

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu
Roberta Fernandes Ramalho

**Caracterização morfológica e fenotípica de leveduras do gênero
Cryptococcus com ênfase na pesquisa de *Cryptococcus neoformans* isoladas
de amostras de água de mar e areia de três ambientes costeiros do estado de
São Paulo: Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba.**

São Paulo

2009

Roberta Fernandes Ramalho

Caracterização morfológica e fenotípica de leveduras do gênero *Cryptococcus* com ênfase na pesquisa de *Cryptococcus neoformans* isoladas de amostras de água de mar e areia de três ambientes costeiros do estado de São Paulo: Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus
de Botucatu, para obtenção do título
de bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Doutora Irma Nelly Gutierrez Rivera
Co-orientadora: Profa. Doutora Vera Lúcia Mores Rall

Botucatu

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ramalho, Roberta Fernandes.

Caracterização morfológica e fenotípica de leveduras do gênero *Cryptococcus* com ênfase na pesquisa de *Cryptococcus neoformans* isoladas de amostras de água de mar e areia de três ambientes costeiros do estado de São Paulo: Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba / Roberta Fernandes Ramalho. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Irma Nelly Gutierrez Rivera

Co-orientadora: Vera Lúcia Mores Rall

1. Microbiologia 2. *Cryptococcus neoformans* 3. Água do mar - Análise

Palavras-chave: Água de mar; Areia; *Cryptococcus neoformans*; Leveduras; Região do Estado de São Paulo

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre
está ao meu lado para me apoiar.

Agradecimentos

Agradeço as todos que me ajudaram direta e indiretamente a realizar esta etapa.

A toda equipe do laboratório de Ecologia Microbiana Molecular da USP: professora Irma Rivera, por me orientar sempre que precisei; às doutoras Gislaine Martins, Mariela Burbano, Claudiana de Paula e Bianca Caetano por sempre me ajudarem com tanta paciência e boa vontade; à Mariana Fonseca, Helena Turano, Lívia Fontes e Natália Nunes por me auxiliarem na realização das práticas e ao técnico senhor Luiz, por ser sempre tão prestativo.

A Professora Doutora Claudete Rodrigues de Paula por disponibilizar seu laboratório e seus conhecimentos que tanto me ajudaram a realizar este trabalho.

Ao Dr. Eriques Gonçalves por transmitir seus conhecimentos.

Aos meus pais, por me darem respaldo para que eu consiga seguir meu caminho e minhas escolhas.

Ao Bruno Viera, por ter me ajudado a crescer como pessoa.

Aos meus amigos Pedro Folegatti, Joyce Pires, Regina Fusco, Helen Akemi e Andrea Fernandes por me proporcionarem tantos momentos bons.

Sumário

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 Introdução	1
2 Revisão da Literatura	3
2.1 Ecologia e Distribuição	3
2.1.1 Ambiente marinho	5
2.1.2 Patogenicidade e Epidemiologia	7
2.1.3 Métodos de Isolamento e Identificação	9
2.1.4 Fatores associados à virulência	11
2.1.5 Origem ambiental da infecção	12
2.1.6 Rota de infecção humana	13
2.1.7 Outras rotas de infecção inicial	14
2.1.8 Diferenças sexuais e susceptibilidade à <i>Cryptococcus neoformans</i>	14
2.1.9 Populações suscetíveis	15
2.1.10 Criptococcose humana	15
3 Objetivos	16
4 Material e Método	16
4.1 Período de amostragem e pontos de coleta	16
4.2 Isolamento de leveduras	18
4.3 Identificação de <i>Cryptococcus neoformans</i>	18
4.3.1 Microcultivo	19
4.3.2 Teste com Nankin ou Tinta da China	20
4.3.3 Teste de Urease	20
4.3.4 Auxanograma (Assimilação de carboidratos e nitrogênio)	20
4.3.4.1 Assimilação de carboidratos	20
4.3.4.2 Assimilação de nitrogênio	21
4.3.5 Zimograma (Fermentação de açúcares)	22
4.3.6 Fenoloxidase	22
4.3.7 Caracterização de fatores associados à virulência	22
4.3.7.1 DNase	22
4.3.7.2 Lipase	23
4.3.7.3 Proteinase	23
4.3.7.4 Fosfolipase	23
5 Resultados	24
5.1 Isolamento de leveduras	24
5.2 Microcultivo	25
5.2.1 Teste de Urease	24

5.2.2 Tinta Nankin.....	25
5.2.3 Auxanograma (Assimilação de carboidratos e nitrogênio).....	26
5.2.4 Zimograma (Fermentação de açúcares).....	26
5.2.5 Fenoloxidase.....	27
5.2.6 Caracterização de fatores associados à virulência.....	27
6 Discussão.....	28
6.1 Reisolamento dos isolados de leveduras.....	28
6.1.2 Identificação da espécie <i>Cryptococcus</i>	28
6.1.2.1 Microcultivo.....	28
6.1.2.2 Observação da cápsula (Teste com tinta nankin) e Teste de Urease.....	29
6.1.2.3 Auxanograma (Assimilação de carboidratos e nitrogênio).....	30
6.1.2.4 Zimograma (Fermentação de açúcares).....	30
6.1.2.5 Produção de fenoloxidase.....	31
6.1.2.6 Caracterização de fatores associados à virulência.....	31
6.1.8 Considerações finais.....	32
7 Conclusões.....	33
Referência bibliográfica.....	34
Anexo – Meios de cultura.....	46

Lista de figuras

Figura 1- Localização dos pontos de coleta de amostras de água do mar em Ubatuba, Canal de São Sebastião e Baixada Santista.....	17
Figura 2 - Teste de Urease (a) <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112, (b) <i>Candida albicans</i> ICB 12A e (c) Isolado Urease Positivo.....	24
Figura 3 - Visualização da cápsula de ATCC de <i>Cryptococcus neoformans</i>	25
Figura 4 - Teste de assimilação de carbono.....	26
Figura 5 - Teste de assimilação de nitrogênio (peptona).....	26
Figura 6 - Fermentação positiva de açúcares (presença de bolhas).....	27

Lista de tabelas

Tabela 1 - Número de isolados de amostras de água e areia nos três ecossistemas estudados, de acordo com os meios de cultura utilizados para o isolamento.....	18
Tabela 2 - Isolados presuntivos de <i>Cryptococcus</i> spp. identificados pelo teste de Urease, de acordo com o local de coleta e tipo de amostra.....	25

Resumo

A levedura *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico da criptococose, uma doença infecciosa cosmopolita que acomete o homem. Embora rara, esta doença é potencialmente fatal, principalmente para os hospedeiros imunocomprometidos. Este patógeno é frequentemente isolado de excrementos de pombos e psitacídeos, possuindo inúmeras fontes ambientais como aves, excretas de pombos, folhas de Eucalipto, árvores em decomposição, torres de igrejas e locais de armazenagem de grãos (áreas portuárias). O isolamento desse microrganismo já foi obtido também a partir do ambiente aquático marinho. A identificação de fontes ambientais se faz necessária para proteger a saúde humana e, principalmente as populações suscetíveis como os imunodeprimidos. Sendo assim, o presente trabalho pesquisou a presença de *Cryptococcus neoformans* em isolados de leveduras obtidas de amostras de água de mar e areia de três regiões costeiras do Estado de São Paulo: Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba. Os isolados foram analisados de acordo com características micro e macroscópicas e testes bioquímicos: microcultivo, urease, tinta nankin, auxanograma, zimograma e fenoloxidase. Foram analisados 199 isolados, dos quais 175 apresentaram características sugestivas para *Cryptococcus* spp. no teste de microcultivo. Todos esses 175 isolados foram semeados no meio Uréia de Christensen para verificação da produção de urease e submetidos à técnica com tinta nankin para visualização da cápsula. Desses, somente 24 foram selecionados para o teste seguinte que foi o Auxanograma (assimilação de carboidrato e nitrogênio). Dos 24, 10 foram submetidos ao teste de Zimograma (fermentação de açúcares), a partir do qual 4 foram selecionados para a realização do teste de Fenoloxidase em meio contendo Dopamina. Nenhum dos 4 isolados testados apresentaram coloração negra ou marrom característico de *Cryptococcus neoformans*. De acordo com esses testes, chegamos a 4 isolados identificados como sendo do gênero *Cryptococcus*, mas não foi encontrada a espécie *neoformans*.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*; água de mar; areia; leveduras; região costeira do Estado de São Paulo.

Abstract

The yeast *Cryptococcus neoformans* is the etiologic agent of cryptococcosis, an infectious cosmopolitan disease that affects humans. Although rare, this disease is potentially fatal, especially for immunocompromised hosts. This pathogen is frequently isolated from excrements of pigeons and parrots, with many environmental sources such as birds, pigeon droppings, eucalyptus leaves, decaying trees, towers, churches and places of storage of grain (the port area). The isolation of this microorganism has been obtained also from the aquatic environment. The identification of environmental sources is needed to protect human health, especially susceptible populations such as immunocompromised. Therefore, this study investigated the presence of *Cryptococcus neoformans* in yeast isolates obtained from samples of sea water and sand from three regions of São Paulo: São Sebastião Channel, Santos and Ubatuba. Isolates were analyzed according to micro-and macroscopic characteristics and biochemical tests: microculture, urease, ink nankin, auxanograma, zymogram and phenol. We analyzed 199 isolates, 175 of which had features suggestive for *Cryptococcus* spp. in microculture. All these 175 isolates were sown in the Christensen urea middle to verify the production of urease and submitted to the technique nankin ink to visualize the capsule. Of these, only 24 were selected for the next test that was the auxanograma (assimilation of carbohydrate and nitrogen). Of the 24, 10 were tested in zymograms (fermented sugar), from which 5 were selected for the phenoloxidase test in medium containing dopamine. None of the 5 isolates tested had black or brown color characteristic of *Cryptococcus neoformans*. According to these tests, we arrived at 5 isolates identified to the genus *Cryptococcus*, but not the *neoformans* specie.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; sea water; sand; yeast; São Paulo state coastal region.

1. Introdução

Os oceanos constituem mais de 70% da superfície terrestre. No entanto, este ecossistema é o menos explorado do ponto de vista microbiológico, considerando sua diversidade e o impacto antropogênico. Nos últimos anos, em razão da expansão das atividades humanas na região costeira marinha, tornou-se imperativa a necessidade de uma avaliação contínua da qualidade das águas litorâneas. Considerando que a balneabilidade constitui a qualidade da água para fins de recreação, os corpos de água contaminados por esgotos domésticos, ao atingirem as águas das praias, podem expor os banhistas à bactérias, fungos, vírus e protozoários, podendo levar ao desenvolvimento de doenças ou infecções após o banho em águas contaminadas (RIVERA *et al.*, 2008). Sabe-se que a riqueza conhecida e estimada da diversidade microbiana está representada por 75 mil e 1,5 milhões de espécies de fungos, 4.900 mil e 1 milhão de bactérias e 4 mil e 400 mil de vírus, respectivamente. Esses dados sugerem que o número de espécies descritas de fungos, bactérias e vírus são 5%, 0,5% e 1%, respectivamente, do número total de espécies existentes (HAMMOND, 1995; HAWKSWORTH, 2001; FROESE e BISBY, 2002).

Dentre esses microrganismos, os fungos estão emergindo como uma ameaça comum à saúde humana, principalmente devido à imunossupressão causada pela AIDS e aos tratamentos médicos incluindo altas doses de terapias com esteróides e quimioterapia (OSIEWACZ, 2002).

Leveduras são fungos unicelulares cujas células são frequentemente esféricas, ovais ou cilíndricas. Geralmente, a reprodução é por brotamento, porém, algumas leveduras podem formar, em alguma fase de seu ciclo, filamentos que sejam necessários para a expressão de certas características, como por exemplo, a patogenicidade (MADIGAN *et al.*, 1997). Existem aproximadamente 100 gêneros e 800 espécies descritas de leveduras (KURTZMAN e FELL, 1998) e é possível que esse número represente apenas 1% das espécies que existem na natureza (FELL, 2001).

Existem, pelo menos, 38 espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* e a espécie *neoformans* é dividida em duas variedades (*neoformans* e *gatti*), de acordo com critérios fenotípicos, sorológicos, genéticos, bioquímicos e epidemiológicos,

sendo ambas patogênicas para o homem. Os antígenos da cápsula determinam cinco tipos de *C. neoformans*: A, B, C, D e AD (CICHON, 2006). Os sorotipos A e D são os que mais comumente causam infecção no homem e 90% delas ocorrem em hospedeiros imunodeprimidos (MOREIRA *et al.*, 2006). Além do acometimento meningoencefálico, responsável por significativos índices de morbidade e mortalidade, *C. neoformans* pode também causar manifestações clínicas como: pulmonares, cutâneas, ósteo-articulares, renais, prostáticas e no sistema hematopoiético (LAZERA *et al.*, 1993).

O *Cryptococcus neoformans* recebe este nome em sua fase assexuada e é chamado de *Filobasidiella neoformans* em sua fase sexuada (CASADEVALL e PERFECT, 1998). É um microrganismo pertencente ao Domínio *Eucarya* e ao Filo *Basidiomycota* que se apresenta na forma tecidual como levedura encapsulada (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

A variedade *gatti* é encontrada em climas tropicais e subtropicais, associada com árvores de Eucalipto e raramente causa infecção em pacientes HIV positivo, mesmo nas áreas endêmicas (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Já a variedade *neoformans* é representada por microrganismos saprófitas (REOLLON *et al.*, 2004) e amplamente distribuída no ambiente e representa a maioria dos isolados obtidos de pacientes com AIDS (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

A levedura *Cryptococcus neoformans* já foi encontrada em diversas fontes: árvores em decomposição, ovos e pescoço de pombos e insetos, poeira domiciliar, torres de igreja, solos contaminados com fezes de pombos e áreas de armazenamento de grãos em áreas portuárias (CASADEVALL e PERFECT, 1998; LAZERA, 1998; REOLLON *et al.*, 2004; BARONI, 2006).

Pal, em 1989, trabalhando em viveiros isolou *Cryptococcus neoformans* de excretas, madeiras das gaiolas e dos ninhos e a partir dos bicos, penas e pés de algumas aves como: *Amandava amandava* (Bengalim-da-Índia) e *Lonchura malacca* (Tricolored Munia) entre outras. Passoni *et al.* (1988) isolaram *Cryptococcus neoformans* de *Paroaria dominicana* (Galo-da-campina), *Psittacidae* (Família do Papagaio), *Serinus canarius* (Canário), *Sicalis flaveola* (Canário-da-terra), *Sporophila caerulea* (Coleirinho) de material colhido em ambiente doméstico na

cidade do Rio de Janeiro. Contudo, hoje, as fontes mais conhecidas são excretas de pombos (SWINNE-DESGAIN, 1975; ELLIS e PFEIFFER, 1990; LEVITZ, 1991; PASSONI, 1999; BARONI *et al.*, 2006).

Além disso, a presença de *Cryptococcus neoformans* também foi demonstrada na cidade de Santos em áreas urbanas e próximas às praias por Soares *et al.* (2005).

Trabalhos pioneiros de Emmons, no início dos anos 50, fazem referência ao acúmulo de excretas secas e envelhecidas de pombos (*Columba livia*) em solos contaminados, como fontes saprobióticas de *C. neoformans* em ambientes urbanos (CICHON, 2006). Esta é uma ave sinantrópica e de grande importância e interesse para a saúde pública, tendo em vista que é encontrada em grande número nos centros urbanos devido à diversos fatores como a facilidade de encontrar alimento e abrigo. A alimentação está baseada em grãos e sementes ou em restos de alimentos e lixo.

Além da grande capacidade de adaptação e de sua prolificidade, o principal problema é que o *C. neoformans* permanece viável nas fezes secas dessa ave durante muitos anos, tornando-se um reservatório de partículas infectantes passíveis de inalação (BARONI *et al.*, 2006).

Além do acometimento meningoencefálico, responsável por significativos índices de morbidade e mortalidade, *C. neoformans* pode também causar manifestações clínicas como: pulmonares, cutâneas, ósteo-articulares, renais, prostáticas e no sistema hematopoiético (LAZERA *et al.*, 1993).

Sendo assim, a identificação de isolados de leveduras provenientes de fontes ambientais se faz necessária para minimizar a possibilidade de imunodeprimidos entrarem em contato com o fungo potencialmente patogênico (CICHON, 2006).

2. Revisão da literatura

2.1 Ecologia e Distribuição

A natureza esporádica de criptococose humana, a extrema raridade da transmissão entre humanos (BEYT e WALTMAN, 1978; GLASER e GARDEN, 1985) e a alta prevalência de *Cryptococcus neoformans* no ambiente indicam que a infecção humana é adquirida de fontes ambientais.

Cryptococcus neoformans foi primeiramente isolado por Sanfelice em 1984 de suco de pêra fermentado. Desde que Emmons descreveu essa levedura em solos contaminados com excreta de aves em 1951, dezenas de estudos relataram o isolamento do *C. neoformans* var. *neoformans* de excreta de aves, principalmente de pombos (*Columba livia*) ao redor do mundo. Essa espécie e variedade já foi e vem sendo isolada, com menos frequência, de outras fontes como árvores, solos, poeira e aves.

C. neoformans foi isolado de madeira em decomposição de cavidades de árvores vivas no Brasil (LAZERA *et al.*, 1996). Relatos na literatura mostram que essa levedura é capaz de produzir a enzima lacase (WILLIAMSON, 1994), além de descrever que, em fungos, a atividade fenoxidase tem sido associada com a habilidade de degradar a lignina da madeira (EGGERT *et al.*; LAZERA *et al.*, 1996).

Embora a var. *gatti* seja classicamente associada com árvores de Eucalipto, é notável que a var. *neoformans* também tem sido ocasionalmente isolada dessa árvore (DUARTE *et al.*, 1994). O isolamento de *Cryptococcus neoformans* de madeira (MCDONOUGH *et al.*, 1961; LAZERA *et al.*, 1993; LAZERA *et al.*, 1996) pode refletir a habilidade desse fungo de usar esse material em decomposição como habitat. Os trabalhos que associam a var. *neoformans* com árvores, juntamente com a associação estabelecida da var. *gatti* com árvores de Eucalipto e a proximidade genética entre essas duas variedades, sugerem que *C. neoformans* var. *neoformans* pode ter um nicho arbóreo que ainda não foi descoberto. Não há uma relação firme entre var. *neoformans* e árvores ou espécies vegetais. Mais pesquisas precisam ser realizadas para clarificar a relação dessa espécie com fontes arbóreas (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

O solo é frequentemente descrito como um sítio ecológico para *Cryptococcus neoformans* (AJELLO, 1956; AJELLO, 1958; MCDONOUGH *et al.*, 1961; SOTGIU *et al.*, 1966). A maioria dos trabalhos foi realizada em celeiros, aviários ou áreas potencialmente contaminadas com fezes de aves (EMMONS, 1955; AJELLO, 1956; AJELLO, 1958; DENTON e DI SALVO, 1968). Não é claro se *C. neoformans* em excreta de aves é originado do solo ou se esse microrganismo no solo reflete uma contaminação com fezes de aves.

Um estudo epidemiológico realizado em Burundi reportou o isolamento de *C. neoformans* de poeira domiciliar em 54% das casas recentemente ocupadas por pacientes com HIV que relataram a criptococose e em 20% de casas escolhidas aleatoriamente (SWINNE *et al.*, 1991).

A associação de *C. neoformans* var. *neoformans* com excreta de aves, particularmente de pombos, é conhecida desde os anos 50 e tem sido confirmada repetidamente por inúmeros estudos (GUGNAMI *et al.*, 1972; RUIZ *et al.*, 1989; ANSHENG *et al.*, 1993; CASTANON-OLIVARES e LOPEZ-MARTINEZ, 1994). As fezes dos pombos permitem que essa levedura sobreviva por muito tempo, e estudos têm demonstrado, através de testes com cultura que esse microrganismo permanece viável por quase 2 anos quando mantido nessas excretas desidratadas (LITTMAN e BOROK, 1968).

Foram obtidas evidências de que a associação desse microrganismo com esse substrato pode ser a única forma desse microrganismo assimilar creatinina como fonte de nitrogênio (STAIB, 1962; STAIB *et al.*, 1976). Como a creatinina deiminase é produzida pelas duas variedades, a inabilidade de *C. neoformans* var. *gatti* de colonizar excreta de aves pode refletir diferenças na regulação do mecanismo enzimático dessa enzima responsável pelo metabolismo da creatinina (POLACHECK e KWON-CHUNG, 1980; KWON-CHUNG, 1991).

O mecanismo pelo qual as fezes se tornam infectadas não é bem conhecido, mas estudos sugerem que a contaminação pode ocorrer pelo contato das fezes com o ar contaminado (SWINNE-DESGAIN, 1975). Contudo, pombos podem contribuir para a propagação dessa levedura através de suas fezes, que constituem um meio rico para *C. neoformans* e poderiam disseminar o fungo no ambiente carregando-o em seus bicos e patas.

2.1.1 Ambiente marinho

Leveduras estão distribuídas em quase todas as partes do ambiente aquático: mares, oceanos, estuários, rios e lagos (FELL, 2001). Quando encontradas nesse ambiente geralmente são asporogênicas e oxidativas ou fracamente fermentativas (PITT e MILLER, 1970).

Nesse ecossistema têm papel na biodegradação de óleo e compostos recalcitrantes, no parasitismo de animais marinhos, na reciclagem de nutrientes e decomposição de substratos orgânicos (KUTTY e PHILIPP, 2008).

Leveduras marinhas isoladas de diferentes fontes, como água do mar, sedimentos, peixe, aves e mamíferos marinhos já foram encontradas (HUNTER, 1920; BHAT *et al.*, 1955a; BHAT *et al.*, 1955b; SUEHIRO, 1960; VAN UDEN e FELL, 1968). Algumas espécies frequentemente coletadas de água do mar foram obtidas em alta quantidade em áreas altamente poluídas (FELL e VAN UDEN, 1963).

Yamasato *et al.* (1974) conduziram um estudo sobre leveduras no Oceano Pacífico numa profundidade de 4000m e conseguiram isolar, entre outros, o gênero *Cryptococcus*.

Hagler e Mendonça (1981) estudaram leveduras de águas marinhas e estuários com diferentes níveis de poluição no Estado do Rio de Janeiro e encontraram baixas concentrações de células por litro dessas leveduras em águas limpas, mas, em contrapartida, em águas poluídas e com florescimento de algas o número alcançou milhões de células por litro. Bhat e Kachwalla (1955) também em amostras de água do mar, porém na costa de Bombay, na Índia, conseguiram isolar leveduras do gênero *Cryptococcus*. Paula *et al.* (1983) a partir de amostras coletadas em praias poluídas e não poluídas da Baixada Santista também isolaram leveduras do gênero *Cryptococcus*. Loureiro *et al.* (2005) isolaram leveduras em amostras de areia e água do mar coletadas em duas praias de Olinda, onde 4 gêneros e 31 espécies foram identificadas, sendo o gênero *Candida* o mais encontrado.

Em relação à sedimentos marinhos, Fell *et al.* (1960) isolaram da Baía de Biscayne, na Flórida e nas Bahamas *Cryptococcus neoformans*, entre outras leveduras. Esse estudo relatou que as leveduras são mais abundantes em lama do que em sedimentos arenosos. E, a partir de estudos, Fell e van Uden (1963) concluíram que a disponibilidade de oxigênio é um fator limitante para o crescimento de leveduras dentro de sedimentos. E ainda, Hagler e Mendonça (1981) sugerem que sedimentos de litorais poluídos não são favoráveis para leveduras estritamente oxidativas como *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, as quais são mais comuns em ambientes menos poluídos.

2.1.2 Patogenicidade e Epidemiologia

C. neoformans é uma levedura de distribuição mundial e a exposição de humanos a ele é presumivelmente um evento comum, visto que a prevalência de infecções por esta levedura na população parece estar relacionada ao número de indivíduos com o sistema imune comprometido e a exposição deles à ambientes com esse microrganismo (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Em pessoas saudáveis essa infecção não é comum, por isso, a prevalência de criptococose numa população pode ser um indicador para a porcentagem total de indivíduos com deficiência no sistema imune. Por outro lado, em pacientes transplantados e/ou com AIDS, cujo sistema imune possui problemas severos, estão mais predispostos a adquirir a criptococose (DIAMOND e BENNETT, 1974; DUPerval *et al.*, 1977; KOVACS *et al.*, 1985; ENG *et al.*, 1986; CLARK *et al.*, 1990).

A infecção por *Cryptococcus neoformans* quase sempre ocorre em um estado avançado da AIDS (CROWE *et al.*, 1991). A meningoencefalite é a doença mais comum causada por essa levedura nesse grupo de pacientes. A criptococose em pacientes com AIDS é geralmente incurável e indivíduos que sobrevivem à doença inicialmente precisam de terapia de longa duração para prevenir a recorrência da mesma (ZUGER *et al.*, 1986).

As diferenças na apresentação clínica e nas consequências de criptococose causada por cepas var. *neoformans* e *gatti* foram relatadas por Fisher *et al.* (1993) e Speed e Dunt (1995). Um estudo na Austrália revelou maior mortalidade em pessoas com infecções causadas pela var. *neoformans*. Por outro lado, infecções causadas pela var. *gatti* têm pouca mortalidade, mas frequentemente apresentam complicações como sequelas neurológicas que requerem cirurgias e terapia prolongada (SPEED e DUNT, 1995).

Em relação à ocorrência da criptococose ao redor do mundo, a maior parte da literatura relata casos em países do hemisfério Norte, como os Estados Unidos. Mas essa doença é um problema em muitas regiões.

Na África, onde os isolamentos de *Cryptococcus neoformans* predominam, relatos sugerem que a infecção por essa levedura foi muito maior do que nos

Estados Unidos (CLUMECK *et al.*, 1984; KATLAMA *et al.*, 1984; PIOT *et al.*, 1984; VAN DE PERRE *et al.*, 1984; FRIEDMAN *et al.*, 1994).

No Zaire, 6 de 7 isolados foram classificados como *C. neoformans* var. *neoformans* dentre amostras ambientais e clínicas (SWINNE *et al.*, 1986a; SWINNE *et al.*, 1986b). Em Burundi todos os isolados clínicos e ambientais foram classificados da mesma forma (SWINNE *et al.*, 1991).

Na Ásia, estudos indicam a presença de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* de amostras ambientais e clínicas, incluindo pacientes HIV positivos, em países como Tailândia (IMWIDTHAYA, 1994), Índia (ABRAHAN *et al.*, 1997), Taiwan (HSU *et al.*, 1994) e China (ASHENG *et al.*, 1993). Um caso de infecção causada por *C. neoformans* var. *gatti* foi relatada em pacientes com AIDS na Índia (ABRAHAN *et al.*, 1997).

A incidência de criptococose na Austrália talvez seja maior do que em outras áreas do mundo (EDWARDS *et al.*, 1970). Dentro da Austrália, a incidência na era pré-AIDS era significativamente maior no Norte (4,7 por 100.000) do que no Sul do país (1,8 por 100.000). Nesse país, a criptococose é causada por ambas as variedades de *Cryptococcus neoformans*.

Na América Central, América do Sul e Caribe, estudos mostram a presença de *Cryptococcus neoformans* associado a criptococose no Brasil (var. *neoformans* e *gatti*) (ROZENBAUM e GONCALVES, 1994; ROZENBAUM *et al.*, 1992), Venezuela (var. *neoformans* e *gatti*) (VILANUEVA, 1989), Porto Rico (var. *neoformans*) (RUIZ *et al.*, 1989) e Cuba (var. *neoformans*) (ANDREU *et al.*, 1990).

No Brasil, foi verificada a presença dessa levedura na cidade de Campo Grande (MS) relacionada a habitat de aves em cativeiro. Entre outubro de 1994 e fevereiro de 1998 foram registrados 23 casos de meningoencefalite criptococócica no Hospital Universitário da UFMS, na cidade citada. Destes, 18 pacientes estavam com AIDS e 5 não tinham condição predisponente evidente. A absoluta maioria era de área urbana (FILIÚ, 2002). Em Uberlândia, um estudo realizado no Hospital da Universidade Federal entre março de 1998 e novembro de 2003 relatou 96 pacientes com diagnóstico de criptococose, sendo 81,3% portadores de AIDS. Em 89 casos a var. era *neoformans* e em 7 era *gatti* (MOREIRA *et al.*, 2006).

Montenegro e Paula (2000) comprovaram a ocorrência do *C. neoformans* variedade *neoformans* em fontes ambientais na Cidade de São Paulo, onde foram coletadas amostras de fezes de pombos dos 38 sítios analisados. O resultado mostrou que dez (26,3%) apresentaram positividade para o isolamento do fungo, e ainda duas amostras do fungo foram obtidas de materiais vegetais de eucaliptos provenientes do parque Ibirapuera e da Aclimação.

Na França, a infecção por HIV é a predisposição para 86% dos casos de criptococose (DROMER *et al.*, 1996). Entre os pacientes sem HIV, as condições que favoreciam essa infecção eram neoplasias, transplante de órgãos e terapia com corticosteróide.

Nos Estados Unidos, a cidade de Nova Iorque é um epicentro para a epidemia da AIDS. E dois estudos realizados há três décadas documentaram que sítios contaminados com fezes de pombos eram positivos para *C. neoformans* (LITTMAN e SCHNEIERSON, 1959 e CURRIE *et al.*, 1994). Um levantamento geral nos hospitais de Nova Iorque mostrou mais de 1200 casos de criptococose em 1991. A infecção por *Cryptococcus neoformans* associada à indivíduos com HIV é conhecida desde os anos 80 (CURRIE e CASADEVALL, 1994).

Excluindo *C. neoformans* e exceto pelos poucos casos clínicos de *C. albidus*, *C. curvatus* e *C. laurentii*, outras espécies não causam criptococose (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Na última década, técnicas moleculares têm sido aplicadas para investigar a epidemiologia da infecção (PERFECT *et al.*, 1989; POLACHEK e LEBENS, 1989; VARMA e KWON-CHUNG, 1989). Todas as análises moleculares realizadas em isolados de *C. neoformans* mostraram uma significativa variedade genética. Hunter e Fraser (1990) interpretaram a diversidade genética de acordo com a teoria do polimorfismo adaptativo, o qual sugere que a diversidade de espécies é proporcional à diversidade de nichos ecológicos ocupados.

2.1.3 Método de Isolamento e Identificação

As características gerais de espécies do gênero *Cryptococcus* incluem a ausência de hifa verdadeira ou pseudohifas, balitosporos, a inability de fermentar açúcares, a capacidade de assimilar inositol e produzir Urease.

Em tubos contendo Agar Sabouraud Dextrose ou Agar Extrato de Malte inclinados, a 25 °C, a levedura cresce facilmente, formando colônias brilhantes, viscosas, úmidas e com tonalidade creme. Após um mês podem acumular-se no fundo do tubo de ensaio, devido a sua textura mucóide. Algumas amostras, após sucessivos repiques perdem o aspecto mucoso tornando-se secas.

C. neoformans é parecido em algumas características com as outras espécies. Em sua identificação a presença de cápsula, crescimento a 37 °C, produção de colônias marrons em Agar Semente de Niger vão identificar essa levedura (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

O tamanho e espessura da cápsula podem aumentar significativamente com a maturação da colônia que, conseqüentemente, irá apresentar-se com bastante muco (CASADEVALL e PERFECT, 1998). Segundo Lacaz (2002) as células de culturas que perdem a viscosidade mostram pequeno envoltório capsular. Além disso, esse microrganismo também produz grande quantidade de Urease extracelular (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Cryptococcus neoformans é um patógeno para os mamíferos em grande parte porque de todas as espécies é a única que cresce a 37 °C. Algumas leveduras da espécie *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii* podem crescer a essa temperatura, mas não é comum para essas espécies. De fato, o crescimento de *C. neoformans* é significativamente reduzido a temperaturas entre 39 e 40 °C. A var. *gatti* parece ser mais sensível a essas temperaturas do que a var. *neoformans* e morrem rapidamente quando exposto a essas condições. *C. neoformans* possui outros fatores que influenciam em seu crescimento, como por exemplo, o pH, condições anaeróbias, concentração de CO₂ e concentração de ferro. Essa levedura cresce bem em meio ácido (pH 5-7) e não tolera condições alcalinas de pH acima de 7,6 e também não cresce em condições anaeróbicas. O crescimento de *C. neoformans* irá ser detectado na maioria dos meios padrão contendo Agar para fungos e bactérias, esse microrganismo não é uma levedura fastidiosa e colônias podem ser geralmente observadas em 48 ou 72 horas. Apesar de crescer a 24 °C, para amostras clínicas é recomendado a incubação de 30 a 35 °C. O isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fontes ambientais oferece maior chance de sucesso se as amostras

forem coletadas em locais protegidos da incidência solar (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

A radiação direta pode esterilizar amostras de solo contendo *Cryptococcus neoformans* (DENTON e DI SALVO; ISHAQ *et al.*, 1968), pois a umidade aumenta a sobrevivência de *C. neoformans* nesse substrato (ISHAQ *et al.*, 1968).

2.1.4 Fatores associados à virulência

As taxas de crescimento e os genes que as controlam são extremamente importantes para compor a virulência de cepas de *Cryptococcus neoformans*. Apenas 250 a 300 espécies de fungos já foram descritas como a causa de doenças humanas, dentre as 20.000 espécies (CASADEVALL e PERFECT, 1998) conhecidas.

Apenas algumas espécies de *Cryptococcus* são capazes de crescer a 37 °C, o que possibilita a infecção em mamíferos. Mesmo *C. neoformans* é sensível a temperaturas ambientais acima de 39 °C e demonstra uma queda significativa na taxa de crescimento, com incomum padrão de brotamento, crescimento de pseudohifas e vacuolização proeminente dentro da levedura. Essas mudanças estruturais demonstram uma série de reações de *stress* na maquinaria de replicação. Apesar desse conhecimento, essa levedura pode se adaptar ao hospedeiro mamífero e causar doenças em animais como coelhos, que possuem temperatura corporal de 39,5 °C e em humanos com febre acima de 39 °C em certas condições de imunossupressão.(CASADEVALL e PERFECT, 1998)

A potencial importância da Urease como fator de virulência poderia envolver a habilidade de modificar o pH em determinado local do hospedeiro, como por exemplo, quando as leveduras estão em um fagolisossomo (RUANE *et al.*, 1988; BAVA *et al.*, 1993).

Em relação à cápsula, ocorre liberação extracelular do maior polissacarídeo capsular, glucoronoxilomannan (GXM), durante a infecção e induz efeitos deletérios no hospedeiro, como interferência na fagocitose, inibição da migração de leucócitos para tecidos infectados e na modulação da produção de citocina (RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

O inositol é um metabólito celular que participa na formação da membrana lipídica e em mecanismos de transdução de sinais. Pode também atuar como um dos maiores osmólitos celulares durante situações de *stress* e tem papel no desenvolvimento e crescimento celular. *C. neoformans* tem a capacidade de catabolizar esse açúcar e utilizá-lo como fonte de energia e carbono, mas também é capaz de sintetizar esse composto (VINCENT e KLIG, 1995). Esses dois fatos sugerem o potencial que ele tem de ser um importante fator na regulação e crescimento balanceado dessa levedura e poderia ser particularmente importante no sistema nervoso central dos hospedeiros rico em inositol (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Chen *et al.* (1997) identificaram atividade da enzima fosfolipase em *Cryptococcus neoformans*. A produção dessa enzima parece ser extracelular. Fosfolipase pode ser importante na infecção pulmonar inicial, quando altas concentrações de fosfolipídeos estão presentes no substrato.

Outros testes tradicionais aplicados à caracterização de leveduras são proteinase, lipase e DNase, os quais estão associados ao processo de infecção de leveduras, entretanto, podem estar associados, também, ao processo de sobrevivência das mesmas.

2.1.5 Origem Ambiental da Infecção

A evidência de que o ambiente é uma fonte de *Cryptococcus neoformans* é muito forte, mas circunstancial. Alguns motivos para isso são: esse organismo é comumente encontrado em áreas urbanas, casos de transmissão da infecção entre humanos são muito raros, casos de transmissão da infecção de animais para humanos nunca foi documentado e *Cryptococcus neoformans* raramente é um comensal humano (CASADEVALL e PERFECT, 1998). O único caso de transmissão de um humano para outro foi devido a um transplante com tecidos infectados (OOI *et al.*, 1971; BEYT e WALTMAN, 1978) e acidentes com instrumento infectado com sangue (GLASER e GARDEN, 1985).

Segundo Casadevall e Perfect (1998), *C. neoformans* proveniente de fontes ambientais e clínicas são indistinguíveis do ponto de vista molecular. Essa

observação suporta a idéia de que a criptococose é adquirida de reservatórios ambientais.

2.1.6 Rota de infecção humana

Acredita-se que a infecção humana é resultado da inalação de células dissecadas, formas da levedura pobremente encapsulada ou de basidiósporos. A infecção inicial ocorre nos pulmões, com disseminação extrapulmonar ocorrendo primeiramente em pacientes imunocomprometidos que não conseguem conter a infecção no primeiro sítio. Apesar da aceitação quase universal de que os pulmões são a primeira rota de infecção, há poucas evidências diretas sobre isso (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

O consenso para a rota pulmonar surgiu nos anos 50 e 60 depois da identificação de excreta de aves como um significativo reservatório ambiental com a potencial disseminação por aerossol, o reconhecimento da pneumonia criptocócica como uma síndrome distinta e a descrição de nódulos subpleurais e nódulos linfáticos pulmonares primários por Baker e colaboradores (HAUGEN e BAKER, 1954; SALYER *et al.*, 1974; BAKER, 1976).

Há muitas evidências para se acreditar que a criptococose é resultado de inalação de partículas infectantes. Em primeiro lugar essas partículas possuem um tamanho compatível com a deposição alveolar e já foram isoladas do ar acima de sítios contaminados (POWELL *et al.*, 1972; RUIZ e BULMER, 1981).

Em segundo lugar, lesões pulmonares, muitas vezes na forma de granuloma cicatrizado foram encontrados em pacientes com meningite causada por *C. neoformans* (HAUGEN e BAKER, 1954; SALYER *et al.*, 1974; BAKER, 1976).

Terceiro, a pneumonia criptocócica é reconhecida clinicamente como uma precursora da meningite criptocócica (DRIVER *et al.*, 1995). Quarto e último, infecção pulmonar primária em ratos e camundongos pode resultar em disseminação extrapulmonar (HUFFNAGLE *et al.*, 1991; GOLDMAN *et al.*, 1994; FELDMESSER e CASADEVALL, 1997). Contudo, está faltando uma evidência inequívoca de que o pulmão é o sítio inicial de infecção.

2.1.7 Outras rotas de infecção inicial

Existem outras possíveis rotas e sítios iniciais de infecção. A possibilidade de uma rota gastrointestinal é sugerida pelo fato de haver isolamento de *C. neoformans* de alimentos, como frutas e leite. Infecção humana na nasofaringe foi relatada (JONES, 1927). *C. neoformans* foi isolado de úlceras de pacientes com AIDS (FRIEDMAN *et al.*, 1994). Macacos que receberam alimento infectado com *C. neoformans* desenvolveram infecção disseminada (TAKOS, 1956). Similarmente, esse tipo de infecção ocorreu devido à administração oral de células de leveduras em camundongos e *C. neoformans* encapsulado pode aderir à células epiteliais do sistema gástrico (SALKOWSKI *et al.*, 1987). Úlcera retal foi sugerida como uma porta de entrada em um paciente com infecção disseminada (ALLEN e LOWBEER, 1945).

2.1.8 Diferenças sexuais e susceptibilidade à *Cryptococcus neoformans*

Inúmeros estudos têm relatado a predominância de pacientes masculinos entre indivíduos com criptococose, tanto antes (GENDEL *et al.*, 1950; LITTMAN, 1968; LEWIS e RABINOVICH, 1972) como depois da era da AIDS. Em um estudo realizado em Goiânia por Fernandes *et al.* (2000), de 50 pacientes com criptococose associada a AIDS, 78% era do sexo masculino. Não há explicação biológica satisfatória para este fato. É difícil atribuir essa diferença nas taxas de criptococose à exposição ao patógeno, já que a rota exata de infecção não é bem conhecida. Uma explicação mais provável seriam as diferenças entre o sistema imune de um hospedeiro do sexo masculino e feminino e suas respectivas respostas imunológicas. Hormônios sexuais humanos podem estimular o crescimento e a maturação de outros fungos patogênicos, como *Coccidioides immitis* (DRUTZ *et al.*, 1981). Estrógeno pode inibir a transformação de micélio para levedura em *Paracoccidioides brasiliensis*, uma descoberta que pode ajudar a encontrar uma explicação para a aparente resistência de mulheres a paracoccidioidomycosis (RESTREPO *et al.*, 1984). No caso de criptococose, pode ser que mulheres tenham simplesmente uma base genética que oferece maior resistência. Em camundongos, a susceptibilidade a criptococose está sobre controle multigênico e é influenciado pelo locus xid no cromossomo X (MARQUIS *et al.*, 1985).

2.1.9 Populações suscetíveis

Criptococose pode ocorrer em qualquer idade, no entanto, muitos estudos relatam que a maioria dos casos ocorre entre as idades de 20 a 50 anos (LITTMAN, 1968; DEWYTT *et al.*, 1982). Algumas populações podem ter um risco maior de adquirir criptococose devido à suscetibilidade genética ou maior exposição à partículas infectantes. Apesar de alguns estudos sugerirem que a aquisição da doença ocorre com mais frequência em algumas etnias, não há estudos controlados para indicar diferenças verdadeiras na suscetibilidade étnica (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Essa infecção não é comum em crianças. E os riscos de criptococose são semelhantes aqueles dos adultos e incluem infecção por HIV, desordem linfoproliferativa e terapia imunossupressiva (LEGGIADRO *et al.*, 1992).

No Brasil, Corrêa (1999) estudou no Pará o caso de 79 pacientes, dos quais 19 eram crianças infectadas com *Cryptococcus neoformans*, sendo que em nove a infecção era *var. gatti*. A média da idade era 7,8 anos. No entanto, infecções por *Cryptococcus neoformans* são mais raras do que em adultos.

2.1.10 Criptococose humana

Os principais sítios de infecção incluem o cérebro, pulmões, pele, olhos e próstata. No entanto glândulas adrenais, ossos, coração, fígado, nódulos linfáticos, articulações, músculos e rins também foram relatados como sendo sítio de infecção (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

C. neoformans possui uma única e ainda inexplicável predisposição para estabelecer a infecção no sistema nervoso central. O quadro clínico dessa doença pode ser variável. A maioria dos pacientes (70 a 90%) apresenta sintomas como dor de cabeça, febre, letargia, náusea e vômito, alteração na personalidade, perda de memória, diminuição da sensibilidade e/ou coma (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

No Brasil, no estudo de Fernandes *et al.* 2000 os pacientes estudados apresentaram dor de cabeça, vômito e ocasionalmente febre. Ao contrário da meningite bacteriana, esse sintomas ocorrem de 2 a 4 semanas, e apesar de poder

ocorrer rigidez da nuca, isso não é regra na meningite causada por *C. neoformans* (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Tendo em vista o exposto, este projeto visa à caracterização fenotípica de leveduras com ênfase em *C. neoformans* isoladas de amostras de água do mar e de areia das regiões do canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba.

3. Objetivos

Caracterização morfológica e fenotípica de leveduras do gênero *Cryptococcus* com ênfase em *Cryptococcus neoformans* isoladas a partir de amostras de água do mar e de areia de três ambientes costeiros de São Paulo (Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba) são os objetivos desse estudo, o qual possibilitará analisar o perigo da presença de *Cryptococcus neoformans* nessas amostras.

4. Material e Métodos

4.1 Período de amostragem e pontos de coleta

As coletas de amostras de água do mar e areia foram realizadas no Canal de São Sebastião, Ubatuba e na Baixada Santista no litoral do estado de São Paulo.

Canal de São Sebastião: As amostras de água foram coletadas mensalmente, no período de agosto de 2005 a março de 2007, em dois pontos: (i) Ponto 1 - em frente à Praia do Segredo (Latitude 23° 49' 50" S / Longitude 45° 25' 20" W), (ii) Ponto 2 - na região norte da Praia de Barequeçaba (Latitude 23° 49' 56" S / Longitude 45° 25' 51" W) (Figura 1). As amostras de areia foram coletadas no mesmo período, em dois pontos: (iii) Ponto 1 – Praia do Cabelo Gordo (Latitude 23° 49' 50" S / Longitude 45° 25' 20" W), (iv) Ponto 2 – Praia do Segredo (Latitude 23° 49' 56" S / Longitude 45° 25' 51" W).

Ubatuba: Foram selecionados dois pontos de coleta: (i) Ponto 1 – (Latitude 23° 30' 02" S / Longitude 45° 07' 07" W) e (ii) Ponto 2 - (Latitude 23° 30' 41" S / Longitude 45° 06' 04" W) e as amostras foram coletadas nos meses de fevereiro a maio de 2006 e janeiro a março de 2007 (Figura 1). As amostras de areia foram coletadas no

mesmo período, em apenas um ponto: (iii) Ponto 1 – Praia Lamberto (Latitude 23° 30' 00" S / Longitude 45° 07' 00" W).

Baixada Santista: As coletas de amostras foram realizadas nos meses de fevereiro a maio de 2006 e janeiro a março de 2007 em três pontos de coleta: (i) Ponto 1 - entrada da cidade de São Vicente (Latitude 23° 59' 13" S / Longitude 46° 22' 26" W), (ii) Ponto 2 - Boca da Barra, depois da Ilha das Palmas (Latitude 24° 02' 25" S / Longitude 46° 19' 20" W) e (iii) Ponto 3 – próximo à Marina Astúrias (Latitude 23° 59' 57" S / Longitude 46° 18' 39" W) (Figura 1) . As amostras de areia foram coletadas no mesmo período, em apenas um ponto: (iii) Ponto 1 – Praia José Menino (Latitude 23° 59' 13" S / Longitude 46° 22' 26" W).



Figura 1 – Localização dos pontos de coleta de amostras de água do mar em Ubatuba, Canal de São Sebastião e Baixada Santista
 FONTE: Google Earth.

Água do mar: Em cada ponto, foram coletados 5 litros de água do mar, a dez centímetros abaixo da superfície, em frascos previamente esterilizados.

Areia: aproximadamente 200 gramas de amostras de areia, seca e úmida, foram coletadas e, em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos.

As amostras foram transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia Ambiental/ICB II/USP e analisadas no prazo máximo de 24 horas.

4.2 Isolamento de leveduras

O número de leveduras isoladas em cada local, assim como em cada tipo de amostra e os meios utilizados para o isolamento estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Número de isolados de amostras de água e areia nos três ecossistemas estudados, de acordo com os meios de cultura utilizados para o isolamento.

Local	Tipo de Amostra	SDA	CHROMOagar	Total
Canal de São Sebastião	Água	38	33	71
	Areia	25	16	41
Baixada Santista	Água	42	25	67
	Areia	5	3	8
Ubatuba	Água	7	4	11
	Areia	1	0	1
Total		118	81	199

Legenda: SDA = Agar Sabouraud Dextrose

4.3 Identificação de *Cryptococcus* spp.

Para início dos testes de verificação da presença de *Cryptococcus neoformans* foi feito, primeiramente, uma suspensão dos isolados em solução salina 0,8% e, pela técnica de esgotamento de alça, o reisolamento em Placa de Petri contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose (Difco) (Anexo 1a), para assegurar a pureza das colônias.

As leveduras isoladas foram analisadas quanto às suas características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas, de acordo com os métodos preconizados por Lodder (1970), Kreger Van Rij (1984) e Kurtzman e Fell (1998).

4.3.1 Microcultivo

Esse teste tem como finalidade observar características microscópicas dos isolados. O procedimento foi realizado do seguinte modo:

- Preparação do meio Ágar Fubá acrescido de Tween 80 (Anexo 1b).
- Dentro de uma placa de Petri, lâminas no sentido vertical foram colocadas sobre outras no sentido horizontal, a fim de deixar um espaço para que possa ser colocada uma quantidade de água para manter a umidade dentro da placa.
- Uma pequena quantidade do meio Ágar Fubá acrescido de Tween 80 fundido foi colocada com ajuda de uma pipeta, em cada uma das lâminas que ficaram por cima.
- Após a solidificação deste meio, 3 estrias contendo o inóculo dos isolados foram semeados utilizando uma alça em ponta de agulha estéril.
- As lamínulas foram colocadas sobre o meio deixando as extremidades das estrias descobertas para que haja maior oxigenação dessa região e, conseqüentemente, maior crescimento da levedura cultivada.
- Água destilada estéril foi colocada dentro da Placa de Petri para manter a umidade necessária para o crescimento dos isolados.
- As placas de microcultivo foram incubadas a 26 °C por 48 horas e, após esse período, as mesmas foram analisadas quanto às características morfológicas (forma e tamanho das células, presença de pseudomicélio, micélio verdadeiro e blastosporos).

4.3.2 Teste com Nankin ou Tinta da China

O teste tem como finalidade identificar a levedura *Cryptococcus* pela presença de cápsula, uma estrutura bem nítida em preparações com tinta da China ou Nanquin para indicação desse microrganismo.

A técnica foi realizada do seguinte modo: uma alçada contendo a amostra, uma gota de tinta Nankin e duas gotas de água foram colocadas em uma lâmina. A partir disso, foi colocada uma lamínula e a lâmina foi passada na chama do Bico de Bunsen para fixação. A presença ou ausência de cápsula foram observadas no microscópio. Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112.

4.3.3 Teste de Urease

O objetivo desse teste é a verificação da produção da enzima Urease responsável pela degradação da uréia. A partir desse processo há produção de amônia que alcaliniza o meio, o que causa a viragem do indicador.

As leveduras submetidas ao teste de Tinta Nankin foram também semeadas na superfície do meio inclinado Urease (Anexo 1d) e incubadas a 37 °C por 7 dias. A mudança de coloração, devido à hidrólise da uréia, foi verificada após 24 horas. Para controle positivo foi utilizada a cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112.

4.3.4 Auxanograma (Assimilação de Carboidratos e Nitrogênio)

4.3.4.1 Assimilação de Carboidratos

É baseado na capacidade que as leveduras possuem de utilizar determinado carboidrato como única fonte de carbono para sua viabilidade celular. Para isso, um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono (sem o qual a célula fúngica não pode crescer), foi utilizado e a levedura que se deseja identificar foi semeada. Após a semeadura foi adicionado ao cultivo alguns carboidratos e foi observada a capacidade de utilização deste como fonte de carbono. Quando o carboidrato é assimilado pela levedura observa-se o crescimento desta ao redor da fonte de carbono.

A técnica foi preparada de acordo com os seguintes passos:

- preparação do meio contendo Nitrogênio (Anexo)

- Para cada isolado foi preparado 1 mL de suspensão de leveduras com turbidez equivalente a 9×10^8 células/mL. O inóculo foi semeado utilizando a técnica de *Pour Plate* e, após a solidificação, 9 tipos de açúcares em pó (Mio-Inositol, Lactose, Maltose, sacarose, Melibiose, rafinose, Rhaminose, L-arabinose, Melizitose - Merck) foram adicionados em posições previamente demarcadas na base das placas de Petri.

- As placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas e, após este período as leituras para a observação de regiões opacas ao redor dos açúcares adicionados foram feitas.

4.3.4.2 Assimilação de nitrogênio

A assimilação do referido nutriente demonstra a capacidade que algumas leveduras apresentam de assimilar nitrato de potássio (nitrogênio inorgânico), como única fonte de nitrogênio utilizado em seus processos fisiológicos.

A técnica foi preparada de acordo com os seguintes passos:

- Preparação do meio contendo Carbono (Anexo)

- Para cada isolado foi preparado 1 mL de suspensão de leveduras com turbidez equivalente a 9×10^8 células/mL. O inóculo foi semeado utilizando a técnica de *Pour Plate* e, após a solidificação, pequenas quantidades de compostos nitrogenados em pó (nitrato de potássio e peptona - Merck) foram adicionadas em posições previamente demarcadas na base das placas de Petri. A peptona foi aqui empregada como controle da viabilidade do inóculo, visto que todas as leveduras a utilizam como fonte nitrogenada.

- As placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas e, após esse período, as leituras para a observação de regiões opacas ao redor dos compostos nitrogenados adicionados, indicando assimilação dos mesmos, foram feitos.

4.3.5 Zimograma (Fermentação de açúcares)

É baseado na capacidade que as leveduras têm de fermentar açúcares presentes no meio basal (Anexo) contendo extrato de levedura e peptona. Os 6 açúcares utilizados (Glicose, Lactose, Maltose, Rafinose, Sacarose e Trealose - Merck) foram adicionados numa concentração de 2%.

Seis meios diferentes foram preparados, onde em cada um havia um tipo de açúcar e um volume de 4 mL de cada meio foi distribuído em tubos de ensaio contendo Tubos de Durham. Nesses tubos, foram distribuídos, com o auxílio de uma pipeta, 1 mL de suspensões de leveduras, as quais estavam a uma concentração de 15×10^8 células/mL, de acordo com a escala de MacFarland. Para cada isolado a ser identificado foram feitas 6 suspensões de leveduras, uma para cada tipo de açúcar e foram incubadas a 37 °C. Leituras diárias foram realizadas por um período de 15 dias para visualizar a presença de bolhas indicativas de fermentação.

4.3.6. Fenoloxidase

Para este teste os isolados que assimilarem o açúcar Inositol no teste de Auxanograma foram repicados em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Difco) e com 48 horas de crescimento foram semeados em meio Dopamina (Anexo) através da técnica de esgotamento de alça e incubados a 37 °C. As leituras foram realizadas durante 7 dias. Cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 foi utilizada.

4.3.7 Caracterização de fatores associados à virulência

4.3.7.1 DNase

Os isolados foram semeados em placas de petri contendo DNase-Test-Agar modificado (Anexo) e incubadas por 15 dias a 37 °C. A leitura foi feita mediante visualização de halo de precipitação formado pela adição de HCl (Merck) 5N (LOPEZ-MARTINEZ *et al.*, 1994).

4.3.7.2 Lipase

Os isolados foram semeados em meio para detecção de Lipase (Anexo). As placas feitas em duplicidade foram mantidas em estufa a 37 °C durante 15 dias. O teste foi considerado positivo após visualização de um halo de precipitação ao redor da colônia (MÜHSIN *et al.*, 1997).

4.3.7.3 Proteinase

Os isolados de leveduras foram repicados com alça de platina no centro da placa de petri contendo o meio agar-proteinase (Anexo), bem como o controle positivo (cepa padrão de *Candida albicans*, ICB-12A). As placas feitas em duplicidade foram, então, incubadas à 37 °C, seguindo com leituras de quatro a quinze dias. A presença da enzima foi observada pela formação de um halo translúcido de degradação da proteína ao redor da colônia da levedura (RÜCHEL *et al.*, 1982).

4.3.7.4 Fosfolipase

Os isolados de leveduras foram repicados com alça de platina no centro da placa de petri contendo o meio de agar-fosfolipase (Anexo), bem como, também a cepa padrão de *Candida albicans*, (ICB-12A) empregada como controle positivo. As placas feitas em duplicidade foram, então, incubadas à 37 °C e as leituras feitas no período de quatro a quinze dias. A presença da enzima foi observada pela formação de uma zona opaca de precipitação ao redor da colônia da levedura e a atividade foi medida da mesma forma que para a proteinase (PRICE *et al.*, 1982).

Os resultados dos testes de Lipase, Proteinase e Fosfolipase foram dados de acordo com o valor de Pz (dc/dcd), que é a relação entre o valor do diâmetro da colônia pelo valor do diâmetro do halo formado. Se Pz é igual a 1, o resultado é negativo, se Pz está entre 0,64 e 1 é positivo e se Pz for menor que 0,64 é fortemente positivo.

5. Resultados

5.1 Isolamento de leveduras

Foram selecionadas 199 colônias que apresentaram características como coloração creme e textura mucosa. Em seguida foram semeadas em placas de Petri contendo o meio Agar Sabouraud Dextrose para verificação da pureza e depois colônias isoladas foram semeadas em tubo inclinado contendo o mesmo meio de cultura para a realização dos testes futuros.

5.2 Microcultivo

De um total de 199 leveduras isoladas tanto de água do mar ($n = 149$) como de areia ($n = 50$), 175 foram selecionadas como sugestivas para *Cryptococcus* spp. no teste de Microcultivo, por apresentarem características microscópicas como ausência de hifas e blastoconídeos.

5.2.1 Teste de Urease

Dos 175 isolados selecionados, 24 foram identificados como *Cryptococcus* spp. pelo teste de urease (Tabela 2).

O teste de Urease (Figura 2) foi decisivo para a seleção dos isolados a serem submetidos ao teste de Auxanograma, já que a cápsula pode variar de tamanho e dificultar sua visualização, o que poderia levar a um falso resultado negativo.

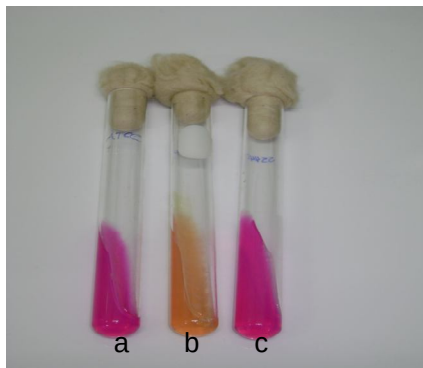


Figura 2: Teste de Urease (a) *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, (b) *Candida albicans* ICB 12A e (c) Isolado Urease Positivo

Tabela 2: Isolados presuntivos de *Cryptococcus* spp. identificados pelo teste de Urease, de acordo com o local de coleta e tipo de amostra.

Local	Amostra	Nº de Isolados
Canal de São Sebastião	Água	10
	Areia	7
Baixada Santista	Água	4
	Areia	2
Ubatuba	Água	0
	Areia	1
Total		24

5.2.2 Tinta Nankin

Foram realizados testes com Tinta Nankin com os 175 isolados para a visualização da cápsula. Essa estrutura foi observada em apenas 8 isolados (33,3%) (Figura 3).

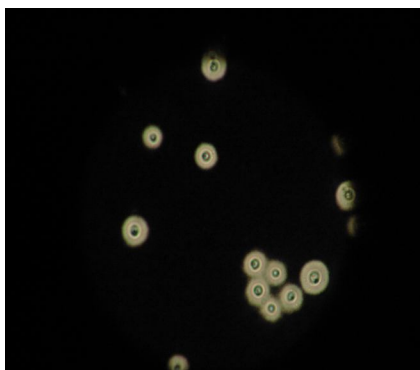


Figura 3: Visualização da cápsula de ATCC de *Cryptococcus neoformans*

5.2.3 Auxanograma

A partir do teste de Assimilação de Carboidratos e Nitrogênio (Auxanograma) foram selecionados 10 (41,7%) isolados que apresentaram formação de halo caracterizando a assimilação do açúcar Inositol, indicativo de *Cryptococcus neoformans* (Figura 4). Outros açúcares foram também testados e houve 8 (33,3%) isolados que assimilaram a lactose, 16 (66,7%) isolados que assimilaram maltose, 19 (45,6%) que assimilaram sacarose, 11 (45,8%) que assimilaram melibiose, 15 (62,5%) que assimilaram rafinose, 6 (25%) que assimilaram rhaminose, 20 (83,3%) que assimilaram L.arabinose e 17 (70,8%) que assimilaram melizitose. Nenhum isolado foi positivo para a assimilação do KNO_3 como fonte de nitrogênio. Dos 24 isolados, 22 (91,7%) apresentaram halo indicativo de assimilação da Peptona (Figura 5). Os dois isolados que não assimilaram esse composto foram submetidos pela segunda vez ao teste, porém continuaram a dar resultado negativo.

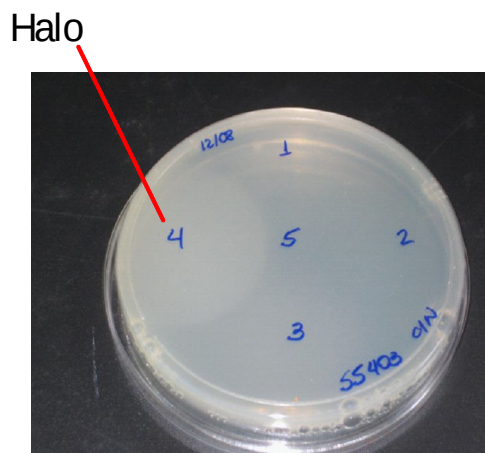


Figura 4: Teste de assimilação de carbono



Figura 5: Teste de assimilação de nitrogênio (peptona)

5.2.4 Zimograma (Fermentação de Açúcares)

Os 10 isolados foram submetidos ao teste de Fermentação de açúcares (glicose, lactose, maltose, rafinose, sacarose e trealose) e somente quatro isolados não fermentaram nenhum dos açúcares testados (ausência de bolhas indicativas da fermentação, característico de *Cryptococcus* spp.) (Figura 6).



Figura 6: fermentação positiva de açúcares (presença de bolhas)

5.2.5 Fenoloxidase

Os quatro isolados foram semeados no meio contendo dopamina para visualização da coloração das colônias e para que a espécie *Cryptococcus neoformans* fosse identificada. Porém, nenhum dos isolados apresentaram coloração marrom a negra, apresentando resultado negativo. Portanto, não pertencem à espécie citada, de acordo com os testes efetuados.

5.2.6 Caracterização de fatores associados à virulência

Os testes de DNase, Lipase, Proteinase e Fosfolipase foram realizados com 9 isolados. A seguir estão os resultados:

DNase: a leitura do teste se fez através da observação da presença ou ausência de halo ao redor da colônia semeada. Nesse teste não houve formação de halo em 3 isolados.

Lipase: os testes foram feitos em duplicata e dos 9 isolados testados, 4 (44,4%) apresentaram resultado “fortemente positivo” nas duas duplicatas; 1 (11,1%) apresentou resultado “positivo” nas duas duplicatas e 4 (44,4%) apresentaram resultado “positivo” em uma das duplicatas e “fortemente positivo” na outra.

Proteinase: dos 9 isolados testados em duplicata, 2 (22,2%) não apresentaram formação de halo e 7 (77,8%) apresentaram resultado “fortemente positivo” para as duas duplicatas.

Fosfolipase: Neste teste, dos 9 isolados, 4 (44,4%) deram resultado “positivo” para as duas duplicatas, 1 (11,1%) isolado teve uma das duplicatas como “positivo” e a outra como “fortemente positivo” e 3 (33,3%) isolados não apresentaram formação de halo ao redor da colônia para cada duplicata.

6. Discussão

6.1 Reisolamento dos isolados de leveduras

A técnica do esgotamento de alça a partir da suspensão salina 0,8% foi eficiente, pois permitiu maior separação das colônias e, em alguns casos, colônias diferentes cresceram e aquelas mais sugestivas para *Cryptococcus* spp. foram selecionadas por apresentarem aspecto mais mucoso e coloração creme e estocados em Agar Sabouraud Dextrose inclinado para posterior identificação.

6.1.2 Identificação de *Cryptococcus* spp.

As características gerais de espécies do gênero *Cryptococcus* incluem a ausência de hifa verdadeira ou pseudohifas, baliosporos, a inability de fermentar açúcares, a capacidade de assimilar inositol e produzir Urease. Os nossos isolados apresentaram essas características quando foram identificados. A seguir explicaremos cada teste realizado.

6.1.2.1 Microcultivo

O uso desta técnica teve como objetivo a observação de estruturas microscópicas características de leveduras do gênero *Cryptococcus*, como ausência de hifas e pseudohifas, presença de blastoconídeos e células arredondadas. É importante que as estrias feitas no Agar Fubá não sejam feitas com quantidades grandes do material a ser analisado, já que isso associado a um grande crescimento da levedura pode prejudicar na observação ao microscópio óptico, pois, nessas condições, as estruturas ficam muito próximas e em camadas espessas, o que dificulta a diferenciação das mesmas. Todos os isolados que apresentaram essas características foram selecionados para os testes posteriores.

6.1.2.2 Observação da cápsula (Teste com Tinta Nankin) e Teste de Urease

A observação da cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp. é melhor se esse teste for realizado com Nankin diluído em água, pois com o Nankin puro a lâmina fica muito escura e não dá o contraste com aquela estrutura. As mesmas amostras que passaram pelo teste de observação da cápsula, também foram submetidas ao teste de Urease. Este último complementa o primeiro, pois alguns isolados não apresentaram a cápsula, mas causaram a viragem do indicador no teste de Urease, indicando produção dessa enzima. Isso pode ser explicado pelo fato de que o tamanho da cápsula pode variar.

A estrutura da cápsula é tão dinâmica que pode mudar de composição dentro de uma única cepa durante a infecção (CHERNIAK *et al.*, 1995). Em algumas amostras, o tamanho da cápsula poderia estar tão pequeno que impossibilitou a observação da mesma. A produção dessa estrutura é regulada pela exposição a fatores como alta concentração de CO₂ e baixa concentração de ferro (VARTIVARIAN *et al.*, 1993) no meio ou no hospedeiro.

Kobaiashy *et al.* (2005) e Jain *et al.* (2005) também utilizaram essa técnica para identificação de *Cryptococcus neoformans*. García-Rivera *et al.* (2004), utilizaram esta técnica juntamente com imunofluorescência e uma cepa de *Cryptococcus neoformans* com uma mutação no gene relacionado à síntese da cápsula foi negativo no teste com tinta Nankin, mas positivo para a presença dessa estrutura no teste realizado com imunofluorescência.

Já a verificação da produção de Urease foi utilizada por Cox *et al.* (1999), Filiú *et al.* (2002), Kobaiashy *et al.* (2005) e Baroni *et al.* (2006), e foi observado que não há diferenças significativas entre a quantidade de urease produzida em isolados ambientais e clínicos (CANTEROS *et al.*, 1996) e é conhecido apenas um isolado ambiental urease-negativa (LI e WU, 1992).

Aqueles isolados que apresentaram produção de Urease foram selecionados para a realização de outros testes, mesmo que não tivesse sido observada a cápsula.

6.1.2.3 Auxanograma (Assimilação de Carboidratos e Nitrogênio)

Esse teste foi realizado utilizando vários açúcares, porém o mais importante deles é o Inositol. Este é um metabólito celular que participa na formação da membrana lipídica e em mecanismos de transdução de sinais. Pode também atuar como um dos maiores osmólitos celular durante situações de *stress* e tem papel no desenvolvimento e crescimento celular.

Cryptococcus neoformans tem a capacidade de catabolizar esse açúcar e utilizá-lo como fonte de energia e carbono, mas também é capaz de sintetizar esse composto (VINCENT e KLIG, 1995). Esses dois fatos sugerem o potencial que ele tem de ser um importante fator na regulação e crescimento balanceado dessa levedura e poderia ser particularmente importante no sistema nervoso central dos hospedeiros rico em inositol. Esse teste é também relatado por Filiú *et al.* (2002) e Kobaiashy *et al.* (2005), porém neste último não foi realizado o teste de assimilação de nitrato. A observação do halo indicativo de assimilação dos açúcares é melhor se estes forem colocados em quantidade média. Em relação às fontes de nitrogênio, *Cryptococcus neoformans* não assimila nitrato (CASADEVALL e PERFECT, 1998) e a peptona serve como controle positivo.

6.1.2.4 Zimograma (Fermentação de Açúcares)

O uso de 1 mL da suspensão salina na turbidez de 15×10^8 células/mL de acordo com a escala de MacFarland permitiu a observação correta dos resultados, porém ao longo dos 15 dias de incubação o crescimento das leveduras compromete a visualização das bolhas nos tubos de Durham, pois o meio se torna muito turvo. Por isso, é importante fazer leituras diárias para que as observações possam ser feitas ainda com o meio mais transparente.

A ausência de bolhas de fermentação é uma das características de leveduras do gênero *Cryptococcus*. Huppert *et al.* (1975) em um estudo comparativo relataram a ausência de fermentação por várias espécies de leveduras, incluindo *Cryptococcus neoformans*. Campos *et al.* (2009) utilizaram esta técnica para identificar microrganismos do gênero *Cryptococcus neoformans* de amostras de cães e gatos.

6.1.2.5 Produção de Fenoloxidase

Dentre as espécies de *Cryptococcus*, *Cryptococcus neoformans* é o único a possuir a enzima lacase que permite a mobilização de precursores de catecol à melanina, como o dopa, dopamina, noraepinefrina e epinefrina (POLACHEK, 1991).

A estrutura da melanina e sua função permanecem pouco compreendidas. Uma série de estudos celulares suportam a hipótese de que a melanina possa ter seu papel na proteção da levedura contra danos causados por reações de oxidação causadas pelo hospedeiro (WANG e CASADEVALL, 1994a; WANG *et al.*, 1995). Células melanizadas também protegem a levedura da ação de macrófagos. Outra possível função da melanina seria a ação como suporte estrutural para a célula (WANG *et al.*, 1996).

É provável que no meio ambiente, *Cryptococcus neoformans* use a melanina para proteger-se da radiação UV (WANG e CASADEVALL, 1994b), temperaturas extremas (ROSAS e CASADEVALL, 1997) e/ou para manter a integridade da parede celular contra a pressão osmótica no ambiente.

Kobaiashy *et al.* (2005), Baroni *et al.* (2006) (amostras de excretas de aves, árvores e fontes ambientais urbanas) e Rodriguez *et al.* (2007) (isolados clínicos) realizaram esse teste para identificação de *Cryptococcus neoformans*. Baroni *et al.* (2006) não fez pela técnica do esgotamento de alça diretamente dos isolados, e sim por semeadura de uma suspensão salina em ponto único.

Pela ausência da produção da fenoloxidase, concluímos que nenhum dos nossos isolados foi identificado como *Cryptococcus neoformans*.

6.1.2.6 Caracterização de fatores associados à virulência

Quanto aos fatores associados à virulência, durante o estágio, foi realizado um treinamento nos testes de proteinase, DNAase, lipase e fosfolipase e foi observado que as leveduras em forma geral podem ou não expressar as enzimas testadas de acordo as condições oferecidas.

6.1.8 Considerações finais

O fato de *Cryptococcus neoformans* já ter sido isolado de penas, patas e bicos de aves por Pal (1985), juntamente com o fato de essa levedura ter sido isolada na cidade de Santos a partir de amostras de ar atmosférico e excretas de pombos coletadas em torres de igrejas, construções antigas próximo às praias e no centro da cidade por Soares *et al.* (2005), indicam um possível risco da presença desse microrganismo nas praias, onde as aves vão a procura de alimento. É possível que isso também ocorra nas outras cidades estudadas e por isso, mais estudos com uma amostragem maior da que foi utilizada aqui são necessários para verificar se esses microrganismos realmente apresentam risco nessas áreas.

Patógenos ambientais que atingem milhões de pessoas todos os anos certamente podem nos prejudicar, especialmente se permanecermos sem conhecimento sobre seu número e padrões de infecção. Pesquisas sobre a incidência e epidemiologia de doenças cujos agentes etiológicos são de origem ambiental são necessárias para entender os organismos e mecanismos que perpetuam doenças e para avaliar melhor o alcance da ameaça representada por patógenos ambientais. Esses dados podem ser utilizados para a realização de um estudo de análise de riscos para desenvolver respostas apropriadas no combate do patógeno no ambiente (Cangelosi *et al.*, 2004).

Em estudos com patógenos ambientais as diferenças intraespecíficas podem acarretar consequências críticas na virulência, transmissão, persistência ambiental e padrões de distribuição ambiental. Pesquisas com esses microrganismos precisam considerar essa diversidade intraespecífica, objetivando entender a ecologia dessas doenças para desenvolver estratégias para o seu controle (Cangelosi *et al.*, 2004).

7. Conclusões

1- Dos 175 isolados que foram selecionados a partir da técnica de microcultivo, 4 (2,3%) foram identificados como pertencente ao gênero *Cryptococcus*, mas não da espécie *neoformans*.

2- Destes cinco, 2 foram provenientes da Baixada Santista e 2 do Canal de São Sebastião .

3- Dos 63 isolados de leveduras de amostras de água de mar na Baixada Santista somente 1 (1,6%) foi identificado como *Cryptococcus* spp. e dos 9 provenientes de amostras de areia 1 (11,1%) foi identificado como *Cryptococcus* spp.

4- Dos 46 isolados de leveduras de amostras de água do mar no Canal de São Sebastião somente 1 (2,2%) foi identificado como *Cryptococcus* spp. e dos 46 provenientes de amostras de areia 1 (2,2%) foi identificado como *Cryptococcus* spp.

5- Não foram encontradas leveduras do gênero *Cryptococcus* em amostras de água e de areia coletadas em Ubatuba.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAN, M.; MATHEWS, V.; GANESH, A.; JOHN, J.; MATHEWS, M. S. Infection caused by *Cryptococcus neoformans* var *gatti* serotype B in an AIDS patient in India. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35 p. 283-284, 1997.

AJELLO, L. Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. **Science**, v.123 p. 876-879, 1956.

AJELLO, L. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. **Am. J. Hyg.**, v. 67 p. 72-77, 1958.

ALLEN, V. K.; LOWBEER, L. Rectal ulcers with perirectal fistula as a port of entrance for torula encephalitis. **South Med. J.**, v. 38 p. 564-569, 1945.

ANDREU, C. F.; MACHIN, G. M.; BERNAL, L. P. A.; MORALES, R.; HERRERA, C. A. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* isolated in Havana city. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85 p. 245, 1990.

ANSHENG, L.; NISHIMURA, H.; TAGUCHI, H.; TANAKA, R.; SHAOXI, W.; MIYAJI, M. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. **Mycopathologia**, v. 124 p.1-5, 1993.

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.

BAKER, R. D. The primary pulmonary lymph node complex of cryptococcosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 65 p. 83-92, 1976.

BAVA, A. J.; NEGRONI, R.; BIANCHI, M. Cryptococcosis produced by a uréase negative strain of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31 p. 87-89, 1993.

BEYT, B. E.; WALTMAN, S. R. Cryptococcal endophthalmitis after corneal transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 298 p. 825-826, 1978.

BHAT, J.V.; KACHWALLA, N. Marine yeasts off the Indian coast. **Proc Ind Acad Sci B**, v. 41 p. 9–15, 1955..

BHAT, J.V.; KACHWALA, N.; MOODY; B.N. Marine yeasts off the Indian Coast. **J Sci Ind Res B**, v. 4 p. 9–15, 1955a.

BHAT; J.V.; KACHWALA, N.; MOODY, B.N. Some aspects of the nutrition of marine yeasts and their growth. **J Sci Ind Res C**, vol. 14, p. 24–27, 1955b.

CAMPOS, F. L.; PEREIRA, J. R.; SILVA, M. V.; SANTOS, B. C. P.; BARONI, F. A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* de sistema nervoso central de cães na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil* **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37 p. 371-375, 2009.

CANGELOSI, A. G.; FREITAG, N. E.; BUCKLEY, M. R. From outside to inside: Environmental Microorganisms as Human Pathogens. **Am. Soc. Microbiol.**, p. 16, 2004.

CANTEROS, C.; RIVAS, C.; RODERO, L.; DAVEL, G. Quantitative urease detection of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans*. In: 3rd International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, 1996, Paris. **Abstract** 1.5:150.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington: ASM Press, 1998 549 p.

CASTANON-OLIVARES, L. R.; LOPEZ-MARTINEZ, R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columbia livia*) droppings in México city. **Mycoses**, v. 37 p. 325-327, 1994.

CHEN, S. C.; WRIGHT, L. C.; SANTANGELO, R. T.; MULLER, M.; MORAN, V. R.; KUCHEL, P. W.; SORREL, T. C. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 65 p. 405-411, 1997.

CHERNIACK, R. L.; MORRIS, L. C.; BELAY, T.; SPITZER, E. D.; CASADEVALL, A. Variation in the structure of glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. **Infect. Immun.**, v. 63 p. 1899-1905, 1995.

Cichon, M. **A suscetibilidade a drogas antifúngicas de isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans*, procedentes da cidade de Curitiba e região metropolitana, Paraná-Brasil**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CLARCK, R. A.; GREER, D.; ATKINSON, W.; VALIANIS, G. T.; HYSLOP, N. Spectrum of *Cryptococcus neoformans* infection on 68 patients infected with human immunodeficiency virus. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12 p. 768-777, 1990.

CLUMECK, N.; SONNET, J.; Taelman, H.; MASCART-LEMONT, F.; DE BRUYERE, M.; VANDEPERRE, P.; DASNOY, J.; MARCELIS, L.; LAMY, M.; JONAS, C.; EYCKMANS, L.; NOEL, H.; VANHAEVERBEEK, M.; BUTZLER, J.-P. Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. **N. Engl. J. Med.**, v. 320 p. 492-497, 1984.

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

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis **Infect. Immun.**, v. 68 p. 443-448, 2000.

CROWE, S. M.; CARLIN, J. B.; STEWART, K. I.; LUCAS, C. R.; HOY, J. F. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. **J. Acquired Immune Defic. Syndr.**, v. 4 p. 770-776, 1991.

CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Estimation of the prevalence of criptococcal infection among HIV infected individuals in New York city. **Clin. Infect. Dis.**, v. 19 p. 1029-1033, 1994.

CURRIE, B. P.; FREUNDLICH, L. F.; CASADEVALL, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical isolates in New York City. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32 p. 1188-1192, 1994.

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

DE WYTT, C.; DIKSON, P. L.; HOLT, G. Cryptococcal meningitis. A review of 32 years experience. **J. Neurol. Sci.**, v. 53 p. 283-292, 1982.

DIAMOND, R. D.; BENNETT, J. E. Prognostic factors in cryptococcal meningitis. **Am. Intern. Med.**, v. 80 p.176-181, 1974.

DRIVER, J. A.; SAUNDERS, C. A.; HEINZE-LACEY, B.; SUGAR, A. M. Cryptococcal pneumonia in AIDS: is criptococcal meningitis preceded by clinically recognizable pneumonia. **J. Acquired Immune Defic. Syndr.**, v. 9 p. 168-171, 1995.

DROMER, F.; RONIN, O.; DUPONT, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* from na Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. **J. Med. Vet. Mycol.**, 30:395-397, 1992.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; LAPORTE, A. Epidemiology of criptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). **Clin. Infect. Dis.**, v. 23 p.82-90, 1996.

DRUTZ, D. J.; HUPPERT, M.; SUN, S. H.; MCGUIRE, W. L. Human sex hormones stimulate the growth and maturation of *Coccidioides immitis*. **Infect. Immun.**, v. 32 p. 2364-2371, 1981.

DUARTE, A.; ORDONEZ, N.; CASTANEDA, E. Association de leveduras Del genero *Cryptococcus* com espécies de *Eucalyptus* em Santa Fe de Bogota. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 36 p. 125-130, 1994.

DUPERVAL, R.; HERMANS, P. E.; BREWER, N. S.; ROBERTS, G. S. Cryptococcosis, with emphasis on the significance of isolation of *Cryptococcus neoformans* from respiratory tract. **Chest**, v. 72 p. 13-19, 1977.

EDWARDS, V. E.; SUTHERLAND, J. M.; TYRER, J. H. Cryptococcosis of the central nervous system. Epidemiological, clinical na terapeutic features. **J. Neurl. Neurosurg. Psychiatr.**, v. 33 p. 415-425, 1970.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERICKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62 p. 1151-1158, 1996.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Ecology, life cycle and infections propagule of *Cryptococcus neoformans*. **The Lancet**, v. 5 p. 336:923, 1990.

EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **J. Bacteriol.**, v. 62 p. 685-690, 1951.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columbia livia*). **Am. J. Hyg.**, v. 62 p. 227-252, 1955.

ENG, R. H. K.; BISHBURG, E.; SMITH, S. M.; KAPILA, R. Cryptococcal infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. **Am. J. Med.**, v. 81 p. 19-23, 1986.

FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Effect of serum IgG1 against murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **J. Immunol.**, v. 158 p. 790-799, 1997.

FELL, J.W. **Collection and identification of marine yeasts.** In *Methods in Microbiology*, Paul J (ed.). Academic Press: New York; p. 347–356, 2001.

FELL, J.W.; AHEARN, S.P.; MEYERS, S.P.; ROTH, F.J. J. R. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida, and adjacent benthic areas. **Limnol Oceanogr**, v. 5 p. 366–371, 1960.

FELL J.W.; VAN UDEN N. Yeasts in marine environments. In: **Symposium on Marine Microbiology**, Oppenheimer CH (ed.). Charles C. Thomas: Springfield, IL; 329–340, 1963.

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.

FILIÚ, W.F.; WANKE, B.; AGUENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.L.; LAZERÁ, M. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, n.6, 2002.

FISHER, D.; BURROW, D. LO.; CURRIE, L. *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia: predominantly variant *gatti* with good outcomes. **Aust. N.Z. J. Med.**, v. 23 p. 687-682, 1993.

FRIEDMAN, M.; BRENSKI, A.; TAYLOR, L. Treatment of aphthous ulcers in AIDS patients. **Laryngoscope**, v. 104 p. 566-570, 1994.

GARCÍA-RIVERA, J.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J.; CSADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) Is Involved in the Extracellular Trafficking of Capsular Glucuronoxylomannan. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 3 p. 385–392, 2004.

GENDEL, B. R.; ENDE, M.; NORMAN, S. L. Cryptococcosis. A review with special reference to apparent association with Hodgkin's disease. **Am. J. Med.**, v. 9 p. 343-355, 1950.

GOLDMAN, D.; LEE, S. C.; CASADEVALL, A. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat. **Infect. Immun.**, v. 62 p. 4755-4761, 1994.

GOLDMAN, D.; HNIN-KHINE, M.D.; ABADI, J.; LINDENBERG, D. J.; PIROFSKI, L. A.; NIANG, R.; CASADEVALL, A. Serologic Evidence for *Cryptococcus neoformans* Infection in Early Childhood. **Pediatrics**, v. 107 p. e66, 2001.

GLASER, J. B.; GARDEN, A. Inoculation of cryptococcosis without transmission of the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 313, p. 266, 1985.

GUGNAMI, H. C.; GUPTA, N. P.; SHRIVASTAV, J. B. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in Delhi Zoological park and its recovery from the sputum of an employee. **Indian J. Med. Res.**, v. 60 p. 182-185, 1972.

HAGLER, A.N.; MENDONCA-HAGLER, L.C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Appl Environ Microbiol.**, v. 41 p. 173–178, 1981.

HAUGEN, R. K.; BAKER, R. D. The pulmonary lesions in cryptococcosis with special reference to subpleural nodules. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 24 p. 1381-1390, 1954.

HUFFNAGLE, G. B.; YATES, J. L.; LIPSCOMB, M. F. Immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. **J. Exp. Med.**, v. 173 p. 793-800, 1991.

HUPPERT, M.; HARPER, G.; SUN, S. H.; DELANEROLLE, V. Rapid Methods for Identification of Yeasts. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 2 p. 21-34, 1975.

HSU, M. M.; CHANG, J.-C.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. **Mycopathol.**, v. 125 p. 77-81, 1994.

HUNTER, A.C. A pink yeast causing spoilage in oysters. **US Dept Agr Bull**, v. 819 p. 1-24, 1920.

HUNTER, P. R.; FRASER, C. A. M. Application of the theory of adaptative polymorphism to the ecology and epidemiology of pathogenic yeasts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56 p. 2219-2222, 1990.

IMWIDTHAYA, P. One year's experience with *Cryptococcus neoformans* in Thailand. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88 p. 208, 1994.

ISHAQ, C. M.; BULMER, G. S.; FELTON, F. G. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v. 35 p. 81-90, 1968.

JAIN, N.; WICKES, B. L.; KELLER, S. M.; FU, J.; CSADEVALL, A.; JAIN, P.; RAGAN, M. A.; BANERJEE, U.; FRIES, B. C. Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* Strains from India. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 43 p. 5733-5742, 2005.

KATLAMA, C.; LEPORT, C.; BRUN-VEZINET, F.; ROUZIOUX, C.; VITTECOQ, D.; LAMBOLEZ, T.; LEBRAS, P.; PETITPREZ, P.; OFFENDSTADT, G.; VACHON, F.; VILDE, J. L.; COULAUD, J. P.; SAIMONT, A. G. Acquired Immunodeficiency syndrome (AIDS) in Africans. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.**, v. 64 p. 379-389, 1984.

KOVACS, J. A.; KOVACS, A. A.; POLIS, M.; WRIGHT, W. C.; GILL, V. J.; TUAZON, C. U.; GELMAN, H.; LANE, H. C.; LONGFIELD, R.; OVERTURF, G.; MACHER, A. M.; FAUCI, A. S.; PARRILLO, J. E.; BENNETT, J. E.; MASUR, H. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Intern. Med.**, v. 103 p. 533-538, 1985.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SOUZA, 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 sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 47 n.(4), 2005.

KREGER-VAN RIJ, N. J. **The yeasts. A taxonomic study.** 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, 1984.

- KWONG-CHUNG, K. J. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans* and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*. **Zentralbl. Bakteriол.**, v. 275 p. 390-393, 1991.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W. Definition, classification and nomenclature of the yeasts, p. 3-5. In: Kurtzman, C.P. and Fell, J. W. (Eds). **The yeasts, A taxonomic study**, 4th ed. Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1998.
- KUTTY, S. N.; PHILIP, R. Marine Yeasts – a review. **Yeast**, v. 25, p. 465–483, 2008.
- LACAZ, C. S. **Tratado de Micologia Médica** 9º Ed. Sarvier p. 429, 2002.
- LAZERA, M.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.31 p.449-454, 1993.
- LAZERA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C.C.F.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34 p.127-131, 1996.
- LAZERA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var *gatti* – evidence for a natural habitat related to decaying Wood in a pottery tree hollow. **Med. Mycol.**, v. 36 p. 119 – 22, 1998.
- LEGGIADRO, R. J.; KLINE, M. W.; HUGHES, W. T. Extrapulmonary cryptococcosis in immunocompromised infants and children. **Pediatric. Infect. Dis. J.**, v. 11 p. 43-47, 1991.
- LEVITZ, S.M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of Cryptococcosis. **RID**. v. 13 p. 1163 – 69, 1991.
- LEWIS, J. L.; RABINOVICH, S. The wide spectrum of cryptococcal infections. **Am. J. Med.**, v. 53 p. 315-322, 1972.
- LI, A.; WU, S. An urease negative *Cryptococcus neoformans*. **Acta Microbiol. Sin.**, v. 32 p. 68-71, 1992.
- LITTMAN, M. L. Cryptococcosis: current status. **Am. J. Med.**, v. 45 p. 922-932, 1968.
- LITTMAN, M. L.; BOROK, R. Relation of the pigeon to criptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v. 35 p. 329-345, 1968.
- LITTMAN, M. L.; SCHNEIERSON, S. S. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York city. **Am. J. Hyg.**, v. 69 p. 49-59, 1959.

LODDER, J. & KREGER VAN RIJ, N. J. **The Yeasts. Taxonomic study.** North Holland, Amsterdam, 1970.

LOPEZ-MARTINEZ, R.; MANZANO-GAYOSSO, P.; MIER, T.; MENDEZ-TOVAR, L. J.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, V. 36 (1): 17-20, 1994

LOUREIRO, S.T.A.; DE QUEIROZ-CAVALCANTI, M.A.; NEVES, R.P.; PASSAVANTE, J.Z.O. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. **Braz J Microbiol.**, v. 36, p. 1–8, 2005.

MADIGAN, M.; MARTINGO, J.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms.** 8thed. p.776, 1997.

MARQUIS, G.; MONTPLAISIR, S.; PELLETIER, M.; MOUSSEAU, S.; AUGER, P. Genetic resistance to murine cryptococcosis: increased susceptibility in the CBA/N XID mutant strain of mice. **Infect. Immun.**, v. 47 p. 282-287, 1985.

MCDONOUGH, E.S.; AJELLO, L.; AUSHERMAN, R.J.; BALOWS, A.; MCCLELLAN, J. T.; BRINKMAN, S. Human pathogenic fungi recovered from soil in an area endemic for North American blastomycosis. **Am. J. Hyg.**, v. 73 p. 75-83, 1961.

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

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

MÜHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOON, A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, v. 40: 465-469, 1997.

OOI, B.; CHEN, B. T. M.; LIM, C. H.; KHOO, O. T.; CHAN, K. T. Survival of a patient transplanted with a kidney infected with *Cryptococcus neoformans*. **Transplantation**, v. 11 p. 428-429, 1971.

OSIEWACZ, H. D. **Interaction of Fungi with Differents Hosts, *Cryptococcus neoformans* as a Model Fungal Pathogen, Molecular Biology of Fungal Development**, p.513, 2002.

PAL, M. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* and munia birds. **Mycosis**, v. 32 p. 250 – 2, 1989.

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 – 11, 1988.

PASSONI, L.F.C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Rev. Iber. Micol.**, v. 16 p. 77 – 81, 1999.

PAULA CR, PURCHIO A, GAMBALE W. Yeasts from the beaches in the southern area of Sao Paulo state 'Baixada Santista', Brazil. **Rev. Microbiol.**, v. 14 p. 136–143, 1983.

PERFECT, J. R., MAGEE, B. B.; MAGEE P. T. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. **Infect. Immun.**, v. 57 p. 2624-2627, 1989.

PIOT, P., QUINN, T. C., TELMAN, H., FEINSOD, F. M., MINLANGUI, K. B., WOBIN, O., MBENDI, N., MAZEBO, P., NDANDI, K., STEVENS, W., KALAMBAYI, K., MITCHELL, S., BRIDTS, C.; MCCORMICK, J. B. Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. **Lancet**, v. ii p. 65-68, 1984.

POLACHECK, I. The discovery of melanin production in *C. neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 276 p. 120-123, 1991.

PITT JI, MILLER MW. The parasexual cycle in yeasts of the genus *Metschnikowia*. **Mycologia**, v. 62 p. 462–473, 1970.

POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, K.J. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. **J. Bacteriol.**, v. 142 p. 15-20, 1980.

POLACHECK, I.; LEBENS, G. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135 p. 65-71, 1989.

POWELL, K. E., DAHL, B. A., WEEKS, R. J. AND TOSH, F. E. Airbone *Cryptococcus neoformans*: particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition. **J. Infect. Dis.**, v. 125 p. 412-415, 1972.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20 : 7 – 20, 1982.

REOLON, A.; PEREZ, L.R.R.; MEZZARI, A. **Bras Patol Med Lab.**, v. 40 n. 5, 2004.

RESTREPO, A., SALAZAR, M. E., CANO, L. E., STOVER, E. P., FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 46 p. 346-353, 1984.

RIVERA, I.N.G., PAULA, C.R. E SOUZA, C. P. Microbiologia Aquática Marinha. In Melo, I.S e Azevedo, J.L. **Microbiologia Ambiental**. 2nd ed. p. 609, 2008.

RODRIGUEZ, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUCK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* contain Protein Components Associated with Virulence. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 7 p. 58-67, 2008.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 153 p. 265-272, 1997.

ROZENBAUM, R.; GONCALVES, A. J. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18 p. 369-380, 1994.

ROZENBAUM, R., GONCALVES, A. J., WANKE, B., CAIUBY, M. J., CLEMENTE H., LAZERA, M. D. S., MONTEIRO, P. C. F.; LONDERO, A. T. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 119 p. 133-136, 1992.

RUANE, P. J., WALKER, L. J.; GEORGE, W. L. Disseminated infection caused by urease-negative *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26 p. 2224-2226, 1988.

RUCHEL, M.F.; TEGELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.20: 233 – 44,1982.

RUIZ, A., VELEZ, D. E FROMTLING, R. A. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. **Mycopathologia**, v. 106 p. 167-170, 1989.

SALYER, W. R., SALYER, D. C.; BAKER, R. D. Primary complex of *Cryptococcus* and pulmonary lymph nodes. **J. Infect. Dis.**, v. 130 p. 74-77, 1974.

SALKOWSKI, C. A., BARTIZAL, K. F., BALISH, M. AND BALISH, E. Colonization and pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* in gnotobiotic mice. **Infect. Immun.**, v. 55 p. 2000-2005, 1987.

SPEED, B. E DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21 p. 28-34, 1995.

SOTGIU, G., MAZZONI, A., MANTOVANI, A., AJELLO, L. E PALMER, J. Survey of soils for human pathogenic fungi from the Emilia-Romagna region of Italy. II. Isolation of *Allescheria Boydii*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. **Am. J. Epidemiol.**, v. 88 p. 329-337, 1996.

STAIB, F. Vogelkot, ein Nahrs substrat fur die Gattung *Cryptococcus*. **Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. 1 Org. A.** v.186 p. 233-247, 1962

STAIB, F., GRAVE, B, ALTMAN, L., MISHRA, S. K., ABEL, T.; BLISSE, A. Epidemiology of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 65 p. 73-76, 1976.

SUEHIRO, S. Studies on the yeasts developing in the putrefied marine algae. **Sci Bull Fac Agric Kyushu Univ**, v. 17 p. 443–449, 1960.

SOARES, M.C.B.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.T.; CASEIRO, M.M E COSTA, S.O.P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 47 p. 31-36, 2005.

SWINNE–DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. **Sabouradia**, v. 13 p. 303 – 08, 1975.

SWINNE, D., KAYEMBE, K. E NIYIMI, M. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* ver *neoformans* in Kinshasa, Zaire. **Ann. Soc. Belg. Trop.**, v. 66 p. 57-61, 1986a.

SWINNE, D., NKURIKIYINFURA E MUYEMBE, T. L. Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Zaire **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v. 5 p. 50-51, 1986b.

SWINNE, D., DEPPNER, M., MANIRATUNGA, S., LAROCHE, R., FLOCH, J.-J. E KADENDE, P. AIDS-associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi: an apidemiological study. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29 p. 25-30, 1991.

TAKOS, M. J. Experimental cryptococcosis produced by the ingestion of virulent organisms. **N. Engl. J. Med.**, v. 254 p. 598-601, 1956.

VAN DE PERRE, P., LEPAGE, P., KESTELYN, P., HEKKER, A., ROUVROY, D., BOGAERTS, J., KAYIHIGI, J.; BUTZLER, J.-P. Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda. **Lancet**, v. ii p. 62-65, 1984.

VAN UDEN, N.; FELL, J.W. Marine yeasts. **Adv Microbiol Sea** v.1 p. 167–201, 1968.

VILLANUEVA, E., MENDONZA, M., TORRES, E., ALBORNOZ, M. B., CAVAZZA, M. E.; URBINA, G. Serotipificacion de 27 cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas em Venezuela. **Acta Cientifica Venezolana**, v. 40 p. 151-154, 1989.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Restriction fragment polymorphism in mitochondrial DNA of *Cryptococcus neoformans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135 p. 3353-3362, 1989.

VARTIVARIAN, S. E., ANAISSIE, E. J., COWART, E. E., SPRIGG, H. A., TINGLER, M. J.; JACOBSON, E. S. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **J. Infect. Dis.**, v. 167 p. 186-190, 1993.

VINCENT, V. L.; KLIG, L. S. Unusual effect of myo-inositol on phospholipid biosyntesis in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 141 p. 1829-1837, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect. Immun.**, v. 64 p. 3004-3007, 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60 p. 3864-3866, 1994b.

WANG, Y., AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect. Immun.**, v. 63 p. 3131-3136, 1995.

WANG, Y., AISEN, P.; CASADEVALL, A. Melanin, melanin ghosts and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 64 p. 2420-2424, 1996.

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **J. Bacteriol.**, v. 176 p. 656-664, 1994.

YAMASATO K, GOTO S, OHWADA K, *et al.* Yeasts from the Pacific Ocean. **J Gen Appl Microbiol.**, v. 20, p. 289–307, 1974.

ZUGER, A., LOUIE, E., HOLZMAN, R. S. SIMBERKOFF, M. S.; RAHAL, J. J. Cryptococcal disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome: diagnostic features and outcome of treatment. **Ann. Intern. Med.**, v. 104 p. 234-240, 1986.

ANEXO - Meios de Cultura

Meio Agar Sabouraud Dextrose - SDA

Agar SDA (Difco) – 65g
Água Destilada – 1000 mL
Autoclavar a 121 °C por 15 minutos
Acrescentar 0,1g de Cloranfenicol (Inlab)

Agar Fuba acrescido de Tween 80

Agar fubá + Tween 80
Tween 80 (Inlab) – 10 g
Fubá (Yoki) – 40 g
Ágar (Difco) – 20 g
Água destilada – 1000 mL

Em um balão colocar 500 mL de água destilada acrescida do fubá. Aquecer até engrossar. Filtrar (com gaze) até obter o mínimo de resíduo. Completar o volume com 500 mL de água destilada.

Em outro balão, fundir o Agar com 500 mL de água juntar o fubá filtrado e o Agar fundido, homogeneizar e colocar o tween 80.

Meio Uréia de Christensen

Solução Basal:

Peptona (Difco) – 1g
Glicose (Difco) – 1g
Cloreto de Sódio (Merck) – 5g
Fosfato Potássio Monobásico (Merck) – 2g
Vermelho de Fenol (Merck) – 0,012g
Agar Bacto (Difco) – 20g
Água Destilada – 1000 mL

Filtrado:

Uréia (Carlo Erba) – 2g
Água Destilada – 10 mL

Esterilizar em membrana de 0,22 µm de poro, 4,7 mm de diâmetro (Millipore) e distribuir 0,5 mL em cada tubo. A filtração foi feita usando-se bomba de vácuo.

Dissolver a peptona, o cloreto de sódio, o fosfato monobásico e o vermelho de fenol em 1000 mL de água destilada e ajustar o pH para 6,8.

Posteriormente adicionar o Agar e aquecer até dissolver completamente.

Com o Agar já dissolvido acrescentar a glicose.

Distribuir 4,5 mL em cada tubo e autoclavar a 115 °C por 15 minutos.

Colocar os tubos em banho Maria a 65 °C e distribuir a Uréia filtrada (0,5 mL em cada tubo). Tomar cuidado para não colocar a uréia no meio basal muito quente, pois pode desnaturar.

Meio contendo Nitrogênio

Sulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,0g

Fosfato de Potássio Monobásico KH_2PO_4 – 1,0g

Sulfato de Magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5g

Ágar Bacto – 20g

Água Destilada – 1000 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

Meio contendo Carbono

Dextrose – 20g

Fosfato de Potássio Monobásico KH_2PO_4 – 1,0g

Sulfato de Magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5g

Ágar – 20g

Água Destilada – 1000 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C

Meio Basal para Zimograma

Extrato de Levedura (Difco) – 0,25g

Peptona (Difco) – 0,25g

Água Destilada – 100 mL

Açúcares (Merck) a 2% (Glicose, Lactose, Maltose, Rafinose, Sacarose e Trealose)

Meio contendo Dopamina

Solução Basal:

Fosfato Potássio Monobásico (Merck) 0,4g

Sulfato de Magnésio (Merck) – 0,25g

Tiamina (Sigma) – 1mg

Glicose (Difco)– 0,5g

Agar Bacto (Difco) – 2,5g

Água Destilada – 80 mL

Acertar o pH para 5,5 com K_2HPO_4 1M

Autoclavar a 121°C por 15 minutos

Filtrado:

Dopa – 0,004g

Asparagina (Sigma)– 0,1g

L. Glutamina (Sigma) – 0,1g

Glicina (Sigma) – 0,1g

Água Destilada – 20 mL

Misturar à solução base resfriada (+ou- 55 °C)

Lipase

Meio para detecção da atividade lipolítica

Solução A:

Peptona (Difco) 10g

NaCl (Merck) 5g

CaCl₂ (Merck) 0,1g

Solução B:

Tween 20 (Research Fine Chemical-Becto)

A solução A deve ser ajustada para o pH de 5,5. As soluções A e B devem ser autoclavadas por 15 minutos a 120 °C, misturadas e distribuídas assepticamente em placas de Petri.

DNases

DNase Test Agar (Difco) 42g

Quemacetina (Inlab) 0,1g

Cicloheximida (Sigma) 0,5g

Água destilada 1000 mL

O meio deve ser autoclavado por 15 minutos a 120 °C e distribuído assepticamente em placas de Petri.

Proteinase

Meio Agar-proteinase

Meio A (meio básico)

Ágar (Difco) 18,0g

Água destilada 900 mL

O meio foi esterilizado por autoclavação a 121 °C por 15 minutos.

Meio B (meio albumina para pesquisa de proteinase):

Yeast carbon base (Difco) 11,7g

Albumina bovina fração V (Sigma) 2,0g

Protovit (Roche) 2,5g

Água destilada 100 mL

O meio B foi esterilizado por filtração (filtro 0,22µm – Millipore) e, após resfriado à 55/56 °C, misturado com o meio A e distribuído em placas de Petri estéreis, em volume de 20 mL.

Fosfolipase

Meio de emulsão de ovo:

Gema de ovo 80g

Solução fisiológica (ADV) 80 mL

Os ovos foram colocados em álcool iodado 70% durante uma hora. Em seguida as gemas foram separadas e colocadas em recipiente previamente esterilizado. Foi adicionado volume de solução fisiológica estéril correspondente ao peso das gemas, sendo a solução agitada vigorosamente.

Meio Agar-fosfolipase:

Peptona (Difco) 10g

Glicose (Difco) 20g

Cloreto de sódio (Reagen) 57,3g

Cloreto de cálcio (Reagen) 0,55g

Ágar (Difco) 20g

Água destilada 1000 mL

O meio foi esterilizado por autoclavação (121 °C/por 15minutos), resfriado a 55 °C/56 °C e a emulsão de ovo foi adicionada ao mesmo. Em seguida a mistura foi distribuída em placas de Petri estéreis com volume de 20 mL.