



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ANA CAROLINA PEIXOTO SOUTO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENÓTIPO VGII
DE *CRYPTOCOCCUS GATTII* EM ISOLADOS
CLÍNICOS E AMBIENTAIS DO BRASIL**

Rio de Janeiro

2014

Análise da Variabilidade do Genótipo VGII de *Cryptococcus gattii* em Isolados Clínicos e Ambientais do Brasil

ANA CAROLINA PEIXOTO SOUTO

Dissertação apresentada ao Curso de Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Marcia dos Santos Lazera e Prof^ª. Dr^ª. Luciana Trilles.

Rio de Janeiro

2014

ANA CAROLINA PEIXOTO SOUTO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENÓTIPO VGII
DE *CRYPTOCOCCUS GATTII* EM ISOLADOS
CLÍNICOS E AMBIENTAIS DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Marcia dos Santos Lazera

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Trilles

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauro de Medeiros Muniz (Presidente)
Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld
Doutor em Vigilância Sanitária
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Ricardo Pereira Igreja
Doutor em Doenças Infecciosas e Parasitárias
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras pela paciência, por confiarem na minha capacidade e terem aceitado me orientar.

Ao Dr. Bodo Wanke pelo carinho.

Aos amigos do laboratório por me receberem de braços abertos quando cheguei.

Aos meus familiares por compreenderem minhas ausências em nossas reuniões.

Aos meus amigos que mesmo longe não desistiram de mim.

À Glaucia e Luciana por terem me ensinado os procedimentos e a rotina do laboratório.

À Isabel por ser uma amiga maravilhosa, me ajudar no laboratório e sempre estar presente quando preciso.

À Carla por me ajudar sempre que preciso.

À Rosani pelo apoio no laboratório. Me ensinou muito e tem muita paciência comigo.

À todos os envolvidos na minha vida por fazerem valer a pena se viver.

Souto, ACP. **Análise da Variabilidade do Genótipo VGII de *Cryptococcus gattii* em Isolados Clínicos e Ambientais do Brasil.** Rio de Janeiro, 2013. 80f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A criptococose é causada por duas espécies distintas de leveduras capsuladas da divisão dos basidiomicetos, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, as quais causam infecções invasivas emergentes de significativa letalidade, seja em imunodeprimidos ou imunocompetentes. No Brasil, a criptococose por *C. gattii* tem caráter endêmico, ocorrendo principalmente em indivíduos HIV negativos. O caráter epidêmico deste agente tem sido evidenciado por surtos em animais, sendo o mais significativo a epidemia ocorrida em Vancouver, Canadá, atingindo humanos e animais desde 1999. A emergência de infecções por *C. gattii* em área temperada tem chamado atenção para mudanças ecológicas e expansão geográfica de variantes virulentas. Diferentes genótipos têm sido identificados nas espécies de *Cryptococcus*, sendo o tipo VNI de *C. neoformans* e o tipo VGI de *C. gattii* predominantes no mundo. Diferentemente, nas regiões N e NE do Brasil, o predomínio das meningites fúngicas humanas está relacionado ao genótipo VGII, o mesmo tipo relacionado à epidemia em Vancouver, Canadá. Foi elaborado um consenso com um esquema de MultiLocus Sequence Typing (MLST) para os membros do complexo *C. neoformans/C. gattii* baseado nas regiões variáveis do genoma (genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e *IGS1*) para a genotipagem das duas espécies. Esta metodologia permitiu identificar os subtipos VGIIa, VGIIb e VGIIc, sendo o último considerado mais virulento dos subtipos de VGII isolados durante a epidemia. Com o objetivo de identificar sub-tipos potencialmente virulentos circulantes no Brasil, analisamos através de MLST, isolados clínicos e ambientais de *C. gattii*, de diferentes regiões e estados do Brasil. Cepas de *C. gattii* da Coleção de Fungos Patogênicos (CFP-IPEC) foram incluídas no estudo e os genótipos VGI-VGIV foram identificados através de *URA5*-RFLP (Restriction fragment length polymorfism do gene *URA5*). As cepas VGII foram analisadas por MLST para identificação de subtipos com base no consenso de tipagem proposto pela ISHAM. Foram encontradas 85 isolados VGII, sendo 75 clínicas e 10 ambientais, todas tipo sexuado MAT α , com exceção de 4 amostras que foram identificadas como MAT α . Na análise de MLST, foram obtidos de 8 a 32 tipos de alelos nos 7 loci, sendo que o gene *LAC1* apresentou a menor variabilidade e a região *IGS1* e o gene *SOD1* maior variabilidade. Verificamos que as cepas VGII do Brasil analisadas apresentam uma expressiva variabilidade molecular, principalmente quando comparadas ao relatado em estudos similares em outras regiões do mundo como Austrália, Canadá e Ásia. Do total de 56 subtipos (STs) identificados, 47 são exclusivos do Brasil e 40 são representados por apenas uma cepa. Os STs mais frequentes foram o ST20 (VGIIa) com 7 cepas e o ST5 com 6 cepas, todos da região norte. O ST124 foi identificado em 5 cepas e detectado exclusivamente na região nordeste (PI) de amostras clínicas e ambientais, sugerindo que estas fontes ambientais urbanas ou peri-urbanas possam ser a origem da infecção em humanos e que certos subtipos possam ter um padrão geográfico restrito. No Brasil, a ocorrência de diferentes STs moleculares sugere uma complexa estrutura populacional deste agente, além disso, a elevada diversidade genética observada nas cepas da região nordeste neste estudo e o fato de que os STs predominantes do surto do Canadá e EUA se encontram somente na região norte reforça a hipótese da origem de *C. gattii* VGII ser na floresta Amazônica.

Palavras-chave: 1. Criptococose. 2. *Cryptococcus gattii*. 3. MLST. 4. tipo molecular VGII. 5. Brasil.

Souto, ACP. **Analysis of the Variability of VGII genotype of *Cryptococcus gattii* in Environmental and Clinical Isolates from Brazil.** Rio de Janeiro, 2013. 80f. Master [Science dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Cryptococcosis is caused by two distinct species of capsulated basidiomycetes yeasts, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, which are responsible for invasive infections with significant lethality, either in immunocompetent or immunocompromised individuals. In Brazil, cryptococcosis by *C. gattii* is endemic, occurring mainly in HIV negative individuals. The epidemic nature of this agent has been reported by outbreaks in animals and human in Vancouver, Canada, which is the most significant outbreak and started in 1999. The emergence of cryptococcosis by *C. gattii* in temperate area has drawn attention to ecological changes and geographical spread of virulent variants. Different genotypes have been identified in *Cryptococcus* spp., and the VNI of *C. neoformans* and the VGI type of *C. gattii* are the most prevalent worldwide. Unlike, the prevalence of human fungal meningitis is related to genotype VGII in the regions North and Northeast of Brazil, the same type of the Canada epidemic. Was developed a consensus MultiLocus Sequence Typing (MLST) scheme for the members of the *C. neoformans/C. gattii* species complex based on the variable regions of the genome (genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* and *IGS1*). This methodology allowed the identification of VGIIa, VGIIb and VGIIc, being the latter the most virulent subtype isolated during the epidemic. The aim of the study is to identify the potentially virulent subtypes of *Cryptococcus* spp., which occur in Brazil, by MLST. Clinical and environmental isolates of *C. gattii* from different Brazilian regions, stored in the Culture Collection of Pathogenic Fungi (CFP- IPEC) were included in the study. The genotypes VGI - VGIV were identified through *URA5* - RFLP (Restriction fragment length polymorphism of *URA5* gene). All 85 VGII strains, 75 clinical and 10 environmental, were analyzed by MLST to identify subtypes based on consensus typing proposed by ISHAM. The majority of the strains (81) were identified as mating type alfa, and four as mating type a. In the MLST analysis, 8 to 32 allele types were observed in the 7 loci. The gene *LAC1* showed less variability and *IGS1* and *SOD1* the highest variability. Our findings showed that Brazilian VGII exhibit a significant molecular variability, especially when compared to the studies in other regions of the world, like Australia, Canada and Asia. From a total of 56 STs (subtypes) identified, 47 are unique in Brazil and 40 are represented by only one strain. The most frequent STs were ST20 (VGIIa), accounting 7 strains, and ST5, accounting 6 strains, all from the northern Brazilian region. The ST124 was identified in 5 strains and detected exclusively in the northeast (PI) region from clinical and environmental strains, suggesting that these urban or peri-urban environmental sources can cause human infection and certain subtypes may have a restricted geographic pattern. In Brazil, the occurrence of different molecular types suggests a complex population structure of this agent, in addition, the high genetic diversity observed in the strains of the northern region and the fact that the predominant subtypes of the outbreak in Canada and the U.S. are only in the north region, reinforce the hypothesis of the origin of *C. gattii* VGII be in the Amazon rainforest.

Keywords: 1. Cryptococcosis. 2. *Cryptococcus gattii*. 3. MLST. 4. molecular type VGII. 5. Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Observação de <i>Cryptococcus</i> e sua cápsula polissacarídica	4
Figura 2: Cultivo de <i>Cryptococcus</i> spp. em meio semente de níger	5
Figura 3: Meio CGB para diferenciação das espécies <i>C. gattii</i> (A) e <i>C. neoformans</i> (B)	6
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Cryptococcus</i>	7
Figura 5: Taxonomia de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	8
Figura 6: Perfil das cepas-padrão em gel de agarose 3%	23
Figura 7: Observação do perfil do tipo sexuado em gel de agarose 3%	27
Figura 8: A - Sítios polimórficos do gene <i>CAP59</i> e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene <i>CAP59</i> de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).	31
Figura 9: A - Sítios polimórficos do gene <i>GPD1</i> e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene <i>GPD1</i> de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).	32
Figura 10: A - Sítios polimórficos do gene <i>LAC1</i> e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene <i>LAC1</i> de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).	33

- Figura 11: A - Sítios polimórficos da região IGS1 e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) da região IGS1 de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%). 34
- Figura 12: A - Sítios polimórficos do gene *PLB1* e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene *PLB1* de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%). 35
- Figura 13: A - Sítios polimórficos do gene *SOD1* e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene *SOD1* de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (demonstrados valores acima de 60%). 36
- Figura 14: A - Sítios polimórficos do gene *URA5* e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene *URA5* de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%). 37
- Figura 15: Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) dos loci *CAP59*, *GPD1*, *IGS1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* combinados de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000

replicações (demonstrados os valores acima de 60%). #,
Cepas de origem ambiental; MAT a, mating type a.

39

Figura 16: Distribuição dos tipos de sequência pelas regiões brasileiras 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Marcadores moleculares com seus iniciadores, ciclo de amplificação e nº de pares de bases usados no MLST.	24
Tabela 2: Lista de cepas VGII utilizadas no estudo de MLST com seus respectivos dados, alelos e subtipos moleculares (ST)	28
Tabela 3: Genes com seus respectivos total de alelos, sítios polimórficos, alelo mais encontrado, nº de isolados com alelos únicos e diversidade haplotípica	30

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervoso Central
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
CGB	meio canavanina-glicina-azul de bromotimol
PCR	Polymerase Chain Reaction
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLMT	Multilocus Microsatellite Typing
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ISHAM	International Society of Human and Animal Mycoses

AT	Tipo de alelo
ST	Tipo de sequencia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
CFP	Coleção de Fungos Patogênicos
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
µL	Microlitro
mg	miligrama
NaCl	Cloreto de sódio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
RPM	rotação por minuto
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Ng	nanograma
Pb	pares de base
Uv	ultravioleta
V	volts
LMM	Laboratório de Micologia Médica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 PATOGENIA	2
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	3
1.4 TAXONOMIA	4
1.5 CICLO DE VIDA	6
1.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	8
1.7 ECOEPIDEMIOLOGIA	16
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVO GERAL	20
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 ISOLADOS	21
5.2 EXTRAÇÃO DE DNA	21
5.3 TIPAGEM MOLECULAR - <i>URA5</i> -RFLP	22
5.4 POLIMORFISMO MOLECULAR DOS ISOLADOS E IDENTIFICAÇÃO DE SUBTIPOS - MLST	24
5.4.1 Amplificação dos genes	24
5.4.2 Purificação	25
5.4.3 Sequenciamento	26
5.4.4 Análise dos resultados	26
5.5 TIPO SEXUADO	26
6. RESULTADOS	28

7. DISCUSSÃO	41
8. CONCLUSÕES	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICE A - Meio de Cultura Semente de Níger (NSA)	65
APÊNDICE B - Meio de Cultura Sabouraud dextrose ágar 2% modificado	66
APÊNDICE C - Tampão de Lise	67
APÊNDICE D - Protocolo de Purificação	68

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica que afeta humanos e animais. É causada por duas espécies distintas de leveduras encapsuladas da divisão dos basidiomicetos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A micose tem como porta de entrada a inalação de blastosporos do meio ambiente causando lesão primária pulmonar, podendo o fungo se disseminar para outros órgãos, porém possui forte tropismo pelo sistema nervoso central (SNC).

A criptococose acomete ambos indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos e possui significativa letalidade e morbidade, principalmente sob a forma de meningoencefalite. Pode apresentar-se como uma infecção cosmopolita oportunista associada às condições de imunodepressão causada por *C. neoformans* ou como uma infecção endêmica que acomete imunocompetentes causada por *C. gattii*; porém podem ocorrer outras formas clínicas com etiologia diferente como por exemplo uma infecção fatal por *C. neoformans* sorotipo A em imunocompetente ou infecção por *C. gattii* na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Lazéra *et al.* 2005).

1.1 HISTÓRICO

Busse em 1894 e Buschke em 1895 informaram o primeiro caso de doença humana causada por essa levedura nomeando-a *Saccharomycosis hominis*. Ao mesmo tempo, o fungo foi cultivado pela primeira vez por Sanfelice em fermentados de suco de pêsego em 1894, denominando o agente de *Saccharomyces neoformans* (Chowdhary, 2012). Em 1896, Curtis identificou a levedura como *Megalococcus myxoides* a partir de um caso humano de infecção na virilha e posterior óbito por infecção do SNC. Mais tarde, após experimentos com animais em laboratório, a levedura foi denominada *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*, por terem sido visualizadas lesões granulomatosas em forma de tumores (Barnett, 2010). Em

1901, Vuillemin renomeou o organismo como *Cryptococcus hominis*, pois não havia a formação de ascósporos como em *Saccharomyces* spp (Bovers *et al*, 2008a). Stoddard e Cuttler (1916) descreveram dois casos de meningite e, em análise de exames histopatológicos, foi visualizada região clara ao redor das leveduras, a qual foi interpretada como evidência de lise celular, o que fez com que o agente fosse denominado *Torula histolytica*. Em 1935, Benham realizou estudos de morfologia, fermentação, patologia e sorologia em numerosas leveduras identificando algumas como *Cryptococcus*, *Saccharomyces* e *Torula*. Tais leveduras foram renomeadas e reunidas em um só gênero e espécie, *Cryptococcus hominis*, com duas variedades (Benham, 1935). Evans, em 1950, verificou diferenças na imunogenicidade de diferentes cepas, sendo identificados os sorotipos A, B e C. Por volta do ano de 1950, Benham propôs o nome *C. neoformans* como *nome conservandum*, tanto para isolados ambientais como para clínicos, encerrando a discussão em torno da terminologia até então usada para casos de criptococose, como doença de Busse-Buschke, blastomicose, torulose e saccharomicose (Benham, 1950). Em 1970, cepas atípicas de *C. neoformans* foram identificadas como uma nova variedade por Vanbreuseghem & Takashio (1970), *C. neoformans* var. *gattii*. A sua importância como um patógeno oportunista tem aumentado nas últimas décadas, principalmente como resultado da SIDA, quimioterapia para tratamento de câncer, e imunossupressão utilizada em transplante de órgãos (Mitchell & Perfect, 1995).

Baseados nas diferenças na distribuição geográfica, nos nichos ecológicos, na epidemiologia, na patobiologia, na apresentação clínica e molecular, atualmente são reconhecidas duas espécies de *Cryptococcus*: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Kwon-Chung & Varma, 2006).

1.2 PATOGENIA

A criptococose é adquirida através da inalação de leveduras ressecadas ou basidiósporos que se depositam nos bronquíolos terminais e alvéolos causando uma pneumonite focal (Levitz, 1991). A partir dos alvéolos, os propágulos podem se disseminar para outros órgãos como fígado (Nara *et al*, 2008), pele (Durden & Elewski, 1994; Van Grieken *et al*, 2007), trato urinário (Sobel & Vazquez, 1999), olhos (Seaton *et al*, 1997) e articulações (Cuellar *et al*, 1992) através da circulação sanguínea, desencadeando infecção

sistêmica regressiva subclínica ou doença, sendo que os agentes possuem um tropismo pelo SNC (Currie *et al*, 1994). Pode ocorrer transmissão através da placenta da mãe para o feto, porém é raro (Patel *et al*, 2012), assim como transmissão por um órgão transplantado de um doador com infecção ativa (Sun *et al*, 2010; Baddley *et al*, 2011).

O curso da infecção (resolução, infecção latente ou disseminação sintomática) depende do estado do sistema imune do hospedeiro, do tamanho do inóculo e da virulência da cepa (Perfect & Casadevall, 2002). Imunocomprometidos com criptococose pulmonar apresentam sintomas mais severos e uma progressão da doença mais rápida que pacientes imunocompetentes (Nadrous *et al*, 2003). A doença pulmonar é mais frequente em indivíduos imunocompetentes e os sintomas variam de quadros assintomáticos a pneumonias graves com insuficiência respiratória (Lazéra *et al*, 2005).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Diversos fatores estão implicados na patogenia da levedura, dentre os quais encontram-se termotolerância a 37°C, síntese de melanina, presença de cápsula (figura 1) e produção de exoenzimas (Karkowska-Kuleta *et al*, 2009). A cápsula, que é composta de cerca de 88% de glucurono-xilomanana (GXM) e 12% de galacto-xilomanana (GalXM) junto com algumas manoproteínas, está presente nos isolados do meio ambiente e pode proteger as células de uma desidratação. A família de genes que controlam a biossíntese da cápsula confere ao *Cryptococcus* a capacidade de elaborar uma cápsula variável e complexa (Bose *et al*, 2003). O componente polissacáride capsular atua inibindo a fagocitose; engloba fatores do complemento; absorve e neutraliza opsoninas, anticorpos protetores e promove ainda a inibição da quimiotaxia de neutrófilos (Campos & Baroni, 2010). Vários genes necessários para a biossíntese da cápsula já foram identificados: *CAP59*, *CAP60* e *CAP64*. A deleção de alguns destes genes resulta em cepa mutante acapsulada e avirulenta. A reintrodução de uma cópia funcional de um dos genes da cápsula no mutante restaura a produção de cápsula e a virulência (Chang *et al*, 1996; Chang & Kwon-Chung, 1998).

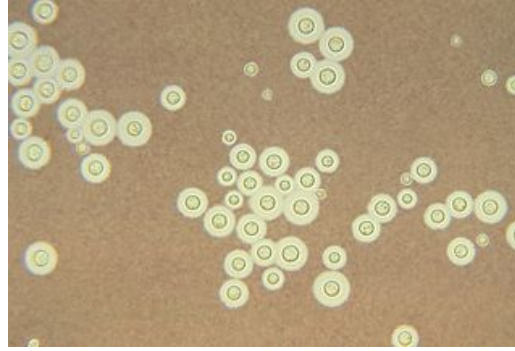


Figura 1: Observação de *Cryptococcus* e sua cápsula polissacarídica (Fonte: CDC)

O tamanho da cápsula e a habilidade de crescimento a 37°C parecem ter relação direta com a produção de fosfolipase e promovem maior atividade enzimática. A fosfolipase produzida é considerada um fator de virulência já que pode digerir membranas celulares e promover lise celular (Santagelo *et al*, 1999), além de destruir substância surfactante nos pulmões, facilitando, com isso, a adesão da levedura (Vidotto *et al*, 1996; Karkowska-Kuleta *et al*, 2009).

A produção de melanina se dá através de enzimas oxidativas chamadas lacases e sua função é proteger a célula contra a fagocitose (Williamson, 1994). A lacase é uma enzima que quebra lignina permitindo que esses fungos cresçam em madeira em decomposição e outros substratos lignificados (Lazéra *et al*, 1998; Chan & Tay 2010). Além do mais, a produção de diversas enzimas como proteases, ureases e fosfolipase B facilita a invasão do tecido (Perfect & Casadevall, 2002; Chayakulkeeree & Perfect, 2006).

1.4 TAXONOMIA

Estudos filogenéticos incluem os membros do gênero *Cryptococcus* no Filo Basidiomycota, classe Tremellomycetes e ordem *Tremellales* (Findley *et al*, 2009) (figura 2).

C. neoformans é o anamorfo associado ao teleomorfo *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung, 1975), e *C. gattii* está associado ao teleomorfo *Filobasidiella bacillispora* (Kwon-Chung, 1976a). Apesar da forma dos basidiósporos das duas espécies serem diferentes, a morfologia da fase de levedura não possui diferenças marcantes. Além do mais, o cruzamento entre *C. neoformans* e *C. gattii* pode gerar diplóides híbridos, mas não recombinantes verdadeiros haplóides (Kwon-Chung & Varma, 2006).

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* são as únicas espécies de heterobasidiomicetos conhecidas como zoopatogênicas, sendo as demais saprófitas, biodegradadoras naturais, ou fitopatogênicas (Santos, 2008).

Staib, em 1963, desenvolveu o meio de *Guizotia abyssinica* (semente de níger) creatinina ágar para distinguir *C. neoformans* e *C. gattii*, produtores de melanina, de outras espécies de *Cryptococcus* spp. (figura 3), facilitando e tornando mais rápida a triagem das amostras clínicas e ambientais dos fungos patogênicos *C. neoformans* e *C. gattii* (Springer & Chaturvedi, 2010).



Figura 2: Cultivo de *Cryptococcus* spp. em meio semente de níger

Cryptococcus gattii pode ser diferenciado de *C. neoformans* por um amplo espectro de técnicas microbiológicas e moleculares (Bovers *et al*, 2008a; Meyer *et al*, 2009). O método convencional utilizado é o uso do meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), que permite o crescimento de *C. gattii*, mas não de *C. neoformans*. Os isolados de *C. gattii* crescem no meio de CGB, pois são resistentes a L-canavanina e são capazes de utilizar a glicina como fonte de carbono e nitrogênio, mudando a cor do meio para azul cobalto devido à liberação de íons amônio no metabolismo da glicina. Muitos isolados de *C. neoformans* são capazes de assimilar a glicina, mas são sensíveis a L-canavanina, não crescendo no meio de CGB, mantendo a cor amarelo-esverdeada original do meio (figura 4) (Kwon-Chung *et al*, 1982a).

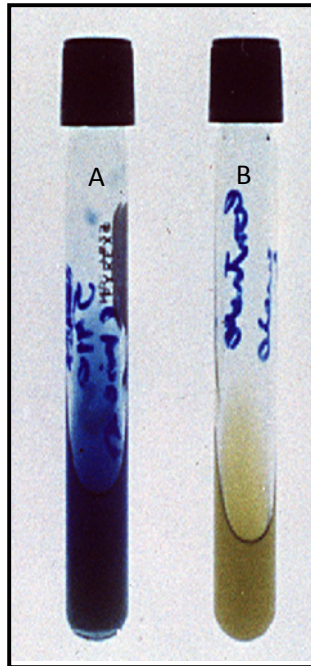


Figura 3: Meio CGB para diferenciação das espécies *C. gattii* (A) e *C. neoformans* (B).

1.5 CICLO DE VIDA

C. neoformans e *C. gattii* possuem dois tipos de reprodução: assexuada e sexuada (figura 5). A fase assexuada, ou anamórfica, é caracterizada por leveduras brotantes e a fase sexuada, ou teleomórfica, é caracterizada pelo cruzamento entre cepas de tipos sexuais (*mating type*) compatíveis (MAT α e MAT α 2). Nesse processo há conjugação das duas células e formação de micélio dicariótico com grampo de conexão e septo tipo doliporo, característico dos basidiomicetos. Na extremidade da hifa ocorrem dilatação e formação de basídios que dão origem a basidiósporos em cadeias, cujo aspecto macroscópico é de fungo filamentoso hialino delicado, denominado *Filobasidiella*. Esta reprodução sexuada é obtida somente *in vitro* em condições específicas e meios especiais como ágar-malte, ágar suco V8 e infusão de feno-ágar (Kwon-Chung *et al*, 1982b).

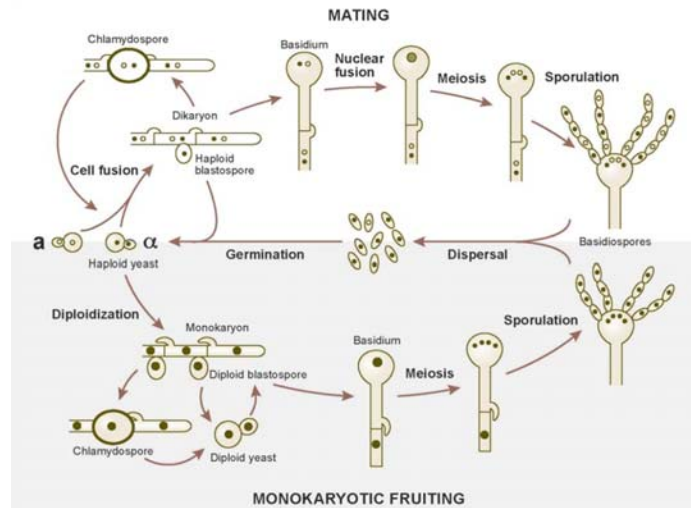


Figura 4: Ciclo de vida de *Cryptococcus* (Fonte: Chowdhary, 2012).

As células MATa produzem feromônio MFa em resposta à depleção de nitrogênio e, em resposta a este feromônio, as células MATalfa formam um tubo de conjugação (Chang *et al*, 2000; Wang *et al*, 2000). As células MATalfa produzem feromônio MFalfa em presença das células MATa. Em resposta a esse feromônio (Shen *et al*, 2002), as células MATa aumentam de tamanho e podem se fundir com o tubo de conjugação das células MATalfa (Davidson *et al*, 2000).

A grande maioria dos isolados clínicos e ambientais são MATalfa, tipo sexuado este que tem sido associado à virulência. Estudos recentes de genética de população fornecem evidências que tanto o cruzamento com ambos os tipos sexuais MATa-MATalfa e o cruzamento unissexuado MATalfa-MATalfa ("same sex mating") ocorrem na natureza com *C. neoformans* e *C. gattii*, com o potencial de influenciar a trajetória evolutiva e a produção de esporos infecciosos. (Xu *et al*, 2000; Yan & Xu, 2003).

Outro tipo de reprodução é a frutificação monocariótica ou haplóide, este processo ocorre em resposta a depleção de nitrogênio e/ou dissecação (Wickes *et al*, 1996). Assemelha-se com o cruzamento, porém o cruzamento ocorre entre células de tipos sexuais opostos (Kwon-Chung, 1976b; Kwon-Chung & Popkin, 1976), enquanto que a frutificação haplóide envolve células do mesmo tipo sexual (Wickes *et al*, 1996). Durante a frutificação o núcleo se funde dentro da hifa (Lin *et al*, 2005), enquanto que no cruzamento a fusão do núcleo ocorre no basídio (Kwon-Chung, 1976b). Além disso, os grampos de conexão durante o cruzamento sexual são completos enquanto que na frutificação eles não são (Wickes *et al*, 1996). A descoberta de que este tipo de reprodução, sob condições laboratoriais, representa um novo tipo de reprodução sexual envolvendo apenas um dos dois tipos sexuais, mais

comumente MATalfa, revelou que a reprodução unissexuada pode influenciar profundamente a estrutura da população (Kwon-Chung *et al*, 1978).

Durante a frutificação haplóide, basídios com basidiósporos viáveis são formados, embora com uma frequência menor do que em um cruzamento padrão MATa-MATalfa (Wickes *et al*, 1996). Apesar de a primeira frutificação haplóide ser descrita em isolados MATalfa de todos os sorotipos (Wickes *et al*, 1996), foi também observada em alguns isolados MATa (Tschärke *et al*, 2003). Interessantemente, um isolado ambiental *C. gattii* da Ilha de Vancouver é um isolado diplóide homozigótico MATa (Fraser *et al*, 2005), que pode ter sido gerado por uma frutificação haplóide aberrante.

1.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Estudos de tipagem molecular dos agentes da criptococose têm utilizado diferentes métodos moleculares: PCR-fingerprinting (PCR com iniciador M13) e RFLP (Restriction fragment length polymorphism) do gene *URA5* segundo Meyer e colaboradores (1999, 2003), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), segundo Boekhout e colaboradores (2001), que permitiram identificar tipos moleculares VN de *C. neoformans* e VG de *C. gattii*. Comparados, estes métodos mostram correspondência entre si, bem como relação com sorotipos (figura 6). Assim, *C. neoformans* corresponde aos genótipos: VNI/AFLP1, sorotipo A; VNII/AFLP1A, sorotipo A; VNIII/AFLP3, sorotipo AD; e VNIV/AFLP2, sorotipo D; e *C. gattii* corresponde aos genótipos: VGI/AFLP4, sorotipo B; VGII/AFLP6, sorotipo B; VGIII/AFLP5, sorotipo B; e VGIV/AFLP7, sorotipo C (Meyer *et al*, 2003; Kidd *et al*, 2004).

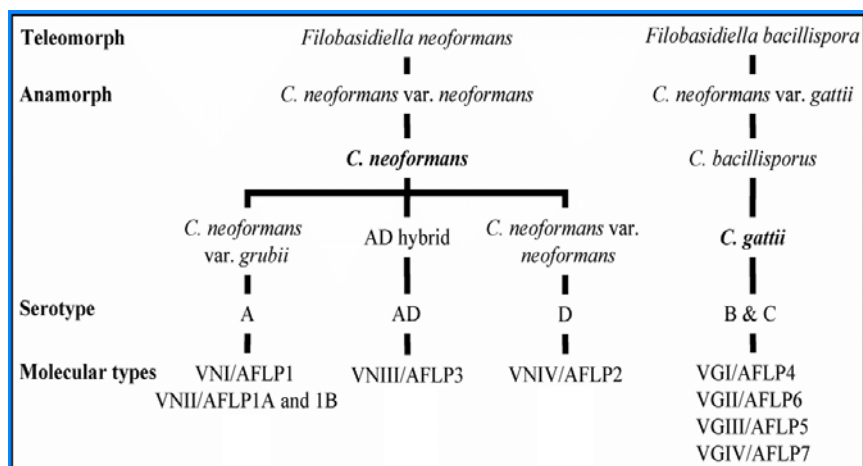


Figura 5: Taxonomia de *C. gattii* e *C. neoformans* (Fonte: Meyer *et al*, 2011).

Como mencionado anteriormente, *C. gattii* pode ser dividido em 4 tipos moleculares (VGI-VGIV). Isto é significativo, uma vez que cada tipo molecular tem características distintas. Os tipos moleculares VGI e VGII são os dois tipos frequentemente associados com a doença em indivíduos saudáveis (Byrnes & Heitman, 2009). Infecções causadas por VGI foram relatadas ocorrendo com taxas elevadas entre certas populações na Austrália, tais como grupos aborígenes, mas também houve muitos casos em outros lugares no mundo. Em contraste, os números de infecção por VGII são elevados no Noroeste do Pacífico, em que mais de 95% de todos os casos são atribuídos a este tipo molecular (Sorrell, 2001; Fraser *et al*, 2003, 2005; Bovers *et al*, 2008b; Byrnes & Heitman, 2009). Em comparação, os tipos moleculares VGIII e VGIV têm sido largamente associados com a doença em pacientes com HIV/SIDA, o que é semelhante ao perfil epidemiológico observado para *C. neoformans* (Perfect, 1989; Sorrell, 2001; Litvintseva *et al*, 2005; Byrnes & Heitman, 2009; Park *et al*, 2009). O tipo molecular VGIII foi isolado em certo número de regiões em todo o mundo (Fraser *et al*, 2005; Bovers *et al*, 2008b), e verificou-se ser o tipo molecular predominante (> 93%) num grupo de pacientes com HIV/SIDA infectados com *C. gattii* no sul da Califórnia (Chaturvedi *et al*, 2005). O tipo molecular VGIV parece ser raro na população global, mas tem sido relatado em pacientes com HIV/SIDA na África subsaariana (Litvintseva *et al*, 2005).

Tipagens mais detalhadas de *C. gattii* tem demonstrado que os surtos possuem geralmente o predomínio de um tipo molecular, por exemplo: VGI na Austrália e VGII no pacífico noroeste americano (Sorrell, 2001; Kidd *et al*, 2005). Além disso, genótipos clonais únicos são frequentemente associados a surtos, por exemplo: VGIIa, VGIIb, VGIIc (Fraser *et al*, 2005; Kidd *et al*, 2004; Byrnes *et al*, 2010).

A virulência e patogenicidade de um microrganismo são determinadas, não por um único gene, mas sim pela interação de vários genes que resulta em um genótipo mais ou menos virulento. Estudos da patogenicidade bacteriana têm demonstrado que o estabelecimento e a gravidade da infecção são determinados pelo genótipo do agente infeccioso (Lopez *et al*, 2003; Arvand *et al*, 2007). Genótipos identificados por MLST são correlacionados com clones hipervirulentos de *Bartonella henselae* (Arvand *et al*, 2007). Enquanto que diferenças na transmissibilidade e virulência de algumas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* estão relacionadas a certos genótipos, aos quais foram incorporados genes de virulência (Lopez *et al*, 2003). Perfis de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tem sido relacionados à virulência de *Sporothrix schenckii* (Kong *et al*, 2006) e genótipos de MLMT (Multilocus Microsatellite Typing) à virulência de *Microsporium*

canis (Sharma *et al*, 2007). Isolados de *Candida albicans* resistente à fluorocitosina são agrupados em um perfil específico de MLST, que foi subseqüentemente atribuído à mudança de um único nucleotídeo no gene *FUR1*(uracil phosphoribosyltransferase) (Dogson *et al*, 2004). Estudos moleculares dos isolados de *C. gattii* da epidemia de Vancouver, Canadá, identificaram um genótipo específico associado (MLST) com grande virulência em humanos e animais, o VGIIa (Fraser *et al*, 2005). Tal genótipo de grande virulência já foi identificado em 2 isolados clínicos no Rio de Janeiro (Pinto Junior *et al*, 2010; Lazéra - comunicação pessoal).

A classificação de *C. neoformans* e *C. gattii* foi originalmente baseada na sorologia, onde os sorotipos foram determinados pelos antígenos capsulares e foram divididos em: *C. neoformans* var. *neoformans* como sorotipo D, *C. neoformans* var. *grubii* como sorotipo A, sendo o sorotipo AD é um híbrido diplóide dos sorotipos A e D e, *C. gattii* como sorotipo B ou C (Kwon-Chung *et al*, 2011; Simwami *et al*, 2011). Sua distinção foi baseada na reação imunológica ao antissoro produzido contra diferentes composições de polissacarídeos que constituem a cápsula da levedura (Nishikawa *et al*, 2003).

A genotipagem tem substituído a tipagem sorológica para a classificação desses organismos, por ser mais precisa e auxiliar na compreensão das relações dentro e entre áreas geográficas (Chowdhary, 2012). A genotipagem de *Cryptococcus* spp. baseia-se em vários métodos moleculares, incluindo DNA fingerprinting (Meyer *et al*, 1993), PCR fingerprinting baseadas em sequências específicas de minisatélite (M13) ou microsatélite (e.g. (GACA)⁴ ou (CTG)⁵) (Baddley *et al*, 2001; Leon *et al*, 2006), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Meyer *et al*, 2003; Kidd *et al*, 2004), pulsed-field gel electrophoresis (Boekhout *et al*, 1997), luminex technology (Diaz & Fell, 2005; Bovers *et al*, 2007), amplified fragment length polymorphisms (AFLP) (Boekhout *et al*, 2001; Sharma *et al*, 2007; Hagen *et al*, 2010), random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (Boekhout & van Belkum, 1997; Lopez *et al*, 2003; Arvand *et al*, 2007), cariotipagem (Boekhout *et al*, 1997), restriction fragment length polymorphism (RFLP) do gene *URA5* (Casadevall & Perfect, 1998) e *PLBI* (Mitchell *et al*, 1995), o uso de sequências do espaçador intergênico (IGS) (Krockenberger *et al*, 2001), multigene sequence analysis (Boekhout *et al*, 2001), multilocus microsatellite typing (MLMT) (Litvintseva *et al*, 2005), mating type locus (Cogliati *et al*, 2006) e multilocus sequence typing (MLST) (Fraser *et al*, 2005).

Apesar de numerosas técnicas moleculares terem sido aplicadas para a subtipagem de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, apenas três métodos produzem resultados comparáveis: PCR fingerprinting, AFLP e MLST (Cogliati, 2013).

PCR Fingerprinting baseia-se na amplificação de sequências de DNA flanqueado por repetições simples de DNA que são utilizados como iniciadores individuais na PCR. A amplificação produz um perfil de bandas que discrimina as cepas ao nível de subespécie. Os iniciadores empregados na PCR fingerprinting incluem uma sequência de minissatélite-específica do fago tipo selvagem M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') e o iniciador microsatellite-específico (GACA)⁴. A técnica foi aplicada pela primeira vez para a tipagem de *Cryptococcus* em 1993 por Meyer e colaboradores para estudar um conjunto de cepas criptocócicas.

O método de tipagem AFLP baseia-se na digestão de amostras de DNA com uma enzima endonuclease de corte frequente e rara combinada com uma amplificação utilizando um adaptador que cria especificidade nos locais de restrição. Ciclos subsequentes da PCR são capazes de selecionar um perfil único, dependendo do número de nucleotídeos adicionados aos iniciadores. Fragmentos marcados com fluorescência são separados por um sequenciador capilar automatizado e visualizados como um perfil de bandas virtuais (Vos *et al*, 1995). A aplicação desta técnica para a tipagem de *Cryptococcus* requer uma digestão com enzimas de restrição *MseI* e *EcoRI* e uma amplificação com os dois iniciadores seletivos *MseI*-G e *EcoRI*-CA (Boekhout *et al*, 2001). A análise global de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* levou à identificação de três genótipos de AFLP (AFLP1, AFLP2 e AFLP3) entre cepas de *C. neoformans* e três (AFLP4, AFLP5 e AFLP6) entre *C. gattii*. Além disso, dois outros subtipos do genótipo AFLP1 foram identificados como AFLP1A e AFLP1B (Boekhout *et al*, 2001). Uma vez que AFLP é uma técnica com alto poder discriminatório, sendo capaz de atribuir um perfil exclusivo para cada cepa, contribuiu para elucidar a causa da epidemia de *C. gattii* na Ilha de Vancouver (Kidd *et al*, 2004).

MLST é uma técnica baseada na análise do sequenciamento de sequências parciais de genes constitutivos e de virulência que apresentavam grupos de sítios polimórficos expressivos. A combinação dos diferentes tipos de alelos dos sítios selecionados determina o genótipo MLST (Taylor & Fisher, 2003). O primeiro estudo utilizando MLST foi realizado com isolados de *C. neoformans* var. *grubii* e empregou 12 sítios polimórficos: *CAP10*, *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *MPD1*, *MP88*, *SOD1*, *TEF1 α* , *TOP1*, *URE1*, *PLB1* e *IGS1* (Litvintseva *et al*, 2006). Os resultados mostraram dois grandes grupos entre os isolados estudados, correspondendo aos tipos moleculares VNI e VNII da técnica PCR fingerprinting e um terceiro grupo, VNB, que incluía apenas isolados de Botswana; apesar de alguns autores não considerarem este um novo grupo. Um segundo estudo investigou isolados de *C. gattii* com o objetivo de elucidar a origem das cepas da epidemia da Ilha de Vancouver (Fraser *et al*,

2005). A análise, usando 7 sítios (*CAP10*, *GPD1*, *IGS1*, *LAC1*, *MPD1*, *PLB1*, e *TEF1 α*) e os dois sítios específicos para mating-type (*SXI α* e *SXI β*), diferenciou os 4 tipos moleculares da técnica PCR fingerprinting (VGI-VGIV) e os dois subtipos da epidemia da Ilha de Vancouver (VGIIa e VGIIb) (Cogliati, 2013).

Análise MLST também pode ser útil na identificação de fontes de infecção. Infecções pelo genótipo VGIIa foram diagnosticadas em pacientes de Alberta (Canadá), Dinamarca, Países Baixos e Suíça, porém todos estes pacientes tinham histórico de viagem à região endêmica da Ilha de Vancouver (Lindberg *et al*, 2007; Hagen *et al*, 2009).

Segundo Meyer e colaboradores (2009), o esquema ideal para o MLST de *Cryptococcus* deve preencher dois critérios: 1- deve amplificar e tipificar os mesmos genes para os 5 sorotipos/8 tipos moleculares usando o mesmo conjunto de iniciadores, e 2- os genes selecionados devem conter uma diversidade suficiente para produzir um esquema de tipagem discriminatório.

Devido à grande importância de *C. neoformans*/*C. gattii* como patógeno fúngico, vários grupos de pesquisa se concentram na determinação molecular de subgrupos geneticamente diversos dentro de cada espécie. Apesar do grande número de ferramentas moleculares aplicadas às espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, o conhecimento da estrutura de população destas espécies ainda é muito limitado, principalmente devido à falta de consenso entre os resultados obtidos pelas diversas técnicas. Para permitir a comparação de resultados, o grupo de trabalho da ISHAM (International Society of Human and Animal Mycoses) determinou a técnica de MLST utilizando sete sítios para a identificação de subtipos moleculares de tais espécies, por seu alto poder discriminatório e pela boa reprodutibilidade em diferentes laboratórios (Meyer *et al*, 2009). Foi colocada uma ênfase especial em sítios que exibiam o mais alto número de tipos de alelos diferentes, assim como o potencial de usar os mesmos iniciadores para os oito tipos moleculares previamente identificados para *C. gattii* e *C. neoformans*. Os genes para esses sítios incluem seis genes constitutivos e de virulência (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*), além do espaço intergênico *IGS1* que foi selecionado com base na sua alta diversidade alélica e que combinados representam um número mínimo de genes que dão um máximo poder discriminatório. Além do mais, as informações concernentes aos tipos de alelos (AT) e aos tipos de sequências (ST) estão disponíveis para acesso público em um banco de dados na página <http://mlst.mycologylab.org/> (Meyer *et al*, 2009). O sistema atribui o código de sequência automaticamente quando uma sequência é comparada com o banco de dados e, um código de sequência progressiva para novas sequências. Os usuários são obrigados a enviar todos os

dados necessários para o controle de qualidade, bem como os dados clínicos para completar o banco de dados caso haja um tipo de sequência novo.

Entre os genes escolhidos para o MLST, três codificam para fatores de virulência: a cápsula polissacarídica (*CAP59*), síntese de melanina (*LAC1*), e fosfolipase (*PLB1*). O gene *CAP59* é requerido para a biossíntese da cápsula (Chang & Kwon-Chung, 1994). Uma enzima chamada lacase catalisa compostos difenólicos em melanina, essa enzima é codificada por dois genes *LAC1* e *LAC2* (Perfect, 2005). O gene *PLB1* codifica a enzima fosfolipase B que possui um papel na invasão celular rompendo tecidos e compartimentos intracelulares das células fagocíticas (Cox *et al*, 2001). O gene *SOD1* codifica a enzima superóxido dismutase que regula a defesa antioxidante por meio da conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Fridovich, 1995). O gene *URA5* codifica a enzima orotidina-5-monofosfato pirofosforilase, componente da via de biossíntese da pirimidina (Edman & Kwon-Chung, 1990). Esta enzima contribui para a passagem das leveduras pela barreira hematoencefálica (Eisenman *et al*, 2007). O gene *GPD1* codifica a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, responsável pelo crescimento durante estresse osmótico (Albertyn *et al*, 1994).

Até hoje, todos os surtos de criptococose registrados foram causados por *C. gattii*. Surtos em animais foram descritos como pneumonia em cabras na Espanha (Baró *et al*, 1998) e forma disseminada em psitacídeos de diferentes espécies em aviário no interior de São Paulo (Raso *et al*, 2004). Na Austrália descobriu-se que a infecção por *C. gattii* é endêmica e afeta principalmente imunocompetentes, especialmente aborígenes (Ellis, 1987), além da epidemia detectada em animais (coalas e wombats) no Território Norte e Sudoeste do país (Carriconde *et al*, 2011). O maior surto foi registrado na ilha de Vancouver, Canadá, atingindo 38 casos humanos, entre 1999 e 2001, a maioria imunocompetente, sendo 58% do sexo masculino. Foi observado 72% dos casos com lesão pulmonar, 26% com lesão de SNC, sendo a letalidade em torno de 10% (Kidd *et al*, 2004).

A existência de uma alta incidência de criptococose na população aborígine do território norte da Austrália não é uma nova descoberta. Lo (1976) analisou 26 casos de criptococose ocorridos nesta região em 1957-1975: 25 estavam presentes em aborígenes de sangue puro, e 24 foram isolados em pacientes com meningite criptocócica. Todos os pacientes indígenas vieram de assentamentos, missões, estações de gado, sendo que nenhum veio de grandes cidades. Esta configuração rural da criptococose em aborígenes também pode explicar a baixa incidência da doença em aborígenes australianos do sul (Ellis, 1987).

O subtipo molecular VGI é o mais encontrado nas amostras clínica, veterinária e ambiental do leste da Austrália, onde as populações humanas são mais concentradas (Sorrell

et al, 1996). Além disso, numerosas infecções VGII foram relatadas na Austrália nos estados do leste, no sudoeste da Austrália Ocidental e no Território Norte (Chen *et al*, 1997; Campbell *et al*, 2005). A população VGII australiana tem estado em evidência desde 2005, quando foi sugerido como a possível origem de um surto em curso de criptococose na Ilha de Vancouver, Canadá (Fraser *et al*, 2005). Dados recentemente apresentados também sugerem a possibilidade de um "surto latente" em toda a Austrália (Carriconde *et al*, 2011).

Os primeiros casos de infecção por *Cryptococcus gattii* na Ilha de Vancouver, British Columbia (BC), no Canadá, ocorreram em 1999, resultando em uma das maiores incidências desta infecção em todo o mundo (Fyfe *et al*, 2008; Galanis & MacDougall, 2010). Começou a infectar animais e seres humanos que vivem ou viajam na Ilha de Vancouver, um clima temperado, muito diferente daquele que foi considerado o nicho ecológico tradicional de *C. gattii* (Hoang *et al*, 2004; Kidd *et al*, 2004; Duncan *et al*, 2006).

Existem duas propostas sobre a origem da epidemia na Ilha de Vancouver e sua expansão para o continente Australiano e os Estados Unidos: 1- O genótipo VGIIb (ST7) saiu da Austrália e se recombinau em trânsito ou na sua chegada a Ilha de Vancouver através da reprodução com tipo sexuado compatível, formando o genótipo VGIIa (ST20), que depois se disseminou para a Colúmbia Britânica e o Pacífico-Norte (Fraser *et al*, 2005). A origem do genótipo VGIIc (ST6) não é clara, mas pode ter surgido fora da região ou pode ser um isolado recombinado (Byrnes *et al*, 2009); 2- A origem da epidemia é o resultado da reprodução com tipos sexuais opostos, possivelmente da América do Sul, onde fez surgir o isolado VGIIa (Fraser *et al*, 2005; Escandon *et al*, 2006).

A maioria dos casos (95%) desta epidemia foi causada pelo tipo molecular VGII e foram agrupados em 2 subtipos clonais, VGIIa e VGIIb (Kidd *et al*, 2004; 2005; Fraser *et al*, 2005), porém o tipo molecular VGI também foi encontrado causando pelo menos seis infecções em humanos e animais e foi isolado de amostras ambientais. A baixa representatividade do VGI em fontes ambientais e clínicas na Ilha de Vancouver é interessante, dado o fato que VGI é o tipo molecular dominante de *C. gattii* em outras áreas do mundo (Kidd *et al*, 2007a). Fraser e colaboradores (2005) demonstraram que os isolados do subtipo VGIIa originados na Ilha de Vancouver são hiper virulentos em estudos experimentais com camundongos.

A Infecção por *C. gattii* persiste como um problema de saúde pública na Ilha de Vancouver, e está se espalhando. Um estudo de vigilância do Centro de Controle de Doenças da British Columbia realizado entre 1999 e 2006 documentou um aumento da incidência de infecção na ilha de Vancouver e que ocorreu infecção em humanos e animais sem histórico de

viagem para a Ilha de Vancouver, indicando que o tipo molecular VGII se espalhou para o continente (MacDougall *et al*, 2007; British Columbia (BC) Centre for Disease Control, 2007). Embora o modo exato de transporte de *C. gattii* da Ilha de Vancouver para o continente não seja conhecido, estudos sobre possíveis mecanismos de dispersão indicam associação de casos de *C. gattii* com locais de alto tráfego, e evidências de dispersão associada a humanos através da roda de carros, sapatos e movimentação de solo ou de produtos de madeira, bem como água (Kidd *et al*, 2007a; 2007b).

O genótipo VGIIa de *C. gattii* pode ter estado presente na região Noroeste do Pacífico dos Estados Unidos muito antes da epidemia na Ilha de Vancouver (Fraser *et al*, 2005; Datta *et al*, 2009). No entanto, nenhum caso humano foi identificado nos Estados Unidos até janeiro de 2006 (Upton *et al*, 2007). O genótipo VGIIa se espalhou a partir da Ilha de Vancouver ao continente da British Columbia e na região Noroeste do Pacífico dos Estados Unidos, possivelmente por causa da atividade humana ou migração animal (Dixit *et al*, 2009).

Byrnes e colaboradores (2009) documentaram infecções pelos genótipos VGIIa e VGIIb na região noroeste do pacífico dos Estados Unidos e identificaram um novo grupo divergente, VGIIc, que infecta humanos e outros mamíferos. O genótipo VGIIc é distinto dos outros isolados analisados até o momento com exceção dos isolados clínicos reportados de Oregon em 2005 (MacDougall *et al*, 2007). Além disso, foi notificada a primeira infecção devido ao tipo molecular VGIII na região. A origem dos genótipos VGIIa da Ilha de Vancouver e VGIIc dos Estados Unidos permanece indefinida (Byrnes *et al*, 2009).

O tipo molecular VGIIb possui uma virulência menor comparado com os genótipos mais virulentos VGIIa e VGIIc (Byrnes *et al*, 2010). A maior virulência de tais isolados, quando comparados com os de outras regiões, sugere que os genótipos circulantes no noroeste do Pacífico são inerentemente aumentados na sua predileção para causar doença em hospedeiros mamíferos. Além do genótipo VGIIa, o novo genótipo VGIIc é altamente virulento em modelo murino. O genótipo VGIIc possui altas taxas de proliferação intracelular em macrófagos e um aumento significativo da percentagem de mitocôndrias com morfologia tubular após a exposição de macrófagos e, assim, isolados VGIIc compartilham atributos de virulência com os isolados VGIIa da Ilha da epidemia de Vancouver (Byrnes *et al*, 2010). Existem evidências genotípicas de que a dinâmica das cepas de *C. gattii* envolvidas no surto da região noroeste do Pacífico pode ser diferente daquela observada na Ilha de Vancouver, com os subtipos VGIIb e VGIIc desempenhando papéis de igual importância que o subtipo VGIIa (Iqbal *et al*, 2010).

Desde 1999, a incidência de infecção por *C. gattii* em animais domésticos tem aumentado consideravelmente no oeste da América do Norte, em paralelo com o surto de criptococose humana. Doenças por *C. gattii* foram diagnosticadas em cães, gatos, furões, botos, alpacas e lhamas, cavalos e pássaros psitacídeos na Ilha de Vancouver, continente da British Columbia (Stephen *et al*, 2002; Lester *et al*, 2004; Duncan *et al*, 2005), bem como em Washington e Oregon (MacDougall *et al*, 2007; Bartlett *et al*, 2008; Byrnes *et al*, 2009). Uma característica única do surto do noroeste do Pacífico é o número de mamíferos marinhos, principalmente botos, que morreram com pneumonia por *C. gattii* (Duncan *et al*, 2005).

No Brasil, Trilles e colaboradores (2008) analisaram a distribuição geográfica dos tipos moleculares de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. O tipo molecular mais encontrado VNI (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada), e VNIII (< 1%). A criptococose primária causada pelo tipo molecular VGII (sorotipo B, MATalfa) prevalece em hospedeiros imunocompetentes no norte e nordeste, mostrando um padrão endêmico regional. Barbosa e colaboradores (2012) analisaram ocos de árvores no Rio de Janeiro e descobriram que a maioria dos isolados eram *C. gattii* VGI (98%), seguido de *C. neoformans* VNI (2%).

1.7 ECOEPIDEMIOLOGIA

C. neoformans e *C. gattii* apresentam grandes diferenças. *C. neoformans* é considerado um patógeno oportunista, acometendo principalmente hospedeiros com o sistema imunológico comprometido, como por infecção por HIV, terapia com esteroides, câncer, quimioterapia, ou terapia para suprimir rejeição de órgão transplantados (Hull & Heitman, 2002), mas pode também ser um patógeno primário em pacientes sem qualquer deficiência aparente no sistema imunológico. Enquanto que *C. gattii* é principalmente encontrado em hospedeiros imunocompetentes (Lazéra *et al*, 2005).

C. neoformans possui distribuição mundial, porém o padrão de distribuição geográfica de *C. gattii* tem mudado na última década (Bovers *et al*, 2008a; Springer & Chaturvedi, 2010). Inicialmente, era encontrado em regiões tropicais e subtropicais, porém, em 1999, surgiu uma epidemia na Ilha de Vancouver, Canadá que está se expandindo para o nordeste

do Canadá e para o Pacífico-Norte dos EUA (Kidd *et al*, 2004; Bartlett *et al*, 2008; Datta *et al*, 2009), o que sugere uma adaptação do fungo a ambientes mais temperados (Kidd *et al*, 2004).

C. neoformans pode ser encontrado no solo, em excretas de aves e ocos de árvores e *C. gattii* normalmente está associado principalmente à madeira em decomposição em ocos de árvores. *C. gattii* foi encontrado colonizando várias espécies de árvores incluindo *Eucalyptus camaldulensis*, na Austrália e México (Ellis & Pfeiffer, 1990; Licea *et al*, 1996), *Terminalia cattapa*, na Colômbia (Callejas *et al*, 1998), e *Syzygium jambolana*, *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa*, *Moquilea tomentosa* e *Guettarda acreana*, no Brasil (Lazera *et al*, 1996; 2000; 2005; Fortes *et al*, 2001), que podem ser consideradas um nicho primário para ambos os patógenos (Lazera *et al*, 2000). *C. gattii* foi isolado de madeira em decomposição em uma árvore de floresta nativa em Maracá, uma ilha sem atividade humana na Amazônia ocidental, norte do Brasil (Fortes *et al*, 2001).

Embora *C. gattii* seja detectado em várias regiões, ele é endêmico na Austrália, Nova Zelândia, Papua Nova Guiné, sul e sudeste da Ásia (Camboja, Malásia, Tailândia, Vietnã, China, Taiwan, Singapura, Nepal, e Índia), partes da América Latina (Argentina, Brasil, Colômbia, Uruguai, Paraguai, Peru, e Venezuela), Califórnia, México, Havaí, África, e partes da Europa (Áustria, Alemanha, França, Itália, Grécia, e Espanha) (Datta *et al*, 2009).

C. gattii está sendo identificado em um grande número de espécies de árvores em diferentes regiões e já foi isolado em *Senna multijuga*, *Cassia grandis*, *Ficus microcarpa*, *Miroxylum peruiferum*, *Caesalpinia peltophoroides* e *Moquilea tomentosa*. (Lazera *et al*, 1993; 1996; 2000; Montenegro *et al*, 2000; Restrepo *et al*, 2000; Reimão *et al*, 2007; Baltazar & Ribeiro, 2008).

No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose por *C. gattii* do SNC em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões norte (N) e nordeste (NE), com letalidade que varia entre 35% a 40% (Cavalcanti, 1995; Corrêa *et al*, 1999; Martins, 2003; Nishikawa *et al*, 2003; Santos *et al*, 2008). Surtos em animais foram descritos como pneumonia em cabras na Espanha (Baró *et al*, 1998) e forma disseminada em psitacídeos de diferentes espécies em aviário no interior de São Paulo (Raso *et al*, 2004).

Nas regiões N e NE do Brasil, a criptococose por *C. gattii* predomina e é considerada endêmica, diferentemente, nas regiões sul (S) e sudeste (SE), a criptococose por *C. gattii* é esporádica, sendo a maioria dos casos de *C. gattii* isolados de pacientes com origem nas regiões N e NE (Trilles *et al*, 2008).

Os principais estudos sobre epidemiologia da criptococose no Brasil enfocam especialmente os casos diagnosticados nas regiões S e SE, onde tem predominado a

criptococose associada à SIDA causada por *C. neoformans* sorotipo A. Estudos de pacientes oriundos do Piauí e Maranhão, e também no Amazonas, indicam que a criptococose atinge essencialmente nativos da região, incluindo jovens e crianças, com elevada morbidade e letalidade nas formas de meningoencefalite por *C. gattii* sorotipo B (Cavalcanti, 1995; Santos, 2000; Nishikawa *et al*, 2003; Lazéra *et al*, 2005). Na região Norte, um estudo retrospectivo chama a atenção para criptococose infantil por *C. gattii*, com elevada letalidade, em Belém do Pará. (Corrêa *et al*, 1999). Neste estudo, a incidência de meningite induzida por *C. gattii* é semelhante a dos casos descritos anteriormente na região Nordeste (Lazera *et al*, 2005). No entanto é diferente dos casos descritos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Nishikawa *et al*, 2003).

No Rio de Janeiro, estudos moleculares de isolados clínicos de criptococose associada a AIDS demonstraram o predomínio do tipo VNI, seguido do VNII (Igreja *et al*, 2004). Nos últimos anos dois casos de criptococose primária causada pelo tipo VGII, foram identificados em nosso laboratório e, tais isolados preservados na Coleção de Cultura de fungos do IPEC-INCQS/FIOCRUZ. Caso 1- sexo feminino, natural do RJ e residente no Flamengo há longos anos, com história de viagem a Brasília, HIV negativo, iniciou em agosto de 2006 com cefaléia em capacete, seguido de desorientação e perda de força muscular generalizada, com isolamento em líquido (LCR) do agente (Lazéra - comunicação pessoal). Caso 2- criança nascida em São Gonçalo-RJ, onde sempre morou, HIV negativa, com cefaléia intensa não diagnosticada por mais de 1 mês, internada no Instituto Fernandes Figueira (IFF) em março de 2005, o cultivo de LCR revelou o mesmo agente, sobreviveu com hidrocefalia e perda da visão (Pinto Junior *et al*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose por *C. gattii* do SNC em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões N e NE, com letalidade que varia entre 35% a 40% (Cavalcanti 1995, Correa *et al.* 1999, Nishikawa *et al.* 2003, Martins *et al.*, 2003). Além do mais, casos graves foram detectados recentemente no Rio de Janeiro causados pelo genótipo VGII, o qual possui um reconhecido potencial de adaptação em ambiente urbano e comportamento endêmico - epidêmico.

Devido à grande importância de *C. neoformans/C. gattii* como patógeno fúngico, vários grupos de pesquisa se concentram na determinação molecular de sub-grupos geneticamente diversos dentro de cada espécie. Apesar do grande número de ferramentas moleculares aplicadas às espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, o conhecimento da estrutura de população destas espécies ainda é muito limitado, principalmente devido à falta de consenso entre os resultados obtidos pelas diversas técnicas. Para permitir a comparação de resultados, o grupo de trabalho da ISHAM determinou a técnica de MLST utilizando sete loci para a identificação de sub-grupos moleculares de tais espécies (Meyer *et al.* 2009). Tal metodologia será utilizada no presente trabalho, o que irá permitir a identificação da presença dos tipos e subtipos moleculares de *C. gattii* no Rio de Janeiro e em outros estados do Brasil, incluindo a presença dos subtipos descritos como mais virulentos, como o VGIIa, que é o responsável pela epidemia de criptococose no Canadá. Além do mais, ainda não se sabe o motivo pelo qual certas linhagens de *Cryptococcus* são mais ou menos virulentas, ou porque acarretam infecção localizada ou disseminada, incluindo o envolvimento do SNC. São necessários estudos que indiquem a influência que um certo genótipo de um agente fúngico tem na infecção e/ou doença, para dar suporte às decisões na prática médica, elaboração de protocolos clínicos e controle da doença. A gravidade e o prognóstico das infecções fúngicas invasivas podem ser determinadas pela aplicação de marcadores genéticos bem definidos, os quais em conjunto com fatores de risco, poderão dar suporte a decisões com relação ao tratamento dos pacientes.

3 OBJETIVO GERAL

Verificar a variabilidade genética e identificar os subtipos de *C. gattii* VGII circulantes no Brasil utilizando MLST como ferramenta molecular.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o tipo molecular dos isolados de *C. gattii* mantidos na coleção CFP/ IPEC.
- Verificar a variabilidade genética nos isolados brasileiros de *C. gattii* tipo molecular VGII.
- Determinar a ocorrência dos subtipos mais virulentos (VGIIa, VGIIb e VGIIc) de *C. gattii* no Brasil.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ISOLADOS

Os 111 isolados de *C. gattii* de fontes ambientais e clínica foram recuperados da Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) do IPEC/FIOCRUZ existente desde 1980 e de isolados enviados do Piauí que foram enviados em forma de dna. Eles foram cultivados em meio de semente de níger (anexo 1) para verificação da pureza, onde verifica-se o crescimento somente de colônias marrons e Sabouraud ágar (HIMedia laboratories PVT) (anexo 2) para verificação de viabilidade, onde verifica-se o crescimento do isolado. Os 111 isolados viáveis de *C. gattii* foram submetidos à tipagem molecular. Após a tipagem molecular, todos os isolados identificados como VGII (85) foram analisados pela técnica de MLST utilizando genes constitutivos e relacionados à virulência (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1* e *URA5*), além da região IGS, por ser a técnica de escolha para a genotipagem global de *C. neoformans* e *C. gattii*.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Foi realizada através de protocolo descrito por Ferrer e colaboradores (2001) com modificações. Cada isolado foi cultivado em placa contendo meio Sabouraud Dextrose agar(Difco MD, USA) acrescido de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) (40mg/L) a 25°C por 48h. Em seguida, uma alça bacteriológica de 10µL foi utilizada para transferir parte da massa de cultivo obtido para um tubo de microcentrifuga estéril, sendo estocada a -20°C “overnight”. Foram adicionados 500µL de tampão de lise [0,5g de SDS (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA); 1,4g de NaCl (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA);

0,73g de EDTA (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) e 20mL de Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) 1M para um volume final de 100mL] (anexo 3) e 5 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA). Seguiu-se agitação vigorosa no vórtex e incubação a 65°C por 1h, sendo agitado a cada 30min. Após, foi adicionado 500 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (v:v:v 25:24:1) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) seguindo-se agitação até a obtenção de suspensão homogênea. Após centrifugação da suspensão, numa centrífuga eppendorf modelo 5424 com rotor FA-45-24-11, a 14000rpm por 15min, cerca de 400 μ L do sobrenadante foram retirados e colocados em novo tubo de microcentrífuga. Adicionou-se igual volume de isopropanol (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) e leve homogeneização foi feita. O DNA foi precipitado a -20°C “overnight” e depois centrifugado a 14000rpm por 15min. A fase líquida foi desprezada e o precipitado foi lavado com 500 μ L de etanol 70% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) e centrifugado a 14000rpm por 15min. A fase líquida foi retirada novamente para secar o precipitado. Como última etapa, o DNA foi suspenso em 100 μ L de água comercial estéril (Fermentas Life Sciences).

5.3 TIPAGEM MOLECULAR - *URA5*-RFLP

A amplificação do gene *URA5* foi feita pelo protocolo descrito por Meyer e colaboradores (2003). Foram utilizados 50ng de DNA em um volume final de 50 μ L, com 1x do tampão de reação [200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl – Invitrogen, Brasil]; 0,2 mM de cada nucleotídeo (Invitrogen, Brasil); 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Invitrogen, Brasil); 50 ng do iniciador senso (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGAC 3') e 50ng do anti-senso (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') e, 1,5U da enzima Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen, Brasil).

A PCR ocorreu em um termociclador Eppendorf (mastercycler gradient, Califórnia, USA) com o seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 seg, anelamento a 63°C por 1 min, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10min. A observação do amplificado foi realizada através da observação de um fragmento de 780 pares de base (pb) com brometo de etídio 4ng/ μ L, sob luz UV. Utilizou-se padrão de peso molecular de 1 Kb (Biotools, Espanha), sendo a corrida de eletroforese realizada em gel de agarose a 1,2% a 100V.

O amplificado foi então submetido à dupla digestão com as enzimas de restrição *HhaI* e *Sau96I* numa solução contendo 20 U/ μ L da enzima *HhaI*, 5U/ μ L da enzima *Sau96I* e um total de 22 μ L de produtos de PCR. Foi colocada uma gota de óleo mineral (Sigma-Aldrich) sobre o conteúdo do tubo de microcentrífuga e incubado a 37°C por 3h.

Para observação dos fragmentos, foi feita eletroforese em gel de agarose a 3%, numa corrida a 100V, utilizando padrão de peso molecular de 100 pb (Biotools, Espanha), corado com brometo de etídio (4ng/ μ L) e visualizado sob luz UV.

Os perfis de banda foram identificados através da comparação visual com as cepas-padrão (figura 7): VNI (CFP 55/WM 148), VNII (CFP 56/WM 626), VNIII (CFP 57/WM 628), VNIV (CFP 58/WM 629), VGI (CFP 59/WM 179), VGII (CFP 60/WM 178), VGIII (CFP 61/WM 161) e VGIV (CFP 62/WM 779).

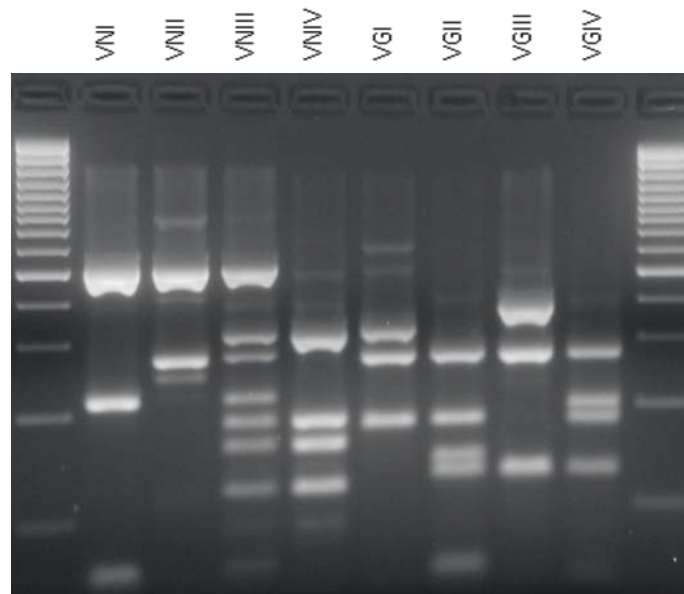


Figura 6: Perfil das cepas-padrão em gel de agarose 3%

5.4 POLIMORFISMO MOLECULAR DOS ISOLADOS E IDENTIFICAÇÃO DE SUBTIPOS - MLST

5.4.1 Amplificação dos genes

O polimorfismo molecular dos isolados e a identificação dos subtipos foi realizado pela técnica de MLST de acordo com Meyer e colaboradores (2009). Para a amplificação dos genes *URA5*, *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1* e a região IGS foram utilizados 50ng de DNA em um volume final de 50µL, com 1x do tampão de reação [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl (Invitrogen, Brasil)]; 0,2 mM de cada nucleotídeo (Invitrogen, Brasil); 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Invitrogen, Brasil); 50 ng do iniciador senso e 50 ng do anti-senso (tabela 1) e, 2,5U da enzima Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen, Brasil). Na tabela 1 estão os marcadores com seus respectivos iniciadores, ciclo de amplificação e nº de pares de bases analisados:

Tabela 1: Marcadores moleculares com seus iniciadores, ciclo de amplificação e nº de pares de bases usados no MLST

Gene	Iniciadores senso/ antisenso	Ciclo de Amplificação	Nº de pares de bases analisados
<i>URA 5</i> Orotidine monophosphate pyrophosphorylase	senso 5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC 3' e antisenso 5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 45seg. Anelamento a 63°C por 1min. Extensão a 72°C por 2min. Extensão final a 72°C por 10min	639pb
<i>CAP 59</i> Capsular associated protein	senso 5' CTC TAC GTC GAG CAA GTC AAG 3' e antisenso 5' TCC GCT GCA CAA GTG ATA CCC 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 30seg. Anelamento a 56°C por 30seg. Extensão a 72°C por 1min. Extensão final a 72°C por 10min	559pb
<i>GPD 1</i> Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase	senso 5' CCA CCG AAC CCT TCT AGG ATA 3' e antisenso 5' CTT CTT GGC ACC TCC CTT GAG 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 45seg. Anelamento a 63°C por 1min. Extensão a 72°C por 2min. Extensão final a 72°C por 10min	543pb

<i>LAC 1</i> Laccase	senso 5' AAC ATG TTC CCT GGG CCT GTG 3' e antisenso 5' ATG AGA ATT GAA TCG CCT TGT 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 30 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 30seg. Anelamento a 58°C por 30seg. Extensão a 72°C por 1min. Extensão final a 72°C por 10min	469pb
<i>PLB 1</i> Phospholipase	senso 5' CTT CAG GCG GAG AGA GGT TT 3' e antisenso 5' GAT TTG GCG TTG GTT TCA GT 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 30 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 45seg. Anelamento a 61°C por 45seg. Extensão a 72°C por 1min. Extensão final a 72°C por 10min	532pb
<i>SOD 1</i> Cu, Zn superoxide dismutase	senso 5' GAT CCT CAC GCC ATT ACG 3' e antisenso 5' GAA TGA TGC GCT TAG TTG GA 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 30seg. Anelamento a 60°C por 30seg. Extensão a 72°C por 2min. Extensão final a 72°C por 10min	700pb
IGS Ribosomal RNA intergenic spacer	senso 5' ATC CTT TGC AGA CGA CTT GA 3' e antisenso 5' GTG ATC AGT GCAT TGC ATG A 3'	Desnaturação inicial a 94°C por 3min, seguido de 35 ciclos de: Desnaturação: 94°C por 30seg. Anelamento a 60°C por 30seg. Extensão a 72°C por 1min. Extensão final a 72°C por 10min	723pb

A observação do amplificado foi realizada sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 1,2%, a 100V, utilizando padrão de peso molecular de 1 Kb (Biotools, Espanha), corado com brometo de etídio 4ng/ μ L.

5.4.2 Purificação

A purificação do amplificado, para a remoção de dímeros de primer e fragmentos pequenos de DNA, se deu através de protocolo do próprio kit de purificação de DNA (anexo 4), de acordo com a marca utilizada - Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, USA).

5.4.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento PDTIS subunidade RTP01A da FIOCRUZ.

5.4.4 Análise dos resultados

A edição das sequências foi feita utilizando o programa Sequencher 4.10.1. (GENE CODES®). O alinhamento e a análise foram realizados no programa Mega 5.1 (MEGA®) e a identificação dos alelos (AT) e tipos de sequência (ST) foram feitos através do banco de dados internacional de MLST (<http://mlst.mycologylab.org>). As árvores filogenéticas foram geradas a partir dos sítios polimórficos das sequências parciais dos genes isolados das cepas estudadas e da análise conjunta das sequências dos genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e região IGS1 no programa Mega 5.1 (MEGA®). A diversidade haplotípica foi analisada com o programa DNAsp 5.10.01, especificando o DNA como haplóide e considerando “gaps”. Quanto mais próximo de 1 o resultado maior será a diversidade haplotípica.

5.5 TIPO SEXUADO

A amplificação dos genes de feromônio para o tipo sexuado MAT α foi realizada usando 50ng dos primers MF α U (5'TTCACTGCCATCTTCACCACC3') e MF α L (5'TCTAGGCGATGACACAAAGGG 3') e para o MAT α foi realizada com 50ng dos primers MFA2U (5' ACACCGCCTGTTACAATGGAC 3') e MFA2L (5' CAGCGTTTGAAGATGGACTTT 3') (Fraser *et al*, 2003). Foram utilizados 50ng de DNA em um volume final de 50 μ L, com 1x do tampão de reação [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl – Invitrogen, Brasil], 0,2mM de cada nucleotídeo (Invitrogen, Brasil); 1,25mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Invitrogen, Brasil); e 2,5U da enzima Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen, Brasil). A PCR ocorreu em um termociclador Eppendorf

(mastercycler gradient, California, USA) com o seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 3min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 57,5°C por 1 min, extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 7min.

A observação do amplificado de banda única se deu através de eletroforese em gel de agarose 3%, numa corrida a 100V utilizando padrão de peso molecular de 50pb (Biotools, Espanha), corado com brometo de etídio 4ng/μL, sob luz UV (figura 8).

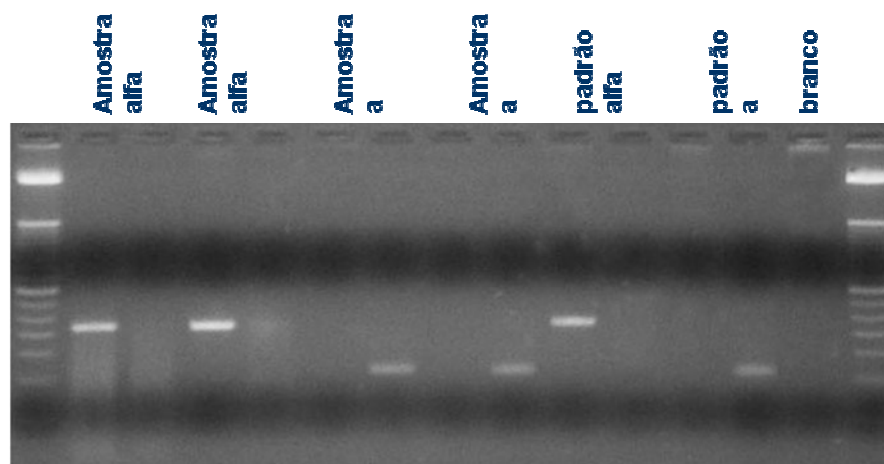


Figura 7: Observação do perfil do tipo sexuada em gel de agarose 3%

6 RESULTADOS

Das 172 cepas analisadas da Coleção de Fungos Patogênicos (CFP-IPEC), foram encontradas 111 de *C. gattii* sendo 85 identificadas como tipo molecular VGII e 26 como VGI. A análise de MLST foi realizada nas 85 cepas VGII, das quais 75 eram amostras de origem clínica e 10 eram de origem ambiental (tabela 2). As cepas são oriundas de 4 regiões do Brasil e foram isoladas no período de 1989 a 2010, sendo 30 cepas da região Norte (AM, PA e RR), 39 da região Nordeste (PI e BA), 9 do Centro-oeste (MS) e 7 do Sudeste (RJ e SP). Não foram encontradas amostras VGII dentre as cepas da região Sul preservadas na CFP. A grande maioria das cepas (81) possui o tipo sexuado MATalfa, porém foram identificadas 3 amostras clínicas (CFP 440, CFP 451 e CFP 452) e 1 amostra ambiental (CFP 442) que possuem tipo sexuado MATa.

Tabela 2: Lista de cepas VGII utilizadas no estudo de MLST com seus respectivos dados, alelos e subtipos moleculares (ST).

Isolado	Tipo sexuado	Ano de isolamento	Origem	Estado	AT							ST
					CAP 59	GPD 1	IGS 1	LAC 1	PLB 1	SOD 1	URA 5	
CFP 172	alfa	1999	Clínica	AM	3	16	15	4	9	23	2	5
CFP 200	alfa	2008	Clínica	AM	3	16	15	4	9	23	2	5
CFP 224	alfa		Clínica	AM	3	16	15	4	9	23	2	5
CFP 28	alfa	2003	Clínica	PA	3	16	15	4	9	23	2	5
CFP 29	alfa	2003	Clínica	PA	3	16	15	4	9	23	2	5
CFP 47	alfa	2005	Clínica	PA	3	16	15	4	9	23	2	5
CFP 174	alfa	1997	Clínica	AM	2	6	10	4	2	15	2	7
CFP 425	alfa	1989	Clínica	RJ	2	6	15	4	16	6	2	10
CFP 165	alfa	2002	Clínica	AM	1	1	4	4	1	14	7	20
CFP 171	alfa	1999	Clínica	AM	1	1	4	4	1	14	7	20
CFP 202	alfa	2008	Clínica	AM	1	1	4	4	1	14	7	20
CFP 6	alfa	2005	Clínica	PA	1	1	4	4	1	14	7	20
CFP 18	alfa	2003	Clínica	PA	1	1	4	4	1	14	7	20
CFP 48	alfa	2005	Clínica	PA	1	1	4	4	1	14	7	20
CFP 121	alfa		Clínica	PA	1	1	4	4	1	14	7	20
CFP 424	alfa	1997	Clínica	RR	2	32	25	30	1	13	7	27
CFP 455	alfa	1997	Clínica	BA	34	6	9	4	16	9	2	28
CFP 151	alfa	1989	Clínica	RJ	34	6	9	4	16	9	2	28
CFP 435	alfa	1989	Clínica	RJ	34	6	9	4	16	9	2	28
CFP 72	alfa	2001	Clínica	MS	4	22	26	4	27	7	3	40
CFP 230	alfa	2001	Clínica	MS	4	22	26	4	27	7	3	40
CFP 158	alfa	2005	Clínica	RJ	4	22	26	4	27	7	3	40
CFP 14	alfa	2003	Clínica	PA	2	6	35	4	1	52	7	119

CFP 16	alfa	2003	Clínica	PA	2	6	35	4	1	52	7	119
CFP 19	alfa	2003	Clínica	PA	28	6	50	25	1	1	7	120
CFP 4	alfa	2004	Clínica	PA	14	6	43	4	26	53	7	121
CFP 27	alfa	2004	Clínica	PA	14	6	43	4	26	53	7	121
CFP 32	alfa	2004	Clínica	PA	1	1	4	4	1	56	7	122
CFP 386	alfa	2007	Clínica	PI	39	34	51	21	1	54	2	123
CFP 433	alfa	1994	Ambiental	PI	14	6	15	4	2	15	2	124
CFP 449	alfa	1998	Clínica	PI	14	6	15	4	2	15	2	124
CFP 462	alfa	1995	Ambiental	PI	14	6	15	4	2	15	2	124
CFP 463	alfa	1995	Ambiental	PI	14	6	15	4	2	15	2	124
4PI	alfa	2008	Clínica	PI	14	6	15	4	2	15	2	124
5PI	alfa	2007	Clínica	PI	2	27	52	4	2	27	32	125
6PI	alfa	2008	Clínica	PI	4	6	26	4	9	57	2	126
CFP 105	alfa	2007	Clínica	PI	2	16	54	4	26	15	7	127
CFP 249	alfa	2008	Clínica	PI	2	16	54	4	26	15	7	127
CFP 259	alfa	2010	Clínica	PI	2	16	54	4	26	15	7	127
8PI	alfa	2007	Clínica	PI	2	6	26	4	2	55	7	128
CFP 77	alfa	1994	Clínica	SP	40	35	57	4	1	59	2	129
CFP 443	alfa	1995	Ambiental	PI	8	16	35	4	2	3	2	130
CFP 442	a	1996	Ambiental	PI	2	27	49	4	1	8	7	131
CFP 423	alfa	1997	Ambiental	PI	2	16	55	4	26	15	2	132
CFP 437	alfa	1994	Ambiental	PI	2	16	55	4	26	15	2	132
CFP 439	alfa	1998	Ambiental	RR	27	6	42	25	1	24	7	133
CFP 114	alfa	1995	Ambiental	PI	2	16	56	4	26	14	2	134
CFP 231	alfa	2000	Clínica	MS	38	22	53	21	2	58	2	135
CFP 436	alfa	2000	Clínica	MS	38	22	53	21	2	58	2	135
CFP 78	alfa	2001	Clínica	MS	15	6	26	28	22	10	2	136
CFP 79	alfa	1999	Clínica	MS	15	6	26	28	22	10	2	136
CFP 422	alfa	2001	Clínica	PI	33	6	25	29	1	1	1	137
CFP 445	alfa	2000	Clínica	MS	10	6	16	4	16	20	2	185
438BP	alfa	2009	Clínica	MS	73	48	53	4	1	15	2	272
CFP 156	alfa	2009	Clínica	RJ	4	6	50	29	1	101	2	273
CFP 201	alfa	2010	Clínica	AM	4	21	36	4	18	22	2	274
CFP 240	alfa	2008	Clínica	PI	2	16	27	21	2	98	2	275
CFP 241	alfa	2008	Clínica	PI	2	16	80	4	9	102	2	276
CFP 426	alfa	1994	Ambiental	PI	2	16	10	4	26	15	2	277
CFP 243	alfa	2009	Clínica	PI	2	6	15	4	2	15	2	278
CFP 256	alfa		Clínica	PI	2	6	38	16	9	99	2	279
CFP 258	alfa		Clínica	PI	2	6	87	4	1	1	2	280
59PI	alfa	2010	Clínica	PI	2	6	25	4	1	1	2	281
64PI	alfa		Clínica	PI	2	6	54	4	26	100	2	282
CFP 440	a	1997	Clínica	BA	2	6	16	4	16	4	2	283
CFP 452	a	1997	Clínica	BA	2	6	16	4	16	4	2	283
CFP 451	a	1995	Clínica	PI	2	27	31	4	1	23	7	284
CFP 454	alfa	2001	Clínica	RR	1	1	16	4	1	14	7	285
CFP 255	alfa	2010	Clínica	PI	1	6	25	4	2	15	7	286
CFP 431	alfa	1997	Clínica	PI	1	22	27	21	27	7	4	287
CFP 457	alfa	1999	Clínica	RR	1	22	27	21	27	7	4	287
CFP 167	alfa	1999	Clínica	AM	3	16	15	4	9	15	2	288
CFP 441	alfa	2002	Clínica	AM	3	16	15	4	9	15	2	288
CFP 458	alfa	1997	Clínica	PI	8	6	25	4	1	16	6	289
CFP 438	alfa	1997	Clínica	PI	8	16	16	4	9	8	7	290
CFP 450	alfa	1997	Clínica	MS	10	6	10	4	16	20	2	291
CFP 453	alfa	2002	Clínica	PI	14	6	35	21	28	1	7	292
CFP 430	alfa	2001	Clínica	BA	13	6	32	26	18	17	8	293
CFP 444	alfa	2001	Clínica	BA	13	6	32	26	18	17	8	293
CFP 459	alfa	1997	Clínica	BA	27	6	88	25	1	15	7	294
CFP 252	alfa		Clínica	PI	33	6	87	29	1	1	1	295
CFP 421	alfa	2005	Clínica	PA	3	6	15	4	9	23	2	296
CFP 51	alfa	2005	Clínica	PA	8	6	35	54	1	103	7	297
CFP 464	alfa		Clínica	PA	8	6	26	4	24	57	2	298
CFP 461	alfa	2006	Clínica	RJ	74	6	89	29	1	1	2	299

Foram obtidos de 8 a 32 tipos de alelos (AT), sendo que o gene *LAC1* se apresentou com a menor variabilidade molecular e a região IGS1 a que mais variou seguida do gene *SOD1* (Tabela 3). A análise do gene *CAP59* demonstrou um total de 18 alelos com 13 sítios polimórficos detectados (figura 9). O alelo mais encontrado foi o alelo 2 com 25 cepas e 5 cepas possuem alelos únicos. A diversidade haplotípica foi igual a 0,8700 revelando uma alta diversidade. O gene *GPD1* demonstrou um total de 10 alelos com 10 sítios polimórficos detectados (figura 10). O alelo mais encontrado foi o alelo 6 com 42 cepas e 5 cepas possuem alelos únicos. A diversidade haplotípica foi igual a 0,6941 revelando uma diversidade considerável. O gene *LAC1* demonstrou um total de 9 alelos com 8 sítios polimórficos detectados (figura 11). O alelo mais encontrado foi o alelo 4 em 64 cepas e 3 cepas possuem alelos únicos. A diversidade haplotípica foi igual a 0,4263 revelando que o gene *LAC1* foi o menos polimórfico. A região IGS1 demonstrou um total de 28 alelos com 36 sítios polimórficos detectados (figura 12). O alelo mais encontrado foi o alelo 15 com 16 cepas e 12 cepas possuem alelos únicos. A diversidade haplotípica foi igual a 0,9359 revelando uma alta variabilidade. O gene *PLB1* demonstrou um total de 10 alelos com 13 sítios polimórficos detectados (figura 13). O alelo mais encontrado foi o alelo 1 com 28 cepas e 2 cepas possuem alelos únicos. A diversidade haplotípica foi igual a 0,8224 revelando uma alta variabilidade. O gene *SOD1* demonstrou um total de 33 alelos com 35 sítios polimórficos detectados. O alelo mais encontrado foi o alelo 15 em 18 cepas e 17 cepas possuem alelos únicos (figura 14). A diversidade haplotípica foi igual a 0,9319 demonstrando que o gene *SOD1* é o gene que possui maior diversidade dentre as cepas analisadas. O gene *URA5* demonstrou um total de 9 alelos com 9 sítios polimórficos detectados (figura 15). O alelo mais encontrado foi o alelo 15 em 18 cepas e 17 cepas possuem alelos únicos. A diversidade haplotípica foi igual a 0,5975 revelando ter razoável diversidade.

Tabela 3: Genes com seus respectivos total de alelos, sítios polimórficos, alelo mais encontrado, nº de isolados com alelos únicos e diversidade haplotípica

Gene	Nº de Alelos	Sítios Polimórficos (gaps inclusos)	Alelo Mais Encontrado	Nº de Isolados com Alelos Únicos	Diversidade Haplotípica
CAP59	18	13	2 (25 cepas)	5	0,8700
GPD1	10	10	6 (42 cepas)	5	0,6941
LAC1	9	8	4 (64 cepas)	3	0,4263
IGS1	28	36	15 (16 cepas)	12	0,9359
PLB1	10	13	1 (28 cepas)	2	0,8224
SOD1	33	35	15 (18 cepas)	17	0,9319
URA5	9	9	15 (18 cepas)	17	0,5975

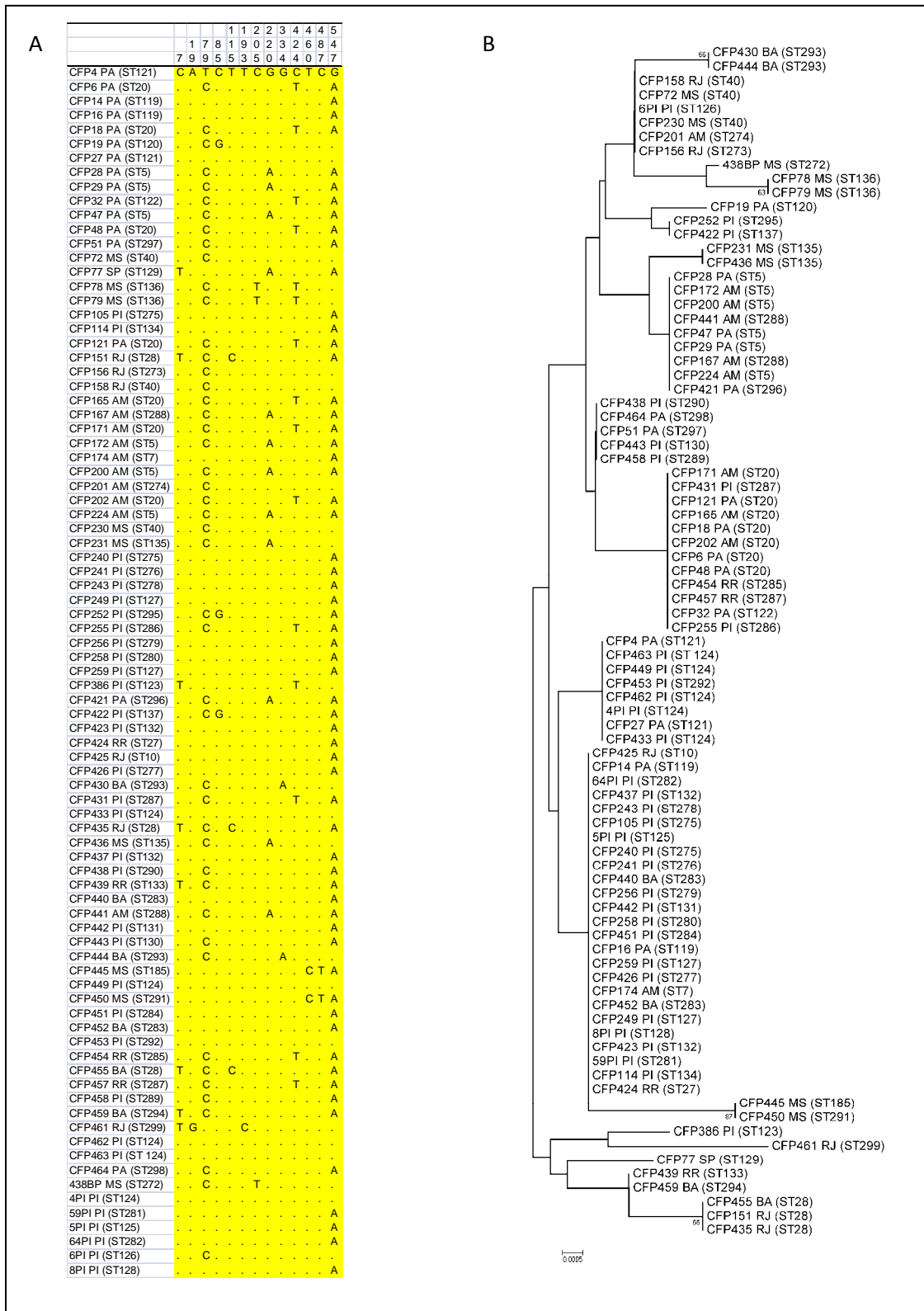


Figura 8: A - Sítios polimórficos do gene *CAP59* e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene *CAP59* de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).

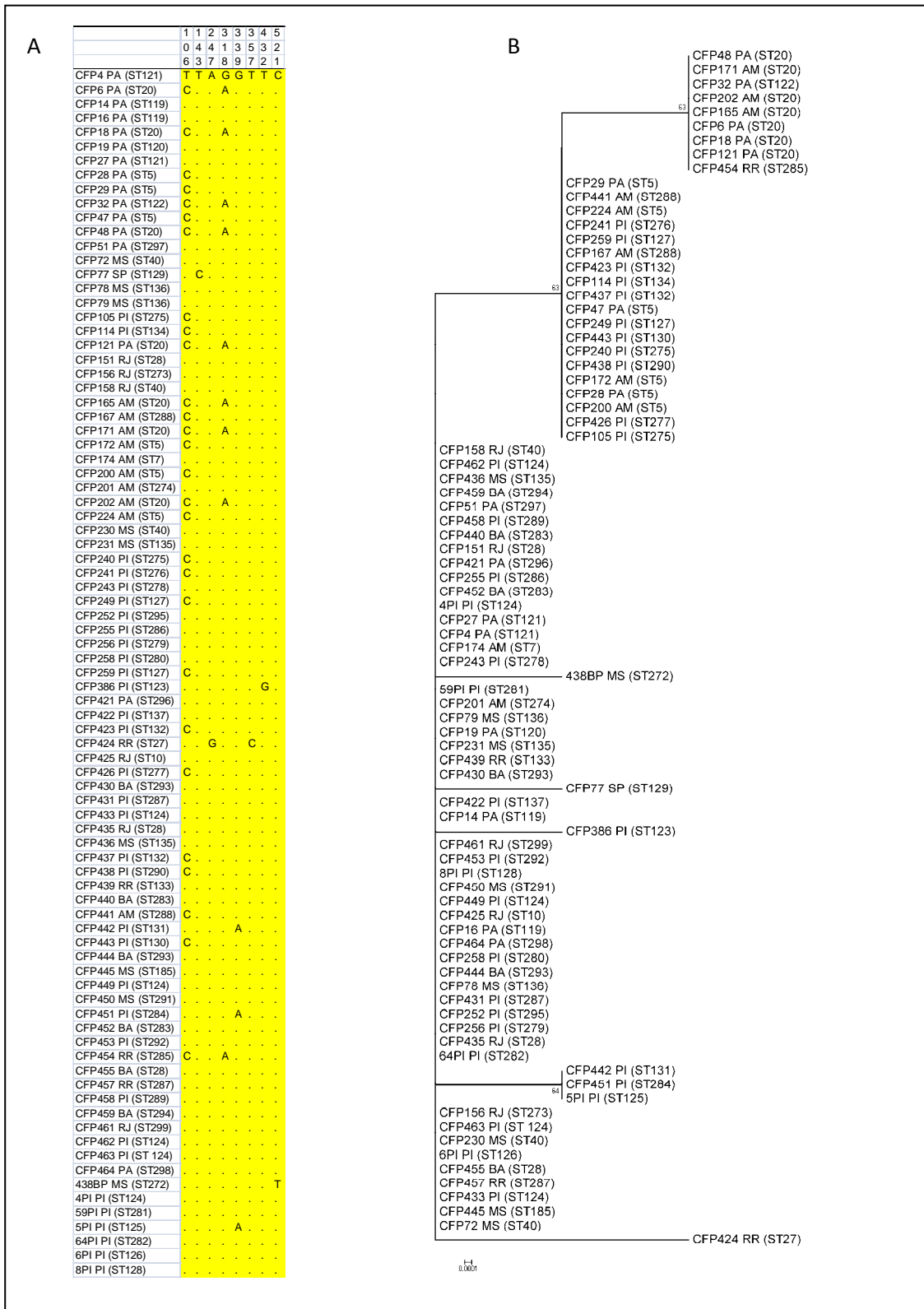


Figura 9: A - Sítios polimórficos do gene *GPD1* e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B - Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene *GPD1* de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).

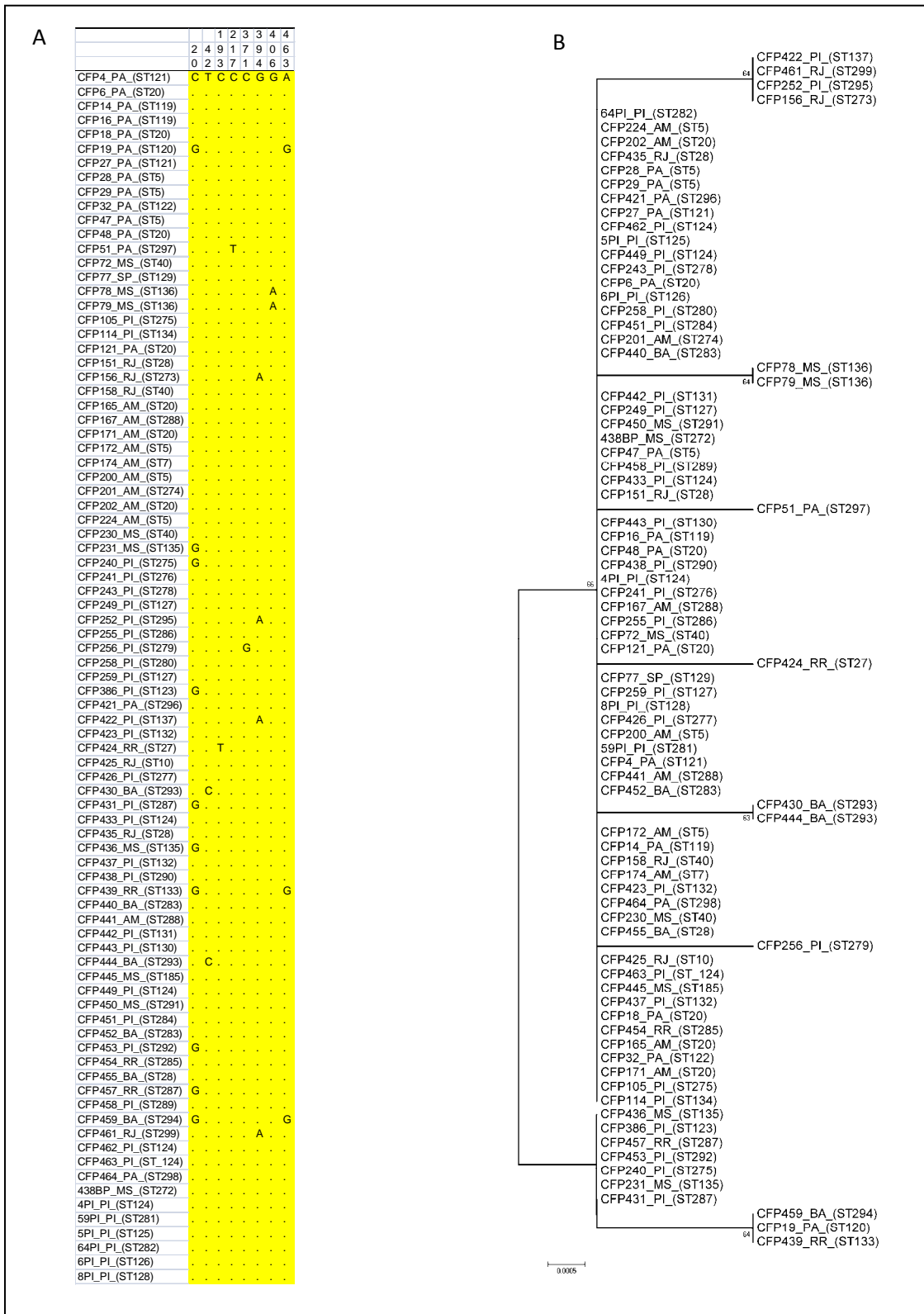


Figura 10: A - Sítios polimórficos do gene *LACI* e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene *LACI* de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).

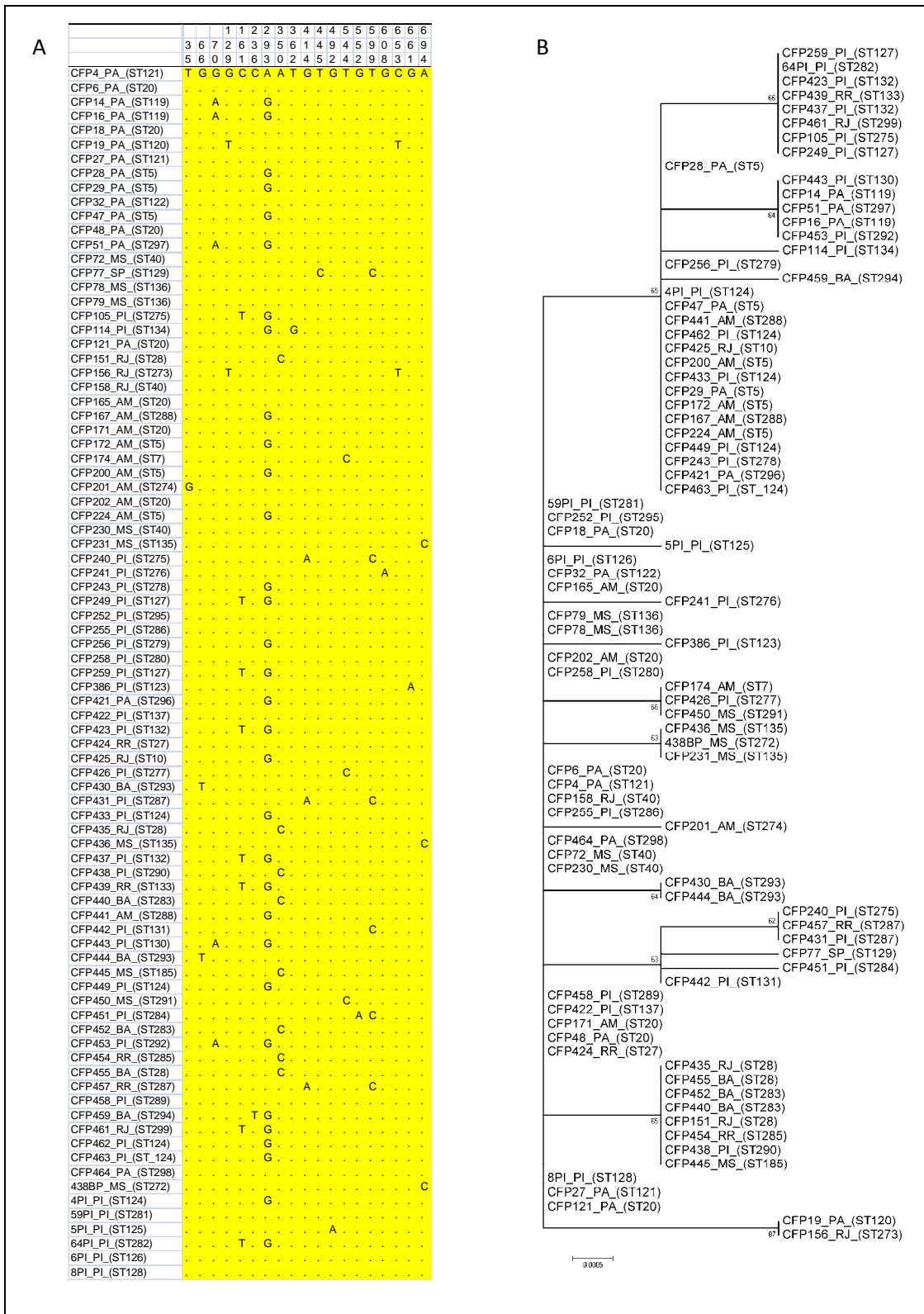


Figura 11: A - Sítios polimórficos da região IGS1 e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) da região IGS1 de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).

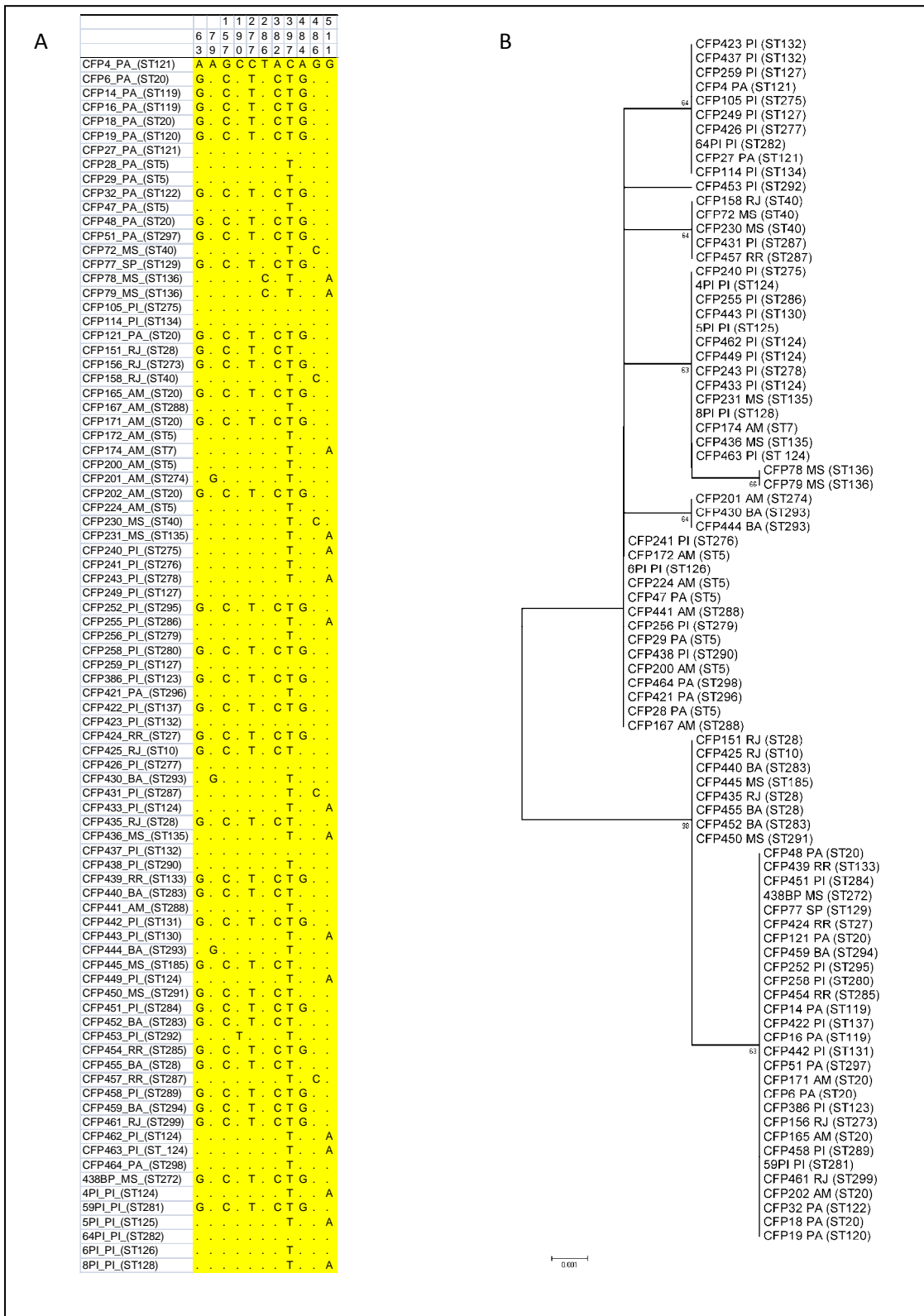


Figura 12: A - Sítios polimórficos do gene *PLBI* e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene *PLBI* de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).

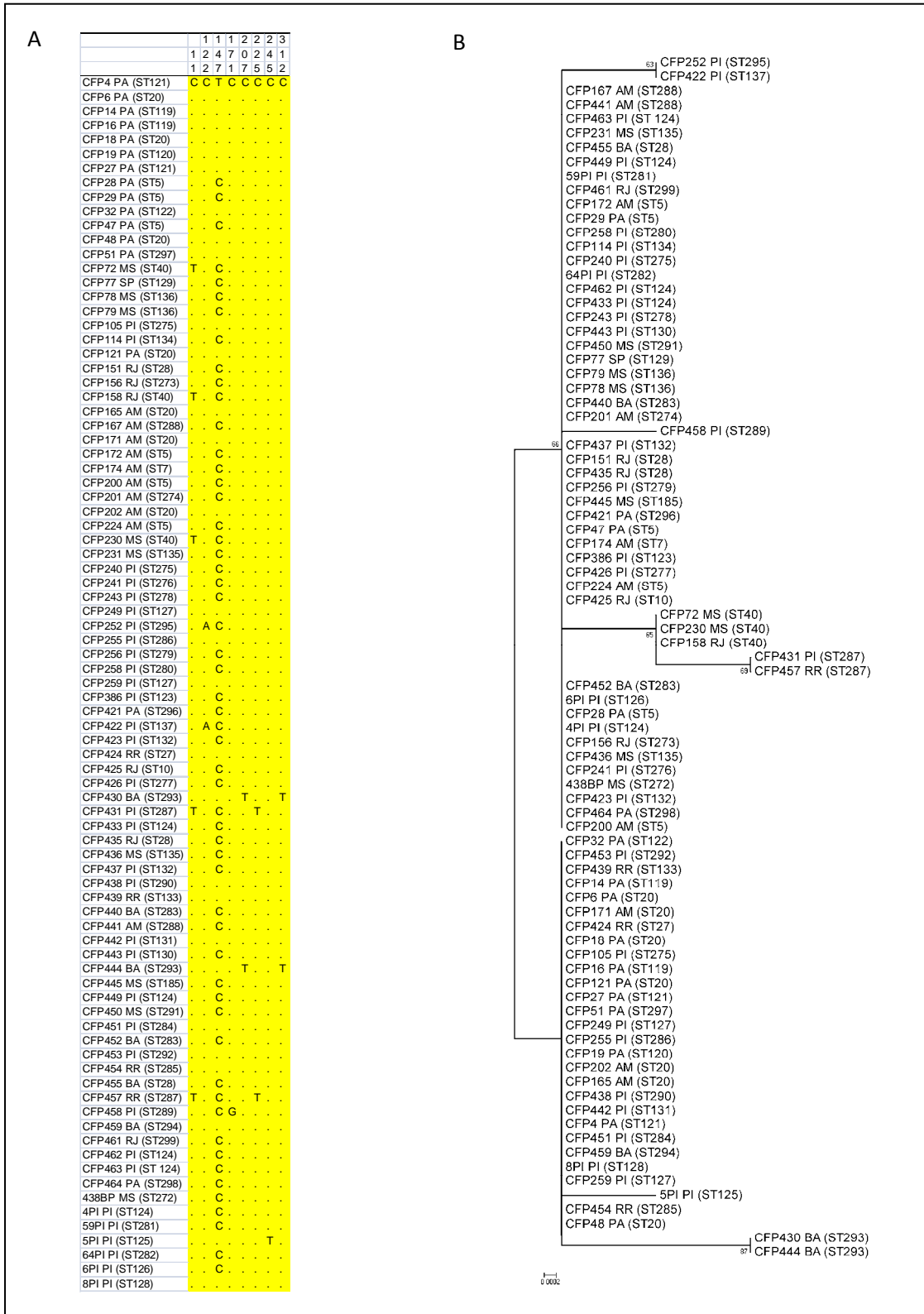


Figura 14: A - Sítios polimórficos do gene *URA5* e suas respectivas posições (gaps não incluídos); B – Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) do gene *URA5* de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (valores acima de 60%).

A análise conjunta dos 7 loci das 85 cepas demonstrou um total de 56 tipos de sequência (ST), com 124 sítios polimórficos detectados. Somente na região norte do Brasil foram encontrados os subtipos VGIIa (ST20) e VGIIb (ST7) , sendo 7 cepas VGIIa do AM e PA e 1 cepa VGIIb do AM. Não foram encontradas cepas VGIIc (ST6) na amostra estudada (figura 16). A diversidade haplotípica da análise conjunta foi igual a 0,982, revelando uma alta diversidade genética entre as cepas VGII brasileiras. Entre os STs identificados nesta análise, 47 são exclusivos do Brasil e 40 possuem apenas uma cepa. Os STs mais frequentes foram o ST20 (VGIIa) com 7 cepas e o ST5 com 6 cepas, todos da região norte. O ST124 foi identificado em 5 cepas, exclusivamente na região nordeste (PI) (figura 17). A Região nordeste foi a que apresentou maior variabilidade genética com 30 STs diferentes em 39 cepas.

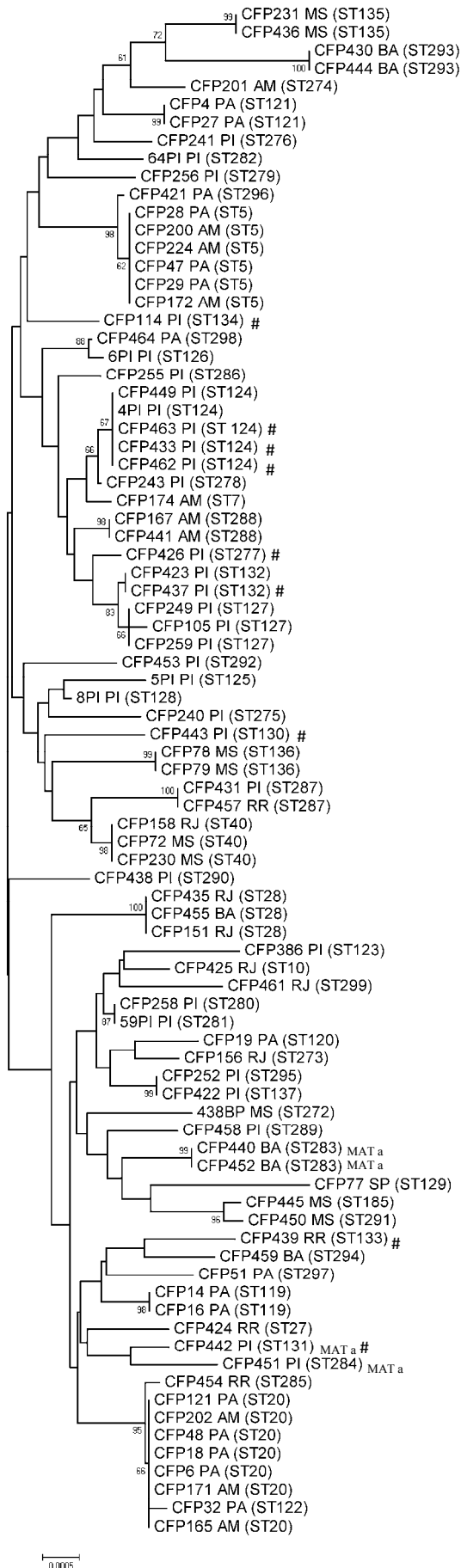


Figura 15: Árvore filogenética neighbor-joining (“unrooted”) dos loci *CAP59*, *GPD1*, *IGS1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* combinados de 85 cepas analisadas. Números nas ramificações são os valores de “bootstrap” obtidos de 1,000 replicações (demonstrados os valores acima de 60%). #, Cepas de origem ambiental; MAT a, mating type a.

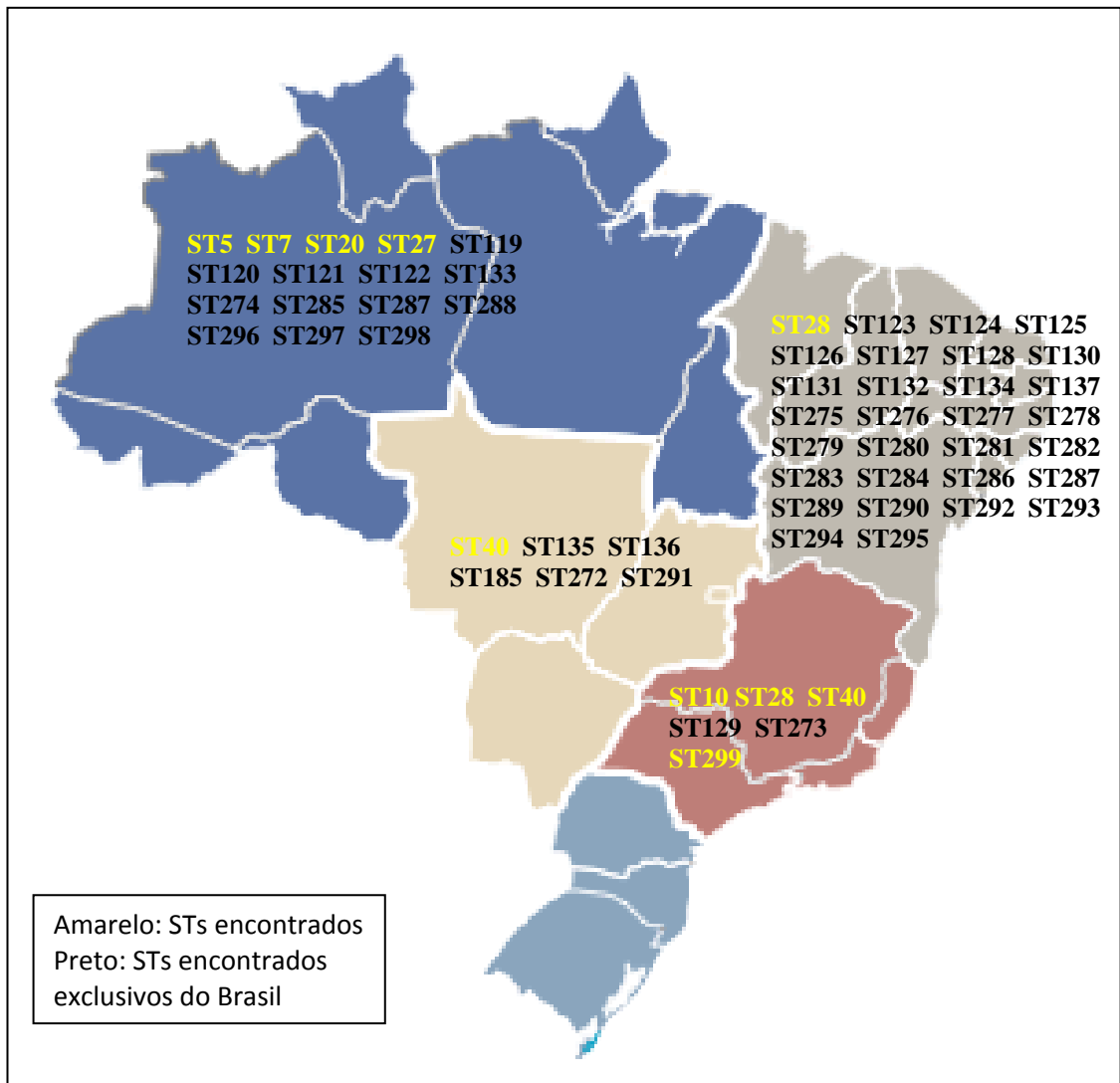


Figura 16: Distribuição dos tipos de sequencia pelas regiões brasileiras

7 DISCUSSÃO

Verificamos que as cepas VGII do Brasil analisadas no presente estudo apresentam uma expressiva variabilidade molecular, principalmente quando comparadas ao relatado em estudos similares em outras regiões do mundo. Em Vancouver, Canadá, Kidd e colaboradores (2004) analisaram amostras de *C. gattii* VGII (20 de origem humana, 5 veterinárias e 67 ambientais) utilizando PCR-fingerprinting com primer M13, *URA5*-RFLP e AFLP, encontrando um subtipo predominante identificado como VGIIa, seguindo-se outro denominado VGIIb, o que no conjunto representa 2 subtipos diferentes em 92 isolados VGII analisados. Este estudo foi pioneiro, após o qual, seguiram-se estudos epidemiológicos utilizando subtipagem de VGII com outros métodos, passando-se então ao uso de números para designar os diferentes STs progressivamente identificados.

Na Austrália, Carricone e colaboradores (2011) utilizando MLST identificaram 6 STs diferentes em 54 amostras VGII clínicas e ambientais, com predomínio de VGIIb/ST7 (em 39 amostras), seguindo-se ST5, ST21, ST33, ST38 e ST48, não sendo encontrado o VGIIa/ST20. Neste estudo observou-se maior variabilidade de VGII do que no Canadá.

Pesquisas mais recentes na Tailândia (Kaocharoen *et al*, 2013) utilizaram a técnica de MLST em 498 cepas clínicas e ambientais e encontraram somente 12 amostras VGII sendo identificados 2 STs (11VGIIb e 1 ST30), confirmando assim uma baixa variabilidade molecular deste tipo molecular de *C. gattii*.

Lockhart e colaboradores (2013) analisaram 273 amostras clínicas nos Estados Unidos encontrando 34 STs diferentes em cepas de *C. gattii* VGI, VGII e VGIII. Quando analisados os STs de 212 cepas VGII - a maioria proveniente da região da costa do Pacífico (PNW) - foram identificados 141 VGIIa, 22 VGIIb, 44VGIIc e um último grupo VGII não-a, não-b e não-c constituído por 5 cepas que podem incluir 1 ou mais outros STs, não discriminados no artigo. Outro trabalho realizado nos EUA, com identificação de subtipos de VGII, analisou amostras de conveniência que não refletem a ocorrência de diversidade geográfica deste agente, seja em séries de isolados clínicos ou de ambiente (Gillece *et al*, 2011). Estes autores comparam a técnica de Whole genome sequencing typing (WGST) com MLST. Dentre os 18

VGII da Costa Pacífica NO dos EUA e da British Columbia 3 STs foram identificados (VGIIa, VGIIb e VGIIc). Portanto, comparando os estudos de variabilidade genética de *C. gattii* VGII mais representativos por país, observamos no Canadá 3 STs/ 93 amostras, na Austrália 6 STs/54 amostras e nos EUA 4 a 8 STs/212 amostras, enquanto que no Brasil chama a atenção a variabilidade expressivamente maior (56 STs/85 amostras de *C. gattii* VGII), até o momento não descrita em outra região endêmica de criptococose por *C. gattii* no mundo.

A análise filogenética dos 7 loci estudados reafirma a diversidade genética já observada e evidencia dois principais subgrupos, o que também foi demonstrado por Carriconde e colaboradores (2011), em um subgrupo onde ocorre o VGIIb (ST 7) e ST 5 além de outros subtipos incluindo o ST 124. Este novo ST (124) foi identificado no baço de tatu do Piauí, de árvores e também de paciente do Piauí, demonstrando que outros microhabitats não descritos podem estar relacionados ao ciclo de vida deste agente e podem representar fontes ambientais para infecção humana, como revolver toca de tatu no semi-árido do Brasil. Por outro lado, o VGIIa (ST 20) predomina no segundo subgrupo.

A ocorrência de diferentes tipos moleculares, refletindo a particular e marcada diversidade genética deste agente no Brasil, sugere uma complexa estrutura populacional deste agente, particularmente *C. gattii* VGII. Diferentes processos reprodutivos estão relacionados à diversidade fúngica, e em particular nos agentes da criptococose. O processo clássico sexuado, meiótico, é o principal modo de reprodução de variantes genéticas que leva a recombinação gênica. Embora muitos fungos apresentem ciclo sexuado heterotálico, um significativo número pode ser homotálico, o que é observado em cerca de 10% dos ascomicotas e alguns basidiomicotas (Deacon, 1997). Formas de reprodução não sexuada em *C. neoformans* foram descritas em experimentos *in vitro* nos quais células haplóides desta levedura, mesmo na ausência do outro tipo sexuado, formam hifas e basidiósporos em meios de baixa disponibilidade de nitrogênio, ocorrendo tanto para o tipo sexuado alfa quanto para o a. Este fenômeno, denominado frutificação haplóide ou monocariótica, além de possibilitar variabilidade gênica, pode ser um mecanismo de sobrevivência em natureza (Tschärke *et al*, 2003). A formação de hifa monocariótica *in vitro* foi recentemente obtida de isolados de *C. neoformans* induzido por altas temperaturas e interrupção do ciclo celular e formação de células gigantes (Fu *et al*, 2013). A frutificação haplóide pode ocorrer também em *C. gattii*, mas não há estudos *in vitro* confirmando este processo de reprodução. Nos dois processos acima referidos há formação de basídio e basidiósporos, no entanto é também descrito um processo de variação não-sexuada no qual diferentes tipos nucleares são observados no

citoplasma de uma hifa. Este fenômeno é chamado heterocariose e pode surgir da mutação em um núcleo da hifa que passa a proliferar junto com o núcleo original ou quando duas cepas fazem anastomose (fusão de parede e membrana celular) de tal forma que seus núcleos fiquem num citoplasma comum. Este é um processo instável, que eventualmente pode formar heterocarios estáveis quando os núcleos proliferam na porção apical da hifa. Pode ocorrer em natureza mas não há estudos que comprovem a importância deste para a acumulação de mutações e variabilidade genética através de pressões seletivas no ambiente (Deacon, 1997).

Com relação aos agentes da criptococose, a maioria dos isolados naturais são haplóides, mas já foram identificados híbridos intraespécies, aneuplóides ou diplóides de *C. neoformans* sorotipo AD e também híbridos interespecíes, tais como sorotipo BD (híbridos VNIV-VGI), sorotipo AB (VNI-VGI), incluindo amostras do Brasil caracterizadas como híbridos *C. gattii* VGII e *C. neoformans* VNI, um do Maranhão e outro do Piauí, ambos de origem clínica (Aminejad *et al*, 2011). A origem destes híbridos é desconhecida, mas estas variantes têm sido consideradas mais virulentas (Aminejad *et al*, 2011). O processo de hibridação possibilita a duplicação de genes, formação de variantes diplóides ou aneuplóides possibilitando alterações cromossômicas e mecanismos adicionais para gerar diversidade genética. Também representa uma das forças relacionadas à evolução de muitos eucariotas e, em populações haplóides ou diplóides, pode possibilitar uma maior adaptação (Deacon, 1997). No caso de *C. gattii*, patógeno de origem ambiental, este fenômeno pode também influenciar na diversificação de genótipos e fenótipos sobrevivendo em diferentes nichos.

Fraser e colaboradores (2005) sugerem que a origem da epidemia em Vancouver, Canadá esteja relacionada a um possível evento prévio de recombinação alfa-alfa (“same sex mating”) gerando variantes mais virulentas que se dispersaram através de basidiósporos e se expandiram clonalmente na região da epidemia, onde atualmente só se encontrou MATalfa, tanto de origem clínica como ambiental.

Estes processos de reprodução, sexuada e assexuada, possuem grandes implicações evolucionárias. A reprodução assexuada promove a colonização de novos habitats e infecção por um ou poucos clones enquanto que a reprodução sexuada está relacionada à sobrevivência em ambientes sob mudanças ecológicas diversas e competição intra e inter-específica. Portanto a reprodução sexuada traz uma vantagem seletiva para adaptação a novas condições ambientais, enquanto que a reprodução assexuada ocorre em genótipos adaptados a novos nichos sendo a combinação de ambos fundamental para a expansão populacional dos agentes da criptococose (Carriconde *et al*, 2011). Nos estudos de Carriconde e colaboradores (2011) na Austrália, foi observada baixa diversidade genética sugerindo o predomínio de estrutura

clonal de *C. gattii* VGII. O mesmo foi observado por Fraser e colaboradores (2005) nos isolados do Canadá. No entanto, a América do Sul destaca-se com uma maior diversidade de subtipos de VGII (Carriconde *et al*, 2011). O presente estudo demonstra que o Brasil apresenta a maior diversidade genética conhecida dentro da população de VGII mundial. Este perfil sugere que mecanismos de variabilidade são elementos muito importantes e atuantes na estrutura populacional das cepas VGII no Brasil.

A diversidade das cepas estudadas é verificada pelo elevado índice de diversidade haplotípica obtido pela análise conjunta dos 7 loci, além da grande quantidade de STs (47), descritos somente no Brasil, e vários STs representados por um único isolado. Portanto, estudos futuros são necessários para verificar se estes perfis são endêmicos exclusivos no Brasil ou se ocorrem em outras regiões do mundo. Com relação aos demais subtipos já encontrados no Brasil e também em outros países, verificamos que o ST20 (VGIIa) predominou no Brasil, no Canadá e EUA, enquanto que o segundo ST mais frequente no Brasil, ST5, é também encontrado na Austrália junto com VGIIb que predomina neste país. Já no Brasil, somente um isolado VGIIb (ST7) foi identificado no estado do Amazonas. Estes 3 STs foram identificados no Brasil somente na região norte, nos estados do Amazonas e Pará. Nesta região foram encontrados mais 13 STs sugerindo grande variabilidade de VGII na região amazônica (18 STs/30cepas). Observa-se, portanto que estes três STs (5, 7 e 20) predominantes em outros países e relacionados a surtos, foram encontrados na região norte do Brasil, porém não foram encontrados nas outras regiões brasileiras. Isto pode ser atribuído ao baixo número de cepas analisadas das regiões centro-oeste e sudeste, no entanto, a região nordeste teve o maior número de cepas analisadas (39). O perfil genético de VGII observado nesta região é completamente diferente da região norte, observando-se 29 STs únicos do nordeste e somente 1 ST comum (ST287) às duas regiões norte e nordeste. É possível que ocorra uma subpopulação de VGII no nordeste distinta e mais diversa do que a subpopulação de VGII da região norte. Esta diferença pode estar relacionada a padrões climáticos e ambientais distintos. Nosso país tem dimensões continentais, incluindo diferentes biomas e graus de antropização. A região norte se caracteriza por um clima tropical úmido com abundância de chuvas e florestas nativas intimamente relacionadas à formação de habitats naturais e à estrutura populacional do fungo nestes ambientes, por outro lado, as condições da região nordeste, onde predomina o clima de semi-árido com baixo regime de chuvas e vegetação xerófila, proporcionam outras condições para a estruturação destes mesmos habitats. Com relação às demais regiões do Brasil, sudeste e centro-oeste, é necessário ampliar o número de amostras para verificar se o mesmo ocorre, pois diferentes perfis foram

observados em cada uma com exceção de um único ST comum a ambas (ST40) e um ST comum entre a região sudeste e nordeste (ST28). É preciso levar em consideração que a maioria dos isolados analisados é de origem clínica e alguns STs encontrados numa região podem ser originários de pacientes que migraram de outras regiões. Em resumo, observamos que as 85 cepas analisadas, com exceção de 8 cepas correspondentes a 3 STs, apresentaram distribuição regional exclusiva. Concluimos portanto que a diversidade genética de VGII no Brasil apresenta uma distribuição geográfica regional com ênfase para as regiões norte e nordeste. Torna-se importante aumentar o número de isolados ambientais nos estudos futuros.

Com relação à distribuição de ST, observamos que o ST 124 e o ST132 foram isolados de fontes ambientais e clínicas. O ST124 foi isolado somente no Piauí de amostras clínicas e também de madeira em decomposição em ocos de árvores coletadas na cidade de Teresina e em uma plantação experimental de *Eucalyptus camaldulensis* da EMBRAPA próximo a esta cidade. Portanto, estas fontes ambientais urbanas ou peri-urbanas podem ser causa da infecção humana e alguns subtipos podem apresentar um padrão geográfico restrito. Por outro lado o ST20 (VGIIa) apresenta larga dispersão na Amazônia, Canadá (Fraser *et al*, 2005) e EUA (Lockhart *et al*, 2013), se apresentando como agente de caráter expansivo e cosmopolita.

Na região sul do Brasil predominam isolados de *C. neoformans* sobre *C. gattii* tanto em isolados clínicos como ambientais. O perfil da coleção de cultura CFP reflete esta tendência e os poucos isolados de *C. gattii* identificados são do tipo VGI. O trabalho prévio mais amplo de cepas brasileiras (Trilles *et al*, 2008) mostra o predomínio de VGII nas regiões norte e nordeste. É possível que o VGII ocorra na região sul de forma ocasional, não predominante e somente estudos de amplas séries de isolados ambientais podem aumentar o conhecimento sobre este assunto.

A diversidade genética populacional de VGII no Brasil está relacionada à estratégia de reprodução onde a recombinação sexuada ou assexuada deve ter um papel importante. A variabilidade observada se expressa não só no alto índice de diversidade haplotípica do conjunto dos 7 loci mas também na análise individual destes loci, onde a região IGS1 apresentou índice significativamente elevado seguido do gene *SOD1*, enquanto que o gene *LAC1* foi o menos variável. Por outro lado, a identificação de 4 isolados MATa sugere que um dos processos implicados na variabilidade seja a reprodução sexuada clássica, mas mecanismos recombinantes alfa-alfa, frutificação monocariótica e hibridização podem estar contribuindo para as estratégias reprodutivas deste agente no Brasil.

A reprodução sexuada tem sido considerada o principal fator para a evolução natural de virulência (Grigg *et al*, 2001). Para investigar a origem da epidemia de Vancouver, foi

feito a análise filogenética através de MLST utilizando 9 loci demonstrando um predomínio de população clonal mas precedido de um evento recombinante entre cepas MATalfa e MATa com produção de variantes virulentas, seguida de dispersão e adaptação na área de Vancouver e seu entorno (Fraser *et al*, 2005). Este evento é hipotético e não foi identificada a possível cepa original que os autores sugerem vinda da Austrália. Estes autores não consideraram os achados sobre o predomínio de VGII na Amazônia então publicados (Trilles *et al*, 2008) e consideravam o VGII um genótipo raro no mundo. No entanto, Fortes e colaboradores (2001) demonstraram a ocorrência de *C. gattii* em uma árvore nativa da floresta Amazônica em uma área remota da Ilha de Maracá, com ecossistema preservado e sem ação antrópica, demonstrando pela primeira vez que florestas tropicais podem abrigar habitats naturais primários para este agente e que na Floresta Amazônica ocorre um nicho especializado de *C. gattii* relacionado à decomposição de madeira. Esta cepa foi mais tarde identificada como VGII (Trilles *et al*, 2008). No presente estudo, analisamos esta cepa identificada como CFP 439 isolada de uma árvore nativa denominada *Guettarda* e identificada como ST 133, que se apresenta como único isolado ambiental de Roraima e seu ST é exclusivo entre as cepas analisadas. Em trabalho recente, Hagen e colaboradores (2013) investigaram a origem da epidemia do Canadá e do surto da Costa Pacífica dos EUA utilizando diferentes metodologias de análise filogenética e de recombinação a partir de um banco de dados de MLST e AFLP de cepas VGII comparando cepas relacionadas ao surto e outras regiões do globo. Concluíram que estes surtos são provenientes de uma população altamente recombinante de *C. gattii* da floresta tropical do norte do Brasil correspondente à Amazônia. A partir desta região da América do sul, linhagens recombinantes teriam se dispersado para áreas temperadas causando infecções em humanos e animais susceptíveis, explicando o padrão epidemiológico na forma de surto. A análise de genealogia baseada em coalescência de genes mostrou que as linhagens mais antigas são originárias do Brasil e a linhagem mais basal e originária de *C. gattii* VGII está relacionada à cepa LMM 645 que corresponde à cepa CFP 439 deste trabalho.

Portanto, o trabalho pioneiro de Fortes e colaboradores (2001) que sugeria a floresta amazônica como habitat original de *C. gattii*, foi corroborado e ampliado por este recente estudo que localiza a origem de *C. gattii* VGII na floresta Amazônica. A elevada diversidade genética observada nas cepas da região norte neste estudo e o fato de que os subtipos predominantes da epidemia do Canadá e EUA se encontram somente na região norte reforçam esta hipótese. Portanto, podemos também sugerir que eventos recombinantes ocorreram nesta região amazônica com dispersão de variantes virulentas para regiões temperadas das Américas. Esta dispersão pode estar relacionada ao comércio e transporte de madeiras da

Amazônia para estas áreas bem como à dispersão de fragmentos de madeira colonizados através de correntes marítimas.

8 CONCLUSÕES

- Foi verificado na CFP que dos isolados de *C. gatti* analisados 85 cepas são VGII, 26 são VGI e não foram encontradas cepas VGIII nem VGIV. As cepas *C. gattii* VGII brasileiras estudadas apresentam uma alta variabilidade genética, sendo a maior até agora registrada em estudos mundias similares;
- A maior diversidade encontrada no Brasil aponta para sub-populações de VGII originais que se dispersaram geograficamente;
- Os subtipos VGIIa e VGIIb, relacionados à epidemia em Vancouver, foram identificados na região norte do Brasil, mas não nas demais regiões brasileiras, indicando um perfil regional peculiar, vinculado à Amazonia;
- A sub-população de VGII analisada na região NE, característica do semi-arido, mostrou-se distinta da região N e demais regiões brasileiras;
- O subtipo VGIIc, relacionado a infecções na Costa Pacífica do EUA, não foi identificado neste estudo;
- A hipótese de que a epidemia de Vancouver é proveniente de uma população altamente recombinante de *C. gattii* VGII originária do Norte do Brasil e, a partir desta região amazônica, linhagens recombinantes teriam se dispersado para áreas temperadas causando infecções em humanos e animais susceptíveis foi reforçada com os resultados deste estudo mostrando a presença dos subtipos VGIIa e VGIIb.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA. *GPD1*, Which Encodes Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase, Is Essential for Growth under Osmotic Stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and Its Expression Is Regulated by the High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. *Mol Cell Biol*. 1994;14(6):4135-4144.

Aminnejad M, Diaz M, Arabatzis M, Castañeda E, Lazera M, Velegraki A et al. Identification of Novel Hybrids Between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia*. 2012; 173:337–346

Arvand M, Feil EJ, Giladi M, Boulouis HJ, Viezens J. Multi-locus Sequence Typing of *Bartonella henselae* Isolates from three continents reveals hypervirulent and feline-associated clones. *PLoSone*. 2007;e1346.

Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. Invasive mould infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1319-1324.

Baddley JW, Schain DC, Gupte AA, Lodhi SA, Kayler LK, Frade JP et al. Transmission of *Cryptococcus neoformans* by Organ Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4):e94–98.

Baltazar LM, Ribeiro MA. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no estado do espírito santo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(5):449–453.

Barbosa GG, Trilles L, Wanke B, Lazera MS. *Cryptococcus gattii* VGI and *Cryptococcus neoformans* VNI Associated with Wood Decay in Ficus Hollow Trees in Rio de Janeiro, Brazil. *Brit Microb Res J*. 2013; 3(1):106-115.

Baró T, Torres-Rodríguez JM, De Mendoza MH, Morera Y, Alía C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):458-461.

Barnett JA. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast*. 2010; 27 (11): 875 – 904.

Bartlett KH, Kidd SE, Kronstad JW. The emergence of *Cryptococcus gattii* in British Columbia and the Pacific Northwest. *Curr Infect Dis Rep*. 2008;10(1):58–65.

Benham RW. Cryptococci: their identification by morphology and serology. *J. Infect. Dis.* 1935;57:255-274.

Benham RW. Cryptococcosis and blastomycosis. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 1950;50:1299–1314.

Boekhout T, van Belkum A. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. *Curr Genet.* 1997;32: 203–208.

Boekhout T, van Belkum A, Leenders ACAP, Verbrugh HA, Mukamurangwa P, Swinne D et al. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47: 432-442.

Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 2001;147: 891-907.

Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G, Doering TL. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Euk Cell.* 2003; 2(4): 655-663.

Bovers M, Diaz MR, Hagen F, Spanjaard L, Duim B, Visser CE et al. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex MAP technology. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1874–1883.

Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol.* 2008a;25:S4–12.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol.* 2008b;45:400-421.

British Columbia (BC) Centre for Disease Control. BC *Cryptococcus gattii* surveillance summary, 1999 –2006. 2007.

Byrnes 3rd EJ, Bildfell R, Frank SA, Mitchell TG, Marr K, Heitman J. Molecular evidence that the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak has expanded into the United States Pacific Northwest. *J Infec Dis.* 2009;199:1081– 1086.

Byrnes 3rd EJ, Heitman J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. F1000 Biology Reports. 2009;1:62.

Byrnes 3rd EJ, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. PLoS Pathog. 2010;6 (4):e1000850.

Callejas A, Ordoñez N, Rodrigues MC, Castañeda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C from the environment in Colombia. Med Mycol. 1998;36: 341-344.

Campbell LT, Currie BJ, Krockenberger M, Malik R, Meyer W, Heitman J et al. Clonality and recombination in genetically differentiated subgroups of *Cryptococcus gattii*. Eukaryot Cell. 2005;4: 1403–1409.

Campos FL, Baroni FA. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* Produtores de Protease e Fosfolipase. Rev Pat Trop. 2010; 39 (2): 83-89.

Carriconde F, Gilgado F, Arthur I, Ellis D, Malik R, Wiele N et al. Clonality and α -a Recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII Population - An Emerging Outbreak in Australia. PLoS One. 2011; 6:e16936.

Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington DC, USA. 1998.

Cavalcanti MAS. Criptococose e seu agente no Meio Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado] - Fundação Oswaldo Cruz, Medicina Tropical; 1995.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cryptococcus_neoformans_using_a_light_India_in_k_staining_preparation_PHIL_3771_lores.jpg?uselang=pt-br#file. Acesso em: 18/01/2014.

Chan MY, Tay ST. Enzymatic characterization of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp. Mycoses. 2010; 53: 26-31.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. Mol Cell Biol. 1994; 14:4912–4919.

- Chang YC; Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, *CAP64*, is essential for virulence. *Infection and Immunity*. 1996; 64:1977-1983.
- Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the third capsule-associated gene, *CAP60*, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 1998; 66: 2230-2236.
- Chang YC, Wickes BL, Miller GF, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans STE12 α* regulates virulence but is not essential for mating. *J Exp Med*. 2000; 191: 871-881.
- Chaturvedi S, Dyavaiah M, Larsen RA, Chaturvedi V. *Cryptococcus gattii* in SIDA patients, southern California. *Emerg Infect Dis*. 2005;11: 1686-1692.
- Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin N Am*. 2006; 20:507-544.
- Chen SCA, Currie BJ, Campbell HM, Fisher DA, Pfeiffer TJ et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in northern Australia: existence of an environmental source other than known host eucalypts. *T Roy Soc Trop Med H*. 1997;91: 547-550.
- Chowdhary A. Molecular epidemiology, environmental dispersion and antifungal susceptibility of *Cryptococcus grubii* and *C. gattii* prevalent in India. India. Tese [Doutorado] - Radboud University Nijmegen; 2012.
- Cogliati M, Esposto MC, Tortorano AM, Viviani MA. *Cryptococcus neoformans* population includes hybrid strains homozygous at mating-type locus. *FEMS Yeast Res*. 2006;6: 608-613.
- Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*. 2013; 2013: 1-23.
- Corrêa MPC, Oliveira EC, Duarte RRBS, Pardal PPO, Oliveira FM, Severo LC. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32:505-508.
- Cox GM, McDade HC, Chen SCA, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC et al. Extracellular phospholipase is a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Mol Microbiol*. 2001;39:166-175.
- Cuellar ML, Silveira LH, Espinoza LR. Fungal arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1992; 51:690-697.

- Currie BP, Freundlich LF, Casadevall A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. *J Clin Microbiol*. 1994;32(5):1188-1192.
- Datta K, Bartlett KH, Baer R, Byrnes E, Galanis E, Heitman J *et al*. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1185–91.
- Davidson RC, Moore TDE, Odom AR, Heitman J. Characterization of the MF α pheromone of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2000; 38: 1017-1026.
- Deacon JW. *Modern Mycology*. 3.ed. London: Blackwell science. 1997; cap8:136-158.
- Diaz MR, Fell JW. Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3662–3672.
- Dixit A, Carroll SF, Qureshi ST. *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009; 2009.
- Dogson AR, Dodgson KJ, Pujol C, Pfaller MA, Soll DR. Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in *FUR1* gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents & Chemotherapy*. 2004; 48: 2223-2227.
- Duncan CG, Stephen C, Lester S, Bartlett KH. Subclinical infection and asymptomatic carriage of *Cryptococcus gattii* in dogs and cats during an outbreak of cryptococcosis. *Medical Mycology*. 2005; 43(6):511–516.
- Duncan C, Schwantje H, Stephen C, Campbell J, Bartlett K. *Cryptococcus gattii* in wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada. *J. Wildl. Dis*. 2006;42:175–178.
- Durden FM, Elewski B. Cutaneous involvement with *Cryptococcus neoformans* in SIDA. *J Am Acad Dermatol*. 1994;30:844–848.
- Edman JC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the URA5 gene from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and its use as a selective marker for transformation. *Mol Cell Biol*. 1990, 10(9): 4538-4544.
- Eisenman HC, Casadevall A, McClelland EE. New Insights on the Pathogenesis of Invasive *Cryptococcus neoformans* Infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2007; 9:457-464.

Ellis DH. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. J Clin Microbiol. 1987; 25:430-431.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1642-1644.

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. 2006; 6:625–635.

Evans EE. The Antigenic Composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A Serologic Classification by means of the Capsular and Agglutination Reactions. J Immunol. 1950; 64(5):423-30.

Ferrer C, Colom F, Frase S, Mulet E, Abad JL, Alio, JL. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. JCM. 2001; 39: 2873–2879.

Findley K, Rodriguez-Carres M, Metin B, Kroiss J, Fonseca A, Vilgalys R et al. Phylogeny and Phenotypic Characterization of Pathogenic *Cryptococcus* Species and Closely Related Saprobic Taxa in the Tremellales. Eukaryotic Cell. 2009; 8(3): 353-361.

Fortes ST, Lazéra MS, Nishikawa MM, Macedo RCL, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. Mycoses. 2001; 44:137-140.

Fraser JA, Subaran RL, Nichols CB, 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. 2003;2: 1036-1045.

Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. Nature. 2005;437: 1360-1364.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem. 1995; 64:97–112.

Fu J, Morris IR, Wickes BL. The production of Monokaryotic Hyphae by *Cryptococcus neoformans* Can Be Induced by High Temperature Arrest of the Cell Cycle and Is Independent of Same-sex Mating. *PLoS Pathog.* 2013; 9(5): e1003335.

Fyfe M, MacDougall L, Romney M, Starr M, Pearce M, Mak S et al. *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. *Can Commun Dis Rep.* 2008;34:1–12.

Galanis E, MacDougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:251–7.

Gillece JD, Schupp JM, Balajee SA, Harris J, Pearson T, Yan Y et al. Whole Genome Sequence Analysis of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest Reveals Unexpected Diversity. *PLoS ONE.* 2011; 6(12): e28550.

Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two ancestries. *Science.* 2001; 294:161-165.

Hagen F, Assen SV, Luijckx GJ, Boekhout T, Kampinga GA. Activated dormant *Cryptococcus gattii* infection in a Dutch tourist who visited Vancouver Island (Canada): a molecular epidemiological approach. *Med Mycol.* 2009;48: 528-531.

Hagen F, Illnait-Zaragozi MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH et al. In vitro antifungal susceptibilities and AFLP genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:5139–4145.

Hagen F, Ceresini PC, Polacheck I, Ma H, van Nieuwerburgh F, Gabaldo T et al. Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. *PLoS ONE.* 2013; 8(8): e71148.

Hoang LM, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, Roscoe DL. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997–2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J Med Microbiol.* 2004;53:935–940.

Hull CM, Heitman J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Genetics.* 2002; 36:557-615.

Igreja RP, Lazéra MS, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from SIDA patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Med Mycol.* 2004;42: 229-238.

Iqbal N, DeBess EE, Wohrle R, Sun B, Nett RJ, Ahlquist AM et al. Correlation of Genotype and *In Vitro* Susceptibilities of *Cryptococcus gattii* Strains from the Pacific Northwest of the United States. *J Clin Microbiol.* 2010; 48 (2):539–544.

Kaocharoen S, Ngamskulrungrroj P, Firacative C, Trilles L, Piyabongkarn D, Banlunara W et al. Molecular Epidemiology Reveals Genetic Diversity amongst Isolates of the *Cryptococcus neoformans/C.gattii* Species Complex in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(7): e2297.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Bioch Polonica.* 2009;56: 211-224.

Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *PNAS.* 2004; 101: 17258-17263.

Kidd SE, Guo H, Bartlett KH, Xu J, Kronstad JW. Comparative gene genealogies indicate that two clonal lineages of *Cryptococcus gattii* in British Columbia resemble strains from other geographical areas. *Eukaryot Cell.* 2005; 4:1629–1638.

Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2007a; 73:1433–1443.

Kidd SE, Bach PJ, Hingston AO, Mak S, Chow Y, MacDougall L et al. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. *Emer Infect Dis.* 2007b;13(1): 51–57.

Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen HD. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol & Infec.* 2006; 12:1077-1081.

Krockenberger MB, Canfield PJ, Kozel TR, Shinoda T, Ikeda R, Wigney DI et al. An immunohistochemical method to differentiate between *Cryptococcus neoformans* varieties and serotypes in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Med Mycol.* 2001;39: 523-533.

Kwon-Chung KJ. A new genus *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia. 1975; 67:1197-1200.

Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia. 1976a; 68:942-946.

Kwon-Chung KJ. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia. 1976b; 68:821–833.

Kwon-Chung KJ, Popkin TJ. Ultrastructure of septal complex in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). J Bacteriol. 1976;126:524-528.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Theodore TS. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov: serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. Int J Syst Bacteriol. 1978; 28: 616–620.

Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). J Clin Microbiol. 1982a;15:535–537.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Rhodes JC. Taxonomic studies on *Filobasidiella neoformans* and their anamorphs. Antonie van Leeuwenhoek. 1982b;48:25-38.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. In: Lea, Febiger. Medical Mycology. Philadelphia, PA. 1992.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006; 6(4):574-587.

Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Wickes BL, Fell JW. Systematic of the genus *Cryptococcus* and its type species of *C. neoformans*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. (eds). *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. Washington DC: ASM Press. 2011. p. 3–15.

Lazéra MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J Med Vet Mycol. 1993; 31:449–454.

Lazéra MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J Med Vet Mycol. 1996;34:127-131.

Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow - evidence for a natural habitat related to decaying wood. *J Med Vet Mycol.* 1998;36: 119-122.

Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2000; 38: 379-383.

Lazéra MS, Gutierrez-Galhardo MC, Cavalcanti MAS, Wanke B. Criptococose. In Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 1ed. Vol II. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005. p. 1223-1235.

Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F et al - EPCAN Study Group. A bedside scoring system (“*Candida* score”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonisation. *Crit Care Med.* 2006; 34: 730-737.

Lester SJ, Kowalewich NJ, Bartlett KH, Krockenberger MB, Fairfax TM, Malik R. Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases (January to July 2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 225 (11):1716–1722.

Levitz SM. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev Infect Dis.* 1991;13:1163-1169.

Licea BA, Garza DG, Zúñiga MT. Aislamento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev Iberoam Micol.* 1996;13: 27-28.

Lin X, Hull CM, Heitman J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature.* 2005; 434: 1017-1021.

Lindberg J, Hagen F, Laursen A, Stenderup J, Boekhout T. *Cryptococcus gattii* risk for tourists visiting Vancouver Island, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 178-179.

Litvintseva AP, Thakur R, Reller LB, Mitchell TG. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with SIDA in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis.* 2005; 192: 888-892.

Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics.* 2006; 172 (4):2223–2238.

Lo D. Criptococose no Território do Norte. *Med J Aust.* 1976; 2: 825-828.

Lockhart SR, Iqbal N, Harris JR, Grossman NT, DeBess E, Wohrle R et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Genotypic Diversity of Human and Veterinary Isolates. *PLoS ONE.* 2013; 8(9): e74737.

Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol.* 2003; 133: 30-37.

MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, Kronstad JW et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(1):42–50.

Martins LMS, Lazéra MS, Leal MJS, Cavalcanti MAS, Eulálio KD, Wanke B. Infecção mista por sorotipo A e B de *Cryptococcus neoformans* como causa de meningoencefalite em criança de Itaituba-PA: relato de caso. *Revi Soc Bras Med Trop.* 2003; 36: 216–216.

Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, 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.* 1993; 31(9):2274-2280.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K 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.* 1999; 20: 1790-1799.

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Ibero American Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 189-195.

Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2009; 47:561–570.

Meyer W, Gilgado F, Ngamskulrungraj P, Trilles L, Hagen F, Castaneda E et al. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A (eds.). *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast.* ASM Press, Washington, DC, 2011. cap 24: p. 327-358.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of SIDA – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microb Rev. 1995; 8 (4):515-548.

Mitchell DH, Sorrell TC, Allworth AM, Heath CH, McGregor AR, Papanoum K et al. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. Clin Infect Dis. 1995; 20: 611-616.

Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. Med Mycol. 2000; 38:385–390.

Nadrous HF, Antonios VS, Terrell CL, Ryu JH. Pulmonary cryptococcosis in nonimmunocompromized patients. Chest. 2003;124(6):2143-2147.

Nara S, Sano T, Ojima H, Onaya H, Ikeda M, Morizane C et al. Liver cryptococcosis manifesting as obstructive jaundice in a young immunocompetent man: report of a case. Surg Today. 2008;38:271–274.

Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. J Clin Microbiol. 2003; 41(1):72–77.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/SIDA. SIDA. 2009; 23: 525-530.

Patel M, Beckerman KP, Reznik S, Madan RP, Goldman DL. Transplacental transmission of *Cryptococcus neoformans* to an HIV-exposed premature neonate. J Perinatol. 2012;32(3):235–237.

Perfect JR. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 1989; 3:77-102.

Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2002;16(4):837-874.

Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;45(3):395–404.

Pinto Junior VL, Pone MV, Pone SM, Campos JM, Garrido JR, de Barros AC et al. *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de

Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010, 43(6):746-748.

Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonisation and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 1994; 220: 751-758.

Raso TF, Werther K, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol.* 2004; 42(4):355-362.

Reimão JQ, Drummond ED, Terceti MS, Lyon JP, Franco MC, Siqueira AM. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brasil. *Mycosis.* 2007; 50:261–264.

Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, Cooper CR Jr, Mcginnis MR, Lázera MS et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med Mycol.* 2000; 38 suppl 1:67–77.

Santagelo RT, Nouri-Sorhabi MH, Sorrell TC, Cagney M, Chen SC, Kuchel PW et al. Biochemical and functional characterization of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *J Med Microbiol.* 1999;48: 731-740.

Santos LO. Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/ FMT/ IMTM (1988- 1998). Rio de Janeiro. Dissertação [mestrado]–Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ; 2000.

Santos WRA. Criptococose e *Cryptococcus neoformans* no estado do Pará: um estudo molecular de isolados clínicos. Rio de Janeiro. [tese de doutorado]- Instituto Oswaldo Cruz, Medicina Tropical; 2008.

Santos WR, Meyer W, Wanke B, Costa SP, Trilles L, Nascimento JL et al. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(8):813-818.

Seaton RA, Verma N, Naraqi S, Wembri JP, Warrell DA. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:44–49.

Sharma R, Hoog S, Presber W, Gräser Y. A virulent genotype of *Microsporium canis* is responsible for the majority of human infections. *J Med Microbiol.* 2007;56(10):1377-1385.

- Shen WC, Davidson RC, Cox GM, Heitman J. Pheromones stimulate mating and differentiation via paracrine and autocrine signaling in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2002; 1:366-377.
- Simwami SP, Khayhan K, Henk DA, Aanensen DM, Boekhout T, Hagen F et al. Low diversity *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* multilocus sequence types from Thailand are consistent with an ancestral African origin. *PLoS Pathog*. 2011; 7: e1001343.
- Sobel JD, Vazquez JA. Fungal infections of the urinary tract. *World J Urol*. 1999; 17: 410–414.
- Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*. 2001; 39: 155-168.
- Sorrell TC, Brownlee AG, Ruma P, Malik R, Pfeiffer TJ, Ellis DH. Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(5): 1261–1263.
- Springer DJ, Chaturvedi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:14–20.
- Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Canadian Veterinary Journal*. 2002; 43(10):792–794.
- Stoddard JL, Cutler EC. *Torula* Infection in Man. Rockefeller for Medical Research. Monograph N 6. 1916; 1-98.
- Sun HY, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Forrest GN, Lyon GM, et al. Unrecognized pretransplant and donor-derived cryptococcal disease in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2010;51(9):1062–1069.
- Taylor JW, Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing—it's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2003; 6 (4):351–356.
- Trilles L, Lazera M, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103: 455-462.
- Tscharke RL, Lazera M, Chang YC, Wickes B, Kwon-Chung KJ. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type specific. *Fungal Genet Biol*. 2003; 39: 230–237.

- Upton A, Fraser JA, Kidd SE, Bretz C, Bartlett KH, Heitman J et al. First contemporary case of human infection with *Cryptococcus gattii* in Puget Sound: evidence for spread of the Vancouver Island outbreak. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (9):3086–3088.
- Van Grieken SA, Dupont LJ, Van Raemdonck DE, Van Bleyenbergh P, Verleden GM. Primary cryptococcal cellulitis in a lung transplant recipient. *J Heart Lung Transplant.* 2007;26:285–289.
- Vanbreuseghem R, Takashio M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. *Ann Soc Belge Med Trop.* 1970; 50 (6): 695-702.
- Vidotto V, Sinicco A, Faria D, Cardaropoli S, Aok S, Ito-Kuwa S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 1996; 136: 119-123.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* 1995; 23(21):4407–4414.
- Wang P, Perfect JR, Heitman J. The G-protein , subunit *GPBI* is required for mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 352-362.
- Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. *Proc Natl Acad Sci USA.*1996; 93: 7327–7331.
- Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol.* 1994; 176(3):656-664.
- Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Ecol.* 2000; 9: 1471–1481.
- Yan Z, Xu J. Mitochondria are inherited from the *MATa* parent in crosses of the basidiomycetefungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics.* 2003; 163:1315-1325.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Meio de Cultura Semente de Níger (NSA)

Pesar em balança analítica os seguintes insumos: 20g de ágar ágar, 400mg de cloranfenicol e 100g de semente de Níger. Colocar 100g da semente de Níger num Becker de 1000mL e 500mL de água destilada para ferver no microondas durante 30 minutos. Esperar esfriar e bater no liquidificador para quebrar a semente. Coar com auxílio de uma gaze, transferindo para um balão de 2000mL. Colocar 20g de ágar ágar, 400mg de Cloranfenicol e 800µL de Amicacina. Completar o volume final para 1000mL com água destilada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Esperar esfriar um pouco e distribuir ± 20mL em Placa de Petri lisa, descartável e estéril 90X150mm na Cabine de Segurança Biológica.

Para o teste de esterilidade, faz-se a observação de contaminantes até 24h após sua produção em temperatura ambiente (+20 a +25°C). Após o teste de esterilidade, é inoculada por 72h/25°C, uma cepa padrão de *Cryptococcus gattii* ATCC 56.990 e uma cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 18.804 para verificar a capacidade indicadora de colônias fenol-oxidase positivas do meio. Após verificar o crescimento de colônias brancas de *C. albicans* no meio e o crescimento pigmentado de *C. gattii*, o lote é liberado para uso.

APÊNDICE B – Meio de Cultura Sabouraud dextrose ágar 2% modificado (Emmons) (HIMedia laboratories PVT)

Pesar 23,5g de Sabouraud dextrose agar e suspender em 500mL de água destilada. Ferver até dissolver completamente e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Esperar esfriar um pouco e distribuir \pm 20mL em Placa de Petri lisa, descartável e estéril 90X150mm na Cabine de Segurança Biológica.

Para o teste de esterilidade, faz-se a observação de contaminantes até 24h após sua produção em temperatura ambiente (+20 a +25°C). Após o teste de esterilidade, se não houver crescimento de nenhum contaminante, o lote é liberado para uso.

APÊNDICE C – Tampão de Lise (para um volume final de 100mL)

Pesar 0,5g de SDS (SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, USA); 1,4g de NaCl (SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, USA); 0,73g de EDTA (SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, USA). Colocar estes insumos em um becker de 200mL e acrescentar 20mL de Tris-HCl (SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, USA) 1M e água destilada para um volume final de 100mL. Colocar em banho-maria a 60°C até a completa solubilização da solução. Dentro da cabine de segurança biológica esterilizar, por filtração utilizando membrana 0,22µm com o auxílio da bomba de vácuo.

APÊNDICE D – Protocolo de Purificação (Promega)

Diluir 1:1 o amplificado com o reagente MEMBRANA BIND no próprio microtubotubo de 200 μ L onde foi feito a PCR e esperar 1 minuto. Transferir a mistura para o microtubo com filtro (fornecido pelo kit) e esperar 1 minuto. Centrifugar por 1 min a 13.000rpm e desprezar o que ficou no microtubo. Adicionar 700 μ L de solução MEMBRANA WASH, centrifugar por 1 min a 13.000rpm e desprezar o que ficou no microtubo. Adicionar 500 μ L de solução MEMBRANA WASH e centrifuga a 13.000rpm por 5 minutos, depois centrifugar por mais 1 minuto a 13.000rpm para secar bem. Transferir o filtro para um novo microtubo tipo eppendorf de 1,5mL e adicionar 50 μ L de água (fornecida pelo kit). Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar a 13.000rpm por 1 minuto. Descartar o filtro e guardar o purificado na geladeira.