DIANA COSTA NASCIMENTO

"Ocorrência de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* em cloaca e inglúvio de papagaios do gênero *Amazona aestiva*"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

DIANA COSTA NASCIMENTO

"Ocorrência de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* em cloaca e inglúvio de papagaios do gênero *Amazona aestiva*"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Nascimento, Diana Costa.
Ocorrência de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* em cloaca e inglúvio de papagaios do gênero *Amazona aestiva* / Diana Costa Nascimento. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia ambiental.

Versão do título para o inglês: Occurrence of yeast belonging to the genus *Cryptococcus* in cloaca and crop of parrots of the genus *Amazona estiva*.

1. *Cryptococcus* 2. *Cryptococcus albidus* 3. *Cryptococcus laurentii* 4. *Amazona aestiva* 5. Cloaca 6. Microbiologia ambiental I. Paula, Profa. Dra. Claudete Rodrigues II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB01/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Diana Costa Nascimento.

Título da Dissertação: Ocorrência de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* em cloaca e inglúvio de papagaios do gênero *Amazona aestiva.*

Orientador(a): Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **127** nas fls. **109** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Claudette Rodrigues de Paula**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Levantamento de leveduras patogênicas do gênero Cryptococcus isoladas do inglúvio e cloaca de papagaios Amazona sp"* do qual participam o(s) aluno(s) **Diana Costa Nascimento,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **29.08.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 30 de agosto de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26668-1	Data da Emissão: 04/01/2011 12:25

Dados do titular

Nome: Diana Costa Nascimento	CPF: 317.320.088-84
Título do Projeto: Levantamento de leveduras patogênicas dos gêneros Cryptococcus e Candida isolados do inglúvio e cloaca de papagaios Amazona sp.	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Swab de cloaca e lavado de ingluvio	12/2010	07/2011
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JUNDIAI	SP	Sítio Joseph Moutran	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Amazona aestiva

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Regurgitação/conteúdo estomacal, Fezes

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 68267196

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26668-1	Data da Emissão: 04/01/2011 12:25

Dados do titular

Nome: Diana Costa Nascimento	CPF: 317.320.088-84
Título do Projeto: Levantamento de leveduras patogênicas dos gêneros Cryptococcus e Candida isolados do inglúvio e cloaca de papagaios Amazona sp.	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	Universidade de São Paulo

SISBIO

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 68267196

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26668-1	Data da Emissão: 04/01/2011 12:25

Dados do titular

Nome: Diana Costa Nascimento	CPF: 317.320.088-84
Título do Projeto: Levantamento de leveduras patogênicas dos gêneros Cryptococcus e Candida isolados do inglúvio e cloaca de papagaios Amazona sp.	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 68267196

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me deu a vida, a oportunidade, a perseverança e a coragem necessária para a caminhada;

À minha mãe, Ester de Souza Costa do Nascimento, e ao meu pai, Djalma do Nascimento, minhas riquezas, por sempre estarem ao meu lado, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelo amor e por acreditarem em minha capacidade;

Ao meu marido, Hugo Alexandre de Campos, eterno companheiro, pela paciência, pelas alegrias, pelo incentivo, pelo companheirismo, pela amizade, pela força, por simplesmente todo o amor.

À Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula, grande orientadora e a quem ouso chamar de amiga, por ser um exemplo de força, de simplicidade, de dedicação, de bondade, de generosidade.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a **Deus**, por me carregar no colo nas horas difíceis, por me dar amor, por me dar força em todos os momentos; e por colocar pessoas **tão iluminadas** e **amadas** no meu caminho;*

*À minha mãe, **Ester**, e ao meu pai, **Djalma**, por todo o amor; incentivo, proteção, carinho e por ensinarem os verdadeiros valores da vida, sem os quais minha caminhada certamente seria inviável;*

*Ao meu marido e eterno companheiro **Hugo**, por todo o amor, amizade, carinho, dedicação. Seu apoio foi crucial para realizar essa travessia.*

*Às minhas amadas irmãs **Ana Claudia**, **Ana Paula**; aos meus cunhados queridos **André** e **Milton;** e aos meus sobrinhos (as) por todos os bons momentos vividos, por todo o incentivo e companheirismo;*

*À **Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula**, por ter aceitado me orientar, por acreditar em mim, por me ensinar a cada segundo e por ser um exemplo de vida, de amor, de perseverança;*

*Ao meu eterno mestre e amigo querido **Prof. Dr. Reinaldo B. Orsi**, por todo o apoio, amizade, ensinamentos, força; companheirismo e puxões de orelha;*

*Aos meus professores queridos e eternos mestres **Me. Marcelo F. S. Castro** e **Dr.Paulo Anselmo Nunes Felippe** pelo apoio, dignidade e amizade;*

*Ao **Prof. Dr. Caio Biasi** e à Profa. **Dra. Marta C. P. Luppi** pelo apoio e incentivo de sempre;*

*À minha amiga querida **Jessyka Farrah Fernandes Campos**, pela grande e antiga amizade, apoio e carinho;*

*À **Bianca Silva Navarro**, pelo companheirismo, auxílio e pela amizade;*

*À minha amiga querida **Clarissa Conde**, pela amizade de tantos anos, carinho e apoio*

*Aos meus colegas de laboratório, **Vanessa, Pedro, Bruno, Débora, Carol, Wanderson, Maria Cecília e Ériques** pelos bons momentos, apoio e ensinamentos;*

*Ao **Carlos Augusto da Silva**, meu amigo querido e grande companheiro nas alegres e esperadas horas do café;*

*À **Bete, Gisele, Naíde, Bruno** pela atenção e serviços prestados;*

*Ao pessoal do setor de esterilização, em especial ao **"Sr. Zé"** (José G. S. Filho), pela atenção de sempre;*

*À **Universidade de São Paulo** por me acolher e por tornar essa caminhada viável;*

*À **CAPES** pelo incentivo financeiro*

*À **todos** aqueles que participaram de alguma forma dessa etapa de minha vida, e que deixaram sua valiosa contribuição;*

*Aos **animais**, minha fonte de inspiração, de paz e de alegria;*

Muito obrigada!!

Diana Costa Nascimento

"Pouco conhecimento faz com que as criaturas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento faz com que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe."

Leonardo Da Vinci

RESUMO

NASCIMENTO, D. C. **Ocorrência de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* em cloaca e inglúvio de papagaios do gênero *Amazona aestiva.*** 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Este trabalho teve como objetivo realizar o isolamento de leveduras do complexo *Cryptococcus* a partir da cloaca e do inglúvio de papagaios do gênero *Amazona aestiva.* Essas aves estão cativas em um criatório particular localizado na cidade de Jundiaí, São Paulo. Para a realização das coletas, as aves foram anestesiadas, e em seguida foi realizado lavado do inglúvio e coleta de material da cloaca. As amostras coletadas foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, de onde foram isoladas colônias leveduriformes. Por meio de análises macro e micromorfológicas, os isolados condizentes com as características do gênero *Cryptococcus* foram submetidos às provas bioquímicas: produção de urease, produção da fenoloxidase, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, fermentação de glicose, semeadura em ágar CGB (L-Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol). Testes de suscetibilidade aos antifúngicos e pesquisa de exoenzimas (proteinase e fosfolipase) foram também realizados. Das amostras isoladas das 40 aves, todas foram provenientes da cloaca. Dos isolamentos, 90% das cepas corresponderam à espécie *C. albidus* var. *albidus*, e 10% corresponderam à espécie *C. laurentii*. Na pesquisa de exoenzimas, 80% dos isolados foram produtores de fosfolipase e 100% foram produtores de proteinase. Estes resultados sugerem que não só o ambiente, como também as aves podem ser carreadoras de *Cryptococcus albidus*. É possível observar muitos estudos acerca de aves sinantrópicas, como pombos; contudo, se faz de extrema necessidade mais estudos envolvendo aves silvestres, que também podem servir de reservatórios e disseminadores de leveduras no ambiente.

Palavras-chave: *Cryptococcus albidus. Cryptococcus laurentii*. Criptococose. *Amazona aestiva*. Microbiologia ambiental.

ABSTRACT

NASCIMENTO, D. C. **Occurrence of yeast belonging to the genus *Cryptococcus* in cloaca and crop of parrots of the genus *Amazona aestiva*.** 2012. 93 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

This work had the purpose to isolate the yeasts from the *Cryptococcus* complex from the cloaca and the crop of parrots of the genus *Amazona aestiva*. These birds are captive in a private nursery located in the city of Jundiai, Sao Paulo. To carry out the sampling, the birds were anesthetized to perform a lavage of the crop and the collection of material from the cloaca. The samples were inoculated on Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol, which were isolated from yeast colonies. Through macro and micromorphological analysis, isolates consistent with the characteristics of the genus *Cryptococcus* were subjected to biochemical tests: production of urease, phenol oxidase production, assimilation of carbon and nitrogen, glucose fermentation, and sowing CGB agar (L-Canavanine, Glycine, Blue Bromothymol). Antifungal susceptibility testing and research exoenzymes (proteinase and phospholipase) were also performed. Of strains isolated from 40 birds, all were from the cloaca. Of the isolates, 90% of the strains corresponded to the species *C. albidus* var. *albidus*, and 10% corresponded to the species *C. laurentii*. In research of exoenzymes, 80% of the isolates were producing phospholipase and 100% were producing proteinase. These results suggest that there is not only an environmental source but also birds can be *Cryptococcus albidus* carriers. It is possible to observe many studies concerning synanthropic birds such as pigeons, however, there is extreme need for further studies involving wild birds, which may also serve as reservoirs and disseminators of yeast in the environment.

Keywords: *Cryptococcus albidus*. *Cryptococcus laurentii*. Cryptococcosis. *Amazona aestiva*. Environmental Microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Histórico de leveduras pertencentes ao complexo patogênico de *Cryptococcus* 16
1.2 Taxonomia e micologia do complexo patogênico de *C. neoformans* 17
1.3 Aspectos gerais do gênero *Cryptococcus* e as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* 18
1.3.1 Ecologia e epidemiologia 20
1.3.2 Fatores relacionados à virulência produzidos por leveduras do gênero Cryptococcus 26
1.3.2.1 Cápsula 26
1.3.2.2 Melanina 27
1.3.2.3 Fosfolipase 28
1.3.2.4 Proteinase 28
1.3.2.5 Termotolerância a 37°C 29
1.4 Técnicas moleculares para a identificação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* 29
1.5 *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner (1947) 29
1.5.1 Características micromorfológicas e laboratoriais de cada variedade 30
1.5.2 Ecologia e epidemiologia 33
1.6 *C. laurentii* (Kufferath) C. E. Skinner (1950) 36
1.6.1 Características micromorfológicas e laboratoriais 36
1.6.2 Ecologia e epidemiologia 37
1.6.3 Controle biológico 40
1.7 Patogenia da infecção causada por leveduras do gênero *Cryptococcus* 41
1.7.1 Homem 41
1.7.2 Animais 43
1.8 Tratamento de eleição para afecção causada por leveduras do gênero *Cryptococcus* 46
2 OBJETIVOS 48
2.1 Objetivo geral 48
2.2 Objetivos específicos 48
3 MATERIAL E MÉTODOS 49

3.1 Animais e local de coleta 49
3.2 Processamento do material coletado 53
3.3 Isolamento e identificação das leveduras 54
3.3.1 Exame direto 54
3.3.2 Teste de produção de urease 54
3.3.3 Teste de produção de fenoloxidase 54
3.3.4 Produção de fosfolipase 55
3.3.5 Produção de proteinase 55
3.3.6 Inoculação em meio contendo Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) 56
3.3.7 Zimograma 56
3.3.8 Auxanograma *57*
3.3.9 Crescimento a diferentes temperaturas 57
3.3.10 Diferenciação molecular – Protocolo da Fundação do Instituto Oswaldo Cruz (RJ) 57
3.3.10.1 PCR 58
3.3.10.2 PCR-RFLP 58
4 RESULTADOS 59
4.1 Isolamentos 59
4.2 Fatores relacionados à virulência 60
4.2.1 Expressão da cor da colônia em meio contendo dopamina 60
4.2.2 Expressão da produção de urease 61
4.2.3 Produção de fosfolipase 62
4.2.4 Produção de proteinase 62
4.3 Tipagem bioquímica das cepas 63
4.3.1 Inoculação em meio contendo Canavanina – Glicina - Azul de Bromotimol 63
4.3.2 Zimograma e auxanograma 63
4.4 Crescimento a 30 °C e 37 °C 64
4.5 Diferenciação molecular (como método de exclusão para *C. neoformans* e *C. gattii*) 64
5 DISCUSSÃO 65
6 CONCLUSÕES 75
REFERÊNCIAS 76
ANEXO – Meios de cultura 89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico de leveduras pertencentes ao complexo patogênico de *Cryptococcus*

O primeiro relato de criptococose foi descrito por Zenker em 1861, contudo, por não possuir evidências de cultura do microrganismo isolado, a descoberta foi questionada. Otto Busse, um patologista que estava trabalhando no Instituto de Patologia da Universidade de Greifswald, na Alemanha, observou corpúsculos ovais obtidos da lesão de sarcoma da tíbia em uma mulher de 31 anos. O microrganismo foi isolado em cultura e sua patogenicidade foi confirmada através da inoculação na pele de um paciente, que morreu em decorrência da disseminação da infecção. Buschke, um físico que tomava conta do paciente, cultivou o patógeno da erupção cutânea e considerou que se tratava de um coccídeo. Na Itália, no mesmo ano, Francesco Sanfelice, isolou uma levedura encapsulada do suco de pêssego e a nomeou de *Saccharomyces neoformans*, comprovando sua patogenicidade através de inoculação animal (HEITMAN et al., 2011).

No ano de 1885, Sanfelice reconheceu a similaridade entre *S. neoformans* e a levedura isolada por Busse (HEITMAN et al., 2011) e em 1901, Vuillemin descreveu que o termo *Saccharomyces* seria inadequado, já que não havia formação de ascósporos e nem fermentação nesses isolados, transferindo-os para o gênero *Cryptococcus* previamente estabelecido por Kutzing em 1833 (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010).

Em 1902, Frothinghan reconheceu a patogenicidade da levedura através da lesão pulmonar em um cavalo, em Massachusetts; sendo esse relato importante para demonstrar a capacidade de causar doença tanto em humanos quanto em animais.

No ano de 1905 é descrito o primeiro caso humano de meningoencefalice, com lesões císticas e gelatinosas, nas quais era possível observar a levedura em abundância (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010). Outras descrições de meningoencefalite foram relatadas por Verse, em 1914; e por Stoddard e Cutler, em 1916, nomeando o fungo causador de *Torula histolytica* (HEITMAN et al., 2011).

Em 1935, Benham realizou um estudo com 22 cepas patogênicas e outras não patogênicas isoladas de humanos (inclusive os isolados de Busse), e baseando-se nas observações morfológicas, patológicas e sorológicas, a autora concluiu que todos os isolados eram, provavelmente, uma espécie; *C. hominis*, e compreendia duas variedades. Em 1950 Benham propôs que o nome torulosi e torula meningite fosse renomeada para criptococose e que o nome *Cryptococcus neoformans* fosse conservado (HEITMAN et al., 2011).

Em 1970 Gattii e Eeckels isolaram no Zaire uma cepa de *C. neoformans* de uma criança de sete anos com meningoencefalite. Vanbreuseghen e Takashio (1970) relataram que o isolado produzia células alongadas "*in vivo*" e na cultura; e se assemelhava a um isolado de *C. neoformans*. Esse atípico isolado foi descrito como uma nova variedade e foi nomeado *C. neoformans* variedade *gattii*. Contudo, Kwon-Chung et al. (1978) determinaram que *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* diferiam consideravelmente nas características morfológicas, bioquímicas e sorológicas, e que o isolado do Zaire era idêntico a uma cepa teleomórfica de *Filobasidiella bacillispora*. Esse achado indicou que *C. neoformans* var. *gattii* era sinônimo de *C. bacillispora*; e em 2002 este último foi renomeado como *C. gattii* (HEITMAN et al., 2011).

No Brasil, os primeiros relatos de criptococose foram nos anos de 1941 e 1944, através de descrições de Carlos da Silva Lacaz e de Floriano de Almeida (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Em fezes de pombos, a primeira descrição foi de Emmons, em 1954 (SWINNE-DESGAIN, 1975).

1.2 Taxonomia e micologia do complexo patogênico *C. neoformans*

Lázera, Igreja e Wanke (2010) afirmam que as leveduras do gênero *Cryptococcus* podem apresentar reprodução sexuada (teleomórfica) ou assexuada (anamórfica) no seu ciclo de vida. De acordo com Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), no estado teleomórfico, o complexo *C. neoformans* e *C. gattii* é classificado em:

Reino Fungi

Filo Basidiomycota

Ordem Tremellales

Família Tremellaceae

Gênero *Filobasidiella*

Espécies:

- *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (sorotipo A e D) no estado teleomórfico e *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A e D) no estado anamórfico;

- *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (sorotipos B e C) no estado teleomórfico e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) no estado anamórfico.

Os membros dos gêneros *Cryptococcus* são considerados leveduras produtoras de urease, reativas ao azul de diazônio B, não fermentadoras, assimiladoras de inositol; sendo que a assimilação de carboidratos varia de acordo com a cepa pesquisada (KURTZMAN;

FELL, 1998). Existem cerca de 70 espécies de *Cryptococcus* no total (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011) e essas podem ser encontradas em uma ampla variedade de ambientes (HEITMAN et al., 2011).

Segundo Pfaller; Mcgginnis e Anaissie (2009), o complexo patogênico de *Cryptococcus* é representado por leveduras encapsuladas heterotálicas que produzem basidiósporos em condições experimentais. Durante a fase haploide de seu ciclo de vida, essas leveduras crescem em meios de cultura de rotina (ágar Sabouraud dextrose), desenvolvendo-se em cerca de 48 a 72 horas. De acordo com Gompertz et al. (2008), em meio de cultura, o fungo apresenta desenvolvimento rápido, crescendo de três a sete dias, colônias úmidas, brilhantes, mucóides; cuja cor varia de branco-creme ao amarelo-marrom. Possuem forma esférica, e ao microscópio podem ser observadas células de diferentes tamanhos devido à sua reprodução por brotamento. É possível recuperar o fungo em inoculações intracerebrais em camundongos jovens.

A capacidade de formar pseudo-micélio ou micélio verdadeiro é ausente nas células haploides (LACAZ et al., 1998). Em laboratório estas leveduras crescem em meios sólidos na temperatura ambiente ou a 37 °C, sendo que temperaturas elevadas podem matar o fungo (KURTZMAN; FELL, 1998).

1.3 Aspectos gerais do gênero *Cryptococcus* e as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*

O gênero *Cryptococcus* apresenta cerca de 70 espécies (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011), sendo sua maioria de vida livre.

Dentre as espécies clinicamente mais importantes pode-se citar *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. *Cryptococcus neoformans* é um dos maiores responsáveis por causar a criptococose humana e animal, atingindo principalmente indivíduos imunologicamente comprometidos, submetidos a corticoterapia prolongada, neoplasias linfoproliferativas ou sarcomas, neutropênicos, diabéticos insulinodependentes, indivíduos com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS), sob tratamento imunossupressor ou transplantados (BARONI et al., 2006; BICANIC; HARRISON, 2005; CASADEVALL; PERFECT, 1998; DARZÉ et al., 2000; JOHNSON et al., 1998; LACAZ et al., 2002; LEAL, 2006; MONTENEGRO; PAULA, 2000; PEDROSO; CANDIDO, 2006; SEVERO, 1993).

Rodriguez et al. (2007) realizaram um relato de criptococose em pacientes com transplante renal de 64 anos que trabalhava em uma granja e apresentou meningoencefalite

em seis meses de tratamento imunossupressor. Após realização de diagnóstico através de antígenos de *Cryptococcus*, iniciou-se o tratamento com anfotericina B com posterior mudança para fluconazol até os exames microbiológicos negativarem.

Pandit et al. (2006) descreveram um caso de meningite criptocócica e criptococose pulmonar em um paciente não infectado pelo vírus da AIDS. Em sua descrição, o paciente acabou contraindo a infecção pela levedura secundariamente ao tratamento com esteroides contra um quadro de polimiosite. Lambertucci, Franco e Queiroz (2005) descrevem quadro semelhante, no qual um paciente sem imunodeficiências ou outras morbidades associadas, chegou ao hospital apresentando febre, cefaleia, náuseas, fotofobia e vômito. Após a punção lombar foi diagnosticada a presença de *C. neoformans*, cujas lesões mais tardiamente foram visualizadas na região de crânio com auxílio de uma tomografia computadorizada. O tratamento foi baseado em anfotericina B, que foi substituída por fluconazol quando o paciente apresentou sintomas de nefrotoxicidade. Posteriormente, com o retorno dos sintomas da doença, a droga foi trocada novamente por anfotericina B com melhora do quadro.

Na Argentina, Garro e Bava (2006) isolaram *Cryptococcus neoformans* a partir de amostras provenientes do conteúdo gástrico de um paciente HIV positivo. Os autores relatam que na amostra foi possível observar, após o exame com tinta da China, poucas leveduras com o formato arredondado e cápsula característica. Procedeu-se com a identificação laboratorial e exame complementar de pesquisa de antígeno polissacarídico capsular a partir do sangue do paciente, que resultou em positividade. Este trabalho evidenciou que, apesar de um evento raro, a levedura também pode ser encontrada em conteúdo gástrico.

Tanto as defesas do hospedeiro quanto os fatores de virulência do agente devem ser considerados no mecanismo da enfermidade (OLIVEIRA, et al., 2008). No caso de imunocompetentes, a espécie clinicamente mais importante é a *C. gattii* (BICANIC; HARRISON, 2005; LEVITZ; BOEKHOUT, 2006; SEVERO, 1993).

De acordo com Pappalardo e Melhem (2003), em humanos a criptococose é mais frequente em adultos, podendo também afetar as crianças. O aumento de casos da síndrome da imunodeficiência adquirida foi acompanhado pelo aumento da incidência da doença. Moreira et al. (2006), afirmam que a afecção é considerada a doença oportunista com maior morbidade e mortalidade entre os pacientes soropositivos.

Dados do Ministério da Saúde apontam a criptococose como primeira manifestação oportunística em cerca de 4,3% dos casos de AIDS/SIDA no Brasil; sendo que, só na região Sudeste, a prevalência da doença associada à portadores do vírus da AIDS é de 8 a 12%

(LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010); o que a caracteriza como um patógeno importante na clínica médica.

1.3.1 Ecologia e epidemiologia

A primeira descrição de *C. neoformans* em excretas de pombos foi feita por Emmons (1955). Após este, vários outros autores documentaram a prevalência da levedura nas excretas dessas e de outras aves, em países diferentes. Carter (1988) descreveu que a levedura ocorre na natureza e alcança altas concentrações em filhotes de pombos e ninhos. A partir desses trabalhos pioneiros, muitos outros autores pesquisaram e encontraram a levedura nos mais variados sítios e localidades. De acordo com Lázera, Igreja e Wanke (2010), *C. neoformans* é cosmopolita, estando relacionado à "*habitats"* de pombos e ambientes urbanos, onde a disseminação é ampla e a exposição humana é um evento rotineiro. Além dos pombos, "*habitats"* de outras aves também podem ser reservatórios, principalmente àquelas relacionadas com a criação em cativeiro.

Filiú et al. (2002) realizaram um trabalho na cidade de Campo Grande, em Mato Grosso do Sul, no qual foram estudadas vinte amostras de fezes de aves em cativeiros; dessas, 50% das amostras foram positivas para *C. neoformans.* No Paraná, Lugarini et al. (2008) isolaram *Cryptococcus neoformans* de excretas de passeriformes e psitaciformes. Das 141 amostras coletadas, 25,53% foram positivas para a levedura, o que reforça a ideia de que as excretas de aves podem servir de reservatório em ambientes domésticos e públicos.

Na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Reolon, Perez e Mezzarl (2004), realizaram estudo no qual foram coletadas 88 amostras de excretas de pombos em diferentes praças da cidade. O material foi incubado a temperaturas entre 29 °C e 30,5 °C durante cinco dias em ágar Sabouraud dextrose, de onde foram isoladas colônias suspeitas da levedura que foram encaminhadas para o processo de identificação através de provas morfológicas como exame direto e prova da urease. Das 88 amostras analisadas, 100% foram positivas para *Cryptococcus neoformans* nos cinco ambientes estudados, o que demonstra sua presença e também a importância desses locais como fonte de transmissão da levedura.

No Nepal, Pal (1997) isolou *C. neoformans* na cidade de Kathmandu, o que demonstra a distribuição dessa levedura nessa parte do mundo. Após coletar 28 amostras de fezes secas de pombos de diferentes locais da cidade, sete apresentaram positividade para a presença da levedura. Em 2005, Chee e Lee realizaram um estudo sobre o isolamento de *C. neoformans* de excretas de pombos em Seoul (Korea). Nesse experimento, 72 amostras de excrementos de

pombos foram coletadas. Dezessete amostras de oito diferentes localidades foram positivas para a levedura.

Recentemente, em 2011, Hedayati et al. isolaram *C. neoformans* de fezes de *Hirundo rustica* (andorinha). Nesse estudo, 97 andorinhas foram estudadas e isoladas 498 colônias de leveduras; das quais 8,7% correspondiam a *C. neoformans*, o que leva a crer que as fezes podem servir como um importante meio de disseminação da levedura no ambiente. Pereira (2006a) realizou experimento com quatro amostras colhidas de excretas de jandaia mitrata (*Aratinga mitrata*) no zoológico do Rio de janeiro, sendo que uma se mostrou positiva para *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* sorogrupo AD.

Nielsen, Obaldia e Heitman (2007) realizaram um experimento cujo objetivo foi determinar o nicho ecológico de *C. neoformans* e *C. gattii*. Como resultados de seus experimentos, observaram que *C. neoformans* completa seu ciclo de vida nas fezes de pombos, enquanto que *C. gattii*, apesar de crescer, não completa seu ciclo nesse substrato. Nesse trabalho, existe a hipótese de adaptação de *C. neoformans* às fezes de pombos.

López-Martínez e Castañón-Olivares (1995), na cidade do México, isolaram *C. neoformans* de várias amostras ambientais. De 711 amostras analisadas, *C. neoformans* foi isolado em sete (9,5%) de 74 amostras de excretas de aves, sendo o papagaio citado como a fonte mais importante. Frutas foram positivas em 9,5% das 169 amostras estudadas. A partir de 468 amostras vegetais apenas 20 (4,2%) foram positivas.

Pal (2005) realizou pesquisa com papagaios mantidos em cativeiro, na qual foram coletadas 45 amostras de fezes, sendo consideradas 15 amostras secas (há mais tempo no ambiente) e 30 amostras frescas. *Cryptococcus neoformans* foi isolado a partir de nove amostras, das quais oito foram provenientes das fezes secas e uma foi proveniente das fezes frescas. Foi descrito ainda, que a incubação das amostras se deu a 25 °C e o cultivo foi realizado em meio contendo semente de girassol, já que no ágar Sabouraud dextrose houve rápida contaminação com fungos filamentosos, não possibilitando a recuperação das leveduras a partir deste meio.

Leveduras do complexo *Cryptococcus* também foram isoladas de amostras fecais provenientes de aves marinhas da Antarctica e sul da America por Chryssanthou et al. (2011). Foram coletadas 94 amostras fecais de aves selvagens, sendo que a identificação das espécies de leveduras foi realizada através de características morfológicas e kits comerciais de caracterização. Dentre as várias leveduras isoladas, estão *C. albidus* e *C. laurentii*.

Lugarini (2007) realizou um estudo com isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de passeriformes e psitaciformes no estado do Paraná. Neste trabalho, foram

coletadas 141 amostras de excretas dessas aves alojadas em gaiolas individuais, coletivas ou em aviários. Dessas, foram 119 amostras cloacais e 24 amostras de inglúvio; obtidas através da introdução de *"swabs"*. Das amostras de excreta, *C. neoformans* foi isolado de 34 (24,11%) amostras de passeriformes e 2 amostras (1,42%) de psittaciformes, totalizando 25,53% das amostras positivas. Nenhuma amostra da cloaca, do inglúvio ou do soro se mostrou positiva. Já os isolados ambientais (fezes) foram considerados *C. neoformans*; e devido a esse fato, esse achado nos remete à importância zoonótica da levedura no ambiente. Além disso, segundo a autora, *C. neoformans* não se mostra como um fungo endosaprobiótico do aparelho digestório de passeriformes e psittaciformes.

Em 2006, Baroni et al. isolaram *C. neoformans* de torres de igreja na cidade do Rio de Janeiro (Brasil). Dez torres foram selecionadas para a amostragem, sendo coletadas amostras de excretas de pombos, do ar das torres e das proximidades durante um ano. Nos resultados, pode-se observar a presença da levedura em todas as torres selecionadas, e das 219 amostras de fezes de pombos, 37,8% foram positivas. Dentre as amostras de ar 15 (4,9%) foram positivas e 98,8% de todas as amostras pertenciam a espécies *C. neoformans*.

Nosanchuk et al. (2000) confirmaram a possibilidade de transmissão de *Cryptococcus* a um paciente imunodeprimido a partir do isolamento da mesma nas fezes de uma cacatua contaminada com a levedura. As amostras do paciente e da ave foram submetidas a uma série de provas, as quais apresentaram igualdade nos resultados, o que evidencia contaminação antropozoonótica.

Estudos ambientais também demonstram a ocorrência natural da levedura colonizando ocos de árvores vivas, o que caracteriza um habitat natural e possível nicho ecológico relacionado à madeira em decomposição em diferentes árvores tropicais, nativas do Brasil ou introduzidas. Dentre as árvores citadas pelos autores, descreve-se a cássia rosa (*Cassia grandis*), cássia amarela (*Senna multijuga*), fícus (*Ficus microcarpa*), jambolão (*Syzygium jambolana*), cacaueiro (*Theobroma cacao*), cabori (*Miroxylum peruiferum*), sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010). Em seu trabalho, Escandón et al. (2005) confirmam que além das fezes das aves a levedura também pode ser isolada de fontes vegetais. Eles isolaram *Cryptococcus gattii* a partir de detritos de *Eucalyptus* spp. na Colombia. Neste trabalho, de 167 amostras, 46 apresentaram positividade para a levedura (27,5 %). Em inoculação das leveduras isoladas em camundongos, não se observou a morte dos mesmos. Lázera, Igreja e Wanke (2010) descrevem que, no caso de *C. gattii*, observa-se, predominantemente casos humanos em regiões tropicais e subtropicais, em indivíduos sem evidencia de imunossupressão. Essa espécie pode ser isolada de fonte

ambiental, em associação com *Eucalyptus*, madeira em decomposição, ocos de árvores tropicais de diferentes gêneros, na região Nordeste e na região Norte.

Lazera et al. (2000) investigaram na cidade de Teresina, Piauí, amostras de madeira em decomposição de 32 cavidades de árvores, que foram semeadas em ágar níger. Foi descrito o isolamento de 123 colônias de *C. neoformans* recuperadas a partir de amostras de seis (18,5%) das 32 cavidades pesquisadas. As variedades *C. gattii* e *C. neoformans* foram encontradas individualmente ou em conjunto, ou seja, compartilhando o mesmo nicho natural, o que pode sugerir um nicho primário para as espécies.

Em 2008, Baltazar e Ribeiro também realizaram pesquisa envolvendo isolamento ambiental no Estado do Espírito Santo com árvores, sendo coletadas 73 amostras de árvores localizadas em locais públicos, 47 amostras coletas de áreas preservadas ou com baixo impacto, e 48 árvores nativas das regiões norte e sul do estado. As amostras foram coletadas com auxílio de um "*swab"* e resultaram em dois (1,2%) isolados de *C. neoformans*, dois (1,2%) de *Cryptococcus gattii* e um (0,6%) de *Cryptococcus laurentii*. Segundo os autores, a espécie *C. gattii* foi encontrada somente em árvores nativas da região norte, enquanto que todas as outras amostras localizadas em área urbana não permitiram a detecção da levedura; o que demonstra uma possível relação entre a ocorrência de floresta nativa e *C. gattii*, e confirma a importância do meio ambiente como fonte de infecção do fungo.

Em 2005 Kobayashi et al. isolaram *Cryptococcus neoformans* de ambientes urbanos em Goiânia, Goiás. Foram coletadas 290 amostras de pombos, excretas de outras aves, solo, árvores ornamentais e material vegetal associado com árvores (*Eucalyptus*). Dessas, 20,3% das amostras de excrementos e 14,3% das amostras de *Eucalyptos* apresentaram a levedura.

Crestani (2007), em seu estudo relata um caso de criptococose disseminada em um indivíduo de 66 anos, do sexo masculino, HIV negativo, o qual residia e trabalhava em uma madeireira na cidade de Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul. A partir desse caso a autora iniciou pesquisa da levedura na madeireira através de coletas de amostras do ar, excretas de pombos e galinhas, serragem, pó de madeira, poeira, cascas e folhas de árvores do gênero *Eucalyptus*. De 40 sítios amostrais foram obtidos três isolados de *C. neoformans* e um isolado de *C. gattii* (dentre outras leveduras). As leveduras foram isoladas de pó de madeira, excreta seca de galinha e de pombo.

Na Itália, Mancianti, Nardoni e Ceccherelli (2001) relataram a ocorrência de leveduras de vários gêneros, como *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* em excretas de psitacídeos, contudo, de todas as amostras coletadas, não houve positividade para o gênero *Cryptococcus*. Assim também aconteceu na cidade de Votuporanga (São Paulo),

onde Rezende, Munhóz e Almeida (2008) realizaram uma investigação ambiental da levedura através das fezes das aves, frutas e detritos de plantas. Nessa investigação não foi constatada a presença da levedura do complexo *C. neoformans* após cinco dias da inoculação, o que requer maiores estudos, visto que essas são reconhecidamente fontes ambientais da mesma.

Santos et al. (2009) também não conseguiram identificar a levedura quando pesquisada em cloaca, coanas e excretas coletadas do fundo de gaiolas de passeriformes e psitaciformes. Nessa pesquisa, das 15 aves estudadas, foram obtidas 29 amostras que foram semeadas em ágar Sabouraud e ágar níger, mantidas a 30 °C por até 30 dias. Apesar de não isolarem leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, outras leveduras, pertencentes ao gênero *Candida* foram descritas, como *C. albicans*, *C. famata* e *C. tropicalis*.

Na grande maioria das vezes, essa levedura atinge o organismo do homem por via aerógena, sob a forma de células pequenas, não capsuladas, e sua patogenicidade está vinculada à produção da cápsula, que dificulta seu reconhecimento pelo sistema imunológico, e consequentemente, sua fagocitose (LACAZ et al., 2002).

A via de infecção mais importante no homem é a inalação de leveduras dessecadas, ou basidiósporos, com cápsula incipiente (CASADEVALL; PERFECT, 1998); que podem ser encontradas em construções, torres de igreja, praças, estábulos, celeiros e barracões (BARONI et al., 2006; PASSONI et al., 1998).

C. neoformans é ubíquo no meio ambiente urbano, sendo considerado um poluente aéreo que pode causar infecções com frequência em grande parte da população que entra em contato com o mesmo. Contudo, isso não acontece porque se trata de um agente oportunista cuja população tem demonstrado elevada resistência natural. Dentre os locais de onde pode ser isolado, destaca-se orofaringe, narinas, escarro, pele do interdígito de mãos e pés, sendo uma contaminação ou colonização transitória. Além da infecção pela via respiratória, também tem sido sugerido em pacientes com imunodepressão grave, a possibilidade de infecção progressiva a partir de sítios colonizados pelo fungo, como mucosa brônquica (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010).

Um importante fator predisponente ao desenvolvimento da criptococose é a presença do HIV, que debilita as defesas do corpo. Outros fatores são tão importantes quanto, como: desordens linfoproliferativas e terapias imunossupressivas (LEGGIADRO; BARRET; HUGUES, 1992). Pappas e Perfect (1999) afirmaram que, dentre os fatores predisponentes à criptocococse nos indivíduos sem o vírus da AIDS, em maior percentual, destacava-se a glicocorticoterapia, seguida de transplante de órgãos sólidos, síndrome da falência de órgãos,

diabetes mellitus, doenças reumatoides, doenças pulmonares crônicas, doenças hematológicas malignas e outras doenças malignas.

O sorotipo A é isolado mundialmente e é o mais frequente em pacientes com AIDS (BOTTONE et al., 1987; MITCHELL; PERFECT, 1995; RINALDI et al., 1986 ROZEMBAUM et al., 1990; SHIMIZU; HOWARD; CLANCY, 1986), sendo a variedade *gattii* extremamente rara em pacientes com HIV, mesmo nas áreas tropicais e subtropicais onde é encontrada.

No Brasil, a presença da doença pode ser confirmada através dos vários relatos de casos. Em 1999, Corrêa et al. relataram 19 casos de criptococose em crianças no estado do Pará. Desses, nove pacientes foram identificados com espécie *C. gattii*. A média de idade desses pacientes foi de 7,8 anos, sendo cinco meninas e quatro meninos. Cinco foram a óbito em três meses após o início dos sintomas, mesmo com tratamento com anfotericina B (associada com fluconazol ou fluocitosina). Os autores relataram que existe uma alta endemia dessa espécie de levedura na região, e normalmente os casos são de grande gravidade. Em Fortaleza, no Ceará, Menezes et al. (2002) estudaram 54 amostras de liquido cefalorraquidiano de pacientes portadores do vírus da AIDS, que foram submetidas a exame direto e à cultura em ágar Sabouraud dextrose a 37 °C. De todas as amostras, cinco (9,25%) foram positivas, e confirmaram a presença da levedura nessa área do país.

No hospital de Doenças Tropicais de Goiânia, Fernandes et al. (2000) coletaram amostras de liquido cefalorraquidiano de 50 pacientes com AIDS que apresentavam dor de cabeça, vômitos e febre ocasional. Foi realizado exame direto com tinta nankin e cultivo em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol a temperatura ambiente e a 37 °C. A identificação das colônias suspeitas se deu através do repique em ágar cenoura batata, ágar níger, meio de Christensen (para determinar a assimilação de uréia) e caracterização das variedades através da inoculação em meio de L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). De todas as amostras avaliadas, 47 (94%) foram identificadas como *C. neoformans* e três (6%) como *C. gattii*. De acordo com os autores, as amostras isoladas foram provenientes de indivíduos de diferentes estados do Brasil, sendo que três isolados de *C. gattii* e 17 de *C. neoformans* foram de pacientes habitantes do interior de Goiás, 23 isolados foram provenientes de pacientes de Goiânia e os sete restantes pertencentes a indivíduos do estado de Tocantins (01), Minas gerais (02), Pará (03) e São Paulo (01).

Paschoal et al. (2007) realizaram estudo retrospectivo envolvendo 452 amostras de liquido cefalorraquidiano provenientes de 183 pacientes com AIDS, internados em um Instituto de Infectologia na cidade de São Paulo, entre os anos de 1996 a 1999. Do total das

amostras pesquisadas, 446 (98,7%) apresentaram *C. neoformans*, e seis (1,3%) foram positivas para *C. gattii*. Este estudo evidencia a alta prevalência de *C. neoformans* em relação à *C. gattii*, bem como a presença destas leveduras nesse estado do país.

1.3.2 Fatores relacionados à virulência produzidos por leveduras do gênero Cryptococcus

De acordo com Buchanan e Murphy (1998), os fatores de virulência podem ser definidos como sendo um conjunto de propriedades peculiares aos microrganismos e que contribuem para o aumento do grau de patogenicidade dos mesmos. Dentre os fatores já conhecidos, destaca-se a formação de pigmentos melanínicos, formação da cápsula e produção de enzimas, como fosfolipase e proteinase (BARONI, 2001).

1.3.2.1 Cápsula

Gompertz et al. (2008) afirmam que o diagnóstico de uma infecção por leveduras do gênero *Cryptococcus* pode ser realizado através do exame microscópico de materiais clínicos (liquido cefalorraquidiano, pús, escarro), através da técnica de contraste pela tinta da China ou nankin que permite visualizar a cápsula da levedura. De acordo com Zaragoza et al. (2009), a cápsula é uma alteração morfológica e especializada que fornece benefício de sobrevivência durante o ciclo de vida do microrganismo. Elas são constituídas principalmente por polissacarídeos, sendo de extrema importância para a resistência em condições de estresse e interações com o ambiente onde se encontra. De Jesus et al. (2010) e Zaragoza et al. (2009) descrevem a cápsula como sendo primariamente composta por dois polissacarídeos, o glicoronoxilomanana (GXM) e o galactoxilomanana (GalXM), e uma pequena porção de mananoproteinas (MP), sendo o GXM mais amplamente estudado, correspondendo cerca de 90% da massa polissacaridica.

Em culturas e em tecidos, o fungo apresenta-se sob a forma de leveduras, e a cápsula polissacarídica inibe a fagocitose (GOMPERTZ et al., 2008).

O componente polissacáride capsular, uma vez no sistema nervoso central, produz meningoencefalite grave. Esses polissacarídeos inibem a fagocitose, consomem complemento, absorvem e neutralizam opsoninas e outros anticorpos protetores. Em alta concentração bloqueiam a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos e inibem a síntese de anticorpos. Esse fator é tão importante que, variantes genéticas sem cápsula de *C. neoformans* obtidas em

laboratório são incapazes de causar doença em animais inoculados (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010).

Experimentos laboratoriais demonstraram que amostras de *C. neoformans* sem capsula são facilmente fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, quando comparadas com as amostras capsuladas (SMALL; MITCHELL, 1986, 1989).

Dentre as técnicas que podem ser utilizadas para visualizar a cápsula, além da coloração com a tinta da China, pode-se citar reações capsulares resultando da ligação dos anticorpos aos polissacarídeos, imunofluorescência e microscopia eletrônica (CASADEVALL; PERFECT, 1998). É importante mencionar que o tamanho da cápsula é bastante variável entre cepas de diferentes espécies e entre células individuais da mesma cepa; o que depende das condições ambientais específicas (ZARAGOZA et al., 2009).

1.3.2.2 Melanina

Em 1962, Staib foi o primeiro a relatar que as colônias de *C. neoformans* crescidas em meio de *Guizotia abyssinica* produziam pigmento escuro em contraste com outras colônias de levedura. Essas leveduras são capazes de produzir a enzima fenoloxidase, que polimeriza, a partir de orto ou para-difenóis, compostos semelhantes à melanina. Em meios de cultivo com dopa ou dopamina, entre outras substâncias, *C. neoformans* apresenta-se com coloração marrom-escura à negra, devido à ação desta enzima, o que não ocorre com outras espécies do mesmo gênero e com outras leveduras como *C. albicans* (GOMPERTZ et al., 2008)

Williamson (1997) descreve que a melanina possui efeitos antioxidantes, protegendo as células e a parede celular da levedura contra a ação efetora mediada pela imunidade celular. A produção de pigmento melanínico também tem ação antifagocitária. Análises bioquímicas sugerem que a sua produção ocorre através da conversão de 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) à dopaquinona, sendo esta reação catalisada pela enzima fenoloxidase (lacase) gerando dopacromo, composto intermediário da reação. De acordo com esta via o dopacromo é descarboxilado e forma 5,6 dihidroxindol o qual sofrerá oxidação gerando o 5,6 indol-quinona tendo como produto final a polimerização da melanina (ITO, 1998; LIN; CHRISTENSEN, 1994; WILLIAMSON; WAKAMATSU; ITO, 1988). Heitman et al. (2011) descrevem que através da ação da fenoloxidase (especificamente uma lacase), substratos exógenos são oxidados a correspondentes quinino e passam por um rearranjo espontâneo por meio de polimerização sequencial, seguido de auto-oxidação para formar melanocromo e finalmente a melanina. Essa capacidade de síntese em meios contendo

compostos fenólicos é amplamente utilizada na identificação dessas espécies em laboratório (LIU; NIZET, 2009).

1.3.2.3 Fosfolipase

De acordo com Ghannoum et al., 2000, as fosfolipases são enzimas produzidas e secretadas por uma ampla variedade de microrganismos patogênicos como parte de seus fatores de virulência. Existem cinco classes de fosfolipases produzidas por microrganismos (A1, A2, B, C e D), o que depende do sítio de hidrólise das ligações éster fosfolipidicas (VAND DEN BOSCH et al., 1982). Dentre essas classes de fosfolipase produzidas, a fosfolipase B (PLB) e fosfolipase C (PLC) têm sido relacionadas à virulência de espécies de *Cryptococcus*. De acordo com Cox et al. (2001) e Siafakas et al. (2006), quando secretada no meio extracelular, a enzima tem a capacidade de hidrolizar fosfolipídeos do hospedeiro.

1.3.2.4 Proteinase

De acordo com Casadevall e Perfect (1998), as proteinases contribuem para a virulência dos microrganismos, degradando os tecidos do hospedeiro ou destruindo proteínas imunologicamente importantes. São enzimas produzidas por vários microrganismos, atuando em seu ciclo de infecção e também participando do catabolismo de proteínas. Podem agir tanto nas vias degradativas quanto nas vias biossintéticas, na liberação de hormônios peptídicos, na coagulação sanguínea, na morte celular e diferenciação de tecidos (CALDERONE, FONZI, 2001).

Em São Paulo, Vidotto et al. (2005) avaliaram 151 cepas de *C. neoformans* isoladas de portadores de HIV, sendo a maioria fortemente produtora no 8° dia de incubação a 37 °C, com valores de Pz entre 0,399 e 0,00 (80,79%). Também observaram a importância do tempo de incubação, pois até o quarto dia a maioria das cepas avaliadas tinha valores de Pz entre 0,699 e 0,40, que diminuíram no oitavo dia. Pereira (2006b) analisou 56 cepas isoladas de excretas de aves de Pet Shop, e verificou que 96% foram fortemente positivas para a produção desta enzima; assim como no estudo de Campos e Baroni (2010), o qual analisou cepas de *Cryptococcus* e observou que todas também eram produtoras ou fortemente produtoras para essa enzima. Alguns trabalhos também descrevem a não produção da susbtância, como no caso das amostras coletadas de excretas de pombos na cidade do Rio de Janeiro (BARONI, 2001).

1.3.2.5 Termotolerância a 37 °C

A capacidade de sobrevivência da levedura a essa temperatura é mediada por um gene que codifica a calcineurina A, uma serina-treonina com atividade catalítica envolvida nas respostas de estresse do microrganismo (ODOM et al., 1997).

Além do complexo patogênico de *C. neoformans* e *C. gattii*, outras leveduras do gênero vem sendo isoladas de casos clínicos, despontando *C. albidus* e *C. laurentii* como as responsáveis por cerca de 80% dos casos de criptococose nao-*neoformans* e não *gattii*. Espécies como *C. humicolus*, *C. uniguttulatus*, *C. magnus* também tem sido reportadas em casos clínicos e atraem o interesse da comunidade científica (AVERBUCH et al., 2002; PFALLER; MCGGINNIS; ANAISSIE, 2009).

Para *C. albidus* e *C. laurentii*, leveduras isoladas da cloaca e do inglúvios dos psitacídeos estudados, estamos dedicando uma revisão de literatura com informações pertinentes a cada uma.

1.4 Técnicas moleculares para a identificação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*

As espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* são divididas em oito tipos moleculares por reação de cadeia por "*polymerase chain (PRC) fingerprint*", "*amplification fragmente length polymorphism*" (AFLP), "*restriction fragmente length polymorphism*" (RFLP) e mais recentemente, "*mutilocus sequencing typing analyses*". Os tipos moleculares de *Cryptococcus neoformans* são VNI, VNII, VNIII e VNIV; já os tipos moleculares de *Cryptococcus gattii* são VGI, VGII, VGIII e VGIV. Resultados indicam que os genótipos VNI e VNII correspondem ao sorotipo A, VNIII ao sorotipo AD, e VNIV ao sorotipo D. No entando, VGI, VGII, VGIII e VGIV contém isolados de ambos os sorotipos (B e C) (BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004; BOEKHOUT et al., 2001; MEYER et al., 2003; SANTOS et al., 2008; SILVA et al., 2012).

1.5 C*ryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner (1950)

De acordo com Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), *Cryptococcus albidus* tem localização filogenética na linhagem dos Filobasidiales, possuindo três variedades: *C. albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *albidus* (1967), *C. albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *kuetzingii* (Fell

& Phaff) Á Fonseca, Scorzetti & Fell (2000) e *C. albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *ovalis* Sugiyama & Goto (1967).

Essa levedura consiste em um complexo de espécies, variabilidade que reflete em uma vasta sinonímia (FELL; STATZELL-TALMAN, 1998), sendo que estudos baseados nas características fisiológicas, bioquímicas e moleculares apontaram para a heterogeneidade das espécies de *C. albidus* (Saito) Skinner, com suas variedades e sinônimos (FONSECA et al., 2000).

Kwon-Chung et al. (2011) consideram a espécie um patógeno oportunista para o homem, compreendendo cerca de 80% dos casos de criptococose ocasionada por *Cryptococcus* não-*neoformans*. De acordo com Yang et al. (2011), *C. albidus* se caracteriza por ser uma levedura oportunista que causa infecção geralmente superficial, mas que pode promover infecções significantes em imunocomprometidos.

1.5.1 Características micromorfológicas e laboratoriais de cada variedade

- *C. albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *albidus* (1967)

Segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), esta variedade apresenta crescimento de colônias que variam de creme a rosadas, butirosas a cremosas, com moderado brilho e superfície lisa quando cultivadas em extrato de malte e em ágar extrato de levedura por duas semanas a 20 °C. Em meio YM caldo, depois de dois dias a 20 °C em cultura submetida a agitação, as células são subglobosas ou amplamente elipsoidais, 6.3-6.9 x 4.8-5.9 µm, ocorrem isoladas ou em grupos, e algumas células se apresentam refratárias. Após uma semana mantida em repouso, pode-se notar sedimento na cultura. De acordo com os autores, a fermentação é ausente e a formação de pseudohifas não ocorre após a inoculação em ágar fubá;

- *C. albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *kuetzingii* (Fell & Phaff) Á Fonseca, Scorzetti & Fell (2000)

Kurtzman, Fell e Boekhout (2011) descrevem que as colônias dessa variedade possuem coloração creme, sendo ligeiramente mucóides, com a superfície brilhante e lisa, quando cultivadas por duas semanas a 20 °C em ágar extrato de malte e ágar extrato de levedura. Em YM caldo, após dois dias a 20 °C em cultura submetida a agitação, as células são ovoides a elipsoidais, 5.8-6.9 x 3.8-4.9 µm, podendo ser visualizadas isoladas ou em grupo. É possível notar a presença de sedimento em culturas em repouso após uma semana do

cultivo. Dentre as características bioquímicas de assimilação de carboidratos, os autores destacam que essa variedade não assimila maltose, melezitose, L-rhamnose; e assimila L-tartarato, com crescimento a 35 °C negativo;

- *C. albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *ovalis* Sugiyama & Goto (1967)

Essa variedade apresenta colônias com coloração creme a amarelada, butirosas, ligeiramente brilhantes e com superfície lisa quando cultivada em ágar extrato de malte e ágar extrato de levedura. Quando inoculadas em YM caldo, após dois dias a 20°C em cultura sob agitação, as células são ovoides a amplamente elipsoidais, 5.8-6.8 x 4.2-4.7 µm, e podem ser visualizadas isoladas ou em grupo. Pode ser notada a presença de sedimento em culturas mantidas em repouso após uma semana da inoculação. Dentre outras características, pode-se destacar a capacidade de assimilar L-lisina, e de não assimilar amido solúvel e L-tartarato. Quando cultivadas a 35 °C, é possível notar crescimento da colônia (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Pesquisando leveduras do gênero *Cryptococcus* em amostras ambientais na Malásia, Tay, Na e Tajjudin (2008) isolaram *C. albidus* e *C. laurentii* e avaliaram que quando essas espécies foram inoculadas em ágar CGB (Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol), *C. albidus* não alterou a coloração do meio, enquanto que *C. laurentii* mudou a coloração do ágar de amarelo para azul-cobalto.

Avaliando a atividade fosfolipásica de leveduras isoladas a partir de aves selvagens, Cafarchia et al. (2008) realizaram pesquisa envolvendo 163 isolados de 13 espécies de leveduras. Os isolados de cloaca (48,1%) e de excreta (73,3%) produziram valores de atividade fosfolipásica alta após cinco dias de incubação. Dentre outras leveduras isoladas, *C. albidus* e *C. laurentii* apresentaram a maior atividade fosfolipásica após dois dias do tempo de pré-incubação, enquanto que *C. neoformans* após cinco dias de tempo de pré-incubação. Os autores descrevem que de acordo com os resultados do trabalho, os isolados de excreta mostraram um maior valor de atividade fosfolipásica do que os isolados da cloaca, indicando que as aves não agem somente como portadoras, mas também como disseminadoras de leveduras produtoras de fosfolipase no ambiente.

A produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* foi avaliada por Pedroso et al. (2007). Em seu trabalho, foram testadas 16 cepas de *C. neoformans*, 17 de *C. albidus*, 13 de *C. laurentii* e 2 de *C. uniguttulatus* nos meios ágar batata e cenoura, ágar alpiste, ágar semente de girassol e ágar L-dopa. A produção do pigmento foi demonstrada por 93,8% das cepas de *C. neoformans* em ágar batata e cenoura, ágar semente de girassol e ágar L-dopa. Dos

isolados de *C. albidus*, 29,4% produziram o pigmento em ágar batata e cenoura e L-dopa, 11,8% em ágar alpiste, e 36% em ágar girassol. No caso de *C. laurentii*, 53,8% produziram pigmento em ágar batata e cenoura e em semente de girassol, 61,5% em L-dopa, 84,6% em ágar alpiste. Somente uma cepa de *C. uniguttulatus* produziu pigmento fraco em ágar batata e cenoura. Os autores descrevem ainda que no caso de *C. albidus* e de *C. laurentii*, o pigmento só foi definido após oito dias de incubação, sendo que os meios ágar batata e cenoura, ágar semente de girassol e ágar L-dopa foram os que melhor evidenciaram a coloração, mesmo que bem menos intensa que a ocorrida com *C. neoformans.*

Ikeda et al. (2002) afirmam em seu trabalho que outras espécies de *Cryptococcus* podem apresentar produção de melanina, porém de forma menos pronunciada do que *C. neoformans* e *C. gattii*. Isso ocorre porque a atividade da enzima fenoloxidase é menor nas outras espécies de *Cryptococcus*, se comparada com *C. neoformans* e *C. gattii*. Menezes, Penatti e Pedroso (2011) também avaliaram a produção de melanina por *C. neoformans, C. laurentii* e *C. albidus* em vários meios de cultura acrescidos de metildopa na forma farmacêutica. Relatam em seu trabalho que *C. neoformans* apresentou coloração mais forte em um curto espaço de tempo se comparada com *C. albidus* e *C. laurentii*.

Pesquisando as características enzimáticas de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e outras leveduras ambientais do gênero, Chan e Tay (2009) afirmam que a maioria dos isolados exibiram atividade de proteinase e fosfolipase. A atividade da lacase foi detectada em todos os isolados de *C. neoformans* e *C. gatti*, mas não nos isolados não-*neoformans*, os autores acrescentam que níveis insignificantes da enzima foram detectados nestes últimos. Isolados ambientais de *C. neoformans* exibiram perfil enzimático similar, assim como os isolados clínicos de *C. neoformans*, exceto pela menor atividade da proteinase e da lacase. A atividade fosfolipásica foi detectada em 69,2% de *C. albidus* e 64,3% de *C. laurentii*, sendo o valor de Pz de *C. neoformans* significativamente mais elevado do que o de *C. laurentii*. Com esses resultados é possível observar que existe a produção de enzimas pelas leveduras ambientais e não-*neoformans*, embora em menor quantidade do que se comparado com as cepas clínicas; o que não as tornam menos relevantes em termos de patógeno, visto o grande número de trabalhos publicados tendo essas leveduras como principais agentes causadores de doença, principalmente em imunossuprimidos.

Uma pesquisa envolvendo presença de leveduras em excrementos de aves e ar atmosférico foi realizada por Pedroso, Ferreira e Candido (2009). Das leveduras isoladas a partir de 86 amostras ambientais, os autores pesquisaram fatores de virulência, como formação de cápsula, crescimento a 37°C e capacidade de produção de melanina. Das 41

cepas isoladas, 15 pertenciam à espécie *C. neoformans* var. *neoformans* (12 de excrementos e 3 de ar), 15 pertenciam à espécie *C. albidus* (12 de excremento e 3 de ar), 9 pertenciam à espécie *C. laurentii* (7 de excrementos e 2 de ar) e 2 pertenciam à espécie *C. uniguttulatus* (de excrementos). As cápsulas foram produzidas por 93,3% de *C. neoformans* var. *neoformans*, 66,7% de *C. albidus*, 88,9% de *C. laurentii* e 50% de *C. uniguttulatus*. Todas as cepas de *C. neoformans*, 20% de *C. albidus* e 44,4% de *C. laurentii* foram capazes de crescer a 37 °C. A produção de melanina em ágar contendo dopamina foi verificada por 93,3% de *C. neoformans*, 26,7% de *C. albidus* e 66,7% de *C. laurentii*; o que reforça a ideia de que, apesar de serem de origem ambiental, são capazes de produzir fatores que interferem com a homeostasia do hospedeiro.

1.5.2 Ecologia e epidemiologia

C. albidus é uma levedura que, assim como *C. neoformans* e *C. gattii*, pode ser encontrada nos mais diversos ambientes. Em 1972, Brandsberg e Kretchmer examinaram dezoito amostras comerciais de comida de aves a fim de determinar a fonte do fungo nas fezes das mesmas. Do total das amostras, quatorze (78%) apresentaram ao menos uma espécie de *Cryptococcus*, sendo elas: *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. luteolus* e *C. albidus* var. *diffluens*. Os autores descrevem a predominância *C. albidus* var. *albidus*, presente em 61% das amostras, seguido por *C. laurentii*, isolado em 39% das amostras, e ressaltam ainda que, no caso das rações peletizadas, o número de colônias reduziu bastante, mas não foi eliminado.

Leite Jr. et al. (2012) também isolaram *C. albidus* de um "*habitat*" diferenciado: o pó dos livros de uma biblioteca na cidade de Cuiabá (Mato Grosso, Brasil). Foram coletados oitenta e quatro "*swabs*" do pó de livros de três livrarias diferentes. O material foi semeado em ágar Sabouraud dextrose, e quando observadas colônias com aspectos característicos da levedura, foram transferidas para ágar semente de níger, à temperatura de 37 °C por 5 a 7 dias. A identificação se deu através de exame direto com tinta da Índia, testes adicionais em CGB, prova da ureia e assimilação de carboidratos. Do total de amostras, 18 (21,4%) foram positivas para *Cryptococcus*, sendo a levedura mais frequentemente isolada *C. gattii* (36,6%). *C. albidus* apareceu em dois (4,6%) dos isolamentos, ficando atrás de *C. terreus* (29,3%), *C. luteolus* (9,8%), *C. neoformans* (7,3%), *C. uniguttulatus* (7,3%). A presença dessas leveduras demonstra mais um ambiente com possibilidades de transmissão da levedura, o que é de grande importância, já que trata-se de um ambiente público.

González-Hein, González e Diaz (2010) efetuaram um estudo no qual realizaram coletas de cloaca de 28 espécies de psitacídeos cativos em um centro de reabilitação no Chile. Do total de 28 aves, três apresentaram *C. albidus*, duas apresentaram *C. laurentii* e uma apresentou *C. neoformans*. Também a partir da cloaca (de pombos), Rosario et al. (2005) realizaram isolamento de leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus.* Dos 331 *"swabs"* cloacais, foi possível recuperar a levedura de 26 (7,85%). Desses, 11 (3,32%) apresentaram *C. uniguttulatus*, 6 (1,81%) apresentaram *C. laurentii*, 6 (1,81%) apresentaram *C. neoformans* var. *neoformans* e 3 (0,91%) apresentaram *C. albidus*.

Cafarchia et al. (2006) pesquisaram amostras provenientes de três sítios diferentes: excrementos de aviários (32), amostras adquiridas de trato digestivo de aves que vieram à óbito (60) e amostras retiradas diretamente da cloaca das aves of prey (182 *"swabs"*). Do total de 454 amostras cultivadas, 215 colônias leveduriformes foram recuperadas e identificadas. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* foi isolado de três amostras cloacais (4,8%) de *Falco tinnunculus* e de uma amostra (3,1%) obtida de *Buteo buteo*. Do total de isolamentos, 18 (9,9%) amostras foram provenientes de cloaca, 13 (40,6%) foram provenientes das amostras fecais. Dos animais mortos, 12 (20%) isolamentos foram recuperados do papo, 3 (5%) do proventrículo e 12 (20% da cloaca). Estes resultados evidenciam que não somente as pombas, mas também outras aves podem carrear e disseminar a levedura no ambiente.

Em 2010 Rosario et al. realizaram pesquisa de *Cryptococcus* em papo e excrementos de pombos, sendo coletados 331 *"swabs*" do papo e 174 amostras de excrementos. De todas as amostras, 81 (24,47%) mostraram positividade para a levedura. Das amostras do papo, 32 (9,66%) foram identificadas como *C. neoformans*, 24 (7,2%) corresponderam a *C. uniguttulatus*, 23 (6,9%) eram *C. albidus* e 2 (0,6%) foram *C. laurentii*. Dos excrementos foram isolados 82% (47,13%) de leveduras pertencentes ao gênero, sendo 59 (33,9%) *C. neoformans*, 9 (5,17%) *C. uniguttulatus*, 8 (4,59%) *C. laurentii* e 6 (3,44%) *C. albidus*.

Em trabalho realizado na cidade de Santos, Soares et al. (2005), estudou 116 amostras, das quais 79 eram excretas de pombos e 37 eram de ar atmosférico próximo a acúmulo de excrementos. Do total de amostras, *C. neoformans* foi isolado em 13,9%, *C. albidus* foi isolado em 12,6% e *C. laurentii* em 8,9%. Do ar atmosférico somente *C. albidus* foi isolado.

Seguindo a linha de isolamento de leveduras a partir de fezes de pombos, Jang et al. (2011) realizaram estudo em vários locais públicos em Seoul (na Coréia). Foram 306 amostras de excrementos coletadas de praças e parques da cidade, e dentre as espécies mais frequentemente isoladas, pode-se destacar *Candida glabrata* (34,1%), *Candida famata*

(12,7%), *Cryptococcus albidus* (14,3%) e *Cryptococcus laurentii* (7,9%). Sobre o gênero *Cryptococcus*, 14 isolados de *C. albidus* foram obtidos de fezes secas e 4 de fezes frescas, 4 isolados de *C. laurentii* foram obtidos a partir de fezes secas, e 6 de fezes frescas, 2 isolados de *C. neoformans* foram obtidos a partir de fezes secas e 2 de fezes frescas. Todos os *Cryptococcus* idolados possuíam cápsula, 16,4% produziam melanina e 33,6% produziam proteinase.

Muitos são os relatos de casos clínicos envolvendo pacientes imunodeprimidos. Em 1987, Dambrosi et al. registraram em Buenos Aires, um caso de criptococose ganglionar por *C. albidus* var. *diffluens*, tendo evolução favorável quando tratada com itraconazol (100 mg por dia). Esta paciente também apresentava sarcoidose com lesões cutâneas e pulmonares. No mesmo ano, Gluck, Myers e Pass relataram um caso de criptococococemia por *C. albidus* em paciente com leucemia mielógena aguda, e acreditaram ser o primeiro relato envolvendo *Cryptococcus* não-*neoformans*.

Em 1996, Loison et al. realizaram o primeiro relato de septicemia por *Cryptococcus albidus* em um paciente com HIV de 38 anos de idade. A levedura foi detectada através de teste de detecção de antígenos no soro. Também procedeu-se com hemocultura, que evidenciou estruturas leveduriformes pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, que foi identificada como sendo da espécie *C. albidus*. Na prova de antifúngicos, a levedura foi sensível a anfotericina B, fluconazol, miconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina. Dessas, a droga de eleição para o tratamento do paciente foi fluconazol, e posteriormente com itraconazol. Também em paciente apresentando positividade para o vírus HIV, Garelick et al. (2004), descreveram um relato de caso de criptococose envolvendo ulceração da esclera por *C. albidus*. A paciente apresentava histórico de tosse, febre e início súbito de uma lesão indolor na esclera do olho esquerdo. A cultura da lesão revelou a presença da levedura, sendo realizado o tratamento com anfotericina B tópico e itraconazol sistêmico; com recuperação completa da paciente.

Relatos de caso envolvendo pacientes recebendo medicações imunossupressoras também podem ser lidos. Burnik et al. (2007) reportam em seu trabalho um caso de um paciente tratado com droga imunossupressora contra a doença de Still, que desenvolveu secundariamente infecção pulmonar por *C. albidus*, que desencadeou a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA). O diagnóstico da criptococose foi feito através de biópsia, exame direto e cultura do agente. Relatam que foi realizado o perfil de assimilação, foi verificada sua morfologia quando inoculado em ágar fubá, prova da uréase positiva e crescimento a 30 °C. Relatam também o lento crescimento da colônia quando submetida a 37

°C. O agente foi submetido à prova de biologia molecular que confirmou a espécie da levedura. O tratamento foi realizado com anfotericina B lipídica, na dose de 400 mg por dia.

Horowitz, Blumberg e Krevolin (1993), isolaram *C. albidus* a partir de um paciente com doença renal em estágio terminal, que vinha recebendo hemodiálise por 19 anos. Após toracocentese, foi realizada cultura fúngica (dentre outros exames laboratoriais), que revelou a presença de células leveduriformes e de fungos filamentosos, que posteriormente foram identificados respectivamente como sendo *Cryptococcus albidus* var. *difluens* e mucormicose. Neste relato, apesar do estado clínico vulnerável do paciente, o mesmo se apresentou negativo para a presença do vírus da AIDS.

Em 2005, Castro et al. relataram um caso de transmissão de *C. albidus* através de transplante de córnea de doador comprovadamente infectado pela levedura. A levedura causou um quadro de ceratite no receptor da córnea, e foi identificada a partir de pesquisa micológica. Este relato chama a atenção para um caso raro de transmissão direta do agente a partir de um doador infectado, ou seja, mais uma forma de transmissão ainda pouco estudada e relatada em literatura.

Narayan et al. (2000) relataram um caso de criptococose cutânea em paciente apresentando síndrome de Sézary. A levedura foi identificada após biópsia da pele, e não foi constatada evidencia de criptococococemia sistêmica. Outro relato envolvendo o órgão cutâneo e *C. albidus* foi descrito por Hoang e Burrus (2007), no qual o paciente desenvolveu criptococose na região da cabeça após oito meses de terapia com uma droga imunomediadora chamada Etanercept.

1.6 *C. laurentii* (Kufferath) C. E. Skinner (1950)

Segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), a espécie *Cryptococcus laurentii* pertence a linhagem dos Tremellales, do clado Bulleromyces. Baroni (2001) aborda em seu trabalho que os relatos de infecções por *C. laurentii* passaram a ter maior frequência na literatura científica, sendo uma espécie saprófita que tem sido relacionada a indivíduos que apresentam imunodeficiência.

1.6.1 Características micromorfológicas e laboratoriais

Quando cultivadas em YNB (*Yeast Nitrogen Base*) com 2% de glicose, é possível notar um fino anel e presença de sedimento e, algumas vezes, ilhotas são observadas nestas

condições. As células são ligeiramente irregulares, com forma amplamente elipsoidais a subglobosas, 5-11 x 4-6,5 µm, com brotamento polar. Em ágar extrato de malte 5%, após sete dias da inoculação a 20 °C, a colônia é pouco convexa, um pouco amorfa, com coloração pálida creme-acinzentada, com aspecto mucóide e suave, com a margem ligeiramente irregular. As células são amplamente elipsoidais a cilíndricas, com 6.5-8.5 x 3-6.5 µm, e usualmente com brotamento polar. Em ágar morfológico para leveduras, após 14 dias a 25 °C, a cultura é lisa a convexa, brilhante, pálida amarelada a amarronzada e as vezes pode apresentar coloração próxima ao salmão, mucóide, lisa, e com margem totalmente linear a um pouco ondulada. As células são elipsoidais, em forma de haltere, subglobosa a globosa, com 3.5-9 x 3-7.5 µm, usualmente com brotamento enteroblastico simpodial nos polos alongados e cônicos das células (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Pseudohifas ou filamentos não são presentes quando cultivadas em ágar batata e em ágar extrato de malte com 5% de glicose. Fermentação é ausente, e tem a capacidade de crescer quando submetidas à temperatura de 25 °C e 30 °C; contudo, seu crescimento à 37 °C é variável (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Em um estudo objetivando avaliar atividade de fosfolipase, proteinase e atividade de hemolisinas de 38 solados de *C. laurentii* recuperadas a partir de fezes de aves cativas e em volta de áreas hospitalares, Ferreira-Paim et al. (2011) constataram que todos os isolados exibiam atividade de fosfolipase (média Pz de 0,783 +-0,09), enquanto que a atividade hemolítica foi demonstrada em 89,4% dos isolados e nenhuma das cepas apresentaram atividade de proteinase. Os autores acrescentaram ainda que as cepas ambientais de *C. laurentii* exibiam cápsula e foram capazes de crescer a 37 °C, embora a temperatura ótima tenha sido a 35 °C. As colônias apresentaram cor bege em ágar níger, o que sugere uma produção baixa de melanina. Todos os isolados apresentaram testes positivos para a assimilação de dextrose, galactose, maltose, sacarose, rafinose, ramnose, dulcitol, inositol, manitol, xilose, peptona, lactose, celobiose e melibiose; sendo negativos para o teste de fermentação.

1.6.2 Ecologia e epidemiologia

Em pesquisa realizada no ano de 1988, Bangert et al. isolaram *Cryprococcus laurentii* em 3 psitacídeos de um total de 61 aves estudadas, ou seja, cerca de 5% apresentavam o patógeno.

Duarte, Ordoñez e Castañeda, em 1994, recuperaram leveduras do gênero *Cryptococcus* a partir de espécies de *Eucalyptus* em Santafé de Bogotá, na Colombia. Segundo os autores, foram isoladas 27 cepas de *Cryptococcus* a partir de 21 árvores localizadas em cinco zonas diferentes da cidade. Dentre as cepas mais isoladas, pode-se destacar *C. laurentii*, sendo as folhas os locais de maior isolamento da levedura. Randhawa, Mussa e Khan (2001) também realizaram pesquisa envolvendo árvores (material em decomposição dentro do tronco e casca do mesmo) visando encontrar leveduras do gênero *Cryptococcus*. Das 702 amostras foram encontradas leveduras pertencentes ao gênero, incluindo *C. neoformans* (4 isolados), *C. laurentii* (2 isolados) e *C. albidus* (1 isolado), sendo os dois últimos provenientes da casca de *Eucalyptus* não identificados.

Em 2005, Rosario et al. realizaram estudo no qual isolaram diversas variedades de leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus* a partir de amostras coletadas de cloacas de pombos. Das 331 amostras coletadas através de "*swab*" cloacal, 26 (7,85%) apresentaram positividade para *C. neoformans*, 11 (3, 32%) amostras evidenciaram *C. uniguttulatus*, 6 (1,81%) amostras foram positivas para *C. laurentii* e 3 (0,91%) foram positivas *C. albidus*. Os resultados demonstram a importância do pombo na epidemiologia da doença, como um reservatório e transportador da levedura. González-Hein, González e Díaz (2010) também realizaram pesquisa envolvendo cloaca de psitacídeos, na qual foram isoladas 28 amostras cloacais dos 131 psitacídeos cativos em um centro de reabilitação da vida selvagem no Chile. Do total de amostras, 20 (71,4%) demonstraram crescimento leveduriforme, sendo a levedura mais frequentemente isolada do *Candida famata* (8/28), seguida por *C. tropicalis* (7/28), *C. albidus* (3/28), *C. laurentii* (2/28), *Rhodotorula* (2/28), *C. glabrata* (1/28) e *C. neoformans* (1/28).

Um estudo realizado na cidade de Fortaleza (Ceará) resultou no isolamento, dentre outras leveduras, de *C. laurentii* a partir de amostras de fezes de pombos, o que evidencia a influência dessa ave na manutenção da levedura no país.

Bernardo, Martins e Martins (2001) realizaram estudo sobre as fontes urbanas de *Cryptococcus* em Lisboa (Portugal), no qual foram pesquisadas plantas ornamentais e fezes de pombos em praças, jardins e parques públicos. *C. laurentii* foi encontrado em flores de eucaliptos (50% positivos), amostras flores ornamentais e de pinheiro, sendo que estes últimos foram 100% positivos para a presença da levedura. Nas fezes de pombos, a levedura foi encontrada em 40% das amostras. Os autores descrevem que também foi encontrado *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. hungaricus*, em quantidade inferior que as demais leveduras. Filion, Kidd e Aguirre (2006) também realizaram trabalho com isolamento de *C. laurenti* a

partir de fezes de *Branta canadensis*, uma ave que, segundo os autores, vive próxima ao homem, podendo conviver nos mesmos ambientes, e assim, ser um importante reservatório da levedura.

Existem trabalhos que relatam o isolamento da levedura a partir do solo, como no caso do trabalho de Vital et al. (2002), no qual foi realizado isolamento de várias leveduras, dentre elas *C. laurentii* e *C. albidus* a partir do solo da estão ecológica de Maracá (Roraima).

De acordo com Cheng et al. (2001), as doenças causadas por *Cryptococcus* não-*neoformans* geralmente são menos patogênicas ao homem, sendo os fatores de risco predisponentes considerados de grande importância para o desenvolvimento da doença. Em seu estudo relatam um caso de fungemia por um paciente neonato prematuro, que foi medicado com anfotericina B, obtendo boa resposta por parte do paciente. Johnson, Bradley e Kauffman (1998) descrevem em seu trabalho que *C. laurentii* é uma das várias leveduras não-*neoformans* que raramente são associadas com infecção humana, e que muitos casos de fungemia tem origem nosocomial e estão associadas com cateteres intravasculares e neutropenia.

Pedroso et al. (2010) publicaram artigo sobre as implicações clínicas e laboratoriais de infecções causadas por *C. albidus* e *C. laurentii*. Nessa revisão, afirmam que os relatos de infecções causadas por estas leveduras estão cada vez mais frequentes. Acrescentam ainda que causam infecções principalmente em imunossuprimidos e que o quadro clínico se assemelha muito com o quadro ocasionado por uma infecção causada por *C. neoformans* e *C. gattii*. As condições que o paciente apresenta, associadas com a imunidade mediada por células são riscos importantes para infecções não-*neoformans*. A profilaxia com azóis tem sido associada com a resistência antifúngica, sendo a anfotericina B a medicação mais utilizada para o tratamento da doença (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007).

Simon et al. (2005) publicaram relato de literatura sobre um caso de infecção por *C. laurentii* em uma criança com nove anos de idade, portador da síndrome da “hiper-imunoglobulina M ligada ao X”. A identificação da levedura foi com base em exame sorológico, identificação morfológica e bioquímica; e o tratamento foi realizado com a prescrição de fluconazol, com cura do indivíduo.

Um caso de pneumonia e efusão pleural causado por *C. laurentii* em um paciente portador do vírus da AIDS foi relatado por Shankar et al. (2006). O paciente estava medicado com drogas anti-tuberculose e tratamentos anti-retrovirais, sendo a levedura recuperada a partir de amostras do fluido pleural. Também em um indivíduo imunocomprometido, Bauters

et al. (2001) isolaram *C. laurentii* a partir da orofaringe de um paciente portador de eritroleucemia, que tinha histórico de uso de fluconazol, bem como antivirais, antibacterianos e citostáticos. Os autores relatam que a espécie isolada foi capaz de crescer a 37 °C, apresentar positividade quando inoculado em ágar CGB e evidenciar reação negativa quando testado quanto à produção de melanina. No teste antifúngico, a levedura se mostrou susceptível a 5-fluocitosina, anfotericina B e miconazol; e resistente ao fluconazol, cetoconazol e itraconazol.

Assim como em imunodeprimidos, a doença também foi relada em indivíduos sem histórico de imunossupressão, como no relato de Vlchkova-Lashkoska et al. (2004), no qual a levedura acometeu a pele de um indivíduo sem o vírus da AIDS e sem qualquer outra causa aparente que levasse à falha de imunidade.

1.6.3 Controle biológico

É crescente a preocupação com a saúde da população, e dentre outros fatores, a saúde está relacionada em grande parte com a alimentação do indivíduo. Quanto menos produtos químicos e tóxicos forem adicionados nos alimentos, mais saudável este chegará a mesa do consumidor. Seguindo esta linha de raciocínio, muitos pesquisadores estudam maneiras de realizar o controle biológico das pragas que podem atingir os alimentos, tornando desnecessária a utilização de fungicidas sintéticos.

C. laurentii é uma levedura que vem sendo estudada como controle biológico de muitos microrganismos. Zhang, Zheng e Xi (2005) realizaram pesquisa envolvendo esta espécies leveduriforme como agente biológico pós-colheita contra o mofo azul da laranja causado por *Penicillium italicum in vitro* e *in vivo*. No estudo, os autores referem que o biocontrole teve efeitos significativos, principalmente quando a levedura foi aplicada antes ou juntamente com *P. italicum* na fruta, sendo *C. laurentii* considerado um agente potencial de biocontrole sob essas condições. A mesma levedura se mostrou eficiente também contra o combate de *Penicillium citrinum* e *Verticicladiella abielina* em frutos do medronheiro (encontrada principalmente na França, Irlanda, Portugal), segundo Zhang, Zheng e Xi (2004).

Blum et al. (2004) também realizaram estudo envolvendo *C. laurentii* como controle biológico com a finalidade de reduzir a podridão pós-colheita de maçãs (ocasionada por *Penicillium expansum*, *Glomerella cingulata* e *Pezicula malicorticis*). Os autores relatam que após a realização dos testes, a aplicação da levedura nas frutas reduziu as podridões tanto quanto os fungicidas testados. Em trabalho realizado também com maçãs, Zheng e Yu (2006)

estudaram o efeito sinérgico da aplicação de ácido acetilsalicílico com *C. laurentii* em maçãs, e segundo seus resultados, a aplicação simultânea de ambos na superfície dos frutos mostraram um aumento da eficácia de *C. laurentii* contra *P. expansum*, podendo aumentar a atividade biológica da levedura por indução de resistência aos agentes patogênicos.

A levedura também tem sido estudada como agente de degradação de óleo comestível em água residual, com obtenção de resultados positivos a respeito do assunto (SUGIMORI, 2009).

1.7 Patogenia da infecção causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*

1.7.1 Homem

De acordo com Lacaz et al. (2002), a criptococose é uma infecção que se manifesta sob sintomatologia variada. Em geral, o organismo atinge o corpo humano através do trato respiratório.

Nos sistema nervoso, as lesões decorrentes da infecção por *C. neoformans* são as mais variadas, com diferentes localizações: espaços perivasculares, substância cerebral, plexos coroides, aqueduto de Sylvius, forâmen de Magendie, cápsula interna e cerebelo; daí a variabilidade dos sintomas apresentados pelos pacientes. Normalmente, essa forma é secundária a processos cutâneos e pulmonares. Dentre os sintomas dos portadores dessa forma clínica, pode-se citar: cefaleia fortíssima, contínua ou intermitente, diplopia, diminuição da visão, chegando à cegueira, nistagmo, estrabismo, paralisia dos nervos cranianos, hiporreflexia, sonolência, vômitos, desorientação. Em caso de infecção disseminada, pode ser isolado do sangue circulante (LACAZ et al., 2002).

Lázera, Igreja e Wanke (2010) descrevem que os sinais clínicos da criptococose podem ser classificados em três formas clínicas: a forma pulmonar regressiva, na qual as lesões pulmonares usualmente passam despercebidas, sendo que o diagnóstico se constitui um achado casual; a forma pulmonar progressiva, na qual existe lesão cística representada por massa repleta se células fúngicas, com mínima reação inflamatória, sintomatologia inespecífica e escassa, sendo o diagnóstico um achado radiológico casual; e a forma disseminada, a qual corresponde quase 90% dos casos diagnosticados, com quadros extrapulmonares de localização do agente. Nesta última forma clínica, o fungo pode se disseminar através da corrente sanguínea e atingir qualquer órgão ou sistema, ocasionando quadros polimórficos e inespecíficos. Devido à baixa imunogenicidade do componente

capsular, não se dispõem de antígenos para testes cutâneos e as provas sorológicas que detectam anticorpos não tem finalidade diagnóstica. Contudo, o diagnóstico pode ser baseado em antígenos polissacárides da cápsula, que podem ser pesquisados no líquido cefalorraquidiano, soro e urina (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010).

Na forma disseminada da doença pode estar presente meningoencefalite subaguda ou crônica, sendo comum cefaleia occipital, inicialmente intermitente, acompanhada ou não de febre alta. Há casos em que ocorrem tremores, calafrios; e com o avançar do quadro até o sistema nervoso central, pode ocorrer redução ou perda da visão, hipertensão intracraniana, hidrocefalia, acometimento de pares de nervos cranianos com lesão ou não das meninges. Em 5% dos casos, pode-se observar lesões hematogênicas osteoarticulares (atingindo vértebras, pélvis, crânio ou costelas). Em 10% dos casos podem ocorrer lesões cutâneas como pápulas, celulite, ulcerações com drenagem de pus (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010).

Darzé et al. (2000) realizaram um estudo com 104 casos clínicos de meningoencefalite criptocócoca, no qual foram analisados 104 prontuários de pacientes internados em um hospital na cidade de salvador (Bahia), no período de 1972 a 1996. De acordo com os resultados, a doença predominou em pacientes com idade variável (de 8 a 79 anos), em sua maior parte do sexo masculino (61,5%), sendo o tempo médio da doença de 27,6 dias. Dentre os sinais e sintomas clínicos mais comuns estão a cefaleia (92,7%), febre (84,4%) e rigidez de nuca (83,2%). A letalidade foi de 42,7%.

Em 1998, Kordossis et al. publicaram um artigo sobre o primeiro relato de meningite por *Cryptococcus laurentii* e um caso fatal de criptococosemia por *Cryptococcus albidus* em pacientes com AIDS. Nesse artigo, os autores descrevem que ambos os casos foram tratados com anfotericina B e fluocitosina. A meningite causada por *C. laurentii* foi controlada com o tratamento, contudo o paciente com criptococococemia por *C. albidus* veio à óbito após 14 dias do início do tratamento, pois segundo os autores, estava no estágio final da AIDS.

Envolvendo o aparelho urinário, Lee et al. (2004) publicaram um relato de criptococose disseminada em um paciente receptor de transplante renal. O paciente apresentava histórico de 10 dias de tosse seca, febre e dispneia progressiva evoluindo para síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e choque séptico fulminante. Após alguns dias, o paciente desenvolveu máculas na pele na região da tíbia, que coalesceram e originaram manchas eritematosas. A levedura foi isolada e identificada a partir da biópsia da pele e cultura do tecido, e o tratamento realizado foi com fluconazol intravenoso. Cleveland, Gelfand e Rao (2012) também descreveram um caso de *C. albidus* após transplante de órgãos. Neste relato, o paciente transplantado desenvolveu a doença após 34 dias de tratamento com

imunossupressores. A levedura foi encontrada após cultivo da mesma em hemocultura, e foi iniciado tratamento com posoconazol, com boa reação por parte do paciente.

Lacaz et al. (2002) afirmam que *C. albidus* é capaz de provocar fungemia em pacientes portadores do vírus da AIDS e em neutropênicos em geral, bem como processos pulmonares e meningite.

No caso de *C. laurentii*, alguns relatos também são descritos na literatura, como em 1998 no qual Kordossis et al. registraram o primeiro caso de meningite por *C. laurentii* em Atenas e em 1999, Pukinskas et al. isolaram de um caso de meningite do liquido cefalorraquidiano amostra de *C. laurentii* de paciente homossexual portador do vírus da AIDS, sendo tratado, sem sucesso, com anfotericina B. Johnson et al. (1998) também relataram dois casos de fungemia por *C. laurentii*, evidenciando que essa levedura também é capaz de provocar lesões cutâneas em pacientes neutropênicos por cateteres

1.7.2 Animais

Organismos leveduriformes podem ser isolados de psitacídeos e outras aves na ausência de sinais clínicos. Casos disseminados de criptococose foram reportados em Kiwis (*Apteryx australis mantelli*) na Nova Zelandia (HILL; WOODGYER; LINTOTT, 1995). Experimentalmente, frangos infectados desenvolveram lesões consistindo em granulomas e necrose do fígado, intestino, pulmões e baço (CHUTE, 1991).

Nas aves, sinais clínicos vão depender da área de envolvimento, mas sinais não específicos como dispneia, anemia, fraqueza, anorexia, apatia e diarreia são reportados. Podem ocorrer quadros de heterofilia (BAUCK, 1994). Quando o envolvimento é ocular e nasal, descarga nasal clara e/ou inchaço dos seios e tecido periorbital podem ocorrer. Em casos de envolvimento do cérebro e das meninges, sinais neurológicos como paresia ou paralisia progressiva, cegueira e flacidez do pescoço podem ocorrer (OGLESBY, 1997). Em muitos casos, a colonização inicial pode se dar no trato respiratório (devido à sua temperatura mais baixa) com subsequente disseminação (CLIPSHAM; BRITT, 1983).

De acordo com Jungerman e Schwartzman (1977), os animais que desenvolvem criptococose podem apresentar muitos sinais. Inicialmente, podem ocorrer processos destrutivos granulomatosos na mucosa oral e faríngea; afetando a mucosa nasal, seios faciais e estruturas ósseas adjacentes. Raramente ocorrem lesões cutâneas como sinais iniciais da doença. Com o passar do tempo, a maior parte dos indivíduos desenvolvem sinais relacionados com afecção do sistema nervoso central, como: indiferença, dilatação da pupila,

ataxia, incoordenação, movimentação em círculos, cegueira parcial ou completa associada com problemas locomotores.

Juliano, Souza e Scheide (2006) relataram um caso de criptococose em um felino doméstico (*Felis catus*) atendido em um Hospital Veterinário na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Os autores descrevem que o animal apresentava lesão sintomática na região nasal, com dificuldade respiratória, espirros, lacrimejamento e temperatura em torno de 39 °C. A lesão em região nasal revelou deformidade de consistência firme, com pouca sensibilidade dolorosa e presença de coriza. Um fato agravante foi que o proprietário do animal relatou que possuía um criatório de pombos em sua residência. Foi realizada colheita de material para exame citológico que revelou a presença de microrganismos capsulados com características sugestivas de *C. neoformans*, o que posteriormente pôde ser comprovado pelo isolamento da levedura em cultivo de ágar Sabouraud dextrose e ágar semente de níger. O tratamento foi realizado com cetoconazol (15 mg/Kg, duas vezes ao dia, durante 6 meses), sendo observada a melhora clínica e o não-isolamento do agente posteriormente ao tratamento.

Santilli, em 2008, descreveu um caso de criptococose óssea e cutânea em felino, atendido em um Hospital Veterinário do município de Leme (São Paulo). Relata que o animal apresentava aumento de volume em região escapular esquerda e também dificuldade locomotora. Não apresentou emese, diarreia, secreção nasal, dispneia ou qualquer outro sinal clínico exceto tumor na região citada e claudicação. Ao exame físico, constatou-se aumento de volume, com consistência mole e manifestação de sensibilidade dolorosa pelo paciente. Após colheita do material e exame micológico, houve a confirmação da infecção por *C. neoformans*. Foi instituída terapia antifúngica com cetoconazol na dose de 10 mg/Kg (via oral. a cada 12 horas) durante 120 dias, com bom prognóstico da doença.

Em bovinos, no caso da infecção das glândulas mamarias, os sinais podem variar de inflamação moderada e transitória de um ou mais quartos do úbere à inflamação severa e distensão das glândulas afetadas. As vacas podem apresentar considerável mal estar, relutância em se movimentar e permanecem com as extremidades separadas de um modo anormal. Durante os primeiros dias as mudanças no leite podem não ser aparentes, contudo, podem ocorrer pequenos grumos brancos na peneira. Em infecções persistentes e severas, um soro aquoso, contendo grumos pode caracterizar a secreção; com mais frequência, o leite aparecerá branco acinzentado, com consistência viscosa e mucóide (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1977).

De acordo com Carter (1988) é incomum em ovinos e caprinos. Em cavalos é frequentemente observada como infecção paranasal, que pode ou não se difundir a outros tecidos, incluindo o cérebro. Como tratamento, a anfotericina B é a droga de escolha, embora derivados do imidazol tenham mostrado algum resultado.

Casos envolvendo *C. albidus* e animais também podem ser encontrados na literatura. Kano et al. (2008), publicaram o primeiro caso de infecção sistêmica por *C. albidus* em felinos. O animal apresentava paralisia de membros traseiros, cegueira em ambos os olhos, desorientação e linfoadenopatia de ambos os linfonodos poplíteos. A levedura foi detectada após uma biópsia por agulha fina no linfonodo poplíteo do animal, que apresentou estruturas leveduriformes encapsuladas. Também foi realizado exame microscópico com tinta da China do liquido cefalorraquidiano, onde foram visualizadas células encapsuladas ovoides. Exames complementares de identificação foram realizados e houve a confirmação de uma infecção por *Cryptococcus*. O tratamento foi iniciado com voriconazol, contudo o animal veio à óbito em três dias.

Também é possível encontrar descrição da doença em cães; como no relato de caso de Labrecque, Sylvestre e Messier (2005), no qual foi detectada infecção sistêmica por *C. albidus* em um animal da raça Doberman Pinscher. Neste relato, após o animal vir a óbito, foram encontradas alterações em vários órgãos, como na esclera, na vulva, em membro anterior, em tecidos subcutâneos do tórax, na glândula mamária, nos pulmões, nos linfonodos, cérebro, pele, miocárdio, tireoide. As células encontradas na necropsia se apresentavam ovoides, com cápsula espessa e com brotamento de base estreita. Após exames de identificação complementares, chegou-se ao diagnóstico de infecção por *C. albidus*.

Apesar de ser capaz de causar doença em humanos e demais animais, a condição patológica ocasionada por *C. laurentii* ainda é pouco relatada nestes últimos. Decostere et al. (2003) realizaram o primeiro relato envolvendo esta espécie com a queda de penas em *Lamprotornis chalybaeus* (estorninho). A ave exibiu penas irregulares especialmente em torno do bico, e crostas acinzentadas aderidas à pele. Os autores descrevem que as penas tinham um aspecto gorduroso e exalava odor de mofo. Além desta, outras aves também apresentaram os sinais após a introdução da mesma no aviário. O diagnóstico foi realizado a partir de amostras coletadas das áreas acometidas e inoculação em vários meios de cultura, incluindo ágar Sabouraud dextrose, no qual foi possível perceber o crescimento de colônias leveduriformes semelhantes às do gênero *Cryptococcus*. Procedeu-se com identificação molecular que levou ao resultado de *C. laurentii*. O animal foi submetido a tratamento com fluconazol na água de beber e respondeu com sucesso.

Campos et al. (2009) em trabalho realizado no Rio de Janeiro, realizaram isolamento de leveduras a partir de coletas provenientes do Laboratório de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman. Das 201 amostras obteve-se o resultado de quatro isolamentos positivos para o gênero nas amostras provenientes de cães, sendo uma de *C. laurentii*, duas de *C. neoformans* e uma de *C. gattii*; sendo o primeiro isolamento descrito de *C. laurentii* a partir do sistema nervoso central de um cão.

Em pesquisa envolvendo a inoculação experimental de *C. albidus* e *C. laurentii* em camundongos normais, Pedroso et al. (2009) estudaram fatores de virulência de ambas as leveduras e o perfil das mesmas antes e após a passagem no animal. Os autores descrevem que *C. albidus* foi isolado dos órgãos dos animais de dois a dez dias a pós a inoculação, enquanto que *C. laurentii* de dois a cento e vinte dias pós-inoculação. As cápsulas de *C. laurentii* apresentavam tamanhos variados, por vezes, as diferenças não foram significativas, algumas cepas de ambas as espécies de leveduras apresentaram capacidade de crescer à temperatura de 37 °C antes e após a inoculação dos animais. Quanto à pigmentação, *C. albidus* não apresentou diferença de coloração após 5-10 dias de incubação, enquanto que *C. laurentii* demonstrou coloração marrom claro após 5 dias de inoculação. Alguns isolados de *C. albidus* foram capazes de produzir proteinase e somente um isolado de *C. laurentii* apresentou atividade proteinase. Todos os isolados de *C. albidus* foram capazes de produzir fosfolipase, enquanto que alguns isolados de *C. laurentii* também mostrou a produção da enzima nas mesmas condições.

1.8 Tratamento de eleição para afecção causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*

O tratamento da criptococose nas formas pulmonar progressiva e disseminada não difere se em paciente imunocompetente ou imunodeprimido, devendo ser com antifúngico específico. No caso de formas exclusivamente pulmonares pode-se utilizar itraconazol durante 6 meses ou mais, na dose de 200 a 400 mg/dia (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010).

O tratamento preconizado para criptococose disseminada é a instituição de anfotericina B que pode ser associada a 5-fluorcitosina (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010). De acordo com Gompertz et al. (2008) também pode ser empregado o fluconazol, sendo que o prognóstico do tratamento depende do diagnóstico precoce e do estado geral do indivíduo.

Outras drogas como o fluconazol ou itraconazol tem sido utilizadas em associação à anfotericina em imunodeprimidos. A 5-fluorcitosina não deve ser utilizada como terapia antifúngica isoladamente, já que cerca de 5% das células de *C. neoformans* são primariamente

resistentes e pode ocorrer seleção dessas variantes com surgimento de resistência secundária. Derivados triazólicos como o fluconazol e o itraconazol podem ser utilizados no tratamento: o primeiro deve ser utilizado durante 6 a 10 semanas, possui excelente atividade antifúngica e atinge boa concentração no organismo; enquanto que o itraconazol também tem demonstrado bons resultados no tratamento específico, mas não é a droga de escolha para o tratamento inicial das formas de meningoencefalite, já que não tem formulação venosa e sua biodisponibilidade é variável (LÁZERA; IGREJA; WANKE, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo realizar o isolamento e a identificação fenotípica de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* a partir de amostras provenientes da cloaca e do ingluvio de 40 papagaios do gênero *Amazona aestiva.*

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o isolamento de leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus* a partir de inglúvio e cloaca de papagaios*;*

- identificar as cepas isoladas por métodos tradicionais: características morfológicas e bioquímicas;

- investigar fatores relacionados à virulência, tais como: produção de proteinase e fosfolipase, produção de fenoloxidase, produção de urease, termotolerância e presença de cápsula.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e local de coleta

O material coletado neste estudo foi proveniente de 40 papagaios do gênero *Amazona aestiva* (Figura 1) sem idade e/ou sexo definidos, localizados no criatório conservacionista Joseph Moutran, na cidade de Jundiaí - São Paulo, situada próximo à margem da Rodovia Anhanguera, Km 52, Jardim Samambaia; no período compreendido entre maio a agosto de 2010. As aves utilizadas nesse estudo não apresentaram sinais aparentes de doença, o que pôde ser determinado levando-se em conta a avaliação clínica de cada ave, sendo aferidos alguns parâmetros, como temperatura, através de termômetro digita, (Figura 2) e peso corporal (Figura 3).

Figura 1 - Fotografia de um exemplar de papagaio do gênero *Amazona aestiva*

Fonte: Nascimento (2012).

Figura 2 - Procedimento de aferição de temperatura com auxílio de termômetro digital em cloaca de papagaio do gênero *Amazona aestiva*

Figura 3 - Aferição de peso corporal de papagaio do gênero *Amazona aestiva* com auxílio de balança digital eletrônica

Na criação, as aves estão dispostas de duas formas diferentes: existe um grupo que fica dentro de recintos fechados (casais e filhotes); e um grupo que fica na “voadeira” (Figura 4), que é um recinto aberto, externo, limitado por tela, onde os papagaios podem se exercitar e formar novos casais. Foram utilizados 22 animais provenientes dos recintos fechados e 18 animais provenientes do recinto aberto (Figura 5).

Figura 4 - Ambiente externo chamado de “voadeira”, local onde os papagaios formam casais para posteriormente serem transferidos para os recintos internos.

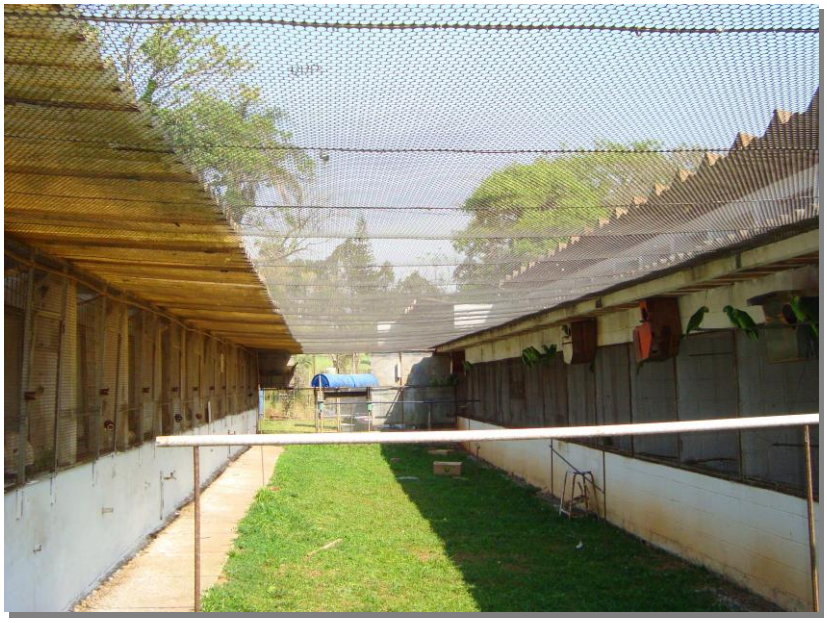


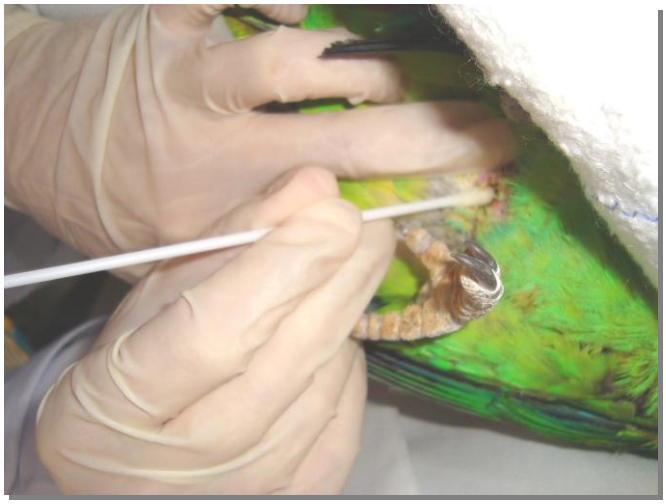
Figura 5 - Figura evidenciando recintos internos, separados por tela do recinto externo. Notar os casais de papagaios dentro de cada ambiente.

Nas aves, o material analisado foi coletado de duas regiões: inglúvio e cloaca. Para a retirada do material do inglúvio procedeu-se lavagem do mesmo com cerca de 5 mL de solução fisiológica a 0,9% estéril através da introdução de sonda uretral estéril número 5 ou 6 (Figura 6). A sonda foi introduzida inicialmente na cavidade oral da ave, direcionada para o esôfago até chegar ao inglúvio. Da cloaca, as amostras foram retiradas com auxílio de um "*swab"* umedecido (Figura 7) com solução fisiológica a 0,9% estéril, sendo mantidas refrigeradas até inoculação em meio de cultura no Laboratório de Leveduras Patogênicas da Universidade de São Paulo.

Figura 6 - Coleta de material proveniente do inglúvio através da técnica de lavado com soro fisiológico NaCl 0,09% estéril.

Fonte: Nascimento (2012).

Figura 7 - Coleta de material a partir de "*swab*" introduzido na cloaca da ave.



3.2 Processamento do material coletado

O processamento das amostras se deu no Laboratório de Leveduras Patogênicas; Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

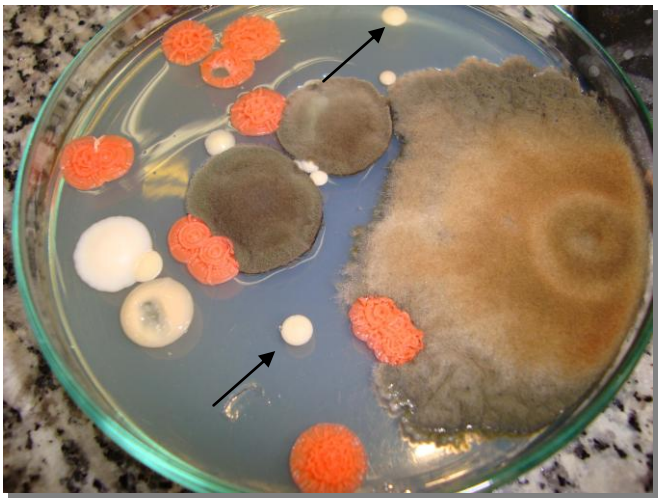
As amostras foram mantidas refrigeradas até o momento da inoculação e processadas como descrito a seguir:

O material proveniente do inglúvio que estava contido na seringa foi homogeneizado. Com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, procedeu-se a retirada de uma alíquota de 0,5 mL que foi inoculada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, EUA) com cloranfenicol a 0,25%. Para espalhar a amostra na superfície do meio, foi utilizada alça de Drigalski estéril.

Os *"swabs"* provenientes da cloaca foram inoculados pelo método de esgotamento diretamente em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, EUA) com cloranfenicol a 0,25%.

As amostras de ambos os sítios foram processadas em triplicada e incubadas por 7 a 10 dias em estufa com temperatura de 30°C. Durante esse período, foram necessárias observações diárias. Todas as colônias leveduriformes que apresentavam ou não características macromorfológicas de *Cryptococcus* (Figura 8) foram isoladas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, EUA) com cloranfenicol a 0,25%. Essas colônias foram posteriormente submetidas a testes micromorfológicos e fisiológicos.

Figura 8 - Placa de Petri com crescimento de diferentes colônias de leveduras e fungos filamentosos. Na ponta das setas colônias leveduriformes suspeitas de *Cryptococcus*.



Ao final de todo o processo foram incubados 392 tubos de ensaio contendo colônias leveduriformes.

É importante destacar que todas as amostras passaram por repique prévio de 48 horas antes de iniciarmos qualquer teste; e que em todos os testes foram utilizadas cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. gattii* ATCC 56990, como método controle para os testes. Os ensaios foram realizados em triplicata

3.3 Identificação dos isolados suspeitos de *Cryptococcus*

3.3.1 Exame direto

Assim que obtivemos colônias puras da amostra, as mesmas foram submetidas a exame direto com tinta da China (nankin) ou nigrosina. Para a realização dessa prova, uma pequena alíquota da colônia foi colocada em uma lâmina de vidro, juntamente com algumas gotas de nankin. Após misturar as duas partes, foi adicionada lamínula e a lâmina foi visualizada em microscópio óptico. Neste teste, como suspeita de isolados de *Cryptococcus*, devem ser visualizadas células leveduriformes ovaladas, arredondadas ou elipsoides, de tamanho irregular, envolvidas ou não por cápsula (KONEMAN et al., 2001; PEDROSO; CANDIDO, 2006).

3.3.2 Teste de produção de urease

As cepas foram submetidas a passagem em meio de Christensen (ANEXO). Neste teste, os isolados pertencentes ao gênero *Cryptococcus* tem a capacidade de hidrolisar a ureia, promovendo a alcalinização do meio, e a viragem do indicador de pH vermelho de fenol; o meio passa de amarelo para avermelhado. Após a inoculação, as cepas foram incubadas a 25 °C por 24 horas.

3.3.3 Teste de produção de fenoloxidase em meio dopamina (KURTZMAN; FELL, 1998)

Para a realização deste teste as culturas foram semeadas em meio contendo dopamina (Sigma, EUA) (ANEXO), devendo ser observada a presença de colônias com pigmentação marrom a enegrecida. As espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* possuem a capacidade de

pigmentação forte, contudo, uma leve tonalidade também pode ser verificada em outras espécies. As cepas foram incubadas a 25 °C por 72 horas.

Para esta prova foram utilizadas três cepas padrões: *C. neoformans* (atividade positiva) ATCC 90112, *C. gattii* (atividade positiva) ATCC 56990 e *C. albicans* (atividade negativa) ICB 12 (ATCC 90028)

3.3.4 Produção de fosfolipase (PRICE, WILKINSON; GENTRY, 1982)

Para pesquisar a produção de fosfolipase, as cepas foram inoculadas utilizando-se o meio ágar fosfolipase (ANEXO) que apresenta em sua composição, gema de ovo. As cepas foram inoculadas pontualmente no centro da placa, na superfície do meio de cultivo, sendo utilizada uma placa para cada cepa, para evitar confluência dos halos.

As cepas foram incubadas a 25 °C por até 15 dias, com leitura diária. Ao produzir fosfolipase, a enzima propicia a formação de uma área de precipitação de cloreto de cálcio, opaca, visível em torno da colônia. O halo produzido foi medido com o auxílio de uma regra transparente graduada em centímetros com subdivisões em milímetros. O valor da atividade fosfolipásica (Pz) foi obtido através do cálculo da razão entre o diâmetro a colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e a zona de degradação (dcp).

Os resultados da produção de exoenzimas foram analisados conforme padrão descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Atividade Enzimática conforme o Pz.

Pz	Atividade enzimática	Índice
1	Negativa	1
>0,64 <1	Positiva	2
≤0,64	Fortemente positiva	3

Fonte: Price, Wilkinson e Gentry (1982).

3.3.5 Produção de proteinase (RUCHEL, TEGELER; TROST, 1982)

Para a realização deste teste foi utilizado um meio de cultura composto de uma parte básica, autoclavada, e de uma porção contendo albumina bovina (fração V – Sigma)

esterilizada por filtração (ANEXO). Após resfriamento a cerca de 50 °C, as partes foram misturadas e o meio distribuído em placas de Petri. Em cada placa foi realizada uma inoculação central na superfície do meio, sendo importante o uso de uma placa por amostra para evitar a confluência dos halos a serem formados. A incubação se deu a 25 °C por até 15 dias, com leitura diária.

A produção de proteinase pode ser verificada pela produção de um halo translúcido que pode tornar-se opaco ao redor do ponto de crescimento da colônia. Para verificar a produção de proteinase foram medidos o diâmetro do halo da zona de degradação do substrato formado ao redor da colônia e o diâmetro da colônia. Esse halo foi medido com o auxílio de uma regra transparente graduada em centímetros com subdivisões em milímetros.

Assim como a fosfolipase, a atividade proteolítica enzimática (Pz) é expressa através do cálculo da razão entre o diâmetro a colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e a zona de degradação (dcp), sendo classificadas de acordo com a tabela 1.

3.3.6 Inoculação em meio contendo Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) **(KURTZMAN; FELL, 1998)**

O meio CGB (ANEXO) permite separar bioquimicamente as espécies *C. neoformans* da espécie *C. gattii*, sendo que esta última cresce no meio com a canavanina e o torna azul-cobalto. As cepas submetidas a este teste foram inoculadas no meio por semeadura e incubadas a 25 °C por até 72 horas; sendo a leitura realizada diariamente.

3.3.7 Zimograma

Este teste foi realizado para comprovar a não fermentação de carboidratos, já que as leveduras do gênero *Cryptococcus* não fermentam açúcares. Foi inoculada uma alçada da amostra em tubos de ensaio contendo meio base para fermentação composto de peptona, extrato de levedura e dextrose 2%. A incubação foi realizada a 25 °C por 14 dias. No caso de positividade, é possível observar a presença de gás no interior dos tubos de Durhan, localizados dentro dos tubos de ensaio.

3.3.8 Auxanograma

Foi realizada uma suspensão das leveduras em concentração igual a cinco da escala de Mc Farland, em 4 mL de solução salina estéril. Essa suspensão foi vertida em uma placa de Petri (140 x 15mm) juntamente com o meio YNB (*Yeast Nitrogen Base* - DIFCO laboratories®, Difco Laboratories, Detroit, Mich.) fundido na temperatura média de 50 °C. As amostras foram homogeneizadas através de "*pour plate*"; e após a solidificação do meio de cultivo, foram aplicadas diferentes fontes de carbono à superfície do meio em espaços delimitados e equidistantes. Como as amostras eram de origem ambiental, foi efetuada a chave ambiental para identificação de leveduras de acordo com Kurtzman, Fell e Boekhout (2011). Desta chave foram instituídos dezoito açúcares diferentes: Amido solúvel, arabinose, celobiose, dulcitol, eritritol, galactose, glicose, inositol, lactose, maltose, melezitose, melibiose, rafinose, ramnose, ribitol, sacarose, trealose e xilose.

O mesmo procedimento foi realizado para o teste de assimilação de fontes nitrogenadas, empregando-se, contudo, o meio YCB (*Yeast Carbon Base* - DIFCO laboratories®, Detroit, Mich.). A incubação foi na temperatura de 25 °C por até 7 dias, com leitura diária. Dentre as fontes nitrogenadas utilizadas pode-se citar nitrato de potássio (KNO_3) e peptona.

As assimilações positivas foram verificadas pela formação do halo de crescimento pelas leveduras nos locais correspondes às aplicações.

3.3.9 Crescimento a diferentes temperaturas **(KURTZMAN; FELL, 1998)**

Para a realização deste teste inoculamos as amostras em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose. Os testes foram realizados em duplicata. Os isolados foram submetidos à temperaturas de 30 ºC e 37 ºC, durante 15 dias, com observações em dias alternados.

A inoculação das amostras no tubo foi feita de modo pontual, e logo após, foi desenhado um círculo com o mesmo tamanho e forma do inóculo, marcando, desta forma, o tamanho inicial da colônia.

3.3.10 Diferenciação molecular – Protocolo da Fundação do Instituto Oswaldo Cruz (RJ)

As cepas isoladas foram identificadas com base em testes fenotípicos e chaves de caracterização, segundo manual *The yeasts* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Após a caracterização dos isolados, as cepas foram mantidas em meio ágar Sabouraud dextrose e encaminhadas para avaliação dessas amostras pela técnica de RFLP – URA5 ao Laboratório de Micologia do IPEC/FIOCRUZ (Rio de janeiro). Essa técnica foi realizada para a confirmação ou não de *C. neoformans* e *C. gattii*.

3.3.10.1 PCR

Para a reação de PCR foi utilizado GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA). O volume total de cada reação foi = 25 µL.

O primer utilizado foi : URA5: 5´- ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3´

SJ01: 5´- TTAAGACCTCTCTGAACACCGTACTC-3´

Para cada microtubo utilizou-se: 12,5 µL de solução pronta para uso Green Master Mix, 1 µL de DNA, 0,7 µL de primer de URA5, 07 µL de primer SJ0. Completou-se com água ultra pura (água Milli Q autoclavada) até completar volume de 25 µL.

3.3.10.2 PCR-RFLP

Para essa reação, utilizou-se microtubos de 0,5 µL, sendo o volume de cada reação igual a 20 L.

Colocou-se no microtubo: 2 µL de tampão tango, 1 µL de enzima de restrição *Cfr* 131 (isômero *Sau* 96I), 1 µL de enzima de restrição *Hha*I, 5 µL de produto de PCR, 1 µL de água ultra pura (água Milli Q autoclavada). Os mircitubos foram colocados em banho maria 37 ºC por 3 horas e após esse período procedeu-se a corrida eletroforética e documentação em gel.

Os perfis foram assinalados visualmente por comparação com os perfis obtidos com as cepas referência: VNI-VNIV e VGI-VGIV (MEYER et al., 2003) – cepas referência representativas de cada tipo molecular (genótipo).

Cryptococcus neoformans – WM 148 – sorotipo A, VNI, WM 626 – sorotipo A VNII; WM628 – sorotipo AD, VNIII; WM629 – sorotipo D VNIV.

Cryptococcus gattii – WM 179 – sorotipo B, VGI; WM 178 – sorotipo B, VGII; WM 161 – sorotipo B VGIII; WM779 – sorotipo C, VGIV.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamentos

Os animais utilizados neste estudo passaram por uma breve pesquisa clínica para aferir o estado de higidez, o que poderia predizer ou não uma patologia. Quanto a esse quesito, todas as aves se apresentaram saudáveis, visto que o peso e a temperatura condiziam com os parâmetros normais, e nenhum outro sinal de doença foi encontrado. Foi estabelecida uma média de temperatura e peso total, outra média de temperatura e peso dos animais provenientes dos recintos internos e também do recinto externo. Os dados podem ser conferidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de peso e temperatura dos animais provenientes dos recintos internos e do recinto externo

	Média total	**Média recinto fechado**	**Média recinto aberto**
Peso	412 g	426 g	394 g
Temperatura	41,5 °C	41,1 °C	42 °C

Desde o início do processamento das amostras foram obtidas um total de 392 cepas morfologicamente diferentes, provenientes de inglúvio e da cloaca. Muitas dessas colônias não representavam o foco do trabalho (isolamento de leveduras do gênero *Cryptococcus*), e por isso foram descartadas. Levando-se em consideração o isolamento total das leveduras, as que pertenciam ao gênero *Cryptococcus* perfaziam 2,55%.

Do total de 40 animais pesquisados, isolamos de 10 aves (25%) leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus*. Das leveduras isoladas, 09 (90%) foram identificadas como *Cryptococcus albidus* var. *albidus* e 01 (10%) como *C. laurentii*. Todas as leveduras do complexo *Cryptococcus* foram isoladas de cloaca.

Dentre as cepas identificadas como *Cryptococcus*, 6 (60%) foram provenientes das aves que se encontravam em recinto fechado, enquanto que 4 (40%) foram provenientes de animais que se encontravam em recinto aberto, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Relação de aves, sítio de isolamento, recinto e identificação das cepas de leveduras provenientes de papagaios do gênero *Amazona aestiva*.

Aves	Sítio de isolamento	Recinto	Identificação
2	Cloaca	Fechado, n° 15	*C. albidus* var. *albidus*
3	Cloaca	Fechado, n° 15	*C. albidus* var. *albidus*
15	Cloaca	Fechado, n° 03	*C. albidus* var. *albidus*
16	Cloaca	Fechado, n° 10	*C. albidus* var. *albidus*
19	Cloaca	Fechado, n° 12	*C. albidus* var. *albidus*
21	Cloaca	Fechado, n° 13	*C. albidus* var. *albidus*
26	Cloaca	Aberto	*C. laurentii*
29	Cloaca	Aberto	*C. albidus* var. *albidus*
31	Cloaca	Aberto	*C. albidus* var. *albidus*
34	Cloaca	Aberto	*C. albidus* var. *albidus*

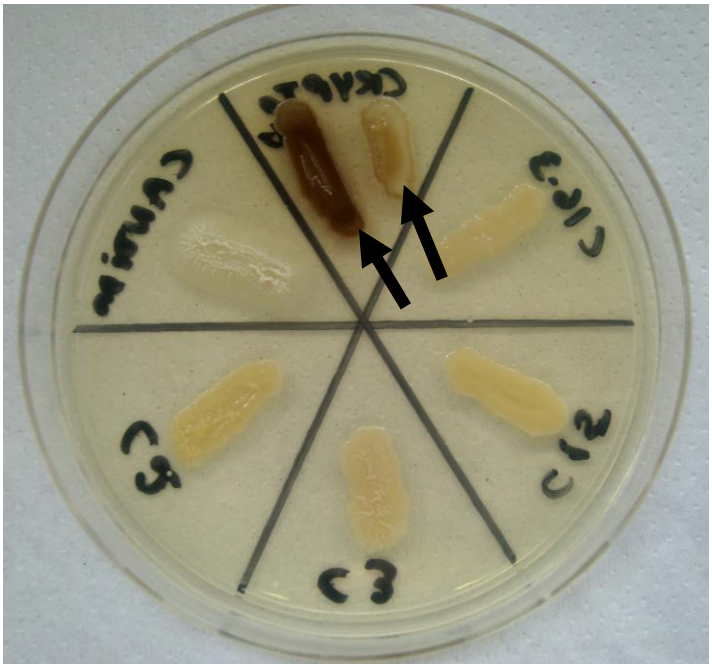
4.2 Fatores relacionados à virulência

4.2.1 Expressão da cor da colônia em meio contendo dopamina

As amostras utilizadas nesse teste passaram por um repique em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO) 48 horas antes da inoculação no meio contendo dopamina, para que assim, todas as cepas mantenham um padrão de crescimento e produção de cor semelhantes. Para comparação da intensidade da cor produzida ou não, foram utilizadas cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, *C. gattii* ATCC 56990 e *C. neoformans* ATCC 90112. Como já descrito em material e métodos, várias cepas foram inoculadas em placas previamente divididas para facilitar a comparação da cor produzida.

Neste teste, as amostras produziram uma leve coloração marrom-amarelada se comparadas com as cepas padrão; apresentaram cor mais fraca do que as padrões *C. gattii* ATCC 56990 e *C. neoformans* ATCC 90112; e mais forte do que a padrão de *C. albicans* ATCC 90028, Figura 9.

Figura 9 - Meio contendo dopamina, utilizado na identificação de *C. neoformans* e *C. gattii* (colônias amarronzadas). A colônia branca corresponde a *C. albicans* e as demais correspondem aos isolados deste trabalho (colônias marrom-amareladas).



4.2.2 Expressão da produção de urease

Neste meio, das 10 amostras testadas, todas tiveram a capacidade de hidrolisar a ureia, ou seja, promoveram a alcalinização do meio e a viragem do indicador de pH vermelho de fenol (Figura 10).

Figura 10 - Tubos de ensaio contendo meio de Christensen. O tubo da esquerda, inoculado com a amostra do estudo, se mostrou positivo para a produção de urease, enquanto que o tubo da direita, inoculado com *C. albicans*, não alterou sua coloração.

Fonte: Nascimento (2012).

4.2.3 Produção de fosfolipase

Na Tabela 4 podem ser verificados os valores de Pz e o respectivo índice para as 10 cepas do gênero *Cryptococcus*. Do total, dentre as amostras estudadas, 80% produziram fosfolipase com índice 3 (fortemente positivas) e as demais não produziram a enzima.

Tabela 4 - Produção de fosfolipase pelas cepas isoladas de cloaca de papagaios do gênero *Amazona aestiva.*

AMOSTRA	Pz	Resultado	Índice	Identificação
C2	0,31	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C3	0,33	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C15	0,28	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C16	0,34	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C19	0,28	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C21	0,32	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C26	1	Neg	1	*C. laurentii*
C29	0,35	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C31	0,32	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C34	1	Neg	1	*C. albidus* var. *albidus*

C – Cloaca, s/h - sem halo, FP – Fortemente Positiva, Neg – Negativa
1 = negativa / 2 = Positiva / 3 = Fortemente Positiva (Segundo Price et al., 1982)

4.2.4 Produção de proteinase

Como pode ser verificado na Tabela 5, oito amostras (80%) foram fortemente produtoras de proteinase, com índice 3; enquanto que duas (20%) foram somente produtoras, com índice 2 desta enzima.

Tabela 5 - Produção de proteinase pelas cepas isoladas de cloaca de papagaios do gênero *Amazona aestiva.*

AMOSTRA	Pz	Resultado	Índice	Identificação
C2	0,5	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C3	0,56	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C15	0,52	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C16	0,47	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C19	0,54	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C21	0,5	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C26	0,75	P	2	*C. laurentii*
C29	0,56	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C31	0,40	FP	3	*C. albidus* var. *albidus*
C34	0,66	P	2	*C. albidus* var. *albidus*

C – Cloaca, s/h - sem halo, FP – Fortemente Positiva, Neg – Negativa
1 = negativa / 2 = Positiva / 3 = Fortemente Positiva (Segundo Price et al., 1982)

4.3 Tipagem bioquímica das cepas

4.3.1 Inoculação em meio contendo Canavanina – Glicina - Azul de Bromotimol (CGB)

Das dez cepas submetidas a inoculação no meio CGB (Canavanina – Glicina – Azul de Bromotimol), nove (90%) se mostraram negativas, não alterando a cor do meio, e uma (10%) se mostrou positiva. A única amostra que se mostrou positiva é aquela que foi identificada como *C. laurentii*.

4.3.2 Zimograma e auxanograma

Todas as amostras (100%) submetidas ao zimograma não fermentaram a glicose.

No auxanograma, nove (90%) das amostras apresentaram características semelhantes na assimilação dos açúcares, e uma (10%) apresentou pequenas diferenças na assimilação dos mesmos. A relação das amostras e dos resultados encontrados esta na Tabela 6.

De todas as amostras pesquisadas, somente a C26 demonstrou comportamento diferenciado, sendo positiva para dulcitol e melibiose; e negativa para ribitol. A associação entre os dados obtidos através da assimilação de carboidratos e os outros testes realizados nos

levou a identificação de *C. laurentii*, pelas chaves taxonômicas pertinentes, e as demais se enquadravam como de *C. albidus* var. *albidus*.

Tabela 6 - Resultados de zimograma e auxanograma refrentes às cepas isoladas de cloaca de papagaio do gênero *Amazona aestiva*. Em destaque amostra de *C. laurentii*.

	C2	C3	C15	C16	C19	C21	C26	C29	C31	C34
Amido solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol/galactitol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.4 Crescimento a 30 °C e 37 °C

Nesta prova, após a incubação em temperaturas diferentes, as leveduras apresentaram comportamento de desenvolvimento distinto. Todas as amostras submetidas a temperatura de 30 °C se desenvolveram. Não se notou desenvolvimento nas leveduras incubadas a temperatura de 37 °C.

4.5 Diferenciação molecular (como método de exclusão para *C. neoformans* e *C. gattii*)

No processo de PCR não ocorreu amplificação do genoma das amostras leveduriformes, provavelmente em função dos "*primers*" utilizados específicos para *C. neoformans* e *C. gattii*. Portanto, nenhuma das amostras isoladas eram das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, prevalecendo a identificação fenotípica mesmo com a leitura da produção da fenoloxidase duvidosa e CGB positivo para uma das amostras.

5 DISCUSSÃO

A relação *Cryptococcus*-ave é de grande importância ecológica e epidemiológica, e também é amplamente estudada; prova disso é o grande número de publicações acerca do assunto. A partir da primeira descrição do isolamento da levedura em excreta de pombos por Emmons (1955), muitos outros trabalhos foram publicados evidenciando a prevalência do fungo nas excretas de columbiformes e de outras aves, em diferentes localidades do mundo. Carter (1988) associou a presença da levedura com ninhos e filhotes de aves, e Lázera, Igreja e Wanke (2010) afirmaram que *C. neoformans* é cosmopolita, estando relacionado principalmente à *habitats* de pombos e de aves criadas em cativeiro. Diversos autores também confirmaram a presença da levedura em excretas de pombos (BARONI et al., 2006; CHEE; LEE, 2005; FILIÚ et al., 2002; NIELSEN; OBALDIA; HEITMAN, 2007; PAL, 1997; REOLON; PEREZ; MEZZARL, 2004).

Publicações descrevendo a levedura em outras espécies de aves também podem ser lidas. No trabalho de Hedayati et al. (2011), verificou-se o isolamento de *C. neoformans* a partir das fezes de andorinha (*Hirundo rustica*), e no trabalho de Pereira (2006a), constatou-se o isolamento da mesma espécie de levedura em jandaia mitrata (*Aratinga mitrata*) residente em um zoológico, o que confirma a presença do agente em aves exóticas e o torna importante sob o ponto de vista de Saúde Pública. O zoológico é um local de grande circulação de pessoas, que podem entrar em contato com os recintos das aves, e consequentemente, serem expostas ao agente.

O isolamento de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* é frequente quando se trata de material orgânico proveniente, principalmente, de fezes de aves; contudo, a recuperação de cepas pertencentes ao gênero a partir da cloaca e do inglúvio de psitacídeos, objeto deste estudo, é um fator ainda pouco estudado. Lugarini (2007) estudou excretas de passeriformes e psitaciformes, bem como realizou um estudo a partir da inserção de "*swab*" no inglúvio e na cloaca das aves. *Cryptococcus neoformans* foi isolado de 24,11% das amostras de excretas de passeriformes e em 1,42% das amostras de excretas de psitaciformes; não sendo isoladas amostras da levedura a partir da cloaca e do inglúvio das aves; o que leva à conclusão de que as leveduras talvez não tenham um caráter endossaprobiótico no aparelho digestório de passeriformes e psitaciformes. No presente trabalho, também foram realizadas coletas de amostras a partir da cloaca, com a introdução de *"swabs"*; e também a partir do papo, com a técnica de lavado do inglúvio. Contudo, apesar de não ter havido isolamentos de

leveduras do gênero *Cryptococcus* a partir do inglúvio, todos os isolados do gênero foram provenientes das amostras de cloaca de animais clinicamente saudáveis.

Lugarini et al. (2008) realizaram isolamento de *C. neoformans* a partir de excretas de passeriformes e psitaciformes, sendo que 25,43% das amostras apresentaram levedura. Em trabalho realizado com aves e várias amostras ambientais no México, López-Martínez e Castañón-Olivares (1995) citam o papagaio como a fonte mais importante da levedura dentre as demais amostras ambientais coletadas. Em experimento realizado também com papagaios mantidos em cativeiro, Pal (2005) realizou coleta de amostras de fezes secas e frescas, e das 45 amostras isoladas totais, nove foram provenientes de fezes secas, enquanto que uma foi proveniente de fezes úmidas. Em nosso trabalho não foram coletadas fezes provenientes do ambiente; as amostras foram retiradas diretamente da cloaca, fato que pode explicar a baixa porcentagem das leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, se comparada ao total das amostras isoladas. Outro fator que deve ser levado em consideração é a competição entre os microrganismos integrantes dessa região anatômica da ave. O ambiente controlado ou não pode também interferir no isolamento das espécies de leveduras, assim como a espécie da ave estudada.

Aves marinhas da Antarctica também foram estudadas por Chryssanthou et al. (2011), sendo isoladas leveduras da espécie *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. gattii*. Estes trabalhos evidenciam de forma clara o papel da ave na manutenção da levedura no ambiente. No presente trabalho, isolamos também *Cryptococcus albidus*, assim como no trabalho citado.

Além de trabalhos descrevendo o isolamento da levedura a partir de excretas de aves, existem também aqueles que referem o isolamento do fungo a partir de amostras ambientais, relacionadas ou não com a presença de aves e das excretas das mesmas. No trabalho de Baroni et al. (2006) foi realizado o isolamento da levedura a partir de excretas de pombos e também do ar de torres de igrejas e de suas proximidades, sendo isoladas não somente cepas de *C. neoformans*, como também cepas de *C. albidus*, não se determinando a variedade.

As fontes ambientais de onde podem ser isoladas leveduras, que compõem o gênero *Cryptococcus*, são extensamente estudadas, visando estabelecer a relação do microrganismo com o ambiente, e assim determinar sua ecologia. É possível encontrar trabalhos que relatam o isolamento da levedura a partir de ocos de árvores vivas, pedaços de madeira, cascas de árvores e matéria orgânica vegetal em decomposição. O trabalho descrito por Lázera, Igreja e Wanke (2010), confirma essa hipótese, visto que isolaram a levedura de várias espécies arbóreas; assim como Escandón et al. (2005), que isolaram a levedura a partir de detritos de *Eucalyptus* spp. Lazera et al. (2000) também recuperaram a levedura a partir de amostras de

madeira em decomposição retiradas de ocos de árvores. Baltazar e Ribeito (2008) descrevem que além de realizar o isolamento de *C. neoformans* a partir de árvores, também recuperaram *C. gattii* e *C. laurentii*. Assim também procedeu Kobayashi et al. (2005) que realizaram pesquisa ambiental e encontraram leveduras do gênero *Cryptococcus* provenientes de excrementos de aves e de *Eucalyptus*. A levedura também foi pesquisada em uma madeireira, onde se confirmou sua presença em pó de madeira, excreta seca de galinha e de pombo e a possível transmissão do fungo a um indivíduo HIV negativo que residia e trabalhava na mesma madeireira (CRESTANI, 2007). Como pudemos observar pela literatura acima citada, o maior número de pesquisas é restrito às espécies *C. neoformans* e *C. gattii* e no meio ambiente. Outras espécies do gênero, tais como *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii* são menos descritas não se levando em consideração sua importância como patógenos e sua interação no meio ambiente.

Assim como *C. neoformans* e *C. gattii*, outras leveduras do gênero *Cryptococcus* também podem ser encontradas nos mais variados ambientes. Brandsberg e Kretchmer (1972) ao avaliar amostras de alimentos de aves encontraram espécies como *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. luteolus*, sendo *C. albidus* mais predominante do que *C. laurentii*. O pó de livros de bibliotecas também foi pesquisado por Leite Jr. et al. (2012), que isolou *C. gattii*, *C. albidus*, *C. terreus*, *C. luteolus*, *C. neoformans* e *C. uniguttulatus*. A partir de amostras do solo, Vital et al. (2002) também realizou o isolamento de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, descrevendo, inclusive a recuperação de *C. laurentii* e *C. albidus* a partir deste material. Como pudemos notar as espécies *C. albidus* e *C. laurentii* já foram isoladas de alimentos de aves. Este é um dado importante, visto que um alimento contaminado com a levedura também pode resultar em contaminação da ave; e as fezes da ave contaminada, podem carrear o microrganismo novamente para o alimento exposto.

Leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* também foram isoladas a partir da cloaca de psitacídeos por González-Hein, González e Diaz (2010). Do total de amostras, três foram identificadas como *C. albidus*, duas como *C. laurentii* e uma como *C. neoformans*. As leveduras também foram recuperadas a partir de amostras provenientes de cloacas de pombos, sendo 1,81% das amostras identificadas como *C. laurentii* e 0,91% identificadas como *C. albidus* (ROSARIO et al., 2005). Em outro trabalho, Rosario et al. (2010) descreve que realizou isolamento de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* a partir de fezes e papo de pombos; sendo que do papo 9,66% foram identificadas como *C. neoformans*, 7,2% corresponderam a *C. unigittulatus*, 6,9% foram *C. albidus* e 0,6% foram *C. laurentii*. Em nosso trabalho, apesar de pesquisarmos a levedura no papo, neste sítio não foi recuperada

nenhuma colônia correspondente ao gênero, sendo a totalidade das amostras isoladas provenientes da cloaca, e as espécies isoladas foram *C. albidus* e *C. laurentii*.

Além dos trabalhos já descritos, outros relatam o isolamento de leveduras não-*neoformans* e não-*gattii* em fezes de pombos, como é o caso de Bernardo, Martins e Martins (2001), Filion, Kidd e Aguirre (2006), Jang et al. (2011), Santos et al. (2005).

Da mesma forma como é possível encontrar pesquisas sobre a presença da levedura no ambiente, também é possível encontrar descrições nas quais a mesma foi estudada, contudo não foi recuperada, como no caso de Mancianti, Nardoni e Cecherelli (2001), que estudaram a presença da levedura em excretas de psitacíceos, mas não realizaram o seu isolamento. Rezende, Munhóz e Almeida (2008) também não conseguiram o isomento do fungo a partir de frutas, fezes de aves e detritos de plantas, e relataram que não foi detectada a presença da levedura após 5 dias da inoculação da mesma. Santos et al. (2009) também não constataram isolamento da levedura do gênero *Cryptococcus* a partir da cloaca, coanas e excretas de passeriformes e psitaciformes enjaulados; contudo, descreveram que houve a recuperação de outras leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, tais como *C. albicans*, *C. famata* e *C. tropicalis*. Em nosso trabalho, foi possível recuperar *C. albidus* e *C. laurentii* a partir de amostras provenientes da cloaca, sendo que as amostras provenientes do inglúvio foram negativas para leveduras do gênero.

Assim como no trabalho de Santos et al. (2009) na fase inicial dos nossos isolamentos, muitas outras leveduras foram encontradas, porém, não se realizou identificação fenotípica, visto que não se tratava do objetivo deste trabalho. De acordo com as características macro e microscópicas das colônias, e da coloração evidenciada pelo meio de cultivo CHROmagar® (Paris, França) podemos sugerir que houve o isolamento de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* e ao gênero *Rhodotorula* (com colônias tipicamente alaranjadas). Colônias secas e rugosas poderiam ser isolados de *Trichosporon* spp.

A criptococose é uma afecção causada por *Cryptococcus* que vem sendo estudada desde sua primeira descrição na literatura, realizada por Zenker, em 1861. Daquela época em diante, a doença e a levedura tiveram muitas denominações diferentes, decorrentes de inúmeras pesquisas acerca do microrganismo, sua ecologia, sua epidemiologia e sua patogenia até se chegar à classificação dos dias atuais (HEITMAN et al., 2011). Ainda é possível encontrar descrições em livros e artigos da antiga classificação de *Cryptococcus neoformans* em três variedades: *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B e C), *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (Sorotipo D e AD) (FRANZOT et al., 1999). Atualmente, o que era conhecido como a antiga variedade *gattii* corresponde à espécie

Cryptococcus gattii, e as variedades *grubii* e *neoformans* correspondem à espécie *C. neoformans* (HEITMAN et al., 2011; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Assim também ocorre com as leveduras não pertencentes ao complexo *C. gatti* e *C. neoformans*, que estão sendo constantemente reclassificadas à medida em que avançam as técnicas de identificação laboratorial e moleculares.

Assim também acontece na espécie *C. albidus*, que segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), possui três variedades: *C. albidus* var. *albidus*; *C. albidus* var. *kuetzingii* e *C. albidus* var. *ovalis*. As três variedades apresentam características que as diferenciam entre si; como no caso da coloração da colônia, na qual a variedade *C. albidus* se caracteriza por produzir pigmentação que varia de creme a rosada; enquanto que as outras duas variedades (*C. kuetzingii* e *C. ovalis*) possuem colônias com coloração creme e creme-amarelada, respectivamente. Em nosso experimento, 90% das amostras isoladas apresentavam colônias com coloração levemente rosada, o que as pré-direcionou na identificação como *C. albidus* var. *albidus*. Todas apresentavam aspecto mucóide, liso e brilhante.

No caso de *C. laurentii*, Kurtzman, Fell e Boekhout (2011) descrevem que a colônia possui coloração pálida creme-acinzentada, com aspecto mucóide; sendo as células amplamente elipsoidais a cilíndricas. De fato nossas culturas apresentaram coloração pálida com aspecto mucoso, e ao exame direto, células com formatos cilíndricos foram presenciadas.

De acordo com o descrito por Pfaller, Mcgginnis e Anaissie (2009), as leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* são capazes de crescer em meios de cultura de rotina, como ágar Sabouraud dextrose, com desenvolvimento em 48-72 horas. Gompertz et al. (2008) afirmam que as colônias do fungo podem crescer de três a sete dias a partir da data da inoculação, apresentando-se com aspecto mucóide, brilhante e com coloração que varia de branco-creme à amarelo amarronzado. Essas características também foram notadas em nosso trabalho; as leveduras iniciaram crescimento notadamente insidioso, a partir do sétimo dia da inoculação, com colônias apresentando aspecto mucóide e brilhante, que as distinguia de outras colônias contaminantes.

A temperatura é um fator limitante no crescimento e desenvolvimento das diferentes espécies e variedades de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Kurtzman e Fell (1998) descrevem que as leveduras pertencentes às espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de crescer à temperatura ambiente ou a 37°C, sendo que temperaturas superiores às descritas podem matar o fungo. Essas espécies crescem facilmente na temperatura em torno de 30 °C, como ficou relatado no trabalho de Reolon, Perez e Mezzarl (2004). Fernandes et al. (2000) submeteram suas amostras provenientes de liquido cefalorraquidiano à 37 °C, as

leveduras cresceram e foram identificadas como C. *neoformans* e *C. gattii*. Pedroso, Ferreira e Candido (2009) relatam em seu trabalho que de todas as leveduras cultivadas a partir de excrementos de aves e amostras ambientais, todas as cepas de *C. neoformans*, 20% de *C. albidus* e 44,4% de *C. laurentii* foram capazes de crescer a 37°C. A baixa taxa de crescimento das espécies não-*neoformans* se comparadas com a espécie *C. neoformans* confirma a hipótese de crescimento insidioso da maioria das cepas não-*neoformans* e não-*gattii*. E, considerando a problemática inicial da temperatura funcional do corpo humano, fica plausível entender o porquê encontramos mais relatos de patologias envolvendo *C. neoformans* e *C. gattii* do que outras leveduras que não pertencem à essas espécies: a sensibilidade à uma elevada temperatura é maior e se torna um fator limitante para o desenvolvimento da cepa e consequente desenvolvimento da doença.

Assim, a capacidade de suportar 37 °C é de relevância patológica, visto que se aproxima muito da temperatura de funcionamento do organismo humano. As cepas recuperadas neste experimento foram submetidas a essa temperatura, e nenhuma delas conseguiu sobreviver ao teste. Contudo, quando submetidas à temperatura de 30 °C, todas (100%) foram capazes de se desenvolver. Descrições como as de Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), afirmam que as variedades de *C. albidus* e a espécies *C. laurentii* são capazes de crescer à temperatura em torno de 20 °C; e que *C. laurentii* tem crescimento variável à 37 °C. Ferreira-Paim et al. (2011) afirmam que as leveduras isoladas em seu trabalho eram da espécie *C. laurentii*, e cresciam à 37 °C, contudo, a temperatura ideal de crescimento girou em torno de 35 °C. Pedroso et al. (2009) também relatam que algumas cepas de *C. albidus* e *C. laurentii* conseguiram se desenvolver quando submetidas à temperatura de 37 °C; assim como no trabalho de Leite Jr. et al. (2012) relatam que as amostras coletadas em seu trabalho foram submetidas à incubação à 37 °C por 5 a 7 dias, sendo que as leveduras isoladas foram: 36,6% de *C. gattii*, 4,6% de *C. albidus*, 29,3% de *C. terreus*, 9,8% de *C. luteolus*, 7,3% de *C. neoformans*, 7,3% de *C. uniguttulatus*. Apesar de estar em menor porcentagem, a espécie *C. albidus* foi capaz de sobreviver a incubação à essa temperatura, característica não confirmada neste trabalho.

Reolon, Perez e Mezzarl (2004) realizaram isolamento de *C. neoformans* a partir de excretas de pombos. As amostras foram incubadas por cinco dias em ágar Sabouraud dextrose, sendo 100% positivas para a levedura. Em nossos isolamentos, o tempo de incubação das primeiras amostras foi de 10 dias, e à 25 °C, visando retardar o crescimento de fungos filamentosos que poderiam contaminar e condenar a placa ao descarte. Destaca-se o comportamento de crescimento insidioso nestas condições de incubação. Pal (2005), também

incubou suas amostras provenientes de fezes secas e frescas de papagaios à temperatura de 25 °C, sendo o cultivo em ágar semente de girassol, já que em ágar Sabouraud dextrose observou-se rápida contaminação da placa por fungos filamentosos.

Sobre a micromorfologia de *C. neoformans*, Gompertz et al. (2008) descreve que as células possuem formato esférico, podendo ser visualizadas estruturas de diferentes tamanhos resultante de sua reprodução por brotamento. Essa afirmação é de especial importância, já que as células visualizadas no exame direto deste experimento tinham como característica morfologia ovalada, o que, em um primeiro momento, já serve como um indício de leveduras não-*neoformans* e não-*gattii*. De fato, quando nos referimos a *C. albidus* var. *albidus*, *C. albidus* var. *kuetzingii*, *C. albidus* var. *ovalis* e *C. laurentii*, a descrição de Kurtzman, Fell e Boekhout (2011) define as células destas espécies como ovoides, subglobosas ou elipsoidais.

De acordo com Gompertz et al. (2008) e Lacaz et al. (2002), a cápsula produzida pelas leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* são associadas à sua patogenicidade pois dificultam o reconhecimento das mesmas pelo sistema imunológico, interferindo diretamente em sua fagocitose. Trata-se de um importante auxiliar no diagnóstico da levedura, visto que, quando submetida à técnica de coloração com tinta nankin ou tinta da China, a cápsula não se cora, o que permite a sua visualização (GOMPERTZ et al., 2008). Lázera, Igreja e Wanke (2010), além de concordarem com os autores acima citados sobre a interferência da cápsula na fagocitose das leveduras pelo organismo hospedeiro, ainda acrescentam que, quando em alta concentração, pode bloquear a quimiotaxia de células de defesa e inibir a síntese de anticorpos, sendo que variantes genéticas sem a cápsula obtidas em laboratório não são capazes de causar a doença. Assim também afirmaram Small e Mitchell (1986, 1989), os quais descrevem em seus trabalhos que quando estão sem a cápsula, as leveduras são facilmente fagocitadas pelos macrófagos e monócitos.

Ainda sobre a cápsula, Zaragoza et al. (2009) afirmam que o tamanho da mesma é variável de acordo com as diferentes espécies existentes e também de acordo com a individualidade de cada célula. Em nosso trabalho, após o primeiro isolamento e purificação das colônias, foi realizado o exame direto das mesmas com tinta nankin, contudo, todas as cepas isoladas (100%) não apresentaram cápsula desenvolvida, talvez pelo fato de não estarem infectantes (causando doença) ou por que não estavam sendo submetidas a estresse, visto que foram isoladas da cloaca de aves sadias (sem sinais clínicos). Em trabalho realizado por Pedroso, Ferreira e Candido (2009), os autores testaram vários fatores de virulência de várias espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, e determinaram que quanto à produção de cápsula, 93,3% das amostras de *C. neoformans* foram capazes de sintetizá-la, contra 66,7%

de *C. albidus* e 88,9% de *C. laurentii*. Nota-se que apesar da alta porcentagem de produção de cápsula das amostras de *C. neoformans, C. albidus* e *C.gattii* também foram capazes de produzi-la, o que não foi verificado por nossas amostras.

De acordo com Gompertz et al. (2008) leveduras do gênero *Cryptococcus* são capazes de produzir melanina, e quando cultivadas em meio contendo dopamina, a espécie *C. neoformans* apresenta-se com coloração escura à negra. Além de conferir à levedura proteção antioxidante (WILLIAMSON, 1997), a melanina também tem ação anti-fagocitária contra as células de defesa do hospedeiro (LIN; CHRISTENSEN, 1994; WILLIAMSON; WAKAMATSU; ITO, 1998), sendo uma característica muito utilizada em uma das etapas de identificação da levedura (LIU; NIZET, 2009). As nossas amostras foram inoculadas em meio contendo dopamina juntamente com cepas ATCC padrão de *C. neoformans* 90112, *C. gattii* 56990 e *C. albicans* 90028, para facilitar a comparação da tonalidade produzida. *C. neoformans* e *C. gattii* produziram coloração escurecida amarronzada no meio, enquanto que *C. albicans* não alterou sua cor, permanecendo a coloração branca da colônia. As cepas isoladas neste experimento produziram tonalidade fraca quando comparadas às cepas padrão de *C. neoformans* e *C. gattii*; e tonalidade um pouco mais forte se comparadas à amostra padrão de *C. albicans*.

Assim também relatou Pedroso et al. (2007), ao avaliar a produção do pigmento por diferentes cepas, em diferentes meios. Os autores descreveram que *C. albidus* e *C. laurentii* apresentaram pigmento nos diferentes meios de cultura que foi definido após 8 dias de incubação, sendo que os meios ágar batata e cenoura, ágar semente de girassol e ágar L-dopa foram os que evidenciaram melhor a coloração, sobretudo, bem menos intensa do que a coloração produzida por isolados de *C. neoformans*. Esta característica foi explicada por Ikeda et al. (2002), que afirmaram em seu trabalho que as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* produzem melanina de uma forma mais pronunciada do que outras leveduras do gênero; característica também evidenciada no trabalho de Menezes, Penatti e Pedroso (2011). Também avaliando a produção da lacase em cepas ambientais, Chan e Tay (2009) afirmam que a quantidade sintetizada da enzima foi insignificante nos isolados não-*neoformans*

As cepas isoladas nesta pesquisa foram submetidas à tipagem bioquímica em meio CGB. As amostras de *C. albidus* var. *albidus* não alteraram a cor do meio, que se manteve com tonalidade amarelada, contudo, *C. laurentii* tornou o meio azul-cobalto, fato que poderia induzir ao erro, visto que sabidamente *C. gattii* também altera a tonalidade do meio. Esse fator foi igualmente relatado por Tay, Na e Tajjudin (2008), que descreveram que suas

amostras de *C. laurentii* também modificaram a cor do meio, enquanto que a *C. albidus* manteve a coloração do mesmo inalterada.

Quanto à produção de fosfolipase, 80% de nossos isolamentos foram capazes de produzir fortemente a enzima, o que é de especial importância, já que se trata de uma substância que tem a capacidade de hidrolisar fosfolipídeos do hospedeiro (COX et al., 2001; SIAFAKAS et al., 2006), que é um importante componente da membrana plasmática dos hospedeiros. Cafarchia et al. (2008) também avaliaram a atividade fosfolipásica de suas amostras, que se mostrou alta após cinco dias de incubação, sendo que *C. albidus* e *C. laurentii* foram as leveduras que apresentaram a maior produção da enzima. Ferreira-Paim et al. (2011) avaliaram em seu estudo a atividade de fosfolipase, proteinase e hemolisinas provenientes de 38 isolados de *C. laurentii*, e descreveram que todos os isolados produziram fosfolipase, e em contrapartida, nenhum isolado exibiu a produção de proteinase.

A proteinase é uma enzima que também pode ser produzida por leveduras do gênero *Cryptococcus*, e foi produzida por 100% das cepas de *C. albidus* e *C. laurentii* isoladas neste trabalho, sendo que 80% das mesmas foram fortemente produtoras desta substância. Casadevall e Perfect (1998) descreveram que essas enzimas tem a função de degradar os tecidos do hospedeiro e destruir proteínas imunologicamente importantes; e Calderoni e Fonzi (2001) complementam que também podem agir na coagulação sanguínea e na morte celular. Diversos trabalhos relatam a capacidade das cepas isoladas de produzirem a enzima, como nos estudos de Campos e Baroni (2010), Pereira (2006b) e Vidotto et al. (2005).

O fato de as cepas isoladas nesta pesquisa serem produtoras e fortemente produtoras de proteinase e fosfolipase lhes confere especial importância clínica, visto que ambas as enzimas produzidas são importantes fatores de virulência.

As leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* são descritas como as mais importantes clinicamente, capazes de causar a criptococose humana e animal principalmente em pacientes com alterações ligadas ao sistema imunológico que levem à imunodepressão (BARONI et al., 2006; BICANIC; HARRISON, 2005; CASADEVALL; PERFECT, 1998; DARZÉ et al., 2000; JOHNSON et al., 1998; LACAZ et al., 2002; LEAL, 2006; LEGGIADRO, BARRET; HUGUES, 1992; MONTENEGRO; PAULA, 2000; PEDROSO; CANDIDO, 2006; SEVERO, 1993). Em relatos de casos relacionados às afecções clínicas causadas por essas espécies, é importante destacar os fatores predisponentes dos indivíduos afetados, bem como os fatores de virulência do microrganismo (OLIVEIRA et al., 2008). No relato de Rodriguez et al. (2007) por exemplo, a doença acometeu um paciente de 64 anos, com depressão imunológica que trabalhava em uma granja, de onde provavelmente adquiriu a levedura.

Pappalardo e Melhem (2003) afirmam em seu estudo que o aumento de casos de indivídus portadores do vírus da AIDS foi acompanhado pelo aumento da incidência da doença, sendo considerada por Moreira et al. (2006) de caráter oportunista com maior morbidade e mortalidade em pacientes com problemas na imunidade. A maior parte das afecções é causada por leveduras da espécie *C. neoformans* e *C. gattii*; contudo, outras espécies fora deste complexo e dentro do mesmo gênero vêm atraindo a atenção de pesquisadores e clínicos que têm descrito um aumento no número de afecções ocasionadas por estas leveduras. Kwon-Chung et al. (2011) afirmam que a espécie *C. albidus*, além de ser um patógeno oportunista, também compreende cerca de 80% dos casos de criptococose não-*neoformans* e não-*gattii*, podendo também promover infecções em indivíduos imunocomprometidos (YANG et al., 2011).

Descrições de criptococose por indivíduos sem o vírus da AIDS também podem ser lidas, como no relato de Pandit et al. (2006), no qual a infecção pela levedura foi atribuída ao uso de esteróides contra um quadro de polimiosite; e no relato de Lambertucci, Franco e Queiroz (2005), no qual um paciente também sem evidências de imunossupressão e/ou outras morbidades associadas acabou por desenvolver a doença. Nesses dois relatos, a espécie identificada como causadora da doença foi *C. neoformans*. Contudo, Bicanic e Harrison (2005); Levitz e Boekhout (2006) e Severo (1993), descrevem que a espécie mais importante do ponto de vista clínico para pacientes imunocompetentes é o *C. gattii*.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- Foi possível isolar leveduras do gênero *Cryptococcus* a partir da cloaca de psitacídeos do gênero *Amazona aestiva*; mas em pequena porcentagem (2,55%) se comparada ao total de amostras isoladas;

- dentre as leveduras isoladas da cloaca e pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, 90% foram identificadas como sendo da espécie *C. albidus* var. *albidus* e 10% foram identificadas como pertencente à espécie *C. laurentii;*

- em meio específico para produção de fenoloxidase, as leveduras apresentaram coloração marrom-amarelada, fato este que pode induzir a um resultado falso-positivo na identificação de cepas do complexo patogênico de *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*);

- a amostra de *C. laurentii* isolada apresentou teste positivo em meio CGB, que é utilizado para a prévia identificação de *C. gattii*;

- a temperatura ótima de crescimento para as leveduras isoladas foi em torno de 25 °C, sendo que temperaturas superiores a 30 °C comprometeram o desenvolvimento das colônias. Este fato pode estar associado a uma menor virulência das cepas;

- neste estudo, as leveduras isoladas foram produtoras das exoenzimas proteinase e fosfolipase, consideradas fatores relacionados a virulência dos microrganismos;

- o conjunto de resultados confirma o papel e a relevância de papagaios do gênero *Amazona aestiva* como fonte de disseminação de leveduras no meio ambiente.

REFERÊNCIAS*

AVERBUCH, D.; BOEKHOUTT, T.; FALK, R.; ENGELHARD, D.; SHAPIRO, M. BLOCK, C. POLACHECK, I. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. **Med. Mycol.,** v. 40, p. 479-484, 2002.

BALTAZAR, L. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 41, p. 449-453, 2008.

BANGERT, R. L.; CHO, B. R.; WIDDERS, P. R.; STAUBER, E. H.; WARD, A. C. S. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. **Avian Dis.,** v. 32, p. 46-52, 1988.

BARRETO DE OLIVEIRA, M. T.; HEITMAN, J.; BOEKHOUT, T.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **J. Clin. Microbiol.,** v. 42, n. 3, p. 1356-1359, 2004.

BARONI, F. A. ***Cryptococcus neoformans* isolados de torres de igreja na cidade do Rio de Janeiro, R.J., Brasil.** 2001. 159 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BARONI, F. A. **Determinação da presença de leveduras do gênero *Cryptococcus* em espécies arbóreas**. 2011. 89 f. Relatório (Pós-Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BARONI, F. A.; PAULA, C. R.; SILVA, E. G.; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N. G.; OLIVEIRA, M. T. B.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.,** v. 48, p. 71-75, 2006.

BAUCK, L. B. Mycoses. In: RITCHIE B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON L. R. (Ed.). **Avian medicine**: principles and application. Lake Worth, F.L.: Wingers Publishing, 1994. p. 998-1006.

BAUTERS, T. G. M.; SWINNE, D.; BOEKHOUT, T.; NOENS, L.; NELIS, H. J. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. **Mycopathologia,** v. 153, p. 133-135, 2001.

BERNARDO, F. M.; MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. Fontes urbanas de *Cryptococcus* spp. – Lisboa. **Rev. Port. Cienc. Veter.,** v. 96, p. 157-160, 2001.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **Br. Med. Bull.,** London. v. 72, n. 1, p. 99-118, 2005.

BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; GUIMARÃES, L. S.; DEZANET, S.; HACK NETO, P. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridrões em maçãs. **Fitopatol. Bras.,** v. 29, p. 433-436, 2004.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOEKOUT, T.;THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C.; ABELN, E. C.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology,** v. 147, p. 891-907, 2001.

BOTTONE, E. J.; SALKIN, I. F.; HURD, N. J.; WORMSER, G. P. Serogroup distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.,** v. 156, p. 238-242, 1987.

BRANDSBERG, J. W.; KRETCHMER, P. B. Cryptococococci of commercial bird feeds. **Sabouraudia,** v. 10, p. 43-46, 1972.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. Whats makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerg. Infect. Dis.,** v. 4, p. 71-74, 1998.

BURNIK, C.; ALTINTAS, N. D.; ÖZKAYA, G.; SERTER, T.; SELÇUK, Z. T.; FIRAT, P.; ARIKAN, S. CUENCA-ESTRELLA, M.; TOPELI, A. Acute respiratory distress syndrome due to *Cryptococcus albidus* pneumonia: Case report and review of the literature. **Med. Mycol.,** v. 45, p. 469-473, 2007.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; COCCIOLI, A.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications from human disease. **Med. Mycol.,** v. 46, p. 429-434, 2008.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, S.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Med. Mycol.,** v. 44, p. 485-492, 2006.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends. Microbiol.,** v. 9, p. 327-335, 2001.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans, C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Rev. Pat. Trop.,** v. 39, n. 2, p. 83-89, 2010.

CAMPOS, F. L.; PEREIRA, J. R.; DA SILVA, M. V.; DOS SANTOS, B. C. P.; BARONI, F. A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans, C. gattii* e *C. laurentii* do sistema nervoso central de cães na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Act. Sci. Vet.,** v. 37, p. 351-355, 2009.

CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington: ASM Press, 1998. 541 p.

CASTRO, L. E. F.; SARRAF, O. A.; LALLY, J. M.; SANDOVAL, H. P., SOLOMON, K. D.; VROMAN, D. T. *Cryptococcus albidus* keratitis after corneal transplantation. **Cornea,** v. 24, p. 882-883, 2005.

CHAN, M. Y.; TAY, S. T. Enzymatic characterization of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp. **Mycoses,** v. 53, p. 26-31, 2009.

CHEE, H. Y.; LEE, K. B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. **J. Microbiol.,** v. 43, n. 5, p. 469-472, 2005.

CHENG, M. F.; CHIOU, C. C.; LIU, Y.; WANG, H.; HSIEH, K. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **J. Clin. Microbiol.,** v. 39, p. 1608-1611, 2001.

CHRYSSANTHOU, E.; WENNBERG, H.; BONNEDAHL, J.; OLSEN, B. Occurrence of yeasts in faecal samples from Antarctic and South American seabirds. **Mycoses**, v. 54, e 811-e 815, 2011.

CHUTE, H. L. Miscellaneous fungal infections. In: CAINEK, B. W. (Ed.). **Diseases of poultry.** Ames, I.A.: Iowa State University Press, 1991. p. 338.

CLEVELAND, K. O.; GELFAND, M. S.; RAO, V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to *Cryptococcus albidus* in a liver transplant recipient. **Q. J. M.**, 2012. doi:10.1093/qjmed/hcs133, 2012.

CLIPSHAM, R.; BRITT, J. O. Disseminated cryptococcosis in a green-winged macaw. **J. Am. Vet. Med. Assoc.,** v. 183, p. 1303-1304, 1983.

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

COSTA, A. K. F. **Leveduras associadas à cloaca e a excrementos de pombos (*Columba livia*)**: um enfoque especial para aspectos micológicos de *Cryptococcus spp.* 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

COSTA, A. K. F.; SIDRIM, J. J. C.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* Strains in Northeast Brazil. **Mycopathologia,** v. 169, p. 207-213, 2010.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSOM, M.; WRIGHT, L. C.; SORREL, S. D. LEIDICH, A.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.,** v. 39, p. 166-175, 2001.

CRESTANI, J. **Isolamento e caracterização de leveduras de uma madeireira e sua correlação com um caso clínico de Criptococose**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DAMBROSI, A. et al. Cryptococcosis por *Cryptococcus albidus*. **Rev. Argent. Micol.,** v. 10. p. 16-19, 1987.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 33, n. 1, p. 21-26, 2000.

DE JESUS, D. M.; NICOLA, A. M.; CHOW, S - K.; LEE, I. R.; NONG, S.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M.; CASADEVALL, A. Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence,** v. 1, n. 6, p. 500-508, 2010.

DECOSTERE, A.; HERMANS, K.; DE BAERE, T.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F. First report on *Cryptococcus laurentii* associated with feather loss in a glossy starling (*Lamprotornis chalybaeus*). **Avian Pathol.,** v. 32, p. 309-311, 2003.

DUARTE, A.; ORDOÑEZ, N.; CASTAÑEDA, E. Asociacion de levaduras del gênero *Cryptococcus* com espécies de *Eucalyptus* em Santafe de Bogota. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 36, p. 125-130, 1994.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **Am. J. Hyg.,** v. 62, p. 227-232, 1955.

ESCANDÓN, P.; QUINTERO, E.; GRANADOS, D.; HUÉRFANO,S.; RUIZ, A.; CASTAÑEDA, E. Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus* spp. em Colombia. **Biomédica,** v. 25, p. 390-397, 2005.

FERNANDES, O. F. L.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SOARES, A. J.; PEREIRA, A. J. S. C.; SILVA, M. R. R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 33, p. 75-78, 2000.

FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L.; MORA, D.J.; LAGES-SILVA, E.; PEDROSA, A. L.; DA SILVA, P. R.; ANDRADE, A. A.; SILVA-VERGARA, M. L. Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, 2011. doi: 10.1007/s11046-011-9500-0.

FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. **Mycopathologia,** v.162, p. 363-368, 2006.

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 35. p. 591-595, 2002.

FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; FELL, J. A. Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribossomal DNA sequence analysis. **Can. J. Microbiol.,** v. 46, p. 7-27, 2000.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii:* separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.,** v. 37, p. 838-840, 1999.

GARELICK, J. M.; KHODABAKHSH, A. J.; LOPEZ, Y.; BAMJI, M.; LISTER, M. Scleral ulceration caused by *Cryptococcus albidus* in a patient with acquired immune deficiency syndrome. **Cornea,** v. 23, p. 730-731, 2004.

GARRO, S.; BAVA, A. J. *Cryptococcus neoformans* em el contenido gástrico de um paciente com SIDA. **Rev. Argent. Microbiol.,** v. 38, p. 206-208, 2006.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospolipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 13, p. 122-143, 2000.

GLUCK, J. L.; MYERS, J. P.; PASS, L. M. Cryptococcemia due to *Cryptococcus albidus*. **South. Med. J.,** v. 80, p. 511-513, 1987.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Micoses sistêmicas In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

GONZÁLEZ-HEIN, G.; GONZÁLEZ, J.; DÍAZ, M. C. Detección de levaduras en cloaca de dos espécies psitácidas nativas em um centro de rehabilitación en Chile. **Arch. Med. Vet.,** v. 42, p. 105-108, 2010.

HEDAYATI, M. T.; MAYAHI, S.; FAKHAR, M.; SHOKOHI, T.; MAJIDI, M. *Cryptococcus neoformans* isolation from Swallow (*Hirundo rustica*) excreta in Iran. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.,** v. 53, p.125-127, 2011.

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

HILL, F. I.; WOODGYER; A. J. LINTOTT, M. A. Cryptococcosis in a North Island Brown Kiwi (*Apterix mantelli*) in New Zealand. **J. Med. Vet. Mycol.,** v. 33, p. 305-309, 1995.

HOANG, J. K.; BURRUS, J. Localized cutaneous *Cryptococcus albidus* infection in a 14-year-old boy on etanercept therapy. **Pediatr. Dermatol.,** v. 24, p. 285-288, 2007.

HOROWITZ, I. D.; BLUMBERG, E. A.; KREVOLIN, L. *Cryptococcus albidus* and Mucormycosis Empyema in a Patient Receiving Hemodialysis. **South. Med. J.,** v. 86, p. 1070-1072, 1993.

IKEDA, R.; SUJITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **J. Microbiol.,** v. 40, p. 1214-1218, 2002.

JANG, Y. H.; LEE, S. J.; LEE, J. H.; CHAE, H. S.; KIM, S. H.; CHOE, N. H. Prevalence of yeast-like fungi and evaluation of several virulence factors from feral pigeons in Seoul, Korea. **Lett. Appl. Microbiol.,** v. 52, p. 367-371, 2011.

JOHNSON L. B.; BRADLEY, S. F.; KAUFFMAN, C. A. Fungemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcaemia. **Mycoses,** Berlin, v. 41, p. 277-280, 1998.

JULIANO, R. S.; SOUZA, A. I.; SCHEIDE, R. Criptococose felina: relato de caso. **Rev. Pat. Trop.,** v. 35, p. 65-70, 2006.

JUNGERMAN, P. F.; SCHWARTZMAN, R. M. **Micologia medica veterinária**. Mexico: Compañia Editorial Continental, 1977.

KANO, R.; KITAGAWA, M.; OOTA, S.; OOSUMI, T; MURAKAMI, Y.; TOKURIKI, M.; HASEGAWA, A. First case of feline systemic *Cryptococcus albidus* infection. **Med. Mycol.,** v. 46, p. 75-77, 2008.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-*neoformans* cryptococcal infections. **Infection,** v. 35, p. 51-58, 2007.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SAOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; BRITO, S. C. A.; SILVA, A. C.; SOUZA, E. D.; SILVA, M. R. R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental soucers in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo,** v. 47, p. 203-207, 2005.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KORDOSSIS, T. et al. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. **Med. Mycol.,** v.36. p.335-339, 1998.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. **The yeast, a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*. In:_____. **The yeasts:** a taxonomic study. 5th ed. New York: ACM Press, 2011. p. 1661-1662.

LABRECQUE, O.; SYLVESTRE, D.; MESSIER, S. Systemic *Cryptococcus albidus* infection in a Doberman Pinscher. **J.V.D.I.** v. 17, p. 598-600, 2005.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.

LAMBERTUCCI, J. R.; FRABCO, R.; QUEIROZ, L. C. Cryptococcal meningoencephalitis and pulmonary nodule in a non-HIV-infected immunocompetent patient. **Rev. Soc, Bras. Med. Trop.,** v. 38, p. 207-208, 2005.

LÁZERA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LAZERA, M. S.; SALMITO CAVALCANTI, M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.,** v. 38, p. 379-383, 2000.

LEAL, A. L. **Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica.** 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LEE, Y. A.; KIM, H. J.; LEE, T. W.; KIM, M. J.; LEE, M. H.; LEE, J. H.; LHM, C. G. First report of *Cryptococcus albidus* – induced disseminated cryptococcosis in a renal transplant recipient. **Korean J. of Intern. Med.,** v. 19, p. 53-57, 2004.

LEGGIADRO, R. J.; BARRET, F. F.; HUGUES, W. T. Extrapulmonary criptococcosis in immunocrompromised infants and children. **Pediat. Infec. Dis. J.,** v. 11, p. 43-47, 1992.

LEITE-JUNIOR, D. P.; AMADIO, J. V. R. S.; MARTINS, E. R.; SIMÕES, S. A. A.; YAMAMOTO, A. C. A.; LEAL-SANTOS, S. A.; TAKAHARA, D. T.; HAHN, R. C. *Cryptococcus* spp. isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **J. Occup. Med. Toxicol**., v. 7, p. 7-7, 2012.

LEVITZ S. M.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus:* the once-sleeping giant is fully awake. **Fems. Yeast Res.,** Oxford, p. 461-462, 2006.

LIN, J.; CHRISTENSEN, B. M. Effect of pH on oxidation pathway of dopamine and DOPA. **J. Electroanal Chem.,** v. 375, p. 219-231, 1994.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends Microbiol.,** v. 17, p. 406-413, 2009.

LOISON, J.; BOUCHARA, J. P.; GUEHO, E.; GENTILE, L.; CIMON, B.; CHENNEBAULT, J. M.; CHABASSE, D. First report of *Cryptococcus albidus* septicaemia in a HIV patient. **J. Infect. Dis.,** v. 33, p. 139-140, 1996.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico city. **Mycopathologia,** v. 129, p. 25-28, 1995.

LUGARINI, C. **Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de passeriformes e psittaciformes do estado do Paraná**. 2007, 92 f. Dissertação (Mestrado Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

LUGARINI, C.; GOEBEL, C. S.; CONDAS, L. A. Z.; MURO, M. D.; FARIAS, M. R.; FERREIRA, F. M.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* isolated from passerine and psittacine bird excreta in the State of Paraná, Brasil. **Mycopathologia.,** v. 166, p. 61-69, 2008.

MALDONADO, L. B.; SOSA, B.; MIZRACHI, R. Aislamiento de levaduras del gênero *Cryptococcus* de excretas de palomas. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.,** Caracas, v. 21, n. 2, 2001.

MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHERELLI, R. Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. **Mycopathologia.,** v. 153, p. 121-124, 2001.

MENEZES, E. A.; MONTEIRO, M. N. R.; ANGELO, M. R. F.; SANTOS, C. D.; FREIRE, C. C. F.; CUNHA, F. A. *Cryptococcus neoformans* causing meningitis in a AIDS patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 35, p. 537-539, 2002.

MENEZES, R. P.; PENATTI, M. P. A.; PEDROSO, R. S. Different culture media containing methyldopa for melanin production by *Cryptococcus* species. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 44, p. 591-594, 2011.

MEYER, W.; CASTANEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTANEDA, E. Ibero American Cryptococcal Study Group. Moleculat typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 9, p. 189-195, 2003.

MITCHEL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 8, p. 515-548, 1995.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* Var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Med. Mycol.,** v. 38, p. 385-390, 2000.

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 39, p. 255-258, 2006.

NARAYAN, S.; BATTA, K.; COLLOBY, P.; TAN, C. Y. Cutaneous *Cryptococcus* infection due to *C. albidus* associated with Sézary Syndrome., **Br. J. Dermatol.**, v. 143, p. 632-634, 2000.

NIELSEN, K.; OBALDIA, A. L.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. **Eukaryot. Cell**., v. 6, p. 949-959, 2007.

NOSANCHUK, J. D.; SHOHAN, S.; FRIES, B. C.; SHAPIRO, D. S.; LEVITZ, S. M.; CASADEVALL, A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. **Ann. Intern. Med.,** v. 132, n. 3, p. 205-208, 2000.

ODOM, A. S.; LIM, M. E.; TOFFALETI, D. L.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Embo J.,** v. 16, p. 2576-2589, 1997.

OGLESBY, B. L. Mycotic diseases. In: ALTMAN, R. B. (Ed.). **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1997. p. 327.

OLIVEIRA, F.; BAZAN, C.; SOLIVA, A.; RITZ, R.; FAGUNDES, E.; CAMARGO, G.; AUGUSTO, M.; SURIAN, C.; CALDERARO, T.; PEREIRA, R. E. P. **Criptococose.** Ano. 6, n. 11, 2008.

PAL, M. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. **Rev. Iberoam. Micol.,** v. 14, p. 181-183, 1997.

PAL, M. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in faecal matter of caged parrots. **Verh. Ber. Erkrg. Zootiere.,** v. 42, p.130-133, 2005.

PANDIT, L.; AGRAWAL, A.; SHENOY, S.; KAMATH, G. Cryptococcal meningitis and pulmonary cryptococcosis in a non-HIV infected patient. **Eur. J. Gen. Med.,** v. 3, p. 80-82, 2006.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brasilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med Trop. S. Paulo**., v. 45, n. 6, p. 299-305, 2003.

PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. Cryptococcosis in the non-HIV infected patient. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON *CRYPTOCOCCUS* AND CRYPTOCOCCOSIS, Vancouver, Canada. **Anais…** Vancouver, Canada: Editora, 1999. p. 23.

PASCHOAL, R. C.; NAKASHITA, A. M.; LIMA, A. L.; MARTINS, M. A.; IULIANO, W. A.; PAPPALARDO, M. C. S. M. Variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes com AIDS em hospital da cidade de São Paulo durante 1996-1999. **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** v. 66, p. 81-84, 2007.

PASSONI, L. F. C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, 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. **Med. Mycol.,** v. 36, p. 305-311, 1998.

PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C. Diagnóstico laboratorial da Criptococose. **Newslab,** v. 77, 2006.

PEDROSO, R. S.; COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 40, p. 566-568, 2007.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiol. Res.,** v. 164, p. 221-227, 2009.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; LAVRADOR, M. A. S.; MAFFEI, C. M. L.; CANDIDO, R. C. Evaluation of the experimental inoculation of *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii* in normal mice: virulence factors and molecular profile before and after animal passage. **Mycopathologia.,** v. 168, p. 59-72, 2009.

PEDROSO, R. S.; PENATTI, M. P. A.; MAFFEI, C. M. L.; CANDIDO, R. C. Infecções causadas por *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii*: implicações clínicas e identificação laboratorial. **Newslab**, v. 102, p. 96-104, 2010.

PEREIRA, J. R. **Primeiro isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excretas de *Aratinga mitrata* no zoológico do Rio de janeiro.** 2006. 79 f. Monografia (Pós-graduação

"*Latu Sensu*" em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos) - Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2006a.

PEREIRA, J. R. **Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* de excretas de aves em lojas de animais do Município do Rio de janeiro.** 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006b.

PFALLER, M. A.; MACGGINNIS, M. R.; ANAISSIE, E. J. **Clin. Mycology**. 2nd ed. New York: Churcill Livingstone, 2009. 688 p.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate methods for detection of phospholipase activity in Candida albicans. **Sabouraudia,** v. 20, p. 15-20, 1982.

PUKINSKAS, S. R. B. S. et al. Isolamento de *Cryptococcus laurentii* em liquor. **Braz. J. Infect. Dis.,** v. 3, 1999.

RANDHAWA, H. S.; MUSSA, A. Y.; KHAN, Z. U. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neofomans* and other yeast-like fungi of clinical interest. **Mycopathologia.,** v. 151, p. 63-69, 2000.

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARL, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Monte Alegre, Rio Grande do Sul. **Bras. Patol. Med. Lab.,** v. 40, n. 5, p. 293-298, 2004.

REZENDE, C.; MUNHÓZ, C. J. M.; ALMEIDA, G. G. Investigação ambiental de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Votuporanga – São Paulo. 87.ed. **Newslab,** 2008.

RINALDI, M. G.; DRUTZ, D. J.; HOWELL, A.; SADE, M. A.; WOFSY, C. B.; HADLEY, W. K.; Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.,** v. 153, p. 642, 1986.

RODRÍGUEZ, I. P.; VALDIVIA, J.; AGRAMANTE, A. A.; CASTILLO, I. C.; ARROYO, M. M.; ALMORA, E. D. Criptococosis em pacientes com transplante renal. **Rev. Cub. Med. Trop.,** v. 59, p. 169-172, 2007.

ROSARIO, I.; MENDOZA, H.; DÉNIZ, S.; ÁLAMO, I.; ACOSTA, B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. Journal Compilation, Blackwell Publishing Ltd. **Mycoses**. v. 48, p. 421-424, 2005.

ROSARIO, I.; SORO, G.; DÉNIZ, S.; FERRER, O.; ACOSTA, F.; PADILHA, D.; ACOSTA, B. Presence of *C. albidus*, *C. laurentii* and *C. uniguttulatus* in crop and droppings of pigeon lofts (*Columba livia*). **Mycopathologia.,** v. 169, p. 315-319, 2010.

ROZEMBAUM, R.; GONÇALVEZ, A. J.; WANKE, B.; VIEIRA, W. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian AIDS patient. **Mycopathologia,** v. 112, p. 33-34, 1990.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, T. M. A comparison of secretory proteinases from diferente strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 3, p. 233-244, 1982

SANTILLI, A. M. **Criptococose óssea – Relato de caso**. 2008. 30 f. Monografia (Conclusão de Curso de Pós-graduação em Clínica Médica de Pequenos Animais) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2008.

SANTOS, L. L.; FERREIRA, F. M.; LOPES, S. F.; CONDAS, L. A.; MURO, M. D.; LUGARINI, C. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp. em excretas de psitacídeos e passeriformes cativos. **Arq. Cien. Vet. Zool. Unipar,** Umuarama, v. 12, n. 1, p. 5-9, 2009.

SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L.; MEDEIROS, R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. D. E. C.; MACÊDO, R. C.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LÁZERA, M. S. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Para, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz., v**. 103, p. 813-818, 2008.

SEVERO, L. C. **Criptococose**: duas doenças? 1993. 103 f. Tese (Livre docência) - Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 1993.

SHANKAR, E. M.; KUMARASAMY, N.; BELLA, D.; RENUKA, S.; KOWNHAR, H.; SUNITI, S.; RAJAN, R.; RAO, U.A. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. **Can. Respir. J.,** v. 13, p. 275-278, 2006.

SHIMIZU, R. Y.; HOWARD, D. H.; CLANCY, M. N. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.,** v. 154, p. 1042, 1986.

SILVA, D. C.; MARTINS, M. A.; SZESZS, M. W.; BONFIETTI, L. X.; MATOS, D.; MELHEM, M. S. C. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 72, p. 332-339, 2012.

SIMON, G.; SIMON, G.; ERDÖS, M.; MARÓDI, L. Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a nine-year-old boy with X-linked Hyper-immunoglobulin M Syndrome. **Pediatr. Infect. Dis. J.,** v. 24, 2005.

SMALL, J. M.; MITCHELL, T. G. Binding of purified and radioiodinated capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A strains to capsule – free mutants. **Infect. Immun**., v. 54, p. 742-750, 1986.

SMALL, J. M.; MITCHELL, T. G. Strains variation in the antifagocytic activity os capsular polisaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Infec. Immune**., v. 57, p. 3735-3756, 1989.

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. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.,** v. 47, p. 31-36, 2005.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. G. oleífera) Farbreaktion fur (*Cryptococcus neoformans*) **Zentrabl Bakteriol.**, v. 148, p. 466-475, 1962.

SUGIMORI, D. Edible oil degradation by using yeast coculture of *Rhodotorula pacifica* ST3411 and *Cryptococcus laurentii* ST3412. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** v. 82, p. 351-357, 2009.

SWINE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. **Sabouraudia**, v. 13, p. 303-308, 1975.

TAY, S. T.; NA, S. L.; TAJUDDIN, T. H. Natural occurrence and growth reaction on canavanine-glycine-bromothymol blue agar of non-*neoformans Cryptococcus* spp. In Malaysia. **Mycoses,** v. 51, p. 515-519, 2008.

VAN DEN BOSCH, J. S.; SMALS, A. G.; VALK, I. M.; KLOPPENBORG, P. W. Lack of difference in growth simulating effect between weekly single and multiple human chorionic gonadotrophin administration in boys with delayed puberty. **Clin. Endocrinol.,** v. 16, p. 1-9, 1982.

VIDOTTO, V.; MELHEM, M.; PUKINSKANS, S.; AOKI, S.; CARRAGA, C.; PUGLIESE, A. Extracellular enzymatic activity and serotipe of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. **Rev. Iberoam. Micol**., v. 22, p. 29-33, 2005.

VITAL, M. J. S.; ABRANCHES, J.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. Brazil. **J. Microbiol.,** v. 33, p. 230-235, 2002.

VLCHKOVA-LASHKOSKA, M.; KAMBEROVA, S.; STAROVA, A.; GOLEVA-MISHEVSKA, L.; TSATSA-BILJANOVSKA, N.; JANEVSKA, V.; PETROVSKA, M. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in a humam immunodeficiency virus-negative subject. **JEADV,** v. 18, p. 99-117, 2004.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Front Biosc**., v. 2, p. 99-107, 1997.

WILLIAMSON, P. R. WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.,** v. 180, p. 1570-1572, 1998.

YANG, Y. L.; LEAW, S. N.; WANG, A. H.; CHEN, H. T.; CHENG, W. T.; Lo, H. J. Characterization of yeasts colonizing in healthy individuals. **Med. Micol**., v. 49, p. 103-106, 2001.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; JESUS, D. M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* **Adv. Appl. Microbiol.,** v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; XI, Y. Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner on biocontrol of postharvest decay of arbustus berries. **Bot. Bull. Acad. Sin.,** v. 45, p. 55-60, 2004.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; XI, Y. Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. **BioControl,** v. 50, p. 331-342, 2005.

ZHENG, X. D.; YU, T. Salicylic acid enhances biocontrol afficacy of the antagonist *Cryptococcus laurentii* in apple fruit. **J. Plant. Growth Regul.,** v. 25, p. 166-174, 2006.

ANEXO – Meios de cultura

1 – Meio contendo Dopamina (KURTZMAN; FELL, 1998)

Solução base

$KH_2PO_4 . 7H_20$	**0,4 g**
$MgSO_4 . 7H_20$	**0,25 g**
Tiamina	**1 mg**
Glicose	**0,5 g**
Ágar	**2,5 g**
H_2O destilada	**80 mL**

Solução com substrato (DOPA)

Dopa	**0,004 g**
Asparagina	**0,1 g**
Glutamina	**0,1 g**
Glicina	**0,1 g**
H_2O destilada	**20 mL**

Ajustar o pH em 5,5 (se necessário, com o uso de K_2HPO_4 - 1M). Filtrar a solução contendo DOPA em membrana Millipore (0,22 µm) e unir à solução base após autoclavação da mesma e resfriamento a 55 °C. Distribuir em placas de Petri.

2 - Meio Canavanina – Glicina – Azul de Bromotimol (C.G.B.) (KURTZMAN, FELL, 1998)

Solução A (Estoque)

L – canavanina	**30 mg**
Glicina	**10 g**
$MgSO_4 . 7H_2O$	**1 g**
Tiamina	**1 mg**
H_2O destilada	**100 mL**

Ajustar o pH para 5,6 e esterilizar por filtração em membrana Millipore (0,22 µm).

Solução com indicador de pH (Azul de bromotimol)

Azul de bromotimol	**0,4 g**
NaOH (0,01N)	**64 mL**
H_2O destilada	**36 mL**

Solubilizar 0,4g de azul de bromotimol em 64 mL de NaOH (0,01 N). Adicionar 36 mL de água destilada.

Solução B (Ágar base com indicador):

Adicionar 20 mL da solução com indicador de pH (azul de bromotimol a 0,4%) a 880 mL de água destilada. Adicionar 20g de ágar e autoclavar a 55 °C. Adicionar 100 mL da solução A à 900 mL da solução B. Homogeneizar e distribuir em placas de Petri.

3 – Ágar para proteinase (RUCHEL; TEGELER; TROST, 1982)

Meio base

Ágar (Difco)	**18g**
H_2O destilada	**900 mL**

Esterilizar por autoclavação a 121 °C

Meio contendo Albumina

Yeast Nitrogen Base (Difco)	**11,7g**
Albumna bovina (fração V – Sigma)	**2g**
Tiamina	**1 mg**
H2O destilada	**100 mL**

Esterilizar por filtração em membrana Millipore (0,22 µm). Resfriar o meio base a 50 °C e unir ao meio contendo albumina. Distribuir em placas de Petri.

4 – Ágar fosfolipase (adaptado de Price; Wilkinson; Gentry, 1982)

Preparo de gema de ovo	
Gema de ovo	**80g**

Os ovos, previamente a este preparo, devem ser imersos em álcool iodado por 1 hora. Em seguida as gemas devem ser separadas e colocadas em recipiente estéril. O volume necessário é pipetado a fim de evitar a entrada de membrana da gema na composição final.

Meio ágar fosfolipase	
NaCl (Reagen)	**57,3g**
$CaCl_3$	**0,55g**
Ágar Sabouraud dextrose (Difco)	**65g**
H_2O destilada	**1000 mL**

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos em autoclave. Resfriar a 50 °C e misturar com emulsão da gema de ovo. Distribuir em placas de Petri

5 – Meio de Christensen

Solução de uréia	
Uréia	**40g**
H2O destilada	**100 mL**

Filtrar em membrana Millipore (0,22 µm)

Preparo de bacto uréia ágar base	
Bacto ureia (Oxoid)	**1,5g**
H2O destilada	**90 mL**

Autoclavar a solução a 115°C por 15 minutos, resfriar a 55°C e adicionar 10 mL da solução de ureia. Homogeneizar e distribuir, sob condições assépticas, em tubos de ensaio esterilizados.