



CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA (MIP)
LABORATÓRIO DE PROTOZOLOGIA

Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina.

LARISSA COAN GARCIA

2008



CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA (MIP)
LABORATÓRIO DE PROTOZOLOGIA

Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina.

Trabalho apresentado como requisito para o cumprimento da disciplina Estágio II (BIO 5156) do currículo do Curso de Graduação em Ciências Biológicas para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Acadêmica: Larissa Coan Garcia

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

Co-orientadora: Thaís Cristine Marques Sincero, MSc

2008

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho foi possível graças ao incentivo e colaboração de muitas pessoas, a quem hoje eu devo dizer: muito obrigada!

Ao prof. Mário Steindel, meu orientador, pela oportunidade de fazer iniciação científica em seu laboratório, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo grande exemplo de profissionalismo que ele representa.

À Thaís, minha adorável co-orientadora, por todo o apoio e dedicação durante a realização dos experimentos e principalmente pela correção da versão escrita.

A minha família, por tudo que representam em minha vida. Aos meus pais, Valdir e Célia, agradeço pelo exemplo de luta, pela educação, por terem me ensinado os verdadeiros valores e por terem acreditado em mim, investindo em minha formação e tornando possível a conclusão deste curso. À Thaís, minha irmã, agradeço pela agradável convivência e pela sua presença marcante em toda a minha trajetória.

Ao Thyago, meu namorado, pelo respeito, pelo amor e por estar sempre ao meu lado. Por ser meu companheiro incondicional até mesmo nos momentos de coletar excretas de pombo pendurado na janela do Mercado Público.

Aos colegas da Proto: Juliano, Yuri, Alexandre, Rebeca, Mari, Elisa Orlandi, Elisa Prestes, Cacá, Ana, Nana, Carol, Camille, Rafa, Pati, Ize, Darlene, Ane, Thaís e Glauber, pela agradável convivência no dia-a-dia do laboratório. Em especial quero agradecer à Darlene pelo auxílio nos ensaios de RAPD e à Pati por me ensinar os primeiros passos deste trabalho.

Aos Professores Carlos José de Carvalho Pinto e Edmundo Carlos Grisard, pelos bons momentos e pela participação em minha formação.

Às grandes amigas que eu fiz durante a graduação: Cíntia, Elise e Lise, pela amizade e pelos maravilhosos cafés ao longo destes quatro anos.

Aos formandos de Ciências Biológicas turma 2008/2, pelos ótimos momentos vividos juntos.

Aos professores Jairo Ivo dos Santos, Aguinaldo Roberto Pinto e Iriane Eger, membros da banca que gentilmente aceitaram avaliar este trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o término desta etapa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Amplificação de fragmentos aleatórios do DNA (do inglês <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CG	Circle Grow medium
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
<i>g</i>	Força da gravidade
GXM	Glicoronoxilomanana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RAPD	Amplificação aleatória do DNA (do inglês <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RFLP	Fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TRIS	Hidroximetil amino metano
v/v	Volume por Volume
var.	Variedade

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema do ciclo de vida de *C. neoformans*. Adaptado de IDNURM *et al.*, 2005. 12
- Figura 2** – Ciclo de infecção do *C. neoformans*. Adaptado de LIN & HEITMAN, 2006. 15
- Figura 3** – Comparação do tamanho da cápsula de *C. neoformans* nas condições *in vitro* e *in vivo*. Adaptado de ZARAGOZA & CASADEVALL, 2004. 16
- Figura 4** – Micromorfologia de *C. neoformans* isolada a partir de excretas de pombo coletadas na torre da Catedral Metropolitana de Florianópolis (aumento de 400x). 25
- Figura 5** – Cultura de *C. neoformans* isolada no presente estudo corada com tinta da China evidenciando a cápsula polissacarídica da levedura (aumento de 400x). 26
- Figura 6** – Morfologia das colônias de *C. neoformans* em Ágar Niger demonstrando a produção de melanina pelos isolados. 26
- Figura 7** – Gel em Agarose 1,5% corado pelo brometo de etídeo representativo dos produtos de amplificação do gene CAP59 dos isolados ambientais de *C. neoformans* utilizando os iniciadores CAP59R e CAP59F. 27
- Figura 8** – Gel em poliacrilamida 6% corado pela prata representativo da digestão dupla pelas enzimas de restrição *AvaI* e *HaeIII* do fragmento de 597pb do gene CAP59 de *C. neoformans*. 28
- Figura 9** – Gel em poliacrilamida 6% corado pela prata representativo do perfil de RAPD obtido com os iniciadores 3303 (A), 3304 (B) e M13 (C). 29
- Figura 10** – Dendrograma dos isolados e amostras padrões de *C. neoformans* baseado na análise dos coeficientes de similaridade de DICE através de UPGMA. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz dos coeficientes de similaridade de DICE dos isolados e amostras padrões de *C. neoformans* utilizando os iniciadores 3303, 3304 e M13 **29**

RESUMO

Cryptococcus neoformans é um fungo leveduriforme capsulado de distribuição cosmopolita causador da Criptococose. No meio ambiente o fungo é encontrado principalmente em excretas de aves. Através das diferenças encontradas na estrutura do polissacarídeo componente da cápsula são identificados cinco sorotipos dessa levedura (A, B, C, D e AD). A infecção humana ocorre através da inalação de propágulos de origem sexual presentes no ambiente. Considerando a prevalência do *C. neoformans* em excretas de aves, a presença de pombos em áreas urbanas é um fator de grande relevância em saúde pública para ocorrência da infecção. No presente trabalho, foram realizadas coletas de excretas de pombos em diferentes locais da região central de Florianópolis. O material coletado foi semeado em placas de Petri contendo meio Ágar Niger (*Guizotia abyssinica*) e cultivado a 30°C. As placas foram examinadas diariamente num intervalo de 15 dias. Colônias com características macroscópicas de *C. neoformans* foram transferidas para tubos de cultura contendo caldo CG e cultivadas a 37°C por 24 a 48 horas. A identificação das amostras isoladas foi realizada através observação microscópica em preparações a fresco coradas pela tinta da China e pela amplificação do fragmento do gene CAP59 através da PCR. Das 40 amostras de excreta de pombo coletadas foram isoladas quatro amostras do fungo. A amplificação do DNA das quatro amostras isoladas mostrou a presença do produto amplificado esperado de 597pb. A metodologia de PCR-RFLP utilizando as endonucleases de restrição *AvaI* e *HaeIII* foi utilizada para identificação do sorotipo e a metodologia de RAPD foi utilizada para estudo da variabilidade genética dos isolados. Todos os quatro isolados apresentaram o mesmo perfil de restrição do padrão sorotipo A. A caracterização das amostras agrupou os quatro isolados em três grupos geneticamente distintos. Estes resultados mostram que embora pertencentes ao mesmo sorotipo, através de RAPD foi possível observar uma grande variabilidade genética, com a formação de grupos distintos das amostras utilizadas como padrões dos sorotipos do fungo.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, amostras ambientais, variabilidade genética.

SUMARIO

1. Introdução	11
1.1. Aspectos gerais do organismo	11
1.2. Virulência e criptococose humana	14
1.3. Epidemiologia	17
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Metodologia	21
3.1. Coleta das amostras	21
3.2. Amostras padrões	21
3.3. Isolamento e conservação das amostras	21
3.4. Extração de DNA genômico	22
3.5. Amplificação do fragmento do gene CAP59	22
3.6. Identificação dos genótipos das amostras padrões e das amostras isoladas de <i>Cryptococcus neoformans</i> através da reação de PCR-RFLP	23
3.7. Amplificação de DNA das amostras através da técnica de RAPD	24
3.8. Análise e tratamento dos dados	24
4. Resultados	25
4.1. Isolamento de <i>Cryptococcus neoformans</i> a partir das excretas de pombo	25
4.2. Caracterização Morfológica dos Isolados	25
4.3. Caracterização molecular dos isolados através da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59	27
4.4. Identificação dos genótipos das amostras padrões e das amostras isoladas de <i>Cryptococcus neoformans</i> através da reação de PCR-RFLP	27
4.5. Avaliação da variabilidade genética de <i>C. neoformans</i> através	28

da técnica de RAPD

5. Discussão	31
6. Conclusões	35
7. Referências	36

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais do Organismo

Os estudos com *Cryptococcus neoformans* tiveram início em 1894, na Itália, quando Sanfelice registrou o primeiro isolado deste fungo a partir de suco de pêssigo, chamando-o de *Saccharomyces neoformans* (PASSONI, 1999). No mesmo ano, foi relatada uma infecção pela levedura em um paciente alemão, sendo a referida levedura chamada de *Saccharomyces hominis*. Entretanto, observações posteriores demonstraram a ausência dos ascóporos característicos do gênero *Saccharomyces*, sendo estas leveduras classificadas no gênero *Cryptococcus* (BOVERS *et al.*, 2008).

C. neoformans é o agente etiológico da criptococose e caracteriza-se como um fungo capsulado de distribuição cosmopolita (NISHIKAWA *et al.*, 2003). Apresenta-se na fase anamórfica (forma leveduriforme) quando em vida parasitária ou ambiental e na fase teleomórfica (forma filamentosa), em determinadas condições ambientais, passando a ser chamado *Filobasidiella neoformans* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; REY *et al.*, 2000). Na fase anamórfica, são leveduras haplóides que se reproduzem assexuadamente por brotamento, enquanto que na forma teleomórfica podem se reproduzir sexuadamente, correspondendo ao estado perfeito do fungo. Apresenta dois “tipos sexuais” ou “*mating-types*” (MAT α e MATa), os quais são complementares (LENGELER *et al.*, 2001 e OHKUSU *et al.*, 2002). O *locus mating-type* é a região do genoma fúngico que regula o ciclo sexual e pode ser diferente entre células de *mating-type* opostos. A reprodução sexuada pode então acontecer se células de *mating-types* opostos se encontrarem (Figura 1). A limitação de nutrientes é um importante fator para a ocorrência do cruzamento. Na ausência de nitrogênio as células MATa produzem o feromônio MFa e, em resposta a esse feromônio, as células MAT α formam um tubo de conjugação (CHANG *et al.*, 2000). Através da conjugação as células produzem hifas dicarióticas com grampos de conexão. As hifas produzem basídios terminais subglobosos ou clavados, onde ocorre cariogamia, meiose, mitose e, então a germinação dos

basidiósporos em leveduras (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992; SORREL & ELLIS, 1997; LENGELER *et al.*, 2001).

Cryptococcus neoformans pode também se reproduzir por frutificação haplóide, que ocorre em resposta à ausência de nitrogênio e/ou dissecação. Este tipo de reprodução é bastante semelhante ao “*mating*”, descrito no parágrafo anterior, entretanto, ocorre com cepas que apresentam o mesmo *mating-type*. Embora a frutificação haplóide tenha sido inicialmente descrita apenas para células MAT α (WICKES *et al.*, 1996), ela também pode ser observada em alguns isolados MAT α (TSCHARKE *et al.*, 2003).

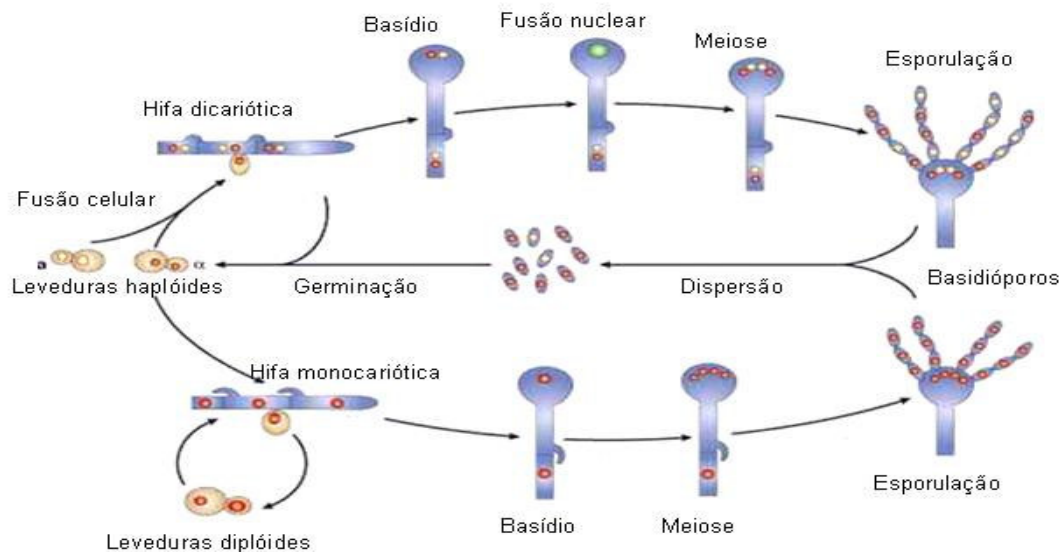


Figura 1 – Esquema do ciclo de vida de *Cryptococcus neoformans*. Acima, reprodução sexuada, abaixo, reprodução assexuada. Adaptado de IDNURM *et al.*, 2005.

A presença de cápsula é uma característica distinta para este microrganismo, uma estrutura dinâmica e elaborada que rodeia a parede celular e é única entre os fungos que infectam humanos, sendo portanto, considerada

um importante elemento para a sua identificação e também para a virulência nas infecções (DOERING, 2000). Aproximadamente 90% da cápsula é constituído pelos polissacarídeos glicuronoxilomanana, galactoxilomanana e mananoproteína (MITCHELL & PERFECT, 1995; CASADEVALL & PERFECT, 1998; CASALI *et al.*, 2001; NISHIKAWA *et al.*, 2003). O tamanho da cápsula é determinado pelo genótipo do fungo e pelas condições de crescimento oferecidas, sendo que as leveduras mostram pequenas cápsulas no ambiente e cápsulas espessas na fase parasitária (MITCHELL & PERFECT, 1995).

Atualmente são reconhecidos cinco sorotipos para este fungo (A, B, C, D e AD). A distinção entre os diferentes sorotipos é baseada na reação imunológica com anti-soro produzido contra diferentes epítomos do polissacarídeo que compõe a cápsula da levedura. Análises fenotípicas, epidemiológicas, ecológicas, fisiológicas e genéticas agruparam a espécie em três variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). O sorotipo AD foi classificado como um híbrido diplóide dos sorotipos A e D (NISHIKAWA *et al.*, 2003). Entretanto, estudos recentes mostraram que as diferenças genéticas entre as variedades são suficientes para classificá-las em duas espécies distintas: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG & VARMA, 2006).

Estas duas espécies diferem na epidemiologia e em seus nichos ecológicos (BOVERS *et al.*, 2008). *C. neoformans* (sorotipos A, D e AD) está mais intimamente relacionado com os casos de criptococose em indivíduos imunodeprimidos, enquanto que o *C. gattii* (sorotipos B e C) pode causar a doença em indivíduos imunocompetentes. O *C. neoformans* é freqüentemente isolado de excretas de aves, especialmente de pombos. Já o *C. gattii*, está fortemente associado a árvores do gênero *Eucalyptus* sp. e outras espécies vegetais em regiões de clima tropical e subtropical (LEVITZ, 1991; LAZERA *et al.*, 1998; PAPPALARDO & MELHEM, 2004).

1.2. Virulência e Criptococose Humana

C. neoformans é um fungo ambiental que tem a capacidade de infectar e causar doença em hospedeiros mamíferos (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Embora atue como patógeno humano, é provável que este seja um encontro que acontece acidentalmente, não sendo o homem seu nicho primário (BOVERS *et al.*, 2008). O fato de pessoas sem sintomas clínicos de criptococose apresentarem anticorpos contra *C. neoformans*, demonstra que humanos freqüentemente entram em contato com o fungo (CHEN *et al.*, 1999).

A infecção pulmonar inicia-se com a inalação de partículas infecciosas, provavelmente basidiósporos ou células leveduriformes dessecadas presentes no ambiente, que apresentam tamanho suficientemente pequeno para a penetração no interior dos alvéolos (CASADEVALL & PERFECT, 1998) (Figura 2). Entretanto, Sukroongreung e colaboradores (1998), demonstraram que em modelo murino, a inalação de basidiósporos pode ser mais eficiente do que a inalação de células leveduriformes no estabelecimento da infecção.

Depois de atingir o trato respiratório, o fungo pode inicialmente causar uma infecção sintomática ou assintomática na área subpleural dos pulmões, ser erradicada ou ainda permanecer em estado latente no interior de um granuloma, dependendo de fatores do hospedeiro (CASADEVALL & PERFECT, 1998; MITCHELL & PERFECT, 1995; KAWAKAMI, 2004).

A patogenia causada pela infecção de *C. neoformans* está relacionada com a disfunção da imunidade inata do hospedeiro (KAWAKAMI, 2004). A criptococose em pacientes imunocompetentes é usualmente limitada, ou seja, os mecanismos de defesa do hospedeiro podem eliminar ou limitar a infecção a um quadro de pneumonia severa. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos a infecção não é limitada ao primeiro sítio, podendo se disseminar através da corrente sangüínea para outros órgãos e tecidos, preferencialmente para o sistema nervoso central (SNC), onde está associada a quadros de meningite, meningoencefalite ou encefalite, com altas taxas de letalidade (ELLIS *et al.*, 2000; KAWAKAMI, 2004).

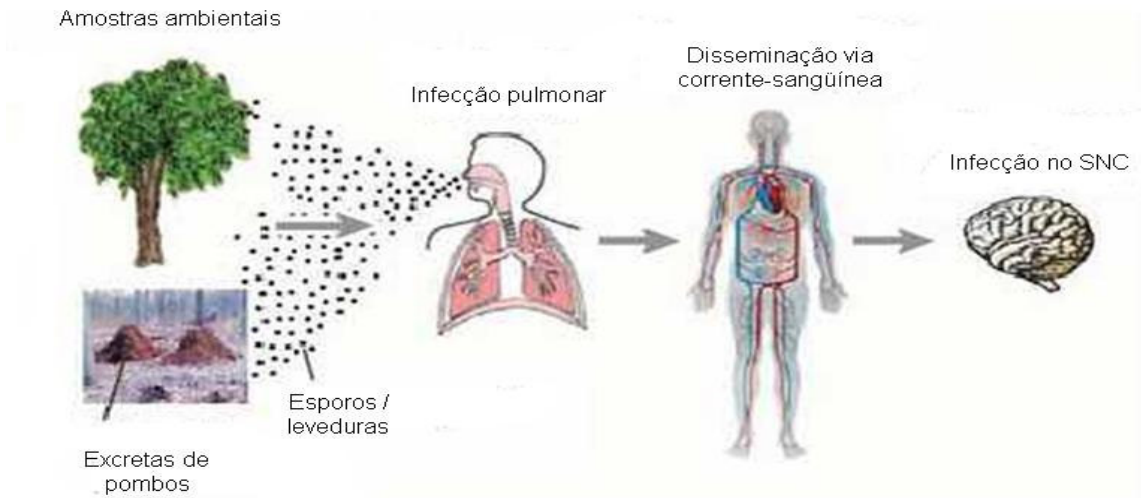


Figura 2 – Ciclo de infecção do *Cryptococcus neoformans*. Adaptado de LIN & HEITMAN, 2006.

C. neoformans possui várias características que lhe permitem sobreviver em vida parasitária. Dentre elas podemos destacar a capacidade de crescer a 37°C, a produção de uma cápsula polissacarídica com atividade antifagocítica, a expressão de lacase, urease e fosfolipase e a produção de manitol (COX *et al.*, 2001). A importância relativa de cada uma destas características ainda não pode ser plenamente compreendida. Entretanto, a presença da cápsula e a expressão de lacase são consideradas os principais fatores de virulência (WATERMAN *et al.*, 2007).

Uma das características das células de *C. neoformans* é a grande variação no tamanho da cápsula dependendo das condições do ambiente onde o fungo se encontra (ZARAGOZA & CASADEVALL, 2004) (Figura 3). O tamanho da cápsula aumenta consideravelmente no organismo do hospedeiro, enquanto que no ambiente e durante o cultivo *in vitro*, seu tamanho é geralmente pequeno, podendo ser aumentado por altas concentrações de CO₂ e baixas taxas de ferro (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 2004). O aumento no tamanho da cápsula é perceptível após algumas horas de infecção e apresenta diferenças

dependendo do órgão onde o fungo está localizado, sendo encontradas cápsulas mais espessas no pulmão e mais reduzidas no cérebro (RIVERA *et al.*, 1998).

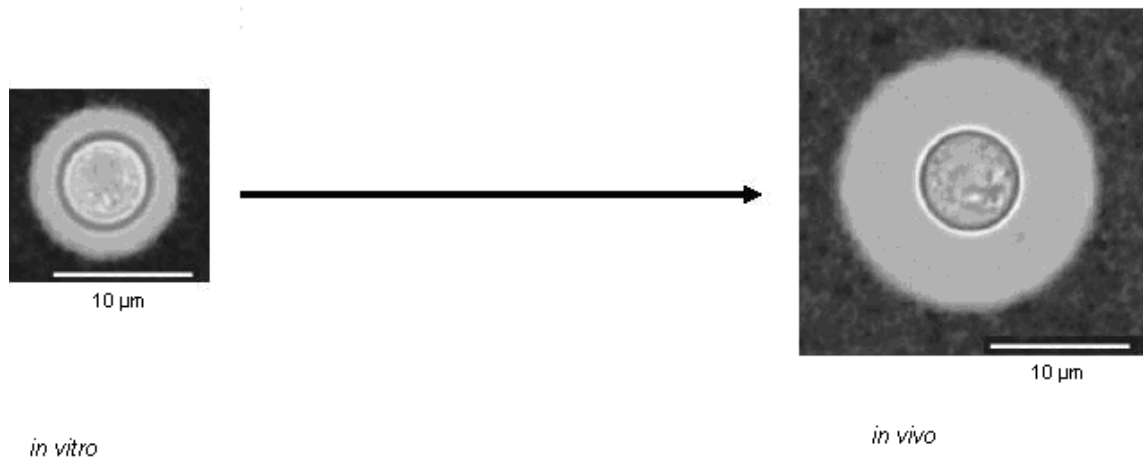


Figura 3 – Comparação do tamanho da cápsula de *Cryptococcus neoformans* nas condições *in vitro* e *in vivo*. Adaptado de ZARAGOZA & CASADEVALL, 2004.

Vários genes, como CAP10, CAP59, CAP60, CAP64, MAN1, CAS1 e UXS1, participam na biossíntese da cápsula, em particular, os genes CAP têm sido reportados como essenciais na síntese desta estrutura (OKABAYASHI *et al.*, 2005).

A influência da cápsula na fisiopatologia da infecção tem sido estudada por diversos autores, e é historicamente relacionada com função anti-fagocítica (JANBON, 2004). Evidências indicam que a cápsula seja um fator chave na virulência de *C. neoformans*. Chang & Know-Chung (1994) demonstraram que quando os genes necessários para a biossíntese da cápsula são deletados, as leveduras acapsuladas são avirulentas enquanto que isolados capsulados apresentam diferentes graus de virulência no modelo murino.

Apesar de o pulmão ser a porta de entrada do patógeno no organismo, a pneumonia raramente manifesta sinais clínicos, sendo a meningoencefalite a forma clínica mais comum da doença. No espaço alveolar, os macrófagos fazem

a linha primária de defesa. A alta prevalência de propágulos infectantes no ambiente e a baixa frequência de pessoas imunocompetentes que desenvolvem a doença se deve à eficiência da imunidade celular (MITCHELL & PERFECT, 1995). Por outro lado, o microrganismo utiliza estratégias que permitem sua sobrevivência no interior de macrófagos, o que provavelmente contribui para os casos de infecções crônicas e latentes. Infecções experimentais em ratos com *C. neoformans* demonstraram que o fungo pode sobreviver por um longo tempo no interior do granuloma (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 1999). As leveduras podem permanecer dormentes e ser reativadas por um evento imunocomprometedor (ABEGG, 2003).

A enzima lacase é um fator de virulência que tem sido investigado em diferentes estudos (ZHU & WILLIAMSON, 2004; WATERMAN *et al.*, 2007). Algumas evidências sugerem que a atividade da lacase como ferro oxidase pode proteger o *C. neoformans* através da oxidação de ferro (Fe^{+2}) a (Fe^{+3}) no interior do fagossomo e conseqüentemente diminuir a formação do radical hidroxila. Além disso, acredita-se que a lacase contribua para a virulência através da produção de melanina, com resultante aumento na disseminação do patógeno para o cérebro (LIU *et al.*, 1999). O neurotropismo da levedura, além de possibilitar a evasão ao sistema imune do hospedeiro, pode ser explicado pela grande quantidade de catecolamina existente no SNC, que serve de substrato para esta fenoloxidase e a melanina sintetizada protege o fungo da atividade oxidante do SNC (MITCHELL & PERFECT, 1995).

1.3. Epidemiologia

A criptococose é uma infecção oportunista que ocorre sobretudo em doentes com imunodeficiência celular. Sua incidência aumentou drasticamente com o advento da AIDS em 1980 e, em nível mundial, tem-se convertido na infecção fúngica letal mais comum nos pacientes HIV positivos, sendo em muitos casos a primeira indicação da síndrome (OSUNA *et al.*, 2008).

A criptococose ocorre em 6 a 10% dos pacientes com AIDS nos Estados

Unidos, Europa, Austrália e América do Sul, enquanto que 15 a 35% desses pacientes são acometidos pela criptococose no continente africano (MITCHEL & PERFECT, 1995). No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, no período entre 1980 e 2002, 6% das infecções oportunistas associadas à Aids foram causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* (MINISTÉRIO DA SAUDE DO BRASIL, 2002).

Na população mundial, o sorotipo A é mais comumente isolado, sendo observado em até 90% dos casos, seguido pelos sorotipos B e AD (MEYER *et al.*, 2003; LITVINTSEVA *et al.*, 2005). Os sorotipos D e C são raramente relatados, exceto em alguns países europeus, algumas áreas dos Estados Unidos (Califórnia e Nova Iorque) e Ásia (LITVINTSEVA *et al.*, 2005), e são considerados menos patogênicos (MITCHELL & PERFECT, 1995; CASADEVALL & PERFECT, 1998).

No Brasil, em um estudo conduzido no Estado do Rio Grande do Sul em 2003, foi observada a presença de *C. neoformans* sorotipo D em eucaliptos daquele Estado. Contrariamente, nos isolados clínicos, a variedade encontrada nos diferentes pacientes foi o sorotipo A (CASALI *et al.*, 2003). Ainda no Brasil, a caracterização de isolados de *Cryptococcus* de eucaliptos e outras espécies de vegetais na região norte, sudeste e nordeste mostrou a presença do sorotipo A para as duas primeiras regiões e o sorotipo B para o nordeste (NISHIKAWA *et al.*, 2003). Estes resultados mostraram uma elevada correlação entre os sorotipos isolados de humanos e ambientais nas regiões norte e nordeste.

No Paraná, um estudo comparando *C. neoformans* isolados de excretas de Passeriformes e Psittaciformes com amostras clínicas, revelou a prevalência do sorotipo A. Dentre os isolados ambientais, todos apresentaram este sorotipo, enquanto que nas amostras clínicas apenas uma apresentou sorotipagem diferente, sendo classificada como *C. gattii*. Estes resultados reforçam o papel destas aves como reservatórios de *C. neoformans* no ambiente (LUGARINI, 2006).

No Estado de Santa Catarina, um estudo recente realizado com 35 amostras isoladas de pacientes HIV positivos da grande Florianópolis utilizando

a técnica de PCR-RFLP mostrou que todas as amostras foram classificadas como sorotipo A de *C. neoformans* var. *grubii* (DAMBRÓS, 2005). A análise da variabilidade genética destas amostras através de PCR *fingerprinting* e RAPD revelou uma baixa heterogeneidade genética. Desta forma, a realização de um estudo utilizando amostras ambientais além de isolados humanos proporcionará informações fundamentais para a compreensão do perfil epidemiológico de *C. neoformans* em Santa Catarina e permitirá traçar a relação entre os isolados clínicos e ambientais.

Considerando a prevalência do *C. neoformans* em excretas de aves, a presença de pombos em áreas urbanas e a severidade da criptococose em seres humanos, estudos de correlação entre a presença de aves, suas excretas e a criptococose humana são de grande relevância para a saúde pública.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as características genótípicas de *C. neoformans* isolados a partir de amostras ambientais coletadas na Cidade de Florianópolis.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar *C. neoformans* a partir de amostras de fezes de pombos coletadas na região central de Florianópolis/SC;
- Amplificar, via PCR, um fragmento do gene CAP59 das amostras de *C. neoformans* isoladas;
- Determinar os genótipos das amostras isoladas através da análise do perfil de restrição (RFLP) de produtos de amplificação do fragmento do gene CAP59;
- Avaliar a variabilidade genética das cepas de *C. neoformans* através da técnica de RAPD.

3. Metodologia

3.1. Coleta das Amostras

As coletas foram realizadas em prédios públicos na região central de Florianópolis em locais onde é comum a presença de pombos (Largo da Alfândega, Mercado Público, Praça XV de Novembro, Museu Cruz e Souza, Catedral Metropolitana e Igreja de São Francisco). Entre os meses de fevereiro/2008 e setembro/2008 foram realizadas 32 coletas, atingindo-se um total de 40 amostras diferentes. Com o auxílio de uma espátula, as fezes foram raspadas dos locais que abrigavam as aves ou do solo da Praça XV, armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados e trazidas ao laboratório de Protozoologia da UFSC onde foram processadas para realização do isolamento do fungo.

3.2. Amostras padrões:

Como controles positivos foram utilizadas cepas de referência de *C. neoformans* sorotipos: A (ATCC-LMM794), D (ATCC-LMM797) e AD (ATCC-LMM796) e *C. gatti* sorotipos: B (ATCC-LMM799) e C (ATCC-LMM801), cedidas pelo Laboratório de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia da UFSC.

3.3. Isolamento e Conservação das Amostras

A metodologia utilizada para o isolamento do fungo foi uma adaptação daquela descrita por Casali e colaboradores (2003). Aproximadamente 1g de fezes de pombo foram suspendidas em 10ml de solução salina (0,9%) contendo cloranfenicol e ampicilina na concentração de 0,2 g/l. Após agitação em vortex por 5 minutos, o material foi decantado espontaneamente durante 30 minutos. A seguir, 0,1ml do sobrenadante foram semeados em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose e Ágar Niger, ambos suplementados com 0,2g/l de cloranfenicol. As placas foram cultivadas invertidas a 34°C e examinadas em

intervalos de 15 dias. Colônias creme ou bege em Ágar Sabouraud ou marrom em Ágar Niger foram selecionadas e examinadas ao microscópio, sendo coradas com tinta da China. As amostras que apresentaram características microscópicas de *C. neoformans* foram transferidas para tubos de cultura contendo caldo CG (Circle Grow medium-USB®) e cultivadas a 37°C por 24 a 48 horas sob agitação até atingir a densidade óptica (D.O.) de 2,0. Após esse tempo, 1ml de cultura foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5ml e centrifugado a 5.000xg por 10 minutos. Após a retirada do sobrenadante os tubos contendo o sedimento celular foram mantidos a -20°C até o seu uso. O restante da cultura foi criopreservado a -80°C em caldo CG contendo 30% de glicerol.

3.4. Extração de DNA genômico

O DNA genômico de *C. neoformans* foi extraído conforme descrito por Dambrós (2005). O sedimento obtido no item anterior foi incubado a 30°C por 12 horas com 500µl de tampão para lise celular (Tris-HCl 50mM pH 7,5 / EDTA 10mM pH 8,0 / 2-Mercaptoetanol 1% e Liticase 1%). A seguir, a amostra foi fervida por 30 minutos com 200µl de tampão contendo Triton X-100 2% e SDS 1%, e 200µl de pérolas de vidro (0,45mm de diâmetro). Após a lise das amostras, foram adicionados 500µl de fenol-clorofórmio (v/v) e a amostra foi misturada vigorosamente em vortex por 5 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 13.000xg por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e submetida a uma nova extração com igual volume de clorofórmio e o DNA precipitado em isopropanol 100% v/v e lavado uma vez com etanol 70%.

A quantificação e o grau de pureza das amostras do DNA foi determinado em espectrofotômetro (260/280nm). Após a quantificação, as amostras de DNA foram aliqüotadas e armazenadas à - 20°C até o seu uso.

3.5. Amplificação do fragmento do gene CAP59

A amplificação do fragmento do gene CAP59 foi realizada conforme descrito por NAKAMURA e colaboradores (2000). Em cada tubo de reação o

volume final foi de 20µl, utilizando-se 1U da enzima Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia®), 2mM de cada dNTP, 10pmol de cada iniciador (CAP59F 5'-GAG TGT CTC CGC AAC CCG CA-3' e CAP59R 5'-CCT ACT CTG CCA AAT CAA CTC-3') e 10ng de DNA molde ou 3µl diretamente de cultura sem extração prévia de DNA. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler®, obedecendo os seguintes parâmetros de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, ligação do iniciador a 60°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 3 minutos seguido de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para observação do produto amplificado 3µl da amostra amplificada foram adicionados de 3µl de tampão de amostra 2x (0,08% de azul de bromofenol, 0,08% de xilenocianol e 10% de glicerol) e submetidos à eletroforese em gel em gel de Agarose 1,5% a 120V por 2 horas. Os géis foram corados pelo brometo de etídio e os resultados documentados em sistema de fotodocumentação digital.

3.6. Identificação dos genótipos das amostras padrões e das amostras isoladas de *Cryptococcus neoformans* através da reação de PCR-RFLP

O produto amplificado do gene CAP 59 foi precipitado através da adição de 10µl isopropanol e suspenso em 20µl de água ultrapura. A digestão enzimática foi realizada a 37°C por três horas utilizando 5µl do produto amplificado (conforme descrito no item 3.5), 1 U das enzimas de restrição *Avall* e *HaeIII* e 3µl do respectivo tampão em um volume final de 20µl. Para visualização dos fragmentos gerados, 3µl da amostra amplificada foram adicionados de 3µl de tampão de amostra 2x (0,08% de azul de bromofenol, 0,08% de xilenocianol e 10% de ficoll) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% a 100V por 2 horas. Os géis foram corados pela prata e os resultados documentados em sistema de fotodocumentação digital.

3.7. Amplificação de DNA das amostras através da técnica de RAPD.

Para a amplificação do DNA genômico das amostras através da técnica de RAPD foi utilizada a metodologia descrita por Steindel e colaboradores (1993). As reações foram preparadas em um volume de 20µl utilizando-se 1,5U da enzima Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTP, 10pmol de um dos iniciadores (3303 5'- TCA CGA TGC A- 3', 3304 5'- GCA CTG TCA- 3', M13 5'- GAG GGT GGC GGT TCT- 3') e 1ng de DNA molde em tampão contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 50mM KCl e 1,5mM MgCl₂. Para amplificação as amostras foram submetidas às seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 2 ciclos de ligação do iniciador a 30°C por 2 minutos e 1 minuto de extensão a 72°C, seguido de 33 ciclos a 94°C por 1 minuto, ligação do iniciador a 40°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A eletroforese e a visualização dos resultados foram realizadas conforme descrito no item 3.6.

3.8. Determinação dos coeficientes de similaridade das amostras estudadas.

As amostras foram analisadas duas a duas, para determinação do percentual de bandas compartilhadas entre elas e calculado o coeficiente de similaridade de Dice ($S=2a/2a+b+c$), onde a = o número de bandas compartilhadas entre as amostras 1 e 2; b = o número de bandas exclusivas da amostra 1 e c = número de bandas exclusivas da amostra 2. Os dados derivados desta fórmula foram inseridos em uma matriz de similaridade que foi então utilizada para análise das amostras através de UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis). A linha de feion marcada no UPGMA representa a média das similaridades entre os pares e indica o ponto de referência para divisão dos organismos em grupos separados (SNEATH & SOKAL, 1962).

4. Resultados

4.1. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir das excretas de pombo

De um total de quarenta amostras de excreta de pombo coletadas, o isolamento do fungo foi possível em quatro (10%) delas sendo que três amostras foram provenientes das coletas realizadas na torre da Catedral Metropolitana (as mesmas foram nomeadas como CAT1, CAT2 e CAT3) e uma na torre da Igreja São Francisco (nomeada como ISF). Nas demais amostras em que houve crescimento em nenhuma delas foi observado a morfologia colonial e ou microscópica compatível com *Cryptococcus*.

4.2. Caracterização Morfológica dos Isolados

Todos os isolados eram compostos por leveduras globulosas (figura 4), pouco encapsuladas (figura 5), positivas quanto à capacidade de produção melanina em meio Ágar Níger (figura 6) e termotolerantes a 37°C.

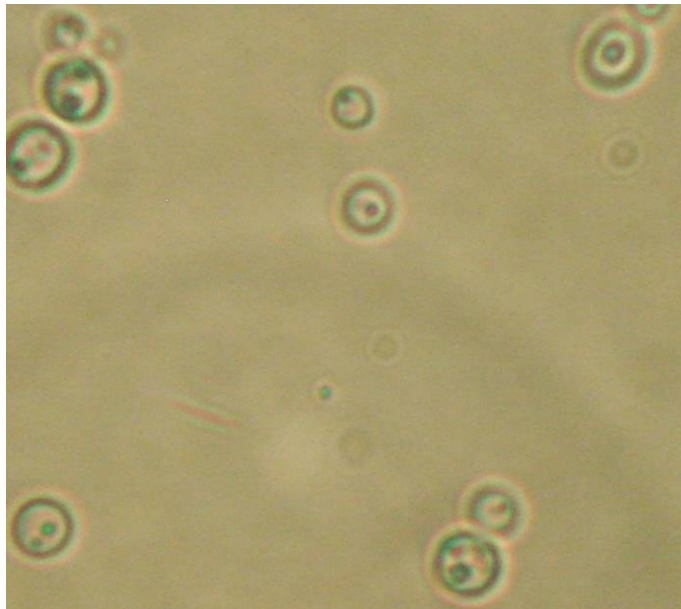


Figura 4 – Micromorfologia de *Cryptococcus neoformans* isolado a partir de excretas de pombo coletadas na torre da Catedral Metropolitana de Florianópolis (aumento de 400x).

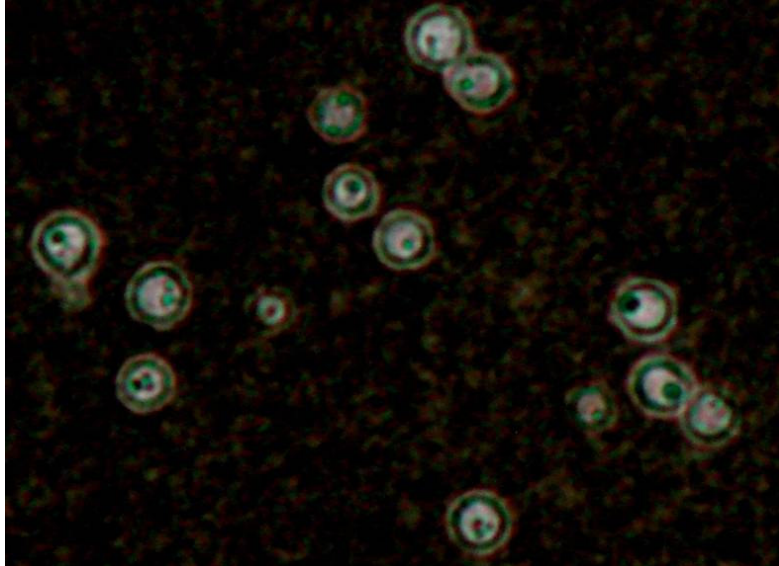


Figura 5 – Cultura de *Cryptococcus neoformans* isolada no presente estudo corada com tinta da China evidenciando a cápsula polissacarídica da levedura (aumento de 400x).

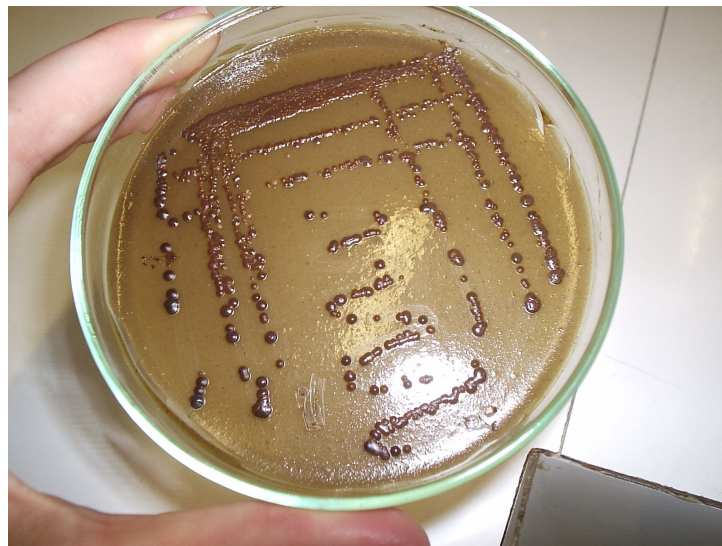


Figura 6 – Morfologia das colônias de *Cryptococcus neoformans* em Ágar Niger demonstrando a produção de melanina pelos isolados.

4.3. Caracterização molecular dos isolados através da reação de amplificação do fragmento do gene CAP59

As amostras isoladas quando submetidas à amplificação do fragmento do gene CAP59 a partir de leveduras obtidas diretamente da cultura apresentaram um produto de amplificação esperado de 597pb (Figura 7).

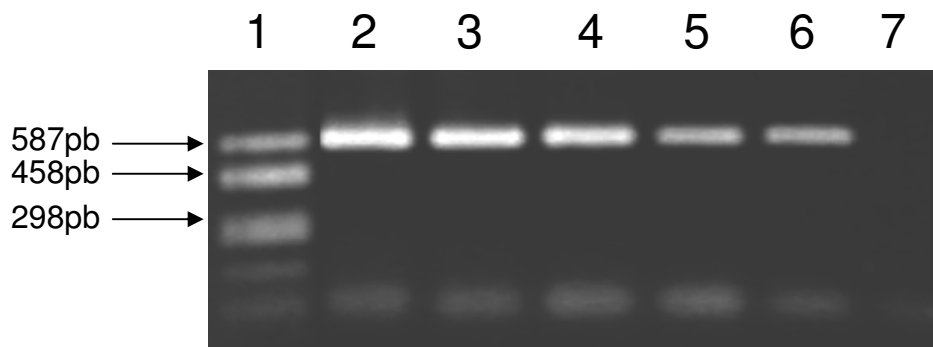


Figura 7 – Gel em Ágarose 1,5% corado pelo brometo de etídeo representativo dos produtos de amplificação do gene CAP59 dos isolados ambientais de *C. neoformans* utilizando os iniciadores CAP59R e CAP59F. 1- Padrão de peso molecular (DNA de puC18 clivado com endonuclease *HaeIII*); 2- controle positivo (sorotipo AD ATCC – LMM796); 3- isolado CAT1; 4- isolado CAT2; 5- isolado CAT3; 6- isolado ISF; 7- controle negativo (sem adição de DNA).

4.4. Identificação dos genótipos das amostras padrões e das amostras isoladas de *Cryptococcus neoformans* através da reação de PCR-RFLP

Após a amplificação pela reação em cadeia da polimerase, o DNA das 4 amostras isoladas de *C. neoformans* isoladas foi submetido à técnica de RFLP utilizando-se as enzimas de restrição *Avall* e *HaeIII* conforme descrito no item 3.6. Os resultados mostraram que os isolados apresentam o mesmo perfil de restrição do padrão do sorotipo A (Figura 8).

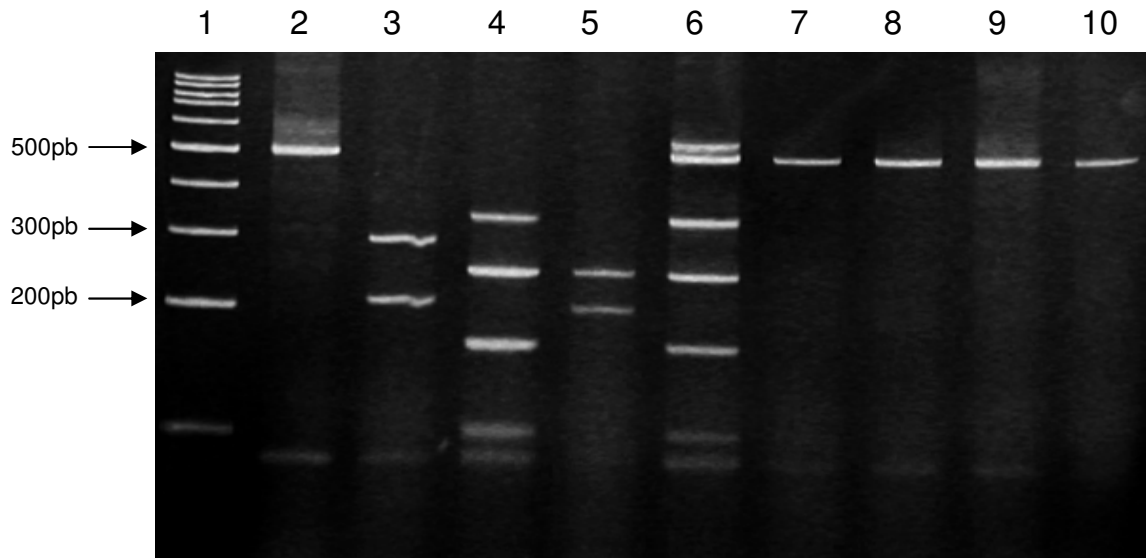


Figura 8 – Gel em poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata representativo da digestão dupla pelas enzimas de restrição *Avall* e *HaeIII* do fragmento de 597pb do gene *CAP59* de *Cryptococcus neoformans*. 1- Padrão de peso molecular (100pb ladder); 2- amostra padrão sorotipo A; 3- amostra padrão sorotipo B; 4- amostra padrão sorotipo C; 5- amostra padrão sorotipo D; 6- amostra padrão sorotipo AD; 7- isolado CAT1; 8- isolado CAT2; 9- isolado CAT3; 10- isolado ISF.

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

No sentido de investigar a variabilidade genética das amostras isoladas em comparação com os padrões de 4 sorotipos (A, C, AD e AD) foram utilizados os iniciadores 3303, 3304 e M13. Como pode ser visualizado nas figuras 9A (iniciador 3303), 9B (iniciador 3304) e 9C (iniciador M13) cada um desses iniciadores mostrou um perfil de bandas distinto.

O perfil das amostras padrões foi bastante semelhante para todos os iniciadores, ao contrário dos isolados, que exibiram grande variabilidade entre si e foram bastante distintos dos padrões frente a todos os iniciadores testados.

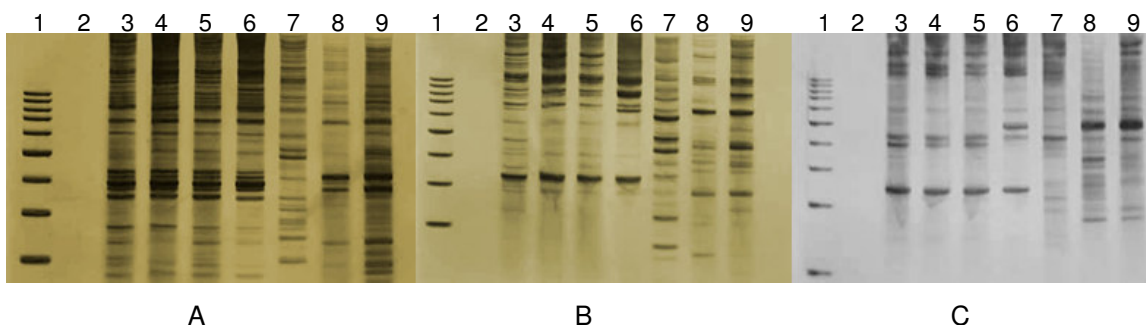


Figura 9 – Gel em poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata representativo do perfil de RAPD obtido com os iniciadores 3303 (A), 3304 (B) e M13 (C). 1- padrão de peso molecular (100pb ladder); 2- controle negativo (sem adição de DNA); 3- amostra padrão sorotipo A; 4- amostra padrão sorotipo C; 5- amostra padrão sorotipo D; 6- amostra padrão sorotipo AD; 7- isolado CAT2; 8- isolado CAT3; 9- isolado ISF.

Os perfis de bandas dos isolados e amostras padrões gerados pelos iniciadores 3303, 3304 e M13 foram utilizados para a análise de compartilhamento de bandas, para tanto, foram consideradas bandas numa faixa aproximadamente entre 170pb e 1500pb. A matriz dos coeficientes de similaridade de DICE está mostrada na tabela 1. O dendograma correspondente obtido por UPGMA está mostrado na figura 10. Estes resultados mostram que os padrões e os isolados pertencem a três grupos distintos.

	A	C	D	AD	CAT2	CAT3	ISF
A	X	0,903	0,950	0,918	0,533	0,464	0,603
C		X	0,949	0,949	0,551	0,407	0,590
D			X	0,965	0,526	0,452	0,600
AD				X	0,526	0,452	0,600
CAT2					X	0,307	0,474
CAT3						X	0,654
ISF							X

Tabela 1 – Matriz dos coeficientes de similaridade de DICE dos isolados e amostras padrões de *C. neoformans* utilizando os iniciadores 3303, 3304 e M13. A = amostra padrão sorotipo A; C = amostra padrão sorotipo C; D = amostra padrão sorotipo D; AD = amostra padrão sorotipo AD; CAT2 = isolado II da Catedral; CAT3 = isolado III da Catedral; ISF = isolado da Igreja São Francisco.

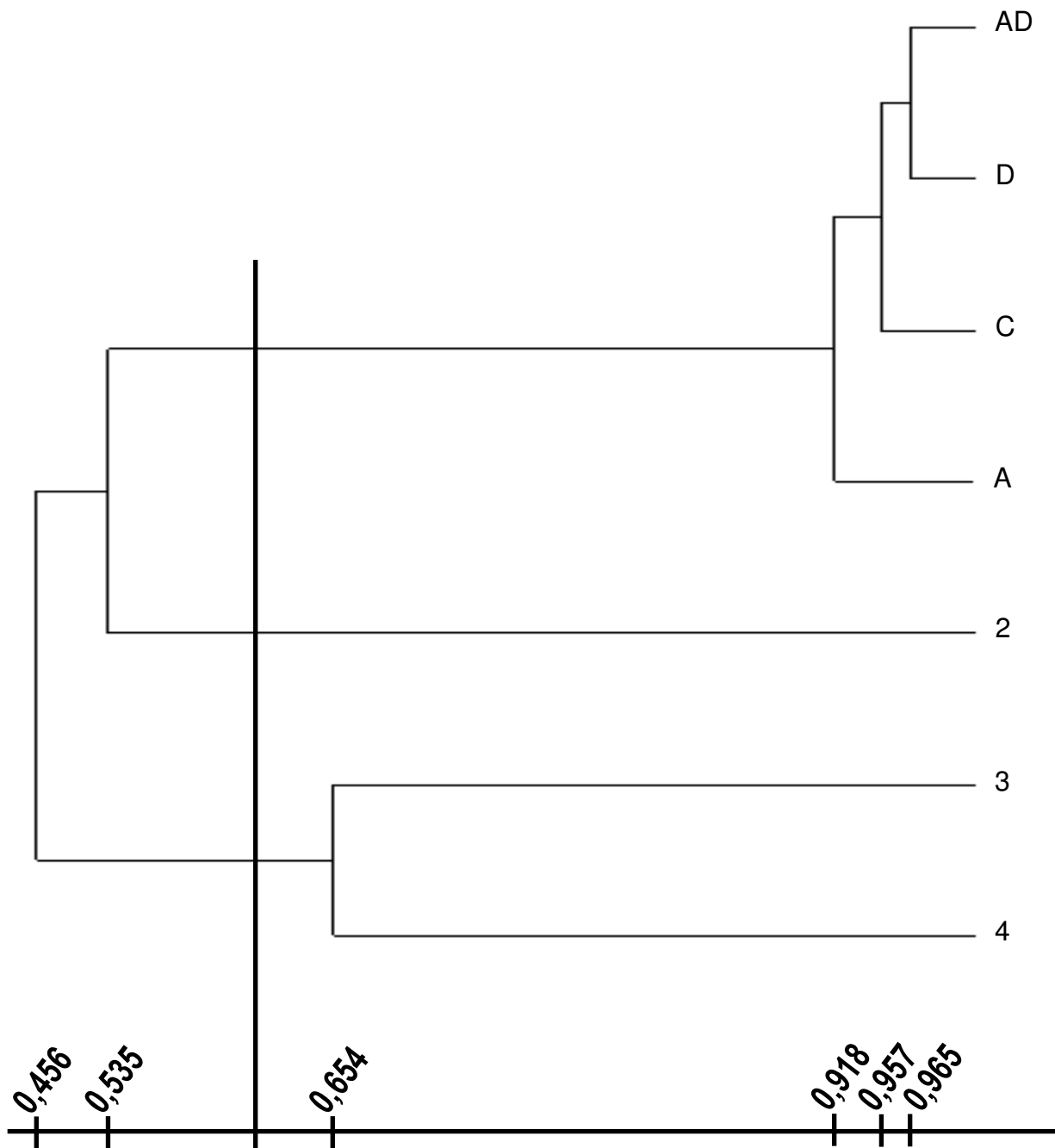


Figura 10 – Dendrograma dos isolados e amostras padrões de *Cryptococcus neoformans* baseado na análise dos coeficientes de similaridade de DICE através de UPGMA. O coeficiente de similaridade mostrado na escala foi obtido pelo cálculo do índice de DICE. A linha vertical representa a linha de fenon. A = amostra padrão sorotipo A; C = amostra padrão sorotipo C; D = amostra padrão sorotipo D; AD = amostra padrão sorotipo AD; 2 = isolado CAT2; 3 = isolado CAT3; 4 = isolado ISF.

5. Discussão

A associação entre *C. neoformans* e algumas espécies de aves, principalmente pombos, tem sido freqüentemente relatada, e seus excrementos são considerados o substrato natural mais importante para o fungo (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Entretanto, a ocorrência de criptococose em aves é raramente descrita, provavelmente, devido à alta temperatura corpórea das mesmas, em torno de 42 °C (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Apesar disso, as leveduras podem sobreviver à passagem pelo trato intestinal e permanecer em seus excretas durante muito tempo quando protegidas do sol (DENTON & DI SALVO, 1968).

A exposição humana ao *C. neoformans* é bastante comum e ocorre principalmente em locais onde a presença de pombos seja constante, como, centros históricos, igrejas, praças, jardins zoológicos e parques (PASSONI *et al.*, 1998). Nesse contexto, considerando a alta incidência de pombos na região central de Florianópolis, o presente estudo visou à avaliação da presença de *C. neoformans* em amostras ambientais coletadas na referida região, bem como a avaliação da variabilidade genética encontrada nos isolados.

A porcentagem de amostras positivas para *C. neoformans* (10,0%) neste estudo foi baixa quando comparada com estudos semelhantes realizados em outras cidades do Brasil. Na cidade de Goiânia, Kobayashi e colaboradores (2005), encontraram uma freqüência de 23,2%. Soares e colaboradores (2006), em estudo realizado na cidade de Santos, observaram uma freqüência de 13,9% das amostras de excretas de pombos positivas para *C. neoformans*. Nas torres das igrejas do Rio de Janeiro, o *C. neoformans* foi encontrado em 37,8% das amostras de excretas de aves coletadas (BARONI *et al.*, 2006).

A baixa taxa de isolamento do fungo no presente estudo, provavelmente deve-se ao pequeno número de amostras coletadas e também ao fato de que a maioria dos locais de coleta apresentava algum grau de exposição as condições meteorológicas. As quatro amostras positivas para *C. neoformans* encontradas neste estudo foram coletadas em áreas protegidas na torre da Catedral

Metropolitana e da Igreja São Francisco. Estudos realizados por Kobayashi *et al.*, (2005) demonstraram que a presença do fungo em amostras ambientais é maior quando as mesmas encontram-se protegidas das condições meteorológicas. Além disso, em alguns pontos de coleta, grande parte das amostras foi de excretas frescas, o que pode ter contribuído para falhas no isolamento do fungo. Excrementos úmidos sofrem maior decomposição por bactérias, causando uma forte alcalinização do substrato e conseqüente inibição do crescimento de *C. neoformans*. Por outro lado, excretas secas são um substrato bastante favorável devido à baixa presença de bactérias viáveis e menor competição (GRANADOS & CASTAÑEDA, 2005). Segundo Mitchell & Perfect, (1995), excretas secas e mais antigas são fontes mais prováveis para o isolamento de *C. neoformans*. Os isolados encontrados no presente estudo eram todos provenientes de amostras desidratadas, que provavelmente estavam nos locais de coleta há um tempo considerável.

Além das colônias de *C. neoformans*, uma grande variedade de outros fungos filamentosos e leveduriformes, que não foram identificados, cresceram nas placas de Ágar Niger utilizadas para o isolamento. A presença ou ausência de organismos competidores, principalmente fungos filamentosos que apresentam rápido crescimento, pode ser um importante fator limitante para o crescimento de *C. neoformans* (GRANADOS & CASTAÑEDA, 2005; LUGARINI *et al.*, 2008).

C. neoformans quando cultivado em meios contendo compostos difenólicos é capaz de sintetizar melanina através da enzima lacase (fenoloxidase) associada a sua membrana celular (CASADEVALL, 2001). Cabe ressaltar que as quatro amostras isoladas neste trabalho apresentaram colônias de coloração marrom escuro quando cultivadas em meio Ágar Niger (Figura 4). A capacidade de produção de melanina é bastante associada ao tropismo deste patógeno pelo sistema nervoso central, onde a grande quantidade de catecolamina serve de substrato para a fenoloxidase (MITCHELL & PERFECT, 1995).

A capacidade de crescer em temperatura corpórea humana é outra

característica importante deste microrganismo e muito contribui para a sua patogenia (CASADEVALL e PERFECT, 1998). Os quatro isolados obtidos neste trabalho foram termotolerantes à temperatura de 37°C. Além disso, as leveduras apresentaram cápsulas não muito desenvolvidas (figura 5), o que é bastante comum em amostras ambientais (ZARAGOZA & CASADEVALL, 2004).

Análises no genoma de *C. neoformans* identificaram mais de 30 genes provavelmente envolvidos na biossíntese da cápsula polissacarídica (LOFTUS *et al.*, 2005). Dentre eles, os genes CAP foram os primeiros descritos como participantes na produção da cápsula. Cada um deles (CAP10, CAP59, CAP60, CAP64) é individualmente necessário para sintetizar a GXM. Entretanto, suas exatas funções ainda são desconhecidas (OKABAYASHI *et al.*, 2007). No presente estudo foram utilizados os iniciadores CAP59F e CAP59R desenhados a partir da seqüência do gene CAP59 para a identificação das amostras isoladas através da técnica da PCR, que permitem a amplificação de um fragmento de 597pb, o qual contém 30% da seqüência codificante do exon mais longo do gene (NAKAMURA *et al.*, 2000). Todas as quatro amostras isoladas quando submetidas a este ensaio apresentaram a banda esperada de 597pb.

Com o advento da biologia molecular, muitas técnicas têm sido utilizadas para analisar o genótipo de polimorfismos de organismos. Estas técnicas incluem RAPD, RFLP e AFLP (CAVALCANTE *et al.*, 2007). No presente estudo, a metodologia de PCR-RFLP foi utilizada na tipificação das quatro amostras isoladas. Dambrós (2005) testou um painel de enzimas de restrição para clivar o fragmento amplificado de 597pb do gene CAP59. Os resultados obtidos mostraram que a digestão combinada das endonucleases *Avall* e *HaeIII* gerou um perfil de restrição próprio para cada sorotipo de *C. neoformans*. No presente estudo, as amostras isoladas quando submetidas à restrição por essas duas enzimas, apresentaram o mesmo perfil de restrição da amostra padrão sorotipo A. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, que demonstram que o sorotipo A é o mais prevalente em isolados ambientais e também em amostras clínicas, tanto no Brasil quanto em outras regiões do mundo (CASALI *et al.*, 2003). Estudos utilizando metodologias semelhantes e realizados em

diferentes cidades do Brasil também encontraram o sorotipo A como o mais abundante entre as amostras isoladas a partir de excretas de pombo (SOARES *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005; BARONI *et al.*, 2006).

Diferentemente dos resultados gerados pela técnica de RFLP, onde todos os isolados apresentaram perfis homogêneos e idênticos ao padrão do sorotipo A, sugerindo que estes isolados pertencem a este grupo, os ensaios de RAPD mostraram perfis de bandas bastante heterogêneos entre os isolados. A análise dos coeficientes de similaridade de DICE e o dendograma correspondente obtido por UPGMA agruparam as amostras analisadas em três grupos distintos. As 4 amostras padrões sorotipo A, C, D, e AD ficaram agrupadas em um *cluster* com elevada similaridade ($>0,91$), enquanto que as três amostras ambientais formaram 2 grupos distintos com similaridade de 0,65 (isolados CAT3 e ISF) e um grupo a parte representado pelo isolado CAT2.

A avaliação de divergências baseadas em um único marcador (gene CAP59) em geral reflete apenas a variabilidade do marcador e não a variabilidade genética entre os organismos. O perfil de RAPD compara bandas de DNA amplificadas de forma aleatória no genoma do organismo e, portanto, pode refletir diferenças inter e intraespecíficas. Este marcador tem sido utilizado em estudos de variabilidade genética de inúmeros organismos incluindo bactérias e linhagens de camundongos (WELSH & McCLELLAND, 1990; WELSH *et al.*, 1991), *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* (STEINDEL *et al.*, 1993) e *Leishmania* spp. (TIBAYRENC *et al.*, 1993) entre outros. O RAPD é um tipo de marcador classificado como dominante ou multi-locus por gerar simultaneamente dados de *locus* múltiplos. Ele amplifica regiões anônimas do genoma produzindo um padrão de múltiplas bandas para cada indivíduo, sendo portanto, um marcador útil para estudos de variabilidade genética.

6. Conclusões

A partir de excretas de pombos acumuladas em locais protegidos foi possível o isolamento de *C. neoformans* reforçando a relação do patógeno com os excrementos destas aves;

Todos os isolados cultivados em placas com meio Ágar Níger apresentaram colônias de coloração marrom evidenciando a atividade da enzima fenoloxidase;

Quando submetidos à amplificação do fragmento do gene CAP59 todos os isolados apresentaram o produto de amplificação esperado de 597pb, utilizada como diagnóstico de *C. neoformans*;

De acordo com a técnica de PCR-RFLP as quatro amostras isoladas nesta pesquisa apresentaram perfil de restrição igual ao da amostra padrão de sorotipo A;

Os perfis de RAPD utilizando os iniciadores 3303, 3304 e M13 mostraram uma alta variabilidade genética entre os isolados de *C. neoformans*;

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma baixa prevalência ambiental de *C. neoformans* na região central de Florianópolis, entretanto, faz-se necessário aumentar o número de amostras coletadas para maiores informações sobre a epidemiologia do fungo nesta região.

7. Referências

- ABEGG, M.A. **Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de potenciais reservatórios ambientais inexplorados no Rio Grande do Sul.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- BARONI, F. de A.; PAULA, C. R.; SILVA, E. G. da; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N. G.; OLIVEIRA, M.T. B. de; GAMBALE, W. ***Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.48, p.71-75, 2006.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the ***Cryptococcus neoformans* – *Cryptococcus gatti* species complex.** Revista Iberoamericana de Micología, v.25, p.S4-S12, 2008.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans*.** Washington: ASM Press, Library of Congress, 541 pp., 1998.
- CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L.; KHINE, H.; ABADI, J.; LINDENBERG, D. J.; PIROFSKI, L.; NIANG, R.; CASADEVALL, A. **Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood.** Pediatrics. v.107, p. E66, 2001.
- CASALI, A. K.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. ***Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v.20, p.34-37, 2001.
- CASALI, A. K.; GOULART, L.; ROSA, E.; SILVA, L. K.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A.; ALVES, S. H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M. H. **Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul.** FEMS yeast research, v.3, p.405-415, 2003.
- CAVALCANTE, S. C.; FREITAS, R. S.; VIDAL, M. S. M.; DANTAS, K. C.; LEVI, J. E.; MARTINS, J. E. C. **Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.102, p.41-47, 2007.
- CHEN, L. C.; GOLDMAN, D. L.; DOERING, T. L., PIROFSKI, L. A.; CASADEVALL, A. **Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans.** Infection and immunity, v. 67, p. 2218-2224, 1999.

CHANG, Y. C.; WICKES, B. L.; MILLER, G. F.; PENOYER, L. A. ; KWON-CHUNG, K. J. ***Cryptococcus neoformans* STE12 α regulates virulence but is not essential for mating.** The Journal of experimental medicine, v.191, p. 871-882, 2000.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. **Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence.** Molecular and cellular biology, v.14, p. 4912-4919, 1994.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT J. R.. **Extracellular Phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*.** Molecular microbiology, v.39, p.166-175, 2001.

DAMBRÓS, B. P. **Variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* isolado de pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, Santa Catarina.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

DENTON, J. F. & DI SALVO, A. **The prevalence of *Cryptococcus neoformans* in various natural habitats.** Sabouraudia, v.6, p.213-217, 1968.

DOERING, T. L. **How does *Cryptococcus* get its coat?** Trends in Microbiology, v.8, p.547-552, 2000.

ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D.; MEYER, W.; BARTON, R. **Epidemiology: surveillance of fungal infections.** Medical Mycology, v.38, p.173-182, 2000.

GRANADOS, D .P.; CASTAÑEDA, E. **Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area.** Microbial Ecology, v.49, p.282-290, 2005.

GARCIA-HERMOSO, D.; DROMER, F.; JANBON, G. **Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection.** Journal of clinical microbiology, v.37, p.3204–3209, 1999.

GARCIA-HERMOSO, D.; DROMER, F.; JANBON, G. ***Cryptococcus neoformans* Capsule Structure Evolution In Vitro and during Murine Infection.** Infection and Immunity, v.72, p. 3359-3365, 2004.

IDNURM, A.; BAHN, Y.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A. **Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans***. Nature Reviews Microbiology, v.3, p.753-764, 2005.

JANBON, G. ***Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation**. FEMS Yeast Research, v.4, p.765-771, 2004.

KAWAKAMI, K. **Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans***. Japanese journal of infectious diseases, v.57, p.137-145, 2004.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; HASIMOTO E SOUZA, L. K.; FERNANDES, O. F. L.; BRITO, S. C. A.; SILVA, A. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M. R. R. **Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.47, p.203-207, 2005.

KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J. E. **Cryptococcosis**. Medical Mycology Philadelphia, p.397-445, 1992.

KWON-CHUNG, K. J. & VARMA, A. **Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?** FEMS Yeast Research, v.6, p.574-587, 2006.

LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. A.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. ***Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow**. Medical Mycology, v.36, p.119-122, 1998.

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

LEVITZ, S.M. **The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis**. Reviews of infectious diseases, v.13, p.1163-1169, 1991.

LIN, X. & HEITMAN, J. **The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex**. Annual review of microbiology, v.60, p.69-105, 2006.

LITVINTSEVA, A. P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. **Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans***. Journal of Clinical Microbiology, v.43, p.556-564, 2005.

LIU, L., TEWARI, R. P., WILLIAMSON, P. R. **Laccase Protects *Cryptococcus neoformans* from Antifungal Activity of Alveolar Macrophages.** Infection and immunity, v.67, p.6034-6039, 1999.

LOFTUS BJ, FUNG E, RONCAGLIA P, ROWLEY D, AMEDEO P, BRUNO D, VAMATHEVAN J, MIRANDA M, ANDERSON IJ, FRASER JA, ALLEN JE, BOSDET IE, BRENT MR, CHIU R, DOERING TL, DONLIN MJ, D'SOUZA CA, FOX DS, GRINBERG V, FU J, FUKUSHIMA M, HAAS BJ, HUANG JC, JANBON G, JONES SJ, KOO HL, KRZYWINSKI MI, KWON-CHUNG JK, LENGELER KB, MAITI R, MARRA MA, MARRA RE, MATHEWSON CA, MITCHELL TG, PERTEA M, RIGGS FR, SALZBERG SL, SCHEIN JE, SHVARTSBEYN A, SHIN H, SHUMWAY M, SPECHT CA, SUH BB, TENNEY A, UTTERBACK TR, WICKES BL, WORTMAN JR, WYE NH, KRONSTAD JW, LODGE JK, HEITMAN J, DAVIS RW, FRASER CM, HYMAN RW. **The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*.** Science, v.25, p.1321-1324, 2005.

LUGARINI, C. **Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de passeriformes e psittaciformes no Estado do Paraná.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2006.

LUGARINI, C.; GOEBEL, C. S.; CONDAS, L. A. Z.; MURO, M. D.; FARIAS, M. R. de; FERREIRA, F. M.; VAINSTEIN, M. H. ***Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine BIRD Excreta in the State of Paraná, Brazil.** Mycopathologia, v.166, p.61-69, 2008.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. **Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates.** Emerging Infectious Disease, v.9, p.189-195, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS.** Brasília, 2002. Disponível em: <www.aids.gov.br> Acesso em: 20 set. 2008.

MITCHELL, T. G. & PERFECT, J. R. ***Cryptococcosis* in the era of AIDS 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*.** Clinical microbiology reviews, v.8, p.515-548, 1995.

NAKAMURA, Y.; KANO, R.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. **Molecular analysis of CAP59 gene sequences from five serotypes of *Cryptococcus neoformans*.** Journal of clinical microbiology, v.38, p.992-995, 2000.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C.; BEZERRA, C. C.; PEREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. **Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans***

isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. Journal of clinical microbiology, v.41, p.73-77, 2003.

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

OKABAYASHY, K.; KANO, R.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Expression of capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia, v.160, p.1-7, 2005.

OKABAYASHI, K.; HASEGAWA, A.; WATANABE, T. **Microreview: Capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*.** Mycopathologia, v.163, p.1-8, 2007.

OSUNA, A.; CARRAGOSO, A.; LEMOS, A.; MOCHO, M. L.; GASPAR, O. **Criptococose.** Acta Medica Portuguesa, v. 21, p.307-313, 2008

PAPPALARDO, M. C.; MELHEM, M. S. **Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 45, p.299-305, 2004.

PASSONI, L. F. C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S. ***Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis.** Medical Mycology, v. 36, p.305-311, 1998.

PASSONI, L.F.C. **Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection.** Revista Iberoamericana de Micologia, v. 16, p.77-81, 1999.

REY, A.; KLAUS, B.; LENGELER, K. B.; HEITMAN, J. **Diploid strains of the pathogenic basidiomycete *Cryptococcus neoformans* are thermally dimorphic fungal.** Genetics and Biology, v. 29, p.153-163, 2000.

RIVERA, J.; FELDMESSER, M.; CAMMER, M.; CASADEVALL, A. **Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection.** Infection and immunity, v.66, p.5027-5030, 1998.

SNEATH, P. H. & SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy.** Nature, v.193, p.853-860, 1962.

SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. **Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.47, p.31-36, 2005.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. **Ecology of *Cryptococcus neoformans*.** Revista Iberoamericana de Micología, v.14, p.42-43, 1997.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; MENEZES, C. L. de; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, A. J. **Random amplified polymorphic DNA analysis of *Tripanosoma cruzi* strains.** Molecular and biochemical parasitology, v.60, p.71-79, 1993.

SUKROONGREUNG, S.; KITINIYOM, K.; NILAKUL, C.; TANTIMAVANICH, S. **Pathogenicity of basidiospores of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*.** Medical Mycology, v.36, p.419-424, 1998.

TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D.; AYALA, F. **Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, p.1335-1339, 1993.

TSCHARKE, R. L.; LAZERA, M.; CHANG, Y. C.; WICKES, B. L.; KWON-CHUNG, K. J.; **Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type alpha-specific.** Fungal genetics and biology, v.39, p.230-237, 2003.

WATERMAN, S.R.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SHIN, S.; WILLIAMSON, P.R. **Cell Wall Targeting of Laccase of *Cryptococcus neoformans* during Infection of Mice.** Infection and Immunity, v.75, p.714-722, 2007.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.** Nucleic acids research, v.18, p. 7213-7218, 1990.

WELSH, J.; PETERSEN, C.; McCLELLAND, M. **Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping.** Nucleic acids research, v.19, p.303-306, 1991.

WICKES, B.L.; MAYORGA, M.E.; EDMAN, U.; EDMAN, J.C. **Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the α -mating type.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.93, p.7327-7331, 1996.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. **Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans***. Biological procedures online, v.6, p.10-15, 2004.

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