

KARINE BENITEZ RAMOS

**VARIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DO
COMPLEXO DE ESPÉCIES *Cryptococcus neoformans/gattii*:
REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de
Curso submetido ao
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do
Grau de Licenciado em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos

Florianópolis
Novembro 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Telefone: (0xx48) 3721-9235. Fax: 3721-9672 – e-mail: cecb@ccb.ufsc.br; <http://cienciasbiologicas.grad.ufsc.br>

BIO7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II
ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
Semestre : 2015/ 2

1. Aluno

Aluno: Karine Benitez Ramos

Número da matrícula: 11100608

2. Trabalho

Título do Trabalho: **VARIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Cryptococcus neoformans/gattii*: REVISÃO DE LITERATURA.**

Orientador (a): Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos

Co- Orientador (a): -


Local de Apresentação do Trabalho: MIP 08

3. Avaliação pela banca examinadora

Presidente:	<u>Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos</u>	Nota: <u>9,0</u>
Membro Titular:	<u>Prof. Drª Thaís Cristine Marques Sincero</u>	Nota: <u>9,0</u>
Membro Titular:	<u>Profª .Drª Andrea Rita Marrero</u>	Nota: <u>9,0</u>
Membro Suplente:	<u>Profª Ms. Berenice Pagani Nappi</u>	Nota: _____

Média Final : 9,0 (NOVE)


PRESIDENTE DA BANCA


MEMBRO TITULAR


MEMBRO TITULAR

MEMBRO SUPLENTE

Florianópolis, 25 de Novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, pela determinação e força de vontade que encontrei, nos diversos momentos do meu percurso acadêmico.

Agradeço aos meus familiares, pelo apoio e por compreenderem meus momentos de ausência, enquanto estive empenhada em meus estudos.

Aos meus pais, Eduardo e Geneci, que com muito esforço, dedicação, amor, carinho e sabedoria, me instruíram pelos melhores caminhos, visando sempre minha felicidade e vitória. Foram muitas batalhas que enfrentaram até chegarmos aqui, e concerteza este mérito é nosso. Obrigada, amo vocês.

Ao meu marido, Thiago que vivenciou em estado pleno, minhas frustrações e alegrias, sempre com a palavra certa e no momento certo. Obrigada por tudo, és meu companheiro incondicional, te amo.

Aos meus irmãos e cunhada, Vanessa, Martin e Hana, que tiveram sempre a a palavra amiga e o conselho mais preciso nas horas difíceis. São seres que iluminam minha vida. Obrigada, amo vocês.

Aos meus avós que amo muito, e torcem por mim, estejam a onde estiver, Alexandrina e Aquino, Fermin Alejandro e Maria Dorli. Com certeza tiveram grande importância na minha vida, exemplos de bondade e perseverança.

Aos meus sogros e cunhados que são pessoas maravilhosas, e compreenderam minhas ausências. Obrigada.

Fico extremamente grata, pela orientação recebida durante o Projeto e no desenvolvimento do TCC, pelo Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos, que com muita dedicação, paciência e humildade, aceitou-me como orientanda, mesmo sem me conhecer. Muito obrigada pelo voto de confiança.

Agradeço pela orientação do tema *Cryptococcus* ssp. e de meu orientador, a minha colega de trabalho Sara, que percebeu de imediato a necessidade de uma revisão a cerca do assunto e me sugeriu investigar mais sobre. É uma excelente profissional (Micologista), muito obrigada.

Quero agradecer a Clarice, que inúmeras vezes interrompeu seus estudos do mestrado, para sentar e ler meu trabalho. E das diversas vezes que simplesmente ouviu minhas

dificuldades, tentando da melhor forma saná-las. Muito obrigada, és uma pessoa maravilhosa.

Aos meus colegas de trabalho do setor de Microbiologia, Imunologia e Carga Viral do Hospital Unversitário, que por muitas e muitas vezes, compreenderam meus momentos de angústia e preocupações, tentando torná-los mais alegres. Muito obrigada, Mara, Ivonete, Márcio, Rodrigo, Juliano, Emerita, Michele, Saulo, Rita, seu Luiz Coelho e Marcela.

A todos meus colegas de graduação, que compartilharam comigo, coisas boas e não tão boas, mas sempre unidos, buscando ajuda uns nos outros. Das inúmeras revisões para provas e apresentações de PPCC (Prática Pedagógica como Componente Curricular), que percorreram toda nossa graduação. Um obrigada em especial à Débora Fortkamp e Lucas Martins que tornaram-se grandes amigos.

Aos professores, que desde a primeira fase transmitiram a importância do estudo, e das inesquecíveis saídas de campo, que proporcionaram experiências únicas. Muito obrigada.

E um obrigada em especial, a todos que se propuserem ler este trabalho.

Obrigada.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo realizar uma pesquisa bibliográfica e analisar os estudos publicados sobre variações fenotípicas e genotípicas do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* no Brasil, bem como seus nichos ecológicos e as características desse complexo de espécies com a virulência e patogenicidade dos isolados. As leveduras formam um grande grupo taxonômico, no qual se enquadram espécies do gênero *Cryptococcus*, que compõe-se de espécies saprófitas e espécies causadoras de infecções (criptococose). Provavelmente, esta levedura infecta o ser humano mais comumente por via aerógena, no qual se multiplicam na forma de leveduras capsuladas. Nas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que são espécies patogênicas, o componente capsular predominante é a glucuronoxilomanana, um polissacarídeo de natureza complexa, cuja variação molecular determina os diferentes sorotipos A, B, C, D e AD. O *C. neoformans* é cosmopolita, ocorre em diversos substratos orgânicos, estando frequentemente associados a habitat de aves ou excretas secas, ricas em fontes de nitrogênio, como ureia e creatinina. Condições favoráveis ao crescimento desta levedura formam microfocos, notadamente em centros urbanos e relacionados a pombos. Os ocos das árvores representam interessante nicho ecológico para determinadas aves que fazem ninhos nestes locais, roendo a madeira, como exemplo, alguns psitacídeos. Tais biótipos possibilitam interações entre fungos e protozoários, insetos, pequenos roedores e morcegos em ambientes urbanos e silvestres. O ambiente domiciliar, particularmente a poeira doméstica, também pode apresentar contaminação por este fungo. O *C. gattii*, apesar de ter sido isolado em ambiente de regiões tropicais e subtropicais, pode ser encontrado em áreas de clima temperado e frio, e que desse modo, estas regiões devem ser incluídas na sua distribuição geográfica. Seu habitat natural foi inicialmente descrito na Austrália, associado a restos vegetais de *Eucalyptus camaldulensis*. Atualmente, sabe-se que eucaliptos não representam habitat natural específico, nem associação específica com *C. gattii*, observando-se diferentes padrões geográficos de ocorrência fungo-árvore-madeira em decomposição.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos. Nicho Ecológico. Virulência.
Habitat. Aves. Árvores.

ABSTRACT

The present study aims to conduct a research and review of the published studies on phenotypic and genotypic variations of the complex *C. neoformans* and *C. gattii* in Brazil, as well as to characterize their ecological niches, their virulence and pathogenicity of this complex. The yeasts form a large fungal taxonomic group, in which includes the genus *Cryptococcus*, with comprises saprophytic as well pathogenic species causing infection (Cryptococcosis). This yeast probably infects the human being most commonly through aerial dispersal in which it multiplies as yeasts. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, which are the pathogenic species, display the capsule, which is composed by glucuronoxilomanana, a complex polysaccharide, whose variation in their molecular composition determines the different serotypes A, B, C, D and AD. *C. neoformans* is a cosmopolitan species, occurring in various organic substrates, and it is often associated with habitat or dried excreta of birds, which are rich in nitrogen sources, such as urea and creatinine. Conditions favourable for yeast growth lead to formation of microfoci, notably in urban centers, where pigeons live. The hollow of trees represent an interesting ecological niche for certain birds that nest in these places, gnawing wood, like some parrot species. Such biotopes enable the fungus interact with protozoa, insects, small rodents and bats in urban and wild environments. The household's environment, particularly the household dust, can also be contaminated by this fungus. *C. gattii*, despite having been isolated in tropical and subtropical regions, can also be found in temperate and cold areas. Its natural habitat was formerly described in Australia, associated with decomposing *Eucalyptus camaldulensis* trees. Currently, it is known that *Eucalyptus* trees do not represent the only natural habitat-specific association with *C. gattii*, which may also display different geographic patterns of occurrence in decomposing trees.

Key-Words: Fungi. Ecological niche. Virulence. Habitat. Birds. Trees.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Sorotipos das espécies de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> .	14
FIGURA 2. Reprodução sexuada de <i>Cryptococcus neoformans</i> .	17
FIGURA 3. Cápsula de <i>Cryptococcus</i> observada em tinta nanquim ou tinta-da-china.	22
FIGURA 4. Cultura de <i>Cryptococcus</i> em ágar sabouraud dextrosado	23
FIGURA 5. Cultura de <i>Cryptococcus</i> em ágar niger - atividade de lacase.	27
FIGURA 6. Atividade de ureia, controle A (-) e B (+).	28
FIGURA 7. Características genótípicas das espécies de <i>C.gattii</i> e <i>C. neoformans</i> com suas variações.	31
FIGURA 8. Mapa com os diferentes tipos moleculares e o número de amostras obtidas em cada estado.	32

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Diferenças observadas entre as duas espécies: *cryptococcus gattii* e *cryptococcus neoformans* com suas variações. 15
- TABELA 2.** Análise dos resultados fenotípicos e genotípicos no Brasil, do gênero *Cryptococcus* spp em pacientes. 39

LISTA DE SÍMBOLOS

AFLP: *amplified fragment length polymorphism*

AIDS/SIDA: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

°C: Graus Celsius

CDB-T: Creatinina-dextrose-azul de bromotimol-tiamina

CGB : Canavanina-glicina-azul de bromotimol

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetraacético

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

GCP: Glicina-cicloheximida-fenol vermelho

GXM: Glucuroxilomanana

h: Horas

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

LCR: Líquor céfalo-raquidiano

MAT: *Mating type*

MLST: Tipagem de Sequência Multilocular

NSA: *niger seed agar* - ágar Niger

NM: Macro região do Norte

PCR: *polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogenionico

RAPD: *Randon Amplification of Polymorphic DNA*- amplificação randômica de DNA

RFLP: *Restriction Fragment Length Polimorphism* – fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição.

SM: Macro região Austral

SNC: Sistema nervoso central

sp: Espécie

spp: Espécies

UFC: Unidade formadora de colonia

µL: Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. GÊNERO <i>Cryptococcus</i>	13
1.1.1 CICLO DE VIDA DO <i>Cryptococcus</i>	13
1.1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
1.1.3 <i>Cryptococcus gattii</i>	18
1.1.4 CRIPTOCOCOSE	19
1.1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 FONTES UTILIZADAS	25
3.2. ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Os fungos pertencem ao Reino *Fungi*, são eucarióticos, micro ou macroscópicos, geralmente com quitina e outros componentes na sua parede celular. São aeróbicos e microaerófilos, geralmente necessitando de fontes orgânicas (de carbono e nitrogênio) para a sua sobrevivência. No ambiente, podem ser sapróbios ou patogênicos dependendo das condições e do substrato em que se encontram (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; LACAZ *et al.*, 2002).

Estes organismos não realizam fotossíntese e obtêm seus nutrientes através da absorção dos substratos, por meio de enzimas que os hidrolisam, para torná-los mais assimiláveis. Para seu desenvolvimento e manutenção exigem carbono (açúcares) e nitrogênio (peptídeos) como fonte de macronutrientes. Micronutrientes como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; LACAZ *et al.*, 2002).

Embora não se conheça o número exato de espécies, estima-se que seu número seja de centenas de milhares, dos quais, pouco mais de 200 espécies provocam infecções em seres humanos e animais (SIDRIM; ROCHA, 2004). Do ponto de vista médico, são muito importantes em vários aspectos, pois podem agir como:

1. Agentes de processos infecciosos (micoses);
2. Agentes de hipersensibilidade tardia, como processos alérgicos;
3. Agentes de micetismo – Pela ingestão voluntária e intoxicação por fungos macroscópicos toxigênicos (cogumelos);
4. Agentes de micotoxicoses – Pela ingestão contínua e prolongada de alimentos embolorados que contenham fungos produtores de micotoxinas, que são produtos do metabolismo secundário de muitas espécies de fungos (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

O conhecimento básico de aspectos como morfologia, fisiologia, reprodução, nutrição, atividade bioquímica, metabólitos, virulência e estrutura antigênica é de interesse na área médica uma vez que, auxilia na identificação do agente,

bem como na terapêutica e prevenção de doenças (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os fungos microscópicos (ou micromicetos) são responsáveis por inúmeras doenças. Este grupo é tradicionalmente dividido em três subgrupos, de acordo com suas características morfológicas, macroscópicas e microscópicas:

1. Fungos filamentosos (também conhecidos como mofo e bolores), que se apresentam na forma de filamentos micelianos e estruturas de frutificação ou esporulação. Ex.: *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.;
2. Leveduras, que se apresentam majoritariamente por estruturas de forma arredondada ou ovalada, de reprodução assexuada por gemulação ou brotamento e conhecidas como blastoconídeos. Ex.: *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp.;
3. Fungos dimórficos que, em fases distintas de seu ciclo biológico, podem se apresentar como leveduras ou filamentos micelíneos, dependendo das condições de temperatura e oferta de nutrientes. Ex.: *Sporothrix* sp., *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

As leveduras formam um grande grupo, no qual se enquadram espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, que são importantes agentes causadores de infecções. Este grupo é filogeneticamente heterogêneo, se reproduz por brotamento ou cissiparidade e apresenta estruturas somáticas globosas, ovais ou alongadas. Algumas vezes, as gêmulas formam cadeias de células alongadas, denominadas pseudo-hifas, com constrições no local do septo. Assim, leveduras de algumas espécies do gênero *Candida* produzem pseudo-hifas e hifas verdadeiras (filamentos micelianos), dependendo de condições de seu crescimento, enquanto as células somáticas de *Cryptococcus* reproduzem-se somente por brotamento. As espécies de *Cryptococcus* apresentam hifas verdadeiras somente quando exercem o seu ciclo biológico sexuado (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

1.1.GÊNERO *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* é composto, em sua maioria, por espécies saprofíticas, embora englobe espécies causadoras de doenças (criptococose).

A etimologia da palavra *Cryptococcus*, oriunda da palavra grega “Kryptos”, significa “escondido”, “secreto”, “misterioso”, “obscuro”. Tal terminologia foi criada em 1833 por Kutzing (HEITMAN *et al.*, 2011). Espécies deste gênero foram descritas pela primeira vez em 1894, por Francesco Sanfelice, que isolou o *Cryptococcus neoformans* (antigo *Saccharomyces neoformans*) ao estudar “blastomicetos” do suco de algumas frutas. Este trabalho foi um marco nos estudos sobre criptococose e seu agente etiológico (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

1.1.1 CICLO DE VIDA DO *Cryptococcus*

A maioria das espécies de *Cryptococcus* não sobrevive em tecidos de animais endodérmicos, pois estes possuem temperaturas elevadas e um sistema imune que os protege. Assim, *C. neoformans* e *C. gattii* são consideradas as únicas espécies que causam doença em humanos, devido à capacidade de crescer em temperaturas de 37 °C. No entanto, outras espécies, como *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus* têm sido ocasionalmente relatadas como causa de infecção humana (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; VIVIANI; TORTORANO, 2009).

Segundo Kurtzman *et al.*, (2011), quando apresenta-se no ciclo teleomórfico ou sexuado (estado perfeito) a forma teleomórfica do *Cryptococcus* (*Filobasidiella*) resulta da conjugação de duas cepas compatíveis, α e a .

O complexo *C. neoformans* e *C. gattii* é taxonomicamente classificado da seguinte maneira:

Reino: *Fungi*
 Filo: Basidiomycota;
 Ordem: Tremellales;
 Família: Tremellaceae;
 Gênero: *Filobasidiella*

Espécie:

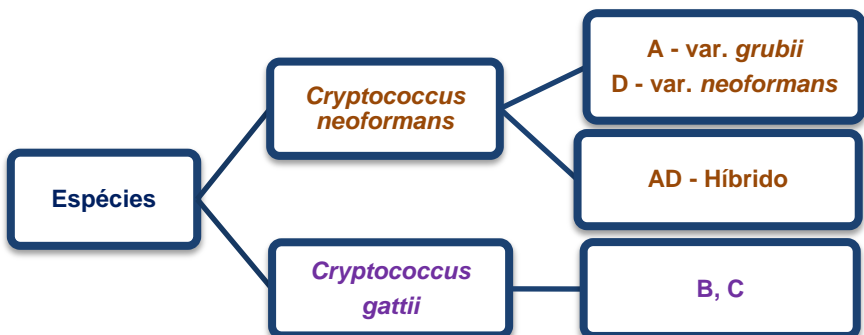
Filobasidiella neoformans
Filobasidiella bacillispora

Quando observadas *In vitro* as duas variedades se apresentam morfológicamente idênticas. No gênero *Cryptococcus* o componente capsular predominante é a glucuronoxilomanana, um polissacarídeo de natureza complexa, cuja variação molecular determina os diferentes sorotipos A, B, C, D e AD, conforme mostrado na **figura 1** (NISHIKAWA *et al*, 2007; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

No estado anamorfo ou assexuado os sorotipos correspondentes são:

C. neoformans (sorotipo A e D);
C. gattii (Sorotipo B e C).

Figura 1. Sorotipos das espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.



Os diferentes sorotipos de *C. neoformans* correspondem a duas diferentes variedades para esta espécie. O sorotipo A corresponde à variedade *grubii* enquanto que o sorotipo D corresponde à variedade *neoformans* (figura 1). Entretanto, com a espécie *C. gattii* não existe atualmente este tipo de correspondência. Diferenças biológicas adicionais observadas entre *C. neoformans* e *C. gattii* são mostradas de forma resumida na **tabela 1**.

Tabela 1. Diferenças observadas entre as duas espécies: *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* com suas variações. **Fonte:** Adaptado de Lacaz, et al., 2002.

Características	var. <i>grubii</i>	var. <i>neoformans</i>	<i>gattii</i>
Sorotipo	A	D	B, C
Estado Perfeito	<i>Filobasidiella neoformans</i>	<i>Filobasidiella neoformans</i>	<i>Filobasidiella bacillispora</i>
Tipo sexual da cultura (a ou α)	α	a e α	a e α
Cultivo / CGB	sem crescimento	sem crescimento	com crescimento
Cultivo / GCP	sem crescimento	sem crescimento	com crescimento
Cultivo / CDB-T	sem crescimento	com crescimento	com crescimento

Abreviações: **CGB:** Canavanina-glicina-azul debromotimol; **GCP:** Glicina-ciclohexamina-vermelho de fenol; **CDBT:** Creatinina-dextrose-azul de bromotimol-tiamina

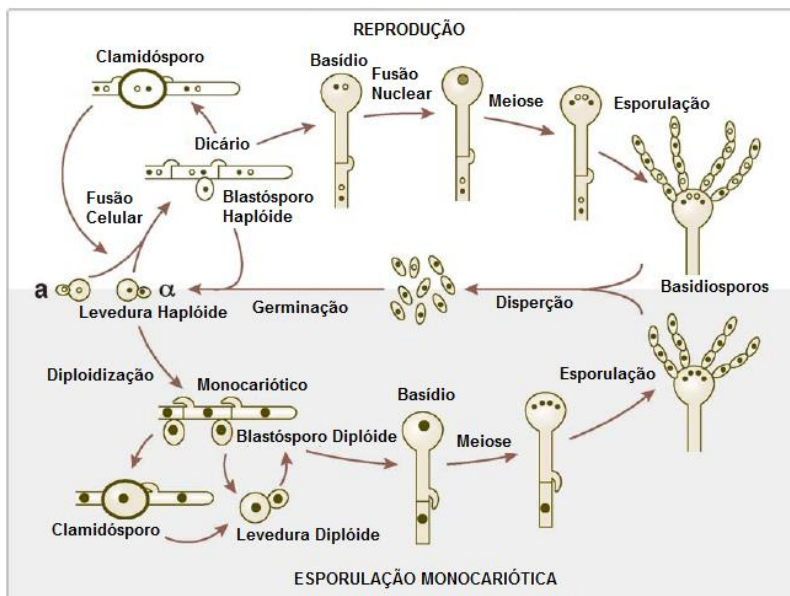
Quando *C. neoformans/gattii* se apresentam no ciclo teleomórfico ou sexuado (estado perfeito) possuem um *locus* com dois alelos α (MAT α) e a (MATa) que é obtido pela conjugação de duas cepas compatíveis, α e a. Mais de 95% dos isolados clínicos e ambientais corresponde ao MAT α (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ *et al.*, 2002).

Análises com oligonucleotídeos iniciadores específicos para genes α e a, utilizando-se PCR, demonstraram que o sorotipo AD é heterozigoto para o *locus* reprodutivo, podendo ser encontrado como aneuploide ou diploide, como resultado da reprodução dos sorotipos A (MAT α) e D (MATa) (CHATURVEDI *et al.*, 2000; BOEKHOUT *et al.*, 2001; LENGELER *et al.*, 2001 apud PEREIRA *et al.*, 2012).

Na reprodução sexuada, o fator mais importante para a ocorrência do cruzamento entre as células **MATa** e **MAT α** é a limitação de nutrientes. As células MATa produzem o feromônio **MFa** na ausência de nitrogênio, e em resposta a esse feromônio, as células MAT α também produzem um feromônio **MF α** , assim, ocorre a formação de um tubo de conjugação e as células produzem hifas dicarióticas com grampos de conexão. Essas hifas produzem basídios terminais subglobulosos ou clavados, onde ocorrem cariogamia, meiose, mitose e a transformação dos basidiósporos em leveduras. Este processo pode ser observado na **figura 2** (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; SORREL & ELLIS, 1997; CHANG *et al.*, 2000; LENGELER *et al.*, 2001 apud PEREIRA *et al.*, 2012 6p).

Um processo de Frutificação monocariótica caracteriza-se por gerar quantidades abundantes de blastoconídios através da filamentação oriunda de um único núcleo (filamentos monocarióticos). Estudo proposto por LIN *et al.*, 2006, relatam que a origem de basidiósporos ocorre através da união entre células com mesmos tipos sexuais (MAT α). Essa reprodução inclui a fusão celular, filamentação, formação de basídios, meiose e esporulação, como ocorre na reprodução sexual de células com tipos sexuais diferentes (MAT α e MATa). O que distingue essa frutificação sexual é o fato da fusão nuclear ocorrer ao mesmo tempo em que a fusão celular.

Figura 2. Reprodução sexuada de *Cryptococcus neoformans*.



Fonte: Adaptado de LIN *et al.*, 2006.

O processo de hibridação tem consequências para a biologia reprodutiva das espécies, como novos genótipos com virulência alterada ou suscetibilidade a drogas antifúngicas que podem surgir através da troca de material genético (LIN *et al.*, 2006).

1.1.2 *Cryptococcus neoformans*

O *C. neoformans* é cosmopolita, ocorre em diversos substratos orgânicos, estando frequentemente associados a habitat de aves ou excretas secas, ricas em fontes de nitrogênio, como uréia e creatinina. Condições favoráveis ao crescimento abundante desta levedura formam microfocos, notadamente em centros urbanos e relacionados a pombos. O ambiente domiciliar, particularmente a poeira doméstica, pode apresentar

contaminação por *Cryptococcus*. No habitat de diferentes espécies de aves, sobretudo aves gregárias em cativeiro, já foi isolado *Cryptococcus*. Ele pode ainda viver saprofiticamente em diversos sítios anatômicos do ser humano (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004; VIVIANI; TORTORANO, 2009).

Foi demonstrada no Brasil, a associação saprofítica de *C. neoformans* var. *neoformans* com madeira em decomposição em ocos de árvores vivas, constituindo um novo habitat natural e indicando um possível nicho ecológico primário para o fungo (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Também, em nosso país, em 1993, o *C. neoformans* var. *neoformans* foi isolado a partir de madeira em decomposição dentro da cavidade de *Syzygium jambolana* e, em 1996, a mesma variedade desta levedura também foi observada em de cavidades de três outras espécies de árvores vivas (*Cassia grandis*, *Senna multijuga* e *Ficus microcarpa*) (LAZÉRA *et al.*, 2000).

1.1.3 *Cryptococcus gattii*

O *C. gattii*, apesar de ter sido isolado em ambiente de regiões tropicais e subtropicais, pode ser encontrado em áreas de clima temperado e frio, que desse modo, devem ser incluídas na sua distribuição. Seu habitat natural foi inicialmente descrito na Austrália, associado a restos vegetais de *Eucalyptus camaldulensis*. No Parque Ibirapuera e em plantação da Embrapa em Teresina, no estado do Piauí, já foi isolado *Cryptococcus* de eucalipto (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE; 2008). Atualmente, sabe-se que eucaliptos não representam habitat natural específico, nem associação específica com *C. gattii*, observando-se diferentes padrões geográficos de ocorrência fungo-árvore-madeira em decomposição (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE; 2008).

Lazéra *et al.*, (1995; 1996) isolaram o *C. gattii*, que à época era considerado apenas uma variedade do *C. neoformans*, de ocos de oiti (*Moquilea tomentosa*) das cidades de Teresina (PI) e Rio de Janeiro, demonstrando que outras árvores podem ser “reservatórios” desta levedura, além do

Eucalyptus camaldulensis. Os ocos das árvores representam interessante nicho ecológico para determinadas aves que fazem ninhos nestes locais, roendo a madeira, como exemplo, alguns psitacídeos. Tais biótipos possibilitam interações entre fungos e protozoários, insetos, pequenos roedores e morcegos em ambientes urbanos e silvestres (LACAZ *et al.*, 2002).

1.1.4 CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma infecção fúngica oportunística, que ocorre com grande frequência em pacientes imunodeprimidos, com “doença de base” (Aids, neoplasia, diabetes, pacientes transplantados, hemopatia grave etc.), e quase sempre se apresenta clinicamente na forma de lesões, principalmente, nos pulmões e sistema nervoso central (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004; VIVIANI, TORTORANO, 2009).

Em geral, o fungo atinge o organismo humano através do trato respiratório. A cápsula parece proteger o fungo da fagocitose já que mutantes não capsulados de *C. neoformans* (obtidos *in vitro*) podem ser facilmente fagocitados por leucócitos (KOZEL, 1977). Provavelmente, esta levedura penetra o organismo de humanos, mais comumente por via aerógena, sob a forma de células pequenas, não-capsuladas, e que se transformariam rapidamente em formas leveduriformes capsuladas.

No *Cryptococcus*, o componente capsular predominante é composto de, pelo menos dois polissacarídeos que são a glucuronoxilomanana e a galactoxilomanana, e uma pequena proporção de manoproteínas, que agem sobre o sistema imunológico do hospedeiro, induzindo ativação e depleção do sistema complemento, reduzida resposta de anticorpos, inibição da migração de leucócitos e da fagocitose. Além disso, a melanina, presente na parede celular do fungo, contribui para virulência por conferir resistência às células fúngicas contra o ataque das células imunológicas efetoras (GOMES *et al.*, 2010; LACAZ *et al.*, 2002).

As lesões causadas pelo *Cryptococcus* ocorrem principalmente nos pulmões e sistema nervoso central. A rota da

infecção por *Cryptococcus* começa nos pulmões, e partindo daí, o fungo pode migrar para outras partes do corpo, apresentando tropismo pelo sistema nervoso central, onde causa meningite, meningoencefalite e encefalite (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

A afinidade do *Cryptococcus* pelo sistema nervoso central, provavelmente, se deve à alta concentração, de nutrientes assimiláveis pelo fungo, à falta de atividade do sistema complemento e a resposta inflamatória fraca ou ausente no tecido cerebral. O cérebro é abundante em catecolaminas, que podem ser utilizadas pelo fungo para síntese de melanina (RODRIGUES *et al.*, 1999).

Na neurocriptococose, a forma clínica mais comum é a meningoencefalite, ocorrendo em mais de 80% dos casos, na forma isolada ou associada com acometimento pulmonar. Com mais frequência apresenta-se como meningite ou meningoencefalite aguda ou subaguda. Porém, em pacientes imunodeprimidos, podem ser encontradas lesões focais únicas ou múltiplas no sistema nervoso central, simulando neoplasias, associadas ou não ao quadro de meningite, (MITCHEL & PERFECT, 1995). Nesses pacientes a doença manifesta-se por náuseas, vômitos e rigidez na nuca. No quadro meningoencefálico, os pacientes podem apresentar alterações de consciência, déficit de memória, linguagem e cognição; também estrabismo, paralisia facial e, às vezes, demência como única manifestação da doença (SORREL *et al.*, 2011).

Num estudo realizado na cidade de Salvador (Bahia), no período de 1972 a 1996, Darze e colaboradores descreveram as características clínicas de 104 casos de pacientes com meningocefalite criptocócica. Os sinais e sintomas clínicos mais comumente observados foram: cefaleia (92,1%), febre (84,4%) e rigidez da nuca (83,2%). A contagem de células no líquido foi superior a quatro células/ml em 95,5% dos pacientes, com predominância de linfócitos em 83,3% dos casos, com letalidade de 42,7% (DARZE *et al.*, 2000).

Em pacientes imunodeprimidos, a meningoencefalite se manifesta de modo agudo, com mais frequência naqueles do sexo masculino, com carga fúngica elevada, com ampla variação de sinais clínicos, mas pode também apresentar poucos sinais e sintomas. Cefaleia e febre estão presentes em torno de 70% dos casos, e deve-se desconfiar de meningite criptocócica sempre

que o paciente portador de HIV apresentar cefaleia e febre de origem inexplicada, demência progressiva e confusão mental (CHUCK, SANDE, 1989; SORREL *et al.*, 2011).

Com relação à distribuição dos casos de criptococose no Brasil, de acordo com as variedades de *Cryptococcus*, Severo estudou 60 casos de criptococose no Rio Grande do Sul, no período de 1980 a 1990, e observou que, de 52 casos, 44 (87%) foram provocados por *C. neoformans* var. *neoformans* e 8 (13%) por *C. neoformans* var. *gattii*, como era conhecido à época o *C. gattii*. Este estudo propôs que a criptococose poderia se apresentar sob duas formas, a saber:

1) Criptococose por *C. neoformans* var. *neoformans*, que ocorre em pacientes imunodeprimidos, é generalizada e não responde satisfatoriamente ao tratamento clássico, sendo, frequentemente de curso fatal;

2) Criptococose por *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (atualmente foi renomeado como espécie *C. gattii*), que ocorre em pacientes imunocompetentes, apresenta manifestação pulmonar exuberante, responde satisfatoriamente ao tratamento clássico e apresenta bom prognóstico.

Quanto ao resultado do teste de sorotipagem, foi observado que amostras analisadas da variedade *C. neoformans* eram constituídas majoritariamente pelo sorotipo A, enquanto que todas as amostras analisadas da variedade *C. gattii* eram do sorotipo B (SEVERO *et al*, 1993).

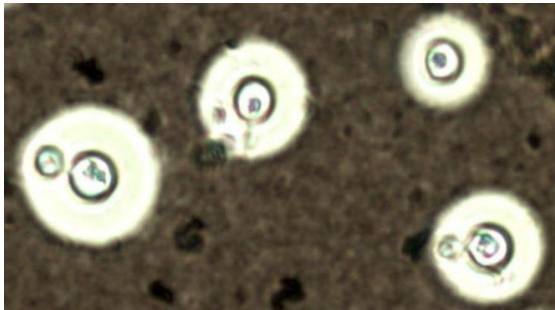
1.1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os métodos laboratoriais mais utilizados para a detecção do *Cryptococcus* no líquido são: a pesquisa microscópica do fungo no sedimento da centrifugação do líquido, o seu cultivo em meios apropriados e a pesquisa imunológica do antígeno capsular (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Para a detecção de *Cryptococcus* no exame microscópico do líquido, utilizam-se diversos tipos de colorações, dos quais o mais utilizado é a coloração com tinta Nanquim (ou tinta-da-China, **figura 3**). Ela permite a observação indireta da cápsula, já que a mesma vai se destacar contra um fundo negro.

O teste da tinta-da-China identifica *Cryptococcus* em 60 a 80% dos casos de criptococose em pacientes com Aids e, aproximadamente, 50% dos casos de criptococose sem Aids (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Figura 3. Cápsula de *Cryptococcus* observada em tinta Nanquim ou tinta-da-china



Fonte: Prof.Dr. Jairo Ivo dos Santos.

A cultura é um dos métodos mais sensíveis para o diagnóstico da criptococose, sendo considerada a técnica de ouro na identificação do *Cryptococcus*. Ela é sensível, específica e de baixo custo, embora haja divergências na literatura quanto à sua real sensibilidade e especificidade (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). As colônias crescem geralmente após 48 a 72 horas de incubação, em temperaturas entre 28-32°C e vários tipos de meios de cultura podem ser utilizados, como ágar-sangue, ágar-Sabouraud e ágar de infusão de cérebro-coração (BHI) (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). No isolamento de *Cryptococcus*, observam-se colônias com aparência mucóide, e tonalidades de coloração creme, evidenciadas na **figura 4** (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

A habilidade de utilizar a glicina como fonte de carbono e nitrogênio e a resistência a canavalina azul de

bromotimol, permite diferenciar *C. gattii* de *C. neoformans*, no meio de CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol). O *C. gattii* é resistente a enzima L-canavanina, e cresce no meio CGB, fazendo com que haja a produção de amônia, alterando o pH do meio e mudando a sua cor de amarelo para azul, enquanto o *C. neoformans* tem o seu crescimento inibido neste meio (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; LACAZ *et al.*, 2002).

Figura 4. Cultura de *Cryptococcus* em ágar Sabouraud dextrosado.



Fonte: Prof. Dr.Jairo Ivo dos Santos.

Com relação à sua terapêutica, embora a criptococose seja uma micose extremamente grave do ponto de vista clínico, existem protocolos que permitem que geralmente se faça um tratamento adequado para esta micose. O antifúngico mais utilizado para esta finalidade é a anfotericina B, aplicada por via venosa e raquidiana. A duração e o esquema de tratamento irão depender da forma clínica do processo. A 5-fluorocitosina também tem sido utilizada, por via oral, associada à anfotericina B, assim como o fluconazol (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; SORREL *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão bibliográfica sobre a diversidade biológica do Complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* no Brasil.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os estudos de variações fenotípicas do complexo *C. neoformans* no Brasil;
- Avaliar os estudos de variações genotípicas do complexo *Cryptococcus gattii* no Brasil;
- Associar os perfis fenotípicos desse complexo de espécies, relatados na literatura, com possíveis características ecológicas ou reservatórios;
- Associar os perfis genotípicos desse complexo de espécies, relatados na literatura, com possíveis características ecológicas ou reservatórios;
- Analisar a existência de possíveis características fenotípicas/genotípicas desse complexo de espécies com a virulência e patogenicidade dos isolados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FONTES UTILIZADAS

Para a revisão bibliográfica de *Cryptococcus*, foi realizada pesquisa bibliográfica nos portais periódicos:

- Capes <http://www.periodicos.capes.gov.br/>;
- Scielo Brasil <http://www.scielo.org/php/index.php>;
- BU UFSC (Biblioteca Universitária – Universidade Federal de Santa Catarina)
<http://portal.bu.ufsc.br/> ;
- PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- Livros relacionados a Micologia Médica, Análises Clínicas e os artigos vinculados a *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, com ênfase no Brasil;

Foram pesquisados os termos: *Cryptococcus* sp., *Cryptococcus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*. O intervalo da pesquisa dos artigos compreendeu o período entre 1992 até 2015.

3.2. ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

Para a escolha da bibliografia, foram utilizados critérios de relevância dos estudos a cerca da temática.

Foram excluídas fontes que não atenderam os critérios fenotípicos e genotípicos do complexo *C. neoformans/C. gattii* no Brasil e no mundo, bem como as características ecológicas e a patogenicidade e virulência do fungo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fatores de virulência de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*

Capacidade de crescer a 37°C

O *C. neoformans* e *C. gattii* são consideradas as únicas espécies que causam doença em animais endodérmicos, devido à capacidade de crescer em temperaturas de 37 °C, sendo um dos principais fatores de virulência destes organismos (BUCHANAN & MURPHY, 1998; BARONI, 2001; VIVIANI; TORTORANO, 2009; GOMES *et al.*, 2010; LACAZ, *et al.*, 2002).

Produção melanina, pela enzima lacase (fenoloxidase)

Entre os fatores de virulência já conhecidos para *C. neoformans* e *C. gattii*, está a produção de melanina, que pode ser observada na **figura 5**. Estes fungos produzem a enzima lacase (fenoloxidase), que age sobre composto difenólicos presentes no meio de cultura, gerando a produção do pigmento melanínico, que fica aprisionado na parede celular do fungo. Essa classe de enzima pertence à família das oxidases, que tem como cofator os íons cobre e ferro. A melanina é um radical livre estável, insolúvel em solventes fisiológicos e resistentes à degradação ácida. O *C. neoformans* e *C. gattii* são as únicas espécies no gênero a produzir melanina a partir de compostos difenólicos via uso da enzima fenoloxidase a 37°C. A melanina confere proteção contra reações oxidativas, defesa contra a radiação UV e ataque de células de defesa do hospedeiro, em função de capacidade de reter enzimas hidrolíticas provenientes do fungo próximo à parede celular (REOLON *et al.*, 2004; LACAZ *et al.*, 2002; BUCHANAN & MURPHY, 1998; BARONI, 2001; VIVIANI; TORTORANO, 2009; GOMES *et al.*, 2010).

Figura 5. Cultura de *Cryptococcus* em ágar niger - atividade de lacase.



Fonte: Prof.Dr. Jairo Ivo dos Santos.

Atividade de urease

A atividade de urease pode ser vista na **figura 6**, onde a urease hidrolisa ureia a amônia e carbamato, resultando em alcalinização do meio, que proporciona mudança de cor no ágar de amarelo pálido, para rosa / magenta, às vezes, num período de poucas horas. O papel desta enzima é converter ureia a uma fonte de nitrogênio, utilizável no seu nicho ecológico (BUCHANAN & MURPHY, 1998; BARONI, 2001; VIVIANI; TORTORANO, 2009; GOMES *et al.*, 2010; COX *et al.*, 2000; STEENBERGEN *et al.*, 2003; REISS *et al.*, 2012; REOLON *et al.*, 2004).

Figura 6 Atividade de ureia, controle A (-) e B (+).



Fonte: Karine Benitez Ramos.

Atividade de protease e de fosfolipase

Outro fator de virulência de *C. neoformans*, de grande importância, é atividade de **proteínase ou protease**, que degrada as proteínas do hospedeiro, tais como colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores de complemento. As proteases atuam no início da invasão ao tecido do hospedeiro, degradando componentes do hospedeiro, o que pode proteger *C. neoformans* contra a resposta imune do hospedeiro bem como, pode auxiliar no mecanismo de escape da célula fúngica dos compartimentos fagossomais (STEENBERGEN *et al.*, 2003; REOLON *et al.*, 2004; BUCHANAN & MURPHY, 1998; BARONI, 2001; VIVIANI; TORTORANO, 2009; GOMES *et al.*, 2010; LACAZ, *et al.*, 2002).

As **fosfolipases** são enzimas capazes de promover a hidrólise de uma ou mais ligações éster em glicerofosfolípidios e auxiliam na degradação e desestabilização da membrana da célula hospedeira e lise celular. A enzima fosfolipase, atua degradando membranas celulares das células do hospedeiro, com consequente penetração tecidual (REOLON *et al.*, 2004; GHANNOUM *et al.*, 2000; BUCHANAN & MURPHY, 1998; BARONI, 2001; VIVIANI; TORTORANO, 2009; GOMES *et al.*, 2010; LACAZ, *et al.*, 2002).

Cepas de MAT α e MATa

Quanto as cepas **MAT α** e **MATa**, nenhuma diferença na virulência foi observada entre α e a, entretanto, durante co-infecção cepas **MAT α** e **MATa** são equivalentes em tecido periférico, mas as células α tem uma predileção acentuada para penetrar no SNC. Isto pode explicar a marcante prevalência de **MAT α** em isolados clínicos. *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam um sistema de *mating* bipolar com um único locus **MAT** contendo dois alelos α e a. Há uma diferença significativa em relação a ocorrência **MAT α** e **MATa** de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans*, uma vez que isolados **MAT α** são 30 a 40 vezes mais frequentes que isolados **MATa**. Kwon Chung *et al.* (1992) demonstraram que a prole do tipo α é mais virulenta que o tipo a, sugerindo que isolados **MAT α** apresentam vantagem seletiva na sobrevivência ambiental (NIELSEN *et al.*, 2005 Apud COSTA *et al.*, 2008, p.41).

Cápsula Polissacarídea

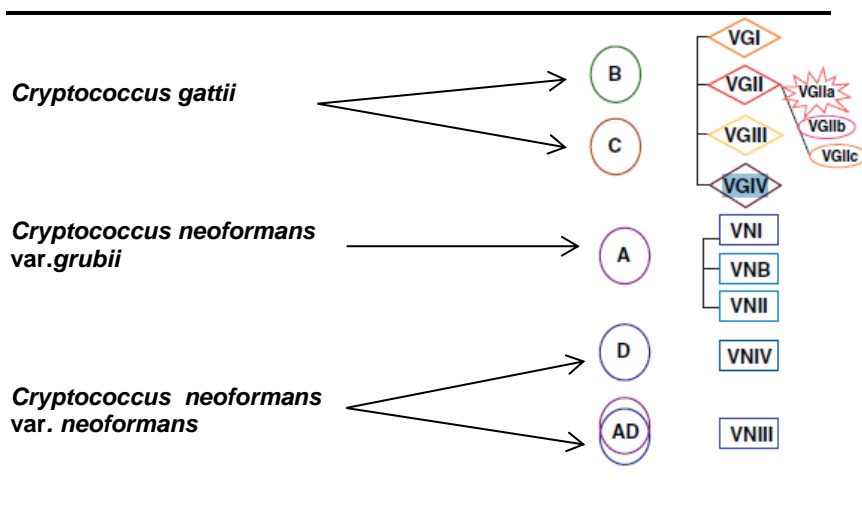
Alguns fatores de virulência destas espécies de fungos auxiliam na sua capacidade de infectar o hospedeiro. Dentre elas a **cápsula polissacarídea**, que é uma estrutura que envolve a parede celular, da célula do *C. neoformans* e *C. gatti*, conferindo-lhes uma morfologia distinta em relação a outras leveduras patogênicas. A cápsula é composta por pelo menos três componentes: manoproteína, galactoxilomanana e glucuronoxilomanana (GMX), que representa 90% dos

componentes da cápsula (STEENBERGEN *et al.*, 2003). Muitos fatores ambientais influenciam no tamanho da cápsula de *C. neoformans*. Fontes de carbono e ausência ou presença de certos aminoácidos e vitaminas modificam o tamanho da cápsula *in vitro*. A presença não apenas de tiamina, L-prolina ou asparagina, mas também baixa concentração de glicose, manose, xilose ou sucrose induz cápsulas largas. Pelo menos quatro genes capsulares individuais foram identificados, caracterizados e nomeados como CAP64, CAP60, CAP59 e CAP10 (JANBON *et al.*, 2004). A função primária desta estrutura deve, provavelmente, auxiliar na sobrevivência do *Cryptococcus* no ambiente. A este respeito, a cápsula é essencial para a sobrevivência em amebas, que é um dos prováveis predadores destes fungos no solo. A cápsula também pode fornecer proteção substancial contra a dessecação, e é essencial para a formação de biofilmes criptocócicas (MCFADDEN *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, têm sido realizados vários estudos relacionados à filogenética e genotipagem de *C. neoformans* e *C. gattii*. Um esquema de tipagem multilocular foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa em *Cryptococcus* da Sociedade Internacional de Micologia Animal e Humana para genotipagem e análise filogenética de *C. neoformans* e *C. gattii* (MEYER *et al.*, 2009). Esse processo de tipagem multilocular incluiu os seguintes *loci* do genoma fúngico: CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5, e a região de IGS1. Um aspecto interessante dessa abordagem é que três desses genes estão relacionados a fatores de virulência para o *Cryptococcus*: CAP59 (cápsula polissacarídica), LAC1 (síntese de melanina), e PLB1 (fosfolipase B).

Com relação às características genotípicas de *C. neoformans*, foram descritos até o momento, três principais genótipos: VNI / VNB, VNII, e VNIV. Para o *C. gattii* foram descritos quatro principais genótipos: VGI, VGII, VGIII, e VGIV (MEYER *et al.*, 2009). Os genótipos do complexo *C. neoformans/gattii* são mostrados de forma resumida na **figura 7**.

Figura 7. Características genótípicas das espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* com suas variações



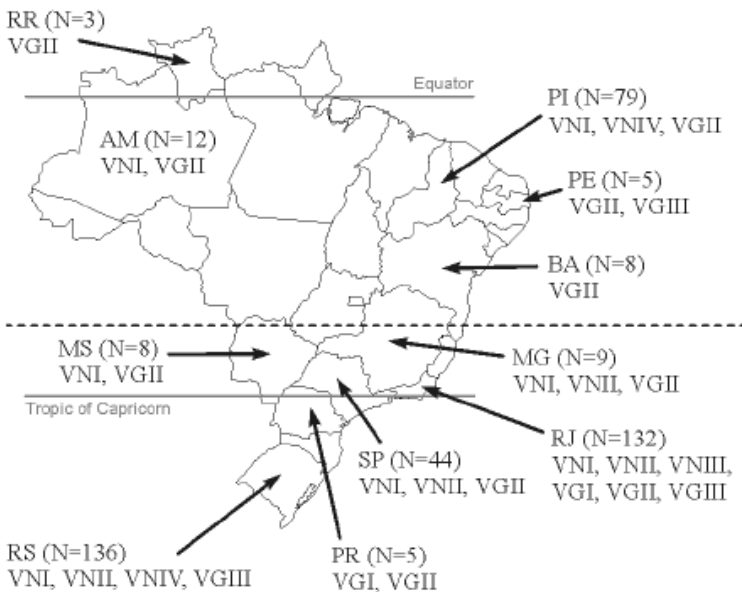
Fonte: Adaptado de CHATURVEDI *et al.*, 2011.

Estudos prévios atestam que o genótipo VNI de *C. neoformans* está fortemente associada à ocorrência de Aids em todo o Brasil com maior incidência no sul e sudeste. Este resultado pode ser explicado pelo fato que estas regiões incluem as maiores cidades do país, onde as ações antrópicas são mais evidentes (CASALI *et al.*, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2007; RIBEIRO, NGAMSKULRUNGRO, 2008; TRILLES *et al.*, 2008). Por outro lado, a criptococose causada por *C. gattii* VGII ocorre esporadicamente nessas regiões, principalmente detectado como casos isolados provenientes das regiões Norte e Nordeste (HORTA *et al.* 2002; NISHIKAWA *et al.*, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2007; TRILLES *et al.* 2008, MORA *et al.* 2010; apud MARTINS *et al.*, 2011).

Em trabalho realizado nas regiões Brasileiras Trilles *et al.*, (2008) estudaram sobre a distribuição dos diferentes tipos moleculares de 443 isolados brasileiros de *Cryptococcus*

neoformans e *Cryptococcus gattii* para determinar a sua distribuição geográfica nos seguintes estados: AM: Amazonas; BA: Bahia; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo, e obtiveram os seguintes dados que podem ser observados na **figura 8**:

Figura 8. Mapa com os diferentes tipos moleculares e o número de amostras obtidas em cada estado.



Fonte: Adaptado de TRILLES *et al.*, (2008).

No geral, os tipos moleculares mais comuns encontrados foram: VNI (64%) e VGII (21%), seguido por VNII (5%), VGIII (4%), e VIG VNIV (3% de cada), e VNIII (<1%) o tipo molecular VGIV não foi identificado entre os Isolados brasileiros. Neste estudo, duas grandes tendências epidemiológicas foram

identificadas no Brasil: *C. gattii* predominantemente ocorreu em NM (Macro região do Norte) que é composta pelos estados do Amazonas, Roraima, Pernambuco, Piauí e Bahia, e *C. neoformans* predominantemente ocorreu em SM (Macro região Austral) que englobam os estados de Mato Grosso do Sul , Minas Gerais , São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, estes estados demonstraram infecções esporádicas por *C. gattii* (TRILLES *et al.*, 2008).

Nas diferentes regiões brasileiras, *C. neoformans* foi isolado de madeira em decomposição, em árvores tropicais, nativas ou introduzidas no Brasil (LACAZ *et al.*, 2002; LAZÉRA *et al.*, 2000; 1996;). A presença do fungo em excretas de pombos e de aves tem sido explicada pelo fato de que estas servem de meio seletivo para *C. neoformans* na natureza, por conter alto conteúdo de substâncias nitrogenadas, tais como a creatinina (LUGARINI *et al.*, 2008; ABEGG *et al.*, 2006; FILIÚ *et al.*, 2002).

Uma das diferenças entre *C. neoformans* e *C. gattii* está no seu nicho ecológico. O *Cryptococcus gattii* está mais associado a ocos de árvores e madeira apodrecida, especialmente o eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*). No entanto, outras 54 espécies de árvores atuam como hospedeiros de *C. gattii* como, por exemplo, os gêneros *Ficus* e *Terminalia*. Sua “dispersão” ocorre pela exportação de madeira das áreas nativas onde está disseminado, além de correntes de ar e água, bem como pássaros, alguns mamíferos e insetos. O *C. gattii* pode sobreviver em água doce e salgada por longos períodos, expondo os mamíferos marinhos, como os botos (REISS *et al.*, 2012).

Na década de 1990, durante o surto que ocorreu na ilha de Vancouver e áreas próximas no Canadá e nos EUA, o genótipo *C. gattii* VGIIa / VGIIc emergiu como um patógeno primário, ilustrando que a espécie não está presente apenas em regiões tropicais e subtropicais, mas também em outras áreas geográficas, incluindo aqueles com climas temperados. Este surto mostrou que a exposição a fontes ambientais, tais como árvores e solos contaminados por esta levedura, pode levar a infecção (criptococose) em humanos e animais (FAVALESSA *et al.*, 2014).

O *C. neoformans* tem uma distribuição global, sendo uma espécie cosmopolita. Está associado a fezes de pombos misturadas com poeira do solo e provoca infecção por meio da

inalação de pós e aerossóis contendo a levedura com produção de basidiósporos (esporos) (REISS, *et al.*, 2012). O ciclo de vida de *C. neoformans* permite que este fungo tenha flexibilidade adicional na adaptação às mudanças de ambientes, na geração fenotípica e plasticidade genotípica (LIN *et al.*, 2006).

Cinco sorotipos são reconhecidos atualmente por *Cryptococcus neoformans/gattii*: A, B, C, D, e AD. A distinção entre esses diferentes sorotipos baseia-se na reação imunológica ao anti-soro produzida contra o polissacarídeo e diferentes componentes da cápsula da levedura. O sorotipo AD foi classificado como um híbrido diplóide de A e D sorotipos e a formação de híbridos dentro de *C. neoformans* e populações *C. gattii* pode gerar diversidade genotípica e fenotípica, com linhagens que podem ocupar novos nichos ecológicos. Estudos recentes, utilizando polimorfismo de DNA AFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados), demonstraram que as diferenças genéticas entre variedades de *Cryptococcus* são suficientes para classificá-los em duas espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii* (LEITE *et al.*, 2012; AMINNEJAD *et al.*, 2012).

Para a cultura das amostras coletadas nos diferentes trabalhos, foi utilizado ágar-Sabouraud, geralmente incubados a temperatura de 25°C e 37°C, mas o crescimento do fungo é melhor a 30°C, a termotolerância máxima é de 40°C. Nestas condições, a levedura cresce facilmente, formando colônias brilhantes, viscosas e úmidas, com tonalidade creme (LACAZ *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2006; LUGARINI *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2012; FILIÚ *et al.*, 2002; LAZÉRA *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2006; CORREA *et al.*, 1999; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE; 2008).

A diferenciação entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, foi obtida fenotipicamente através do uso do meio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Este meio tem pH 5,8 e, com o crescimento do fungo, o pH do meio aumenta, o que é revelado pelo azul de bromotimol que altera a coloração do meio de amarelo esverdeado, para azul cobalto. Alguns isolados de *C. neoformans* são capazes de assimilar a glicina, mas são sensíveis à L-canavanina, não havendo, portanto, crescimento e nem alteração da coloração do meio (LACAZ *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2006; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Ainda, com relação às diferenças fenotípicas entre *C. neoformans* e *C. gattii*, Sorrel *et al.* (2001) em trabalho de revisão sobre *C. gattii*, mostrou que esta variedade é genética e bioquimicamente diferente do *C. neoformans*, produzindo uma fosfolipase B tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SORREL *et al.*, 2001).

Foram utilizados por alguns pesquisadores, meios de cultura específicos para o crescimento de *C. neoformans*, que produz a enzima fenoloxidase, capaz de oxidar substâncias fenólicas presentes nos meios de cultivo preparados com extratos vegetais (cenoura, batata) ou sementes (*vicia fava* ou *Guizotia abyssinica*), produzindo um pigmento de cor escura semelhante à melanina (LACAZ *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2006).

Em todos os artigos analisados, a principal técnica disponível para estudar a cápsula do *C. neoformans*, foi a microscopia de campo claro após coloração, pois a cápsula não é visível sem tinta da china, porque seu índice de refração é semelhante ao de meios aquosos. No entanto, a cápsula é facilmente visualizado como um halo branco que separa a célula a partir de o fundo escuro de partículas da tinta e, esta técnica simples tem sido crucial para muitos estudos da cápsula (MCFADDEN *et al.*, 2006; CORREA *et al.*, 1999; IGREJA *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2012; FAVALESSA *et al.*, 2014; LACAZ *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2010).

A análise dos resultados fenotípicos e genotípicos no Brasil, do gênero *Cryptococcus* spp. em diferentes nichos ecológicos tem a pesquisa realizada no estado do Rio de Janeiro, onde *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, que foi repetidamente isolado a partir de madeira em decomposição, nas cavidades de árvores vivas que crescem em áreas urbanas do Rio de Janeiro, no Brasil. O estudo foi realizado em trinta e uma espécies diferentes de árvores vivas em áreas urbanas. Foram selecionadas quatorze árvores no campus da FioCruz e dezessete no norte da cidade. Sessenta e duas coletas foram realizadas por raspagem da madeira em decomposição no interior das cavidades e da casca exterior dos troncos. Oito dos 31 ocos de árvores produziram colônias de *C. neoformans* var. *neoformans*. Cinco árvores, *Cassia rosa* (*Cassia grandis*), *Cássia amarela* (*Senna multijuga*) e duas figueiras (*Ficus microcarpa*). Ocos de árvores vivas fornecem ambiente, úmido e provavelmente, menos exposta a alterações climáticas.

Recentemente, *C. gattii*, foi isolado a partir de casca e madeira detritos recolhidos no oco de *Eucalyptus tereticornis*. Os autores mostraram que *C. neoformans* var. *neoformans* não está associada a alguma árvore em particular, mas sim com um nicho especializado, resultante da biodegradação natural da madeira que fornece um substrato favorável para o seu crescimento (LAZÉRA *et al.*, 1996).

Lazéra (2000), em estudo na cidade de Teresina, no estado do Piauí, coletadas amostras de 32 ocos de árvores vivas e semeadas em meio de ágar niger (NA). A identificação de *C. neoformans* foi baseada em testes fisiológicos e morfológicos. O meio de Canavanina-glicina-azul de bromotimol foi utilizado para pesquisar a variedades e *Cryptococcus*. Um total de 123 colônias castanho escuro foi recuperado a partir de meios NA, todas identificadas como *C. neoformans*. Os autores sugeriram que *C. neoformans* var. *neoformans*, uma vez estabelecido nestas cavidades, se reproduz melhor do que *C. gattii*. Pela primeira vez, *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo A) e *C. gattii* (Sorotipo B) foram encontrados compartilhando o mesmo habitat, estabelecendo assim, uma possível ligação entre eles em seu ciclo de vida na natureza e um nicho natural primário para as espécies.

Filiú (2002); Abegg (2006) e Lugarine (2006), fizeram pesquisa com aves, em distintas regiões do Brasil, entretanto, nos estudos realizados pode-se observar, que a espécie *C. neoformans* tem íntima associação com algumas espécies de aves, como relatado por Abegg, no estado do Rio Grande do Sul. Nestes estudos, constatou-se que das 59 espécies de aves em cativeiro, mantidas nas gaiolas em um Jardim Zoológico, foram obtidos 38 isolados ambientais de *C. neoformans* a partir de *Psittaciformes* (*Psittacidae*, *Cacatuidae* e *Psittacula*). 33 isolados (87%) eram da var. *grubii*, sorotipo A, tipo molecular VNI, e 5 (13%) de *C. gattii* sorotipo B, tipo molecular VGI.

Filiú, obteve 20 amostras das quais, 10 (50%) das amostras foram positivas para *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* sorotipo A, correspondentes a três locais, comprovando a ocorrência saprofítica de *C. neoformans* na cidade de Campo Grande, relacionado a habitat de aves em cativeiro. Dezesesseis amostras obtidas em seis lojas de aves, uma delas obtida em uma escola, uma obtida em um domicílio, e duas oriundas de raspados de excretas encontradas em solo, em

ambiente aberto. Na cidade de Campo Grande, foram observadas elevadas concentrações do fungo, até 46.000 propágulos viáveis por grama de material seco, refletindo a existência de fontes ambientais na forma de microfocos deste fungo. Nestes locais a levedura pode se dispersar no ar e, subseqüentemente, inalado.

Lugarini, no Paraná, analisou 141 amostras ambientais de *Passerine* e *Psittacine* (108 de *Passerine*, 32 de aves *Psittacine*, e um de uma gaiola contendo tanto a ordem de aves). Dezenove amostras fecais foram coletadas de aves em cativeiro, em pet shops localizados na cidade de Curitiba, Paraná e 122 amostras coletadas de aves em Centro de Triagem de Animais Silvestres (Cetas) PUCPR / IBAMA, localizado em uma Cidade vizinha, Tijucas do Sul, Estado Paraná, que eram em sua maioria aves de companhia de tráfico ilegal. *C. neoformans* foi isolado a partir de 34 (24,11%) e duas amostras de *Passerine* (1,42%), com uma ocorrência global de 25,53%. *C. neoformans* é geralmente isolado a partir de excrementos de aves, enquanto que *C. gattii* não é tipicamente isolado. O número de amostras positivas foi significativamente maior para *Passerine* do que para aves *Psittacine*; Excrementos secos são substratos favoráveis, porque têm um menor número de bactérias viáveis e menos competição biótica. Assim, é mais provável que haja um elevado número de *C. neoformans* do que em fezes úmidas.

Leite (2012), realizou pesquisa em uma Biblioteca no estado do Mato Grosso do Sul, na cidade de Cuiabá, com 84 amostras coletadas de poeira de livros, oito (21,4%) foram positivos para *Cryptococcus* sp, totalizando 41 UFC (Unidade de colônia formadora). Foram encontradas diferentes espécies de *Cryptococcus* dentre eles *C. gattii* em 15 amostras (36,6%) e *C. neoformans* em três amostras (7,3%). Este estudo demonstrou o potencial de se adquirir infecção por criptococose de poeira nas bibliotecas.

Apesar de numerosas técnicas moleculares terem sido aplicadas para identificar os subtipos das cepas *C. neoformans* e *C. gattii*, apenas três métodos foram comprovadas para produzir resultados comparáveis: **PCR fingerprinting** (Reação em Cadeia da Polimerase), **AFLP** (Polimorfismo de Comprimento Fragmentado e Amplificado), e **MLST** (Tipagem de Sequência Multilocular) (COGLIATI *et al.*, 2013).

A PCR *fingerprinting* é baseada na amplificação de sequências de DNA flanqueadas por repetições simples de DNA que são usadas como oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) simples na PCR (COGLIATI *et al.*, 2013). *Fingerprinting* de cepas de *Cryptococcus* recuperado *in vitro* e *in vivo* ao longo do tempo mostram que genótipos evoluem de forma diferente, dependendo do meio ambiente (LIN *et al.*, 2006).

O método AFLP é baseado na digestão de amostras de DNA com uma rara e frequente enzima endonuclease de corte, combinada com a amplificação usando um adaptador que cria especificidade nos sítios de restrição. As etapas subsequentes da PCR são capazes de selecionar um perfil único de acordo com o número de nucleotídeos adicionados aos *primer*. Fragmentos marcados com fluorescência são separados por um sequenciador capilar automatizado e visualizados como um perfil de bandas virtuais. A aplicação dessa técnica para a tipagem do *Cryptococcus* requer a digestão com enzimas de restrição MseI e EcoRI e amplificação com os dois primers seletivos MseI-G e EcoRI-AC (COGLIATI *et al.*, 2013).

MLST é uma técnica de tipagem baseada em análises de sequência de um conjunto de loci polimórficos. A combinação de diferentes tipos alélicos dos loci selecionados determina o genótipo MLST (COGLIATI *et al.*, 2013). Para Mitchell & Litvintseva (2010), a maioria dos métodos de digitação pode ser usada para identificar estirpes individuais, desde que se utilizem controles adequados e protocolos padronizados. No entanto, os métodos variam em estabilidade, reprodutibilidade e custo (MITCHELL; LITVINTSEVA, 2010).

As características epidemiológicas de infecções causadas *Cryptococcus* têm sido extensivamente estudadas em todo o mundo. Infelizmente, poucos estudos moleculares têm sido realizados no Brasil e a ausência de um sistema de comunicação eficiente, restringe a compreensão do dado clínico e epidemiológico assim como dificuldades em se realizar o diagnóstico correto de espécies e variedades (MARTINS *et al.*, 2011).

Na **tabela 2**, podem ser observadas algumas pesquisas realizadas em cidades brasileiras, com pacientes que apresentavam diagnóstico para criptococose, sendo obtidos alguns dados quanto ao fenótipo e genótipo das espécies de *Cryptococcus*, que estão no contexto a seguir.

Tabela 2. Análise dos resultados fenotípicos e genotípicos no Brasil, do gênero *Cryptococcus* spp em pacientes. **Fonte:** Karine Benitez Ramos.

Local	Nº de pacientes	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
Belém (PA)	78	19	59
Rio de Janeiro (RJ)	28	25	03
Minas Gerais (MG)	96	89	07
Teresina (PI)	63	37	24
Bahia (BA)	62	49	13
Cuiabá (MT)	27	17	10
TOTAL	354	236	116

Historicamente, a criptococose foi descoberta, descrita e estudada através de sua face oportunística, associada a sarcoma, linfomas, uso de corticóides, uso de drogas imunossupressoras em hospedeiros transplantados e atualmente

é uma das principais co-morbidades associadas à Aids. Epidemiologicamente, mostra-se como um marcador de hospedeiros com imunodeficiência celular (LAZÉRA *et al.*, 2005). A percepção da importância da criptococose por *C. gattii* é crescente; se antes era vista como problema restrito a grupos populacionais rurais ou nativos, atualmente identifica-se sua ocorrência em diversas regiões onde surjam condições laboratoriais para o diagnóstico e discriminação das espécies de *Cryptococcus* (LAZÉRA *et al.*, 2005).

A descrição de alguns surtos regionais de criptococose é mostrada nas tabelas 2. Onde foi realizada pesquisa na cidade de Belém, estado do Pará, por Corrêa (1999). A esse respeito, no Brasil, nos últimos anos, tem sido observado um incremento nos relatos de criptococose em crianças, sendo que em 29 casos relatados, verificou-se a variedade fúngica em cinco pacientes, dois dos quais estavam infectados por *C. gattii*. O aumento na incidência desta infecção fúngica na infância pode ser atribuído a migração da população rural para a área urbana, principalmente em áreas de desmatamento da Região Amazônica, onde predomina *C. gattii*, conforme foi verificado neste estudo, bem como consequência de desnutrição ou imunodeficiência adquirida (CORRÊA *et al.*, 1999).

Em um período de sete anos, 19 dentre 79 (24%) pacientes com criptococose, hospitalizados em Belém, foram crianças menores de 13 anos, de idade. Em nove (47%) das 19 crianças foi estabelecida como agente causador da micose *C. gattii*. Todos os pacientes apresentavam comprometimento do sistema nervoso central (SNC). Febre e cefaléia foram achados constantes. Rigidez da nuca e vômitos foram observados em 13 (68%) pacientes. Outras queixas: sinais e sintomas respiratórios em dez (53%); alterações visuais em nove (47%). Os pacientes foram tratados com anfotericina B e, em 11 deles, foi associada a 5-fluorocitosina. Fluconazol foi associado em dez dos pacientes. Seis pacientes foram a óbito e 13 apresentaram melhora clínica. Esse achado sugere que o Estado do Pará constitua uma região de alta endemicidade da criptococose por *C. gattii* (CORREIA *et al.*, 1999).

Nos pacientes avaliados com Aids, em estudo prospectivo realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, estado de Minas Gerais, entre março de 1998 e novembro de 2003, em 96 pacientes com diagnóstico

clínico e laboratorial de criptococose, sendo 81,3% portadores de AIDS. *C. neoformans* foi isolado em diferentes amostras, sendo 77% em líquido cefalorraquidiano. A variedade *neoformans* foi isolada em 89 casos e *C. gattii* em sete. A meningoencefalite criptocócica (56,3% dos casos), foi a manifestação clínica mais frequente, seguida de fungemia (13,5%). Entre os fatores de risco, a AIDS (81,3%) foi o mais comumente associado à micose. A pesquisa direta do fungo realizada em 121 amostras demonstrou o microrganismo em 98,3%, com cultura positiva para todas as amostras. Dos pacientes avaliados, 59,4% foram tratados com anfotericina B ou derivados triazólicos, sendo que 72,9% evoluíram para óbito, em particular os portadores de AIDS (62,5%) (MOREIRA et al., 2006).

Áreas urbanas em regiões brasileiras exibem a possibilidade que, pacientes imunocomprometidos, possam adquirir a infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* a partir de múltiplas fontes de inóculo em suas vidas. *C. neoformans* foi isolado a partir de dois grupos de pacientes com AIDS e criptococose no Rio de Janeiro, onde foram estudados por reação em cadeia da PCR *fingerprinting*, e amplificado aleatoriamente análise polimórfica DNA (RAPD). O primeiro grupo continha 60 isolados de série, obtido a partir de 19 pacientes por períodos que variam de 18 a 461 dias; a intenção era determinar se a linhagem original persistiu ou se reinfecção com uma nova estirpe ocorreu. O segundo grupo foi composto por 22 isolados de 11 pacientes, e consistiu de um par de isolados recolhidos de sangue e líquido cefalorraquidiano de cada paciente antes ou logo após o tratamento ser iniciado. O objetivo era determinar se o paciente foi infectado por diferentes estirpes simultaneamente. Todos os isolados foram subtipados por PCR *fingerprinting*, usando minissatélite (M13) e microssatélite [(RPDC) e quatro (GTG) 5] *primers* específicos e análise de RAPD empregando o *primers* combinados 5SOR e CN1. A maioria dos isolados foram *C. neoformans* var. *grubii*, especificamente, os tipos moleculares VNI ou VNII, mas numerosos subtipos foram encontrados. Apenas três isolados foram *C. gattii* (genótipos VGI ou VGII). Exceto em dois casos, todos os isolados obtidos a partir de um mesmo paciente apresentaram perfis idênticos PCR, independentes do tempo de isolamento ou local do corpo. Os resultados confirmam que a infecção criptocócica é causada pela recaída em vez de

reinfeção, mas mostram também que, em casos excepcionais, pacientes podem ser infectados com mais do que uma estirpe de *C. neoformans* (IGREJA *et al.*, 2004).

Em todo o Brasil, *C. neoformans* é a causa da criptococose, e *C. gattii* é endêmico e prevalente nos estados do Norte e Nordeste. No estudo, realizado no estado do Piauí, na cidade de Teresina, foram analisados os tipos moleculares de 63 isolados, coletados a partir do líquido cefalorraquidiano de pacientes diagnosticados com meningite entre 2008-2010. Dos 63 pacientes avaliados, 37 (58,7%) eram positivos para HIV e 26 (41,3%) eram negativos para HIV. Análise de restrição do polimorfismo de fragmentos (RFLP) identificou 37/63 (58,7%) isolados como sendo *C. neoformans* genótipo VNI, predominantemente em pacientes de HIV positivos (32/37, 86,5%) e 24/63 (38,1%). Também foi identificado *C. gattii* VGII, principalmente em pacientes HIV-negativos (21/26, 80,8%). A ocorrência de *C. gattii* VGII em seis crianças aparentemente saudáveis e em sete adolescentes / adultos jovens nesta região reafirma a ocorrência endêmica da criptococose primariamente causada por *C. gattii* VGII e infecção criptococótica humana em pacientes com idade mais jovem. A letalidade ocorreu em 18/37 (48,6%) dos indivíduos HIV - positivos e em 13/26 (50%) dos pacientes HIV – negativos. Os resultados fornecidos no estudo trazem novas informações sobre a epidemiologia molecular de *C. neoformans* e *C. gattii* em algumas áreas endêmicas brasileiras (MARTINS *et al.*, 2011).

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica que afeta seres humanos e animais, principalmente devido a *C. neoformans* e *C. gattii*. Na sequência da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), infecções fúngicas por *C. neoformans* têm se tornado mais comum entre pacientes imunocomprometidos. *C. gattii* foi primeiramente isolado como um patógeno primário em hospedeiros saudáveis e ocorre endemicamente nas regiões Norte e Nordeste Brasil. Os isolados de pacientes HIV-positivos e HIV-negativos atendidos em hospitais universitários na cidade de Cuiabá, Mato Grosso do Sul, na região Centro-Oeste do Brasil, foram avaliados quanto ao seu genótipo e perfil de suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas. A metodologia utilizada para identificar espécies do fungo foi: cultivo em meio CGB (ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol) e genotipagem por URA5-RFLP (fragmentos de DNA

gerados por enzima de restrição). As drogas antifúngicas testadas foram anfotericina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol e voriconazol. As concentrações inibitórias mínimas (MICs) foram determinadas de acordo com a metodologia do CLSI M27-A3 e os resultados encontrados nas amostras de *C. neoformans*, VNI (17/27, 63,0%) e *C. gattii*, VGII (10/27, 37,0%). As CIMs observadas para as drogas antifúngicas foram: anfotericina B (0,5-1 mg / L), fluconazol (1-16 mg / L), flucitosina (1-16 mg / L), itraconazole (0,25-0,12 mg / L) e voriconazol (0,06-0,5 mg / L). Isolados de *C. neoformans*, VNI foram predominantes em pacientes com HIV / AIDS, e *C. gattii*, VGII em pacientes HIV-negativos. Os genótipos identificados foram susceptíveis aos antifúngicos testados. Sendo assim, é importante ressaltar que VGII é um genótipo predominante que afeta indivíduos HIV-negativos em Cuiabá. Estes resultados serviram como orientação a respeito da epidemiologia molecular de *C. neoformans* e *C. gattii* no Estado de Mato Grosso (FALAVESSA *et al.*, 2014).

Para determinar os perfis de susceptibilidade a antifúngico e os genótipos de isolados clínicos de *Cryptococcus* no estado da Bahia. Sessenta e dois isolados foram obtidos de casos de meningite no período de 2006 a 2010. Sua sensibilidade ao fluconazol, itraconazol, anfotericina B e 5-flucitosina foi determinada pela técnica de microdiluição e por fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição (RFLP). *C. neoformans* foi responsáveis por 79% da levedura identificada e *C. gattii* representado os 21% restantes. Na avaliação dos genótipos, os autores observaram que todas as amostras de *C. gattii* isolados eram do genótipo VGII, e 98% dos isolados de *C. neoformans* eram do genótipo VNI. A avaliação da susceptibilidade antifúngica revelou a existência de isolados resistentes ao fluconazol (4,8%), 5-flucitosina (1,6%) e anfotericina B (3,2%). A estratificação dos resultados de sensibilidade para cada espécie mostrou diferenças significativas na susceptibilidade aos azólicos. Este estudo é o primeiro a descrever os perfis de susceptibilidade dos isolados moleculares e clínicos de *Cryptococcus* na Bahia. A alta porcentagem de *C. gattii* isolados pertencentes para o genótipo VGII e sua menor susceptibilidade aos antifúngicos destaca a importância de se conhecer as espécies envolvidas em infecções criptocócicas no nordeste do Brasil (MATOS *et al.*, 2012).

Calvo M. (1999, 2001), estudou os perfis de suscetibilidade de diversas drogas antifúngicas bem como a cariotipagem eletroforética de amostras de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii* isoladas no Brasil, Chile e Venezuela, para determinar perfis segundo as variedades e sorotipos dessa levedura, de acordo com a área geográfica e eventual presença de infecções pelo vírus HIV. De 100 amostras estudadas, 89 foram identificadas como *C. neoformans* var. *neoformans*. Seis dos 11 isolados de *C. gattii* procediam da região sul do Brasil. *C. neoformans* var. *neoformans*, foi considerado o agente da criptococose mais prevalente e apresentou elevada suscetibilidade à anfotericina B, fluconazol, intraconazol e 5 FC. Apesar de pequenas diferenças de suscetibilidade antifúngica exibidos pelas duas variedades de *C. neoformans*, a maioria dos isolados foi sensível para vários fármacos testados.

A estrutura genética única de *C. neoformans* também contribui para a geração de polimorfismo. O genoma deste fungo é particularmente rico em elementos repetitivos, o que é incomum para um microorganismo. A expansão de elementos de repetição num genoma poderia produzir recombinação e instabilidade genômica, causando alterações no nível genômico, como as duplicações, deleções, translocações, inversões e mutações (LIN *et al.*, 2006). Segundo Franzot *et al.*, a existência de variabilidade genética é importante porque pode traduzir-se em variabilidade fenotípica, tais como diferenças antigênicas, virulência ou na suscetibilidade aos agentes terapêuticos (FRANZOT *et al.*, 1997).

A escolha do esquema terapêutico deve considerar a disponibilidade dos agentes antifúngicos, o sítio anatômico da infecção e o estado imune do hospedeiro, assim como diagnóstico rápido e o pronto estabelecimento da terapia antifúngica (GRAYBIL *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002, REISS *et al.*, 2012).

Se os fenótipos morfológicos ou bioquímicas de um isolado são atípicos, os métodos moleculares podem ser usados para estabelecer a identificação. Os marcadores moleculares podem ser utilizados para determinar a estrutura e modos de reprodução de populações e subpopulações de *C. neoformans* e *C. gattii*. Estas informações têm importância para a saúde pública, tendo em vista a capacidade do microorganismo se adaptar rapidamente às mudanças ambientais, hospedeiros,

antibióticos e antimicrobianos (BROWNLEE *et al.*, 1996; MITCHELL *et al.*, 2010).

5. CONCLUSÃO

Cryptococcus neoformans difere do *Cryptococcus gattii* sob vários aspectos, dentre eles, observa-se a distribuição geográfica, onde foi constatado maior endemismo em certas regiões Brasileiras, como na Macro região Austral (SM), com tipos moleculares predominantes, VNI e VNII, enquanto que *Cryptococcus gattii*, gerou maior endemismo nas regiões Brasileiras, na Macro região do Norte (MN), com tipos moleculares predominantes VGII e VGIII.

Para chegar a nível de espécie, a maioria das pesquisas utilizaram o mesmo critério nas culturas, com o CBG : Canavanina-glicina-azul de bromotimol, que de uma maneira rápida e eficaz converte o meio de cultura, revelando qual é a espécie, juntamente é claro, com os métodos de genotipagem, PCR fingerprinting (Reação em Cadeia da Polimerase), AFLP (Polimorfismo de Comprimento Fragmentado e Amplificado), MLST (Tipagem de Sequência Multilocular) e RFLP (Fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição), para uma maior precisão.

Quanto ao nicho ecológico e habitat de cada espécie, parece-me claro que estes organismos estão dividindo o mesmo espaço, entretanto, deve-se levar em conta as condições ambientais favoráveis, para ambas espécies crescerem, isto, foi demonstrado em alguns trabalhos no Brasil abordados na pesquisa, ressaltando a importância de se realizar estudos mais concretos para o monitoramento e dispersão do fungo.

Fatores de virulência do *C. neoformans* e *C. gatti* são desencadeadores dos processos patogênicos, no decorrer da criptococose. Os aspectos fenotípicos, tais como diâmetro de cápsula, hidrólise de ureia, atividade fenoxidase e produção de melanina, contribuem para a virulência do fungo, e requerem maiores estudos, pois, estes proporcionam barreiras eficazes contra ação dos medicamentos utilizados no tratamento dos pacientes.

Maiores investimentos em pesquisa são necessários para que se possa desenvolver métodos mais sensíveis e específicos para identificar corretamente as espécies, variedades e tipos que existem dentro do complexo *Cryptococcus*

neoformans/gattii, para que se possa realizar um diagnóstico mais preciso e precoce da criptococose, minimizando assim a alta morbidade e mortalidade desta micose.

6. REFERÊNCIAS

ABEGG, Maxwel Adriano et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, n. 2, p. 83-91, 2006.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996.

AMINNEJAD, M. *et al.* Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 337-346, 2012.

BARONI, F. A. **Espécies de *Cryptococcus neoformans* isolados de torres de igreja na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil**. 2001. 150f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2001.

BOEKHOUT, T., THEELEN, B., DIAZ, M., *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology** 2001; 147: 891-907.

BROWNLEE, A.G. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **J Clin Microbiol** 34: 1253–1260, 1996.

BUCHANAN, K.L.; MURPHY, J.W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? **Emerging Infectious Diseases**, 4(1): 71-83, 1998.

CALVO, M. *et al.* Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **J Clin microbiol**, v. 39, n. 6, p. 2348-2350, 2001.

CASALI, A.K.; GOULART, L.; ROSA, E. *et al.* - Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates

in the Brazilian State Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res.**, 3:405-415, 2003.

CHANG, Y.C., PENOYER, L.A. Properties of various Rho1 mutant alleles of *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**;182(17):4987-91, 2000.

CHATURVEDI, S., RODEGHIER, B., FAN, J., *et al.* Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **J Clin Microbiol**; 38(5): 2007-9, 2000.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S.. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends in Microbiol**, v. 19, n. 11, p. 564-571, 2011.

CHUCK, S. L.; SANDE, M. A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **New Engl J Med.**, 321 (12): 794-799, 1989.

COGLIATI, M.. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, 2013.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, 41, (5): 524-544, 2008.

COX, Gary M. *et al.* Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000

DARZE, C., LUCENA, R., GOMES I., MELO, A. Características clínicas e laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Rev Soc Bras Med Trop** 33: 21-26, 2000.

DIGNANI, M.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E.J. *Candida*. In: ANAISSIE, E.J.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M. **Clinical mycology**. 2nd ed. Elsevier: Amsterdam, 2009.

FAVALESSA, O. C. *et al.* Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 1037-1043, 2014.

FILIÚ, W. *et al.*, Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 6, p. 591-595, 2002.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: Evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2243-2251, Sept. 1997.

GRAYBILL, J. R. *et al.* Antifungal compounds: controversies, queries and conclusions. **Medical mycology**, v. 38, n. Supplement 1, p. 323-333, 2000.

GOMES, F. S. *et al.* Chemotype determination and phenotypic characterization of isolated *Cryptococcus* from Belém, Pará State, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, p. 43-49, 2010.

HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. ***Cryptococcus* from human pathogen to model yeast**. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2011. 620p.

HORTA, J. A., STAATS, C. C., CASALI, A. K., *et al.* Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Med Mycol**;40(6):565-71, 2002.

IGREJA, R. P. *et al.* Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Medical Mycology**, v. 42, n. 3, p. 229-238, 2004.

JANBON, Guilhem. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 8, p. 765-771, 2004

KOZEL, T.R. Non-encapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. II. Surface receptors for cryptococcal polysaccharide and their role in inhibition of phagocytosis by polysaccharide. **Infect Immun**, 16(1): 99–106, 1977.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (eds). The yeasts, a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNET, J.E. **Medical Mycology**. 1st ed. Philadelphia: Lea & Febider, 1992.

KWON-CHUNG, K.J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, 67 (6): 1197–200, 1975.

LACAZ, C.S.; PORTO; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACARI, E.M.; MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz.9^a ed. São Paulo: SARVIER, 2002.

LAZÉRA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **J Med Vet Mycol**, v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.

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

LAZÉRA, M. S. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 379-383, 2000.

LAZÉRA, M.S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; CAVALCANTI, M.A.S.; WANKE, B. Criptococose. In: COURA J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Vol II. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p.1223-1235, 2005.

LEITE, D.P. et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2012.

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. **Infect Immun**;69(1):115-22, 2001.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.

LUGARINI, C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* isolated from *Passerine* and *Psittacine* bird excreta in the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, n. 2, p. 61-69, 2008.

MARTINS, L.M.S. *et al.* Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]**. 2011, vol.106, n.6, pp. 725-730. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/sci-hub.org/10.1590/S0074-02762011000600012>.

MATOS, C. S. *et al.* Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 7, p. 1647-1652, 2012.

MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; BAEZA, L.C.; MELHEM, M.S. & MENDES-GIANNINI, M.J. - Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 49:41-47,2007.

MCFADDEN, Diane; ZARAGOZA, Oscar; CASADEVALL, Arturo. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 11, p. 497-505, 2006.

MEYER W., AANENSEN D.M., BOEKHOUT, T., *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med Mycol** 47: 561–570, 2009.

Microhabitat in Brazilian libraries. Journal of Occupational Medicine and Toxicology; 2012, 7:11. <http://www.occup-med.com/content/7/1/11>

MITCHELL, T. G. & PERFECT, J. R. **Cryptococcosis in the era of AIDS -100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans***. *Clin Microbiol Rev.*, 8 (4): 515-548, 1995

MITCHELL, T.G.; LITVINTSEVA, A.P; **Typing Species of *Cryptococcus* and Epidemiology of Cryptococcosis**; Department of Molecular Genetics and Microbiology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA; 2010.

MORA D.J., PEDROSA, A.L., RODRIGUES, V. *et al.* .Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol.**;48(4):561-9, 2010.

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. 2006. Criptococose: estudo clinico-epidemiologico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Rev Soc Bras Med Trop**, **39(3)**: 255-258.

NISHIKAWA, M.M., LAZERA, M.S., BARBOSA, G.G. *et al.* Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J Clin Microbiol.**;41(1):73-7, 2003.

OLIVEIRA, W.F.; LAZÉRA, M.; WANK, B.; AGUENA, S.M.; VILELA, V.O.; MECEDO, R.C.L. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online]. 2002, vol.35, n.6, pp. 591-595. ISSN 1678-9849. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822002000600008>.

PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. D. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **FACIDER-Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2012.

REISS, E.; SHADOMY, H. J.; LYON III, G. M.; **Fundamental medical mycology**; NEW JERSEY; 2012.

REOLON, Aline; PEREZ, Leandro Reus Rodrigues; MEZZARI, Adelina. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 5, p. 293-8, 2004.

RIBEIRO, M.A.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 50(6): 315-320, 2008.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes Infect.**, 1(4): 293-301, 1999.

SEVERO, L.C. Criptococose: duas doenças? [tese]. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre; 1993.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: GUANABARA-KOOGAN, 2004.

SORRELL, T.C., ELLIS, D.H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Rev Iberoam Micol.**;14(2):42-3, 1997.

SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol.** 39(2):155-68, 2001.

SORRELL, T.C., CHEN, S.C., RUMA, P. *et al.* *Cryptococcus*. In: ANAISSIE, E.J.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M. **Clinical mycology**. 2nd ed. Elsevier: Amsterdam, 2011.

STEENBERGEN, Judith N.; CASADEVALL, Arturo. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and infection**, v. 5, n. 7, p. 667-675, 2003.

TRILLES, L. *et al.* Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [online]. 2008, vol.103, n.5, pp. 455-462. ISSN 1678-8060. <http://dx.doi.org/sci-hub.club/10.1590/S0074-02762008000500008>.

VIVIANI, M.A., TORTORANO, A.M. Cryptococcosis. **In: ANAISSIE, E.J., MCGINNIS, M.R., PFALLER, M.A. Clinical Mycology**. 2th ed. Springer. 2009.