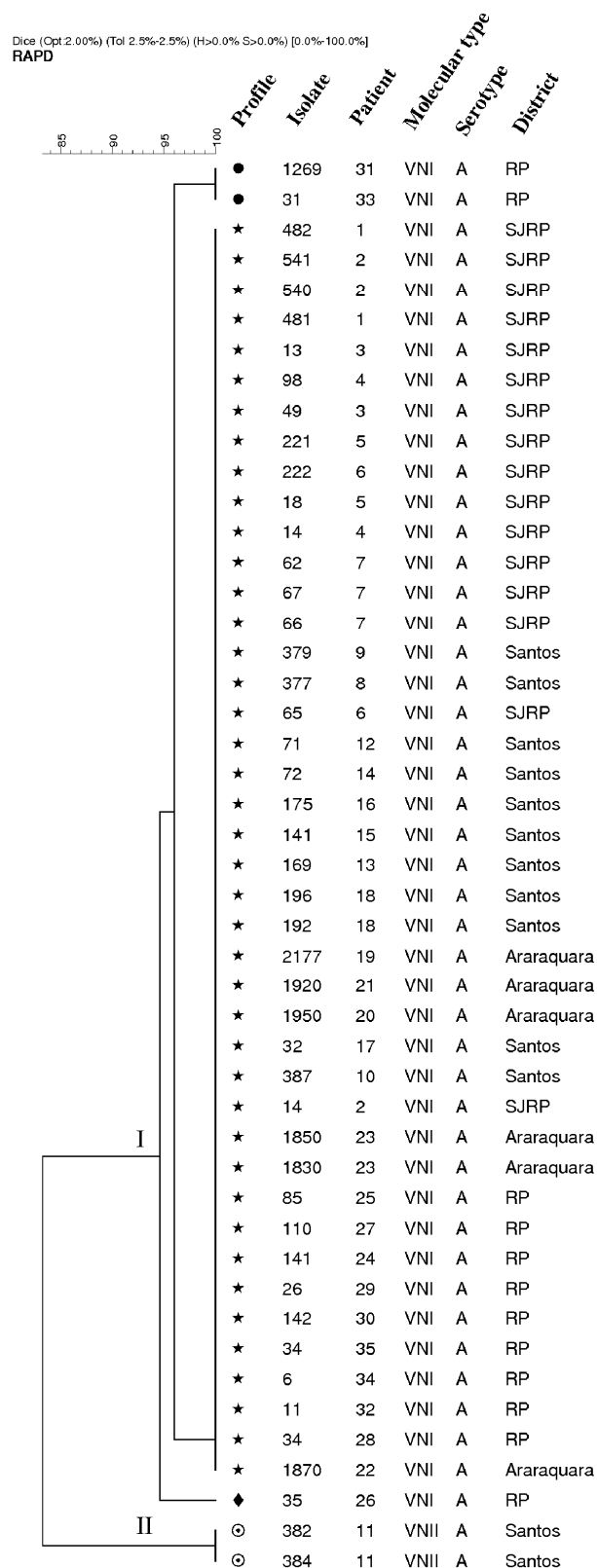


Figure 3. Dendrogram of the PCR-fingerprinting patterns obtained from *C. neoformans* isolates with primer (GACA)₄.

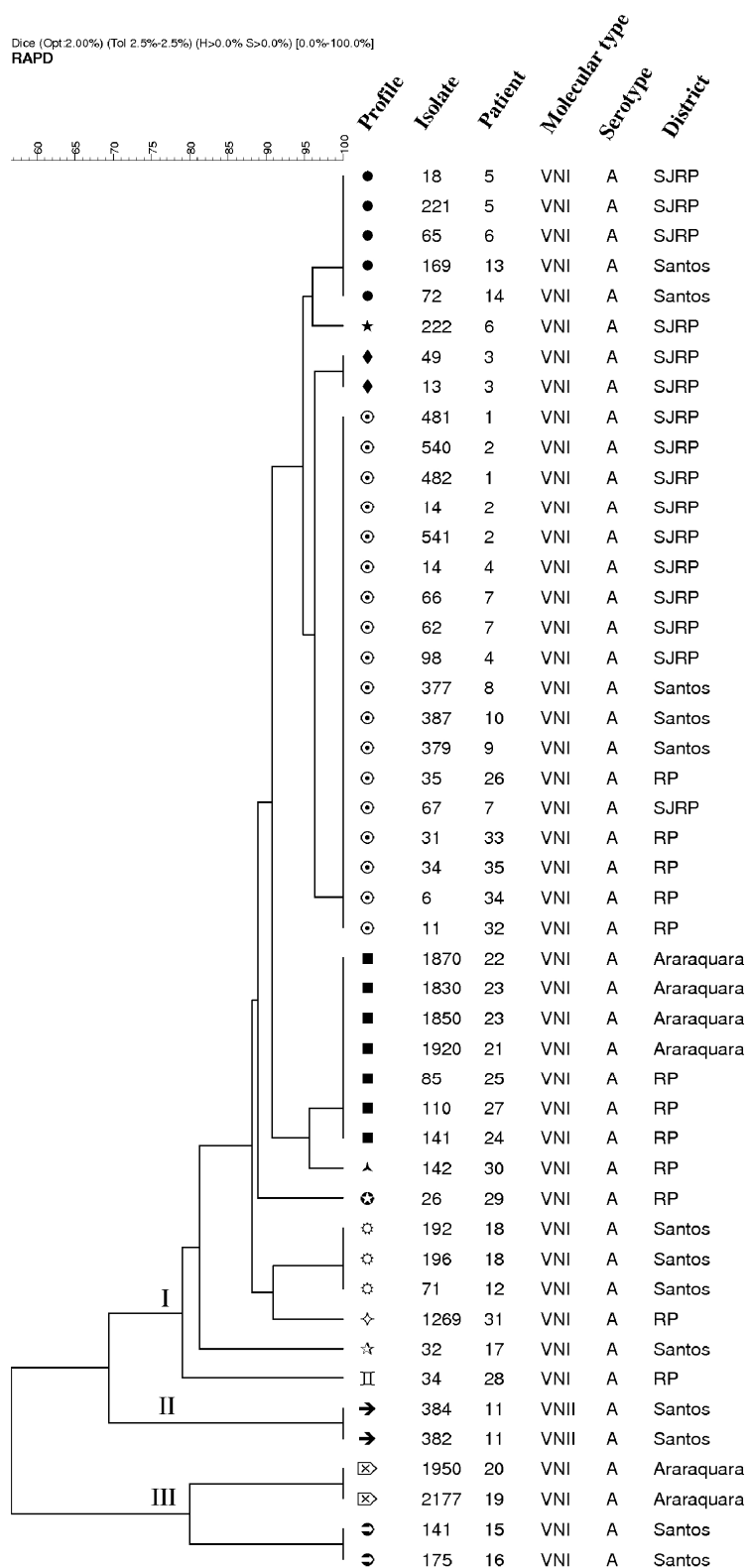
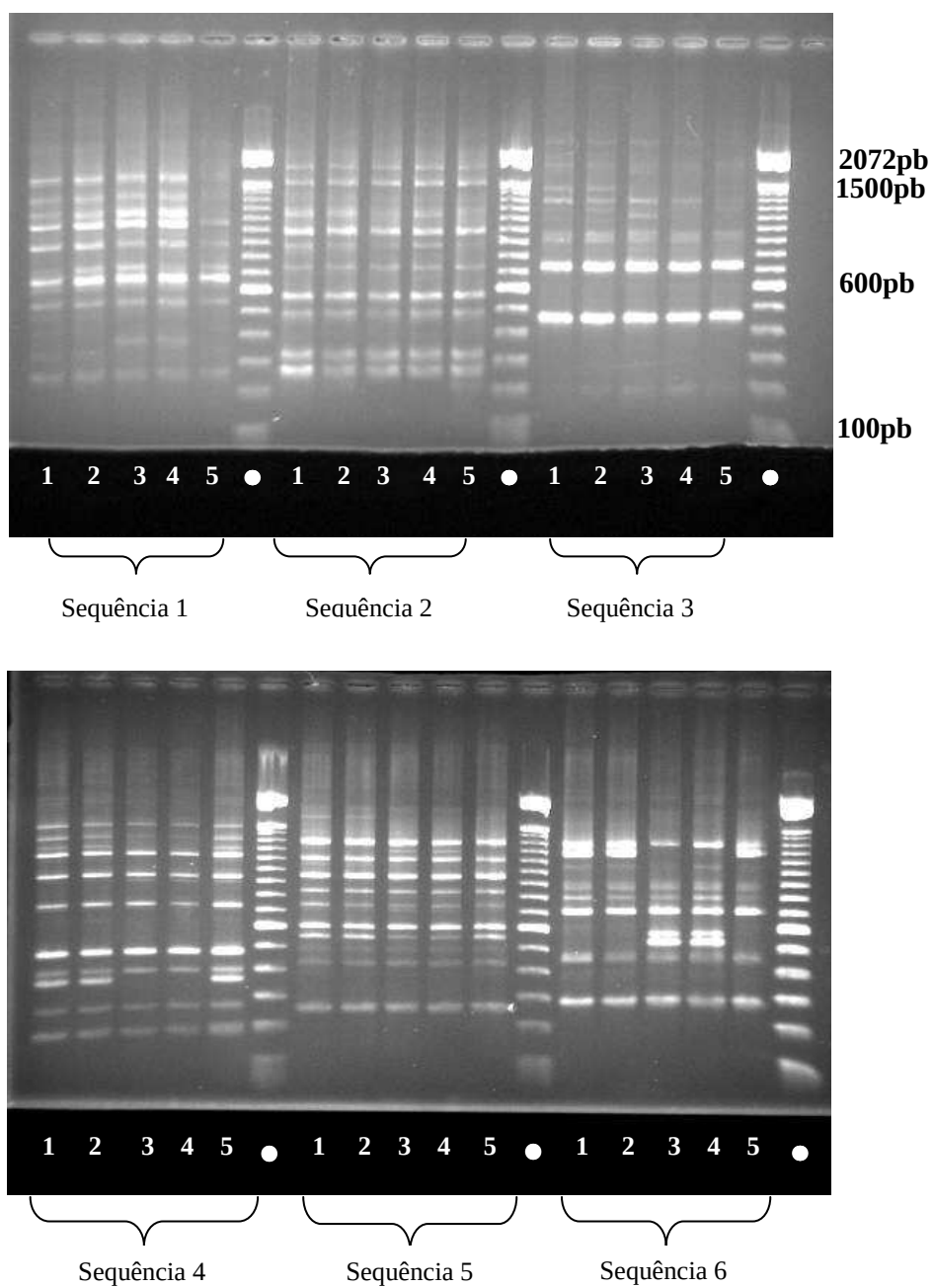


Figure 4. Dendrogram of the RAPD patterns obtained from *C. neoformans* isolates with primer 6.

8. ANEXOS



Anexo 1. Perfis representativos de RAPD de cinco isolados de *C. neoformans* obtidos com os iniciadores 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do Kit Ready to Go (gel a 2%). ● = Marcador de tamanho molecular 100bp (Invitrogen).

Anexo 2. Esquema de diluição das drogas solúveis e insolúveis em água. M27-A2, 2002 – CLSI.

Drogas solúveis em água (fluconazol e 5-fluorocitosina)						
Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	+ Meio* (mL)	= Concentração Intermediária (µg/mL)	= Concentração Final (1:10) (µg/mL)
1	10240	Estoque	1,0	7,0	1280	128
2	1280	Passo 1	1,0	1,0	640	64
3	1280	Passo 1	1,0	3,0	320	32
4	320	Passo 3	1,0	1,0	160	16
5	320	Passo 3	0,5	1,5	80	8
6	320	Passo 3	0,5	3,5	40	4
7	40	Passo 6	1,0	1,0	20	2
8	40	Passo 6	0,5	1,5	10	1
9	40	Passo 6	0,5	3,5	5	0,5
10	5	Passo 9	1,0	1,0	2,5	0,25

A concentração na placa será a metade da concentração final (1:10), devido a adição do inóculo.

Drogas insolúveis em água (anfotericina B e itraconazol)						
Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	+ Meio* (mL)	= Concentração Intermediária (µg/mL)	= Concentração Final (1:100) (µg/mL)
1	3200	Estoque			3200	32
2	3200	Estoque	0,5	0,5	1600	16
3	3200	Estoque	0,5	1,5	800	8
4	3200	Estoque	0,5	3,5	400	4
5	400	Passo 4	0,5	0,5	200	2
6	400	Passo 4	0,5	1,5	100	1
7	400	Passo 4	0,5	3,5	50	0,5
8	50	Passo 7	0,5	0,5	25	0,25
9	50	Passo 7	0,5	1,5	12,5	0,125
10	50	Passo 7	0,5	3,5	6,25	0,0625

* = Dimetil Sulfóxido

A concentração na placa será a metade da concentração final (1:100), devido a adição do inóculo.

Anexo 3A. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B de isolados *C. neoformans* do Estado de São Paulo.

Paciente	Isolado	Ano	Estado	CIMs ($\mu\text{g/mL}$)							
				Fluconazol		Itraconazol		5-Fluorocitosina		Anfotericina B	
1	481	95	SP	2	S	0,125	S	4	S	0,0625	
1	482	95	SP	4	S	0,125	S	8	I	0,0625	
2	540	95	SP	4	S	0,0625	S	4	S	0,125	
2	541	95	SP	4	S	0,0625	S	4	S	0,125	
2	14	96	SP	8	S	0,0625	S	4	S	0,125	
3	13	96	SP	2	S	0,0625	S	4	S	0,0625	
3	49	96	SP	8	S	0,0625	S	4	S	0,0625	
4	98	96	SP	4	S	0,125	S	16	I	0,5	
4	14	96	SP	4	S	0,125	S	16	I	0,5	
5	221	96	SP	4	S	0,0625	S	8	I	0,125	
5	18	97	SP	4	S	0,0625	S	8	I	0,125	
6	222	96	SP	4	S	0,125	S	8	I	0,25	
6	65	97	SP	8	S	0,5	SDD	16	I	0,25	
7	62	97	SP	4	S	0,0625	S	16	I	0,25	
7	66	97	SP	8	S	0,125	S	16	I	0,25	
7	67	97	SP	8	S	0,125	S	16	I	0,25	
8	377	95	SP	4	S	0,0625	S	2	S	0,0625	
9	379	95	SP	4	S	0,0625	S	2	S	0,0313	
10	387	95	SP	4	S	0,0625	S	8	I	0,0625	
11	382	95	SP	2	S	0,125	S	4	S	0,0625	
11	384	95	SP	2	S	0,125	S	8	I	0,0625	
12	71	96	SP	4	S	0,25	SDD	4	S	0,0625	
13	169	96	SP	4	S	0,5	SDD	4	S	0,0625	
14	72	96	SP	2	S	0,25	SDD	8	I	0,25	
15	141	96	SP	2	S	0,25	SDD	8	I	0,25	
16	175	96	SP	4	S	0,25	SDD	8	I	0,25	
17	32	97	SP	4	S	0,25	SDD	8	I	0,25	
18	196	96	SP	4	S	0,25	SDD	16	I	0,5	
18	192	96	SP	4	S	0,25	SDD	16	I	0,125	
19	2177	99	SP	16	SDD	0,25	SDD	8	I	0,5	
20	1950	98	SP	16	SDD	0,25	SDD	8	I	0,25	
21	1920	98	SP	16	SDD	0,25	SDD	8	I	0,5	
22	1870	98	SP	32	SDD	0,5	SDD	4	S	1	

23	1850	98	SP	4	S	0,5	SDD	4	S	1
23	1830	97	SP	8	S	0,125	S	8	I	0,5
24	141	96	SP	8	S	0,25	SDD	4	S	0,5
25	85	98	SP	8	S	0,25	SDD	8	I	0,5
26	35	99	SP	4	S	0,25	SDD	4	S	0,5
27	110	98	SP	8	S	0,25	SDD	4	S	0,5
28	34	99	SP	16	SDD	0,25	SDD	8	I	0,5
29	26	98	SP	8	S	0,25	SDD	2	S	1
30	142	96	SP	8	S	0,25	SDD	8	I	0,5
31	1269	93	SP	16	SDD	0,25	SDD	8	I	0,5
32	11	98	SP	16	SDD	0,25	SDD	4	S	0,5
33	31	98	SP	16	SDD	0,25	SDD	8	I	0,5
34	6	99	SP	16	SDD	0,25	SDD	16	I	0,5
35	34	98	SP	16	SDD	0,25	SDD	8	I	0,5

SP = São Paulo

S = sensível

SDD = sensível dependente de dose

I = intermediário

R = resistente

} Critérios de classificação estabelecidos pelo CLSI, documento M-27 A2.

Anexo 3B. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B de isolados *C. neoformans* do Estado do Rio de Janeiro.

				CIMs (µg/mL)						
Paciente	Isolado	Ano	Estado	Fluconazol		Itraconazol		5-Fluorocitosina		Anfotericina B
1	4	95	RJ	4	S	0,0313	S	32	R	0,25
1	7	95	RJ	4	S	0,0313	S	32	R	0,125
1	8	95	RJ	8	S	0,0313	S	32	R	0,25
1	9	95	RJ	8	S	0,125	S	32	R	0,5
2	2	95	RJ	8	S	0,5	SDD	64	R	1,0
2	6	95	RJ	16	SDD	0,0625	S	16	I	1
3	26	96	RJ	16	SDD	0,125	S	32	R	1
3	27	96	RJ	2	S	0,125	S	32	R	1
3	28	96	RJ	16	SDD	0,25	SDD	32	R	1
3	30	96	RJ	64	R	0,125	S	16	I	1
4	33	96	RJ	4	S	0,0625	S	16	I	0,5
4	34	97	RJ	16	SDD	0,125	S	64	R	0,5
5	41	97	RJ	8	S	0,125	S	64	R	0,5
5	42	97	RJ	8	S	0,125	S	64	R	0,5
6	39	97	RJ	2	S	0,0625	S	8	I	0,5
6	40	97	RJ	16	SDD	0,25	SDD	32	R	0,5
7	43	97	RJ	8	S	0,0313	S	32	R	0,25
7	44	97	RJ	4	S	0,0313	S	16	I	0,5
7	45	97	RJ	8	S	0,125	S	16	I	0,5
7	47	97	RJ	4	S	0,25	SDD	16	I	0,5
8	32	96	RJ	2	S	0,0313	S	32	R	0,5
9	46	97	RJ	8	S	0,125	S	32	R	0,5
9	38	97	RJ	8	S	0,0625	S	32	R	0,5
9	1	95	RJ	8	S	0,125	S	64	R	0,5
10	35	97	RJ	2	S	0,125	S	8	I	0,5
11	49	97	RJ	1	S	0,125	S	8	I	0,0313
11	50	97	RJ	8	S	0,0625	S	64	R	0,5
12	52	97	RJ	8	S	0,0625	S	64	R	0,5
12	54	97	RJ	2	S	0,0625	S	32	R	0,125
12	55	97	RJ	2	S	0,0625	S	16	I	0,5
13	60	97	RJ	4	S	0,5	SDD	8	I	0,5
13	61	97	RJ	4	S	0,25	SDD	16	I	0,5
13	62	97	RJ	8	S	0,25	SDD	8	I	0,5

14	63	98	RJ	4	S	0,25	SDD	16	I	0,5
14	64	98	RJ	4	S	0,5	SDD	16	I	0,25
15	70	98	RJ	4	S	0,0625	S	64	R	1
15	53	97	RJ	8	S	0,25	SDD	64	R	0,5
16	71	98	RJ	4	S	0,125	S	64	R	1
16	74	98	RJ	8	S	0,125	S	64	R	0,5
16	67	98	RJ	2	S	0,5	SDD	16	I	0,5
17	76	98	RJ	16	SDD	0,125	S	16	I	0,5
18	80	98	RJ	0,5	S	0,25	SDD	64	R	0,5
18	81	98	RJ	4	S	0,25	SDD	64	R	0,5
18	82	98	RJ	1	S	0,25	SDD	8	I	1
18	83	98	RJ	4	S	0,25	SDD	8	I	0,5
18	84	98	RJ	8	S	0,25	SDD	64	R	1
18	85	98	RJ	8	S	0,125	S	16	I	0,5
18	86	98	RJ	8	S	0,125	S	8	I	0,5
19	87	98	RJ	16	SDD	0,25	SDD	8	I	1
20	88	98	RJ	1	S	2	R	16	I	1
21	89	99	RJ	1	S	0,0313	S	8	I	0,5
22	90	99	RJ	4	S	0,0625	S	32	R	1
22	93	99	RJ	4	S	0,0313	S	16	I	2
22	111	00	RJ	4	S	0,125	S	64	R	1
22	112	00	RJ	8	S	0,125	S	64	R	1
22	101	99	RJ	8	S	0,125	S	64	R	0,25
23	103	00	RJ	8	S	0,25	SDD	16	I	0,5
23	104	00	RJ	8	S	0,125	S	64	R	0,5
23	105	00	RJ	8	S	0,25	SDD	16	I	1

RJ = Rio de Janeiro

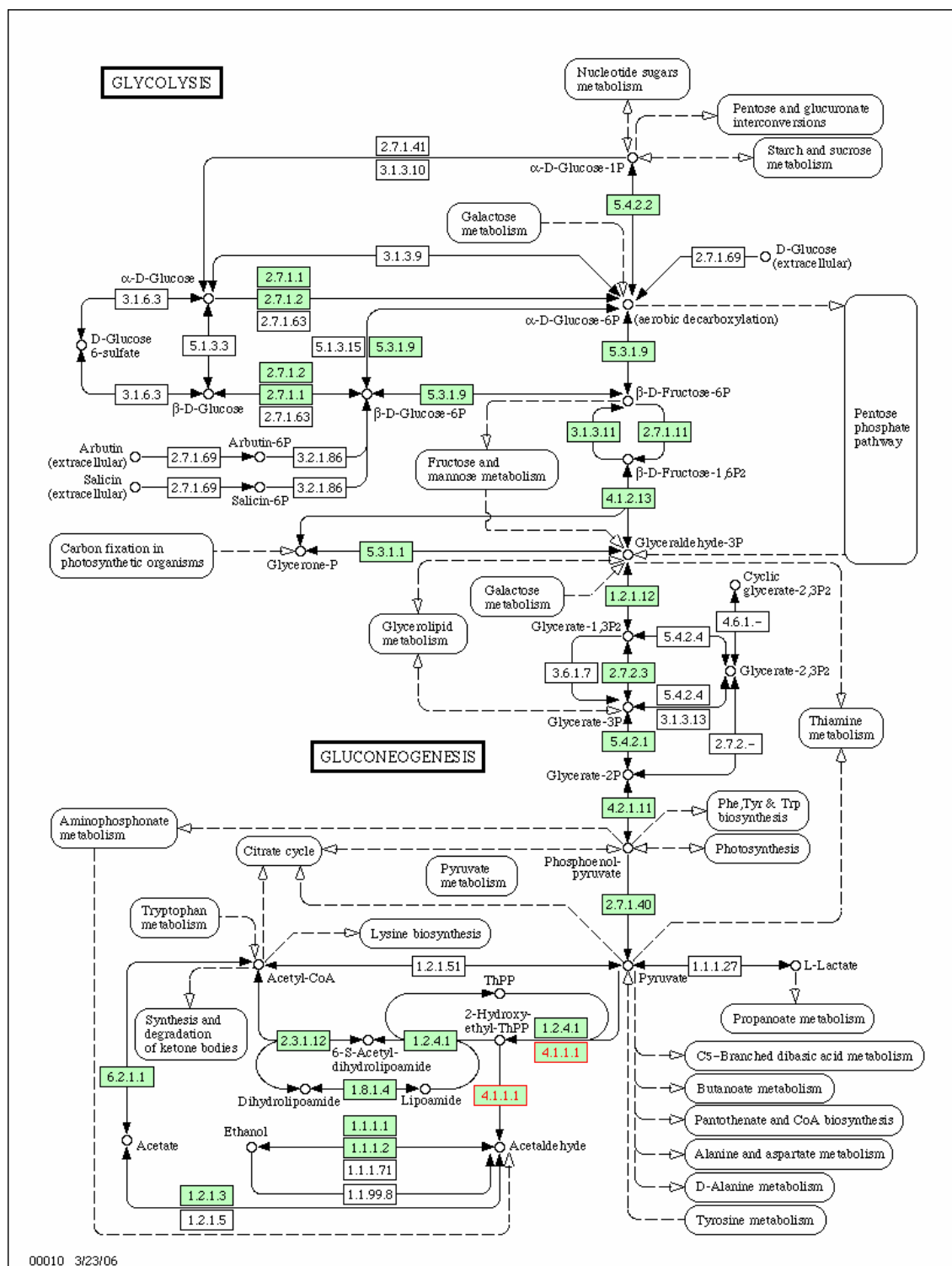
S = sensível

SDD = sensível dependente de dose

I = intermediário

R = resistente

Critérios de classificação estabelecidos pelo CLSI, documento M-27 A2.



Anexo 4. Esquema representativo da via de glicólise e neoglicogênese de *C. neoformans* (http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?cne00010+CNJ00950).

4.1.1.1 = Piruvato decarboxilase