
ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* E *C. laurentii* PRODUTORES DE PROTEASE E FOSFOLIPASE

Felipe Lopes Campos ¹ e Francisco De Assis Baroni ²

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica com caráter oportunista, que pode acometer homens e diferentes espécies animais, principalmente em casos de imunodepressão. A levedura penetra pela via respiratória, pode disseminar-se por via hematôgena e atingir o sistema nervoso central. Objetivando o isolamento da levedura *Cryptococcus neoformans* a partir de sistema nervoso central de cães na cidade do Rio de Janeiro, procederam-se coletas de amostras de cérebro no Laboratório de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman, no bairro da Mangueira, Rio de Janeiro. As etapas de isolamento, identificação e avaliação da produção de protease e fosfolipase ocorreram no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LPA-UFRRJ). Para a avaliação de protease, utilizou-se meio de cultura contendo albumina bovina e para avaliação da produção de fosfolipase, o meio utilizado compunha-se de gema de ovo e CaCl₂. Foram utilizadas 166 amostras de sistema nervoso central, com quatro isolamentos positivos para o gênero, sendo um de *Cryptococcus laurentii*, dois de *Cryptococcus neoformans* e um de *Cryptococcus gattii*, todos produtores de protease e fosfolipase.

DESCRITORES: Fosfolipase. Protease. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. *Cryptococcus laurentii*.

INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica e oportunista que pode acometer homens e diferentes espécies animais, principalmente em casos de imunodepressão. A levedura *Cryptococcus neoformans* é um basiomiceto encontrado em todo o

1 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, Paraná, Brasil.

2 Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

Endereço para correspondência: campos.79@gmail.com

Recebido para publicação em 28/8/2009. Revisto em: 13/1/2010. Aceito em: 21/4/2010.

mundo, em diversos tipos de solo e em tecidos, secreções e excreções de animais e no próprio homem (2, 8, 11, 17).

A infecção é adquirida por meio da inalação de esporos e leveduras e, por via hematogena (4, 13, 14, 20), pode atingir o sistema nervoso central (SNC) (14, 15, 20, 26). Os sinais neurológicos estarão presentes de acordo com o envolvimento das meninges ou aumento da pressão intracraniana (23).

Em cães, o sistema nervoso é o mais afetado, com sinais neurológicos variáveis de acordo com a localização das lesões que podem ocorrer nas meninges, no encéfalo, na medula ou nos nervos periféricos (21). Os sinais clínicos mais comuns são ataxia, depressão, paresia, convulsão, andar em círculo, perda de olfato e cegueira. Netto et al. (2005) encontraram, em um cão com criptococose, massa na região frontal, com comprometimento do olho esquerdo, secreção purulenta e hiperemia conjuntival, além de obstrução da cavidade nasal, dispneia e sinais de desidratação.

Diversos fatores estão implicados na patogenia da levedura, dentre os quais encontram-se termotolerância a 37°C, síntese de melanina, presença de cápsula e produção de exoenzimas (12, 24). O componente polissacáride capsular atua inibindo a fagocitose; consome fatores do complemento; absorve e neutraliza opsoninas, anticorpos protetores e promove ainda a inibição da quimiotaxia de neutrófilos. O tamanho da cápsula e a habilidade de crescimento a 37°C parecem ter relação direta com a produção de fosfolipase e promovem maior atividade enzimática. A fosfolipase produzida é considerada um fator de virulência já que pode digerir membranas celulares e promover lise celular (25), além de destruir substância surfactante nos pulmões, facilitando, com isso, a adesão da levedura (12, 29).

As proteinases degradam tecidos do hospedeiro e destroem proteínas imunologicamente importantes. O *Cryptococcus neoformans* tem baixa atividade proteolítica, mas estas enzimas podem digerir imunoglobulinas e parte do sistema complemento no local da infecção (5).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de protease e fosfolipase de quatro cepas de *Cryptococcus* isoladas de sistema nervoso de cães da cidade do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

A primeira parte do projeto foi desenvolvida no Laboratório de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IMJV), que recebe, periodicamente, fragmentos de sistema nervoso central de animais domésticos e silvestres. As amostras coletadas para o desenvolvimento desta pesquisa eram provenientes de cérebro de cães. As etapas de isolamento, identificação e produção de protease e fosfolipase do *Cryptococcus* foram realizadas no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ (LLPA-UFRRJ).

Obtivemos do IMJV 166 amostras de cérebro de cães (76 machos e 90 fêmeas) de ambos os sexos, com idades entre dois meses e doze anos. Antes do isolamento, o material triturado foi assepticamente colocado no interior de frascos de Erlenmeyer com salina estéril (200mL/frasco) acrescida de cloranfenicol (100mg/L) e submetido a agitação magnética por dez minutos e sedimentação por uma hora (1). O sobrenadante foi aspirado e 0,1 mL inoculado em triplicata, utilizando-se placa de Petri com meio Sabouraud dextrose 4% (DIFCO Laboratories®, Detroit, EUA) e duas placas de Petri contendo meio com dopamina (6, 19, 27). Ambos os meios de isolamento foram acrescidos de cloranfenicol.

As colônias suspeitas de *Cryptococcus* (lisas, úmidas, brilhantes e de coloração marrom-escuro) foram novamente submetidas à prova de produção de fenoloxidase em meio com dopamina. Em seguida, foram realizados os testes de produção de urease em meio Christensen, de assimilação de açúcares (fontes carbonadas) e fontes nitrogenadas (auxanograma) e, finalmente, de fermentação negativa de açúcares (zimograma). O controle dos inoculados foi obtido com cepas de *Cryptococcus neoformans* (ICB 163) e *Cryptococcus gattii* (ICB 162) pertencentes ao acervo micológico do LLPA-UFRRJ.

Antes de serem submetidas aos testes, todas as cepas e os controles positivos foram repicados em meio Sabouraud dextrose a 4% e mantidos por 48 horas para a obtenção de cultura jovem. A atividade enzimática (Pz), tanto para protease quanto para fosfolipase, foi estimada pelo cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e pela zona de degradação (dcp), $Pz = dc/dcp$. Foi considerada negativa quando o $Pz = 1$, positiva com $Pz \geq 0,64 < 1,0$ e fortemente positiva com valores de $Pz < 0,64$; tais classificações receberam, respectivamente, os códigos 1, 2 e 3 (Price et al., 1982).

Produção de protease (Segundo Ruchel et al., 1982)

A produção de protease se deu em meio de cultura contendo uma parte básica e outra com albumina bovina. Os testes foram realizados em duplicata e a inoculação foi feita em um único ponto na parte central de cada placa de Petri. O controle positivo do teste foi feito com uma cepa de *Candida albicans* (ICB USP 12 A), conhecida produtora de protease. Todas as cepas foram incubadas a 32°C com leituras em dias alternados até o 15º dia.

A produção de protease se torna perceptível pela formação de um halo ao redor da colônia formada após a proteólise.

Produção de Fosfolipase (Segundo Price et al., 1982)

Para este teste foi utilizado um meio composto por gema de ovo e $CaCl_2$. Os testes foram realizados em duplicata com inoculação puntiforme na superfície do meio de cultura, na região central da placa de Petri. A incubação se deu em estufa a 32°C e as leituras ocorreram em dias alternados até o 15º dia.

As cepas produtoras de fosfolipase produzem um halo de precipitação ao redor da colônia, com aspecto densamente opaco, formado em consequência da deposição de cloreto de cálcio.

RESULTADOS

Todas as cepas utilizadas apresentaram a produção de protease e fosfolipase, diferindo apenas nos valores do Pz. Das quatro amostras, apenas a de *Cryptococcus gattii* foi considerada positiva para ambas as enzimas e as demais, fortemente positivas (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado do teste de produção de protease e fosfolipase

Cepas	Protease	Fosfolipase	Classificação
	Pz	Pz	
Cepa 1 - <i>Cryptococcus neoformans</i>	0,36	0,40	3
Cepa 2 - <i>Cryptococcus neoformans</i>	0,40	0,53	3
Cepa 3 - <i>Cryptococcus laurentii</i>	0,28	0,50	3
Cepa 4 - <i>Cryptococcus gattii</i>	0,66	0,70	2

3 = fortemente positivo; 2 = positivo; 1 = negativo

DISCUSSÃO

Dos quatro isolamentos obtidos, observou-se que o perfil de produção de protease classificou as cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii* como fortemente positivas e as de *Cryptococcus gattii* como positivas. A maior parte das cepas originadas de excretas de aves não são produtoras de protease e expressam este potencial após inoculação *in vivo* (10). Em nosso trabalho, as cepas de origem clínica colonizaram substrato, o que, provavelmente, induziu a levedura na expressão desta característica. Cepas de *Cryptococcus neoformans* produziram protease capaz de digerir plasma humano, evidenciando o potencial proteolítico da levedura e possibilitando a maior expressão do grau de virulência, o que facilitou sua colonização tecidual no hospedeiro (1).

O isolado de *Cryptococcus laurentii* apresentou produção de protease e fosfolipase, consideradas em ambos os testes como fortemente positivas. Na literatura, há poucos relatos da ocorrência desta espécie de *Cryptococcus* em tecidos animais. A produção de exoenzimas pode representar a possibilidade de colonizar diferentes regiões do organismo animal. Em Lisboa, esta espécie foi encontrada em casos de otite em cães (3) e seu isolamento também foi observado a partir da plumagem de ave da espécie *Lamprotornis chalybaeus* (7).

O isolado de *Cryptococcus gattii* apresentou-se como produtor de ambas as enzimas, expressando, em grau menor ao das outras cepas avaliadas, sua potencial virulência.

Na espécie humana, um estudo que envolveu 151 cepas de *Cryptococcus neoformans* originárias de pacientes com AIDS detectou a produção de fosfolipase e protease em todos os isolados. Em nosso estudo, a espécie estudada foi a canina, que possui estruturas tissulares semelhantes à espécie humana. Neste caso, a produção de exoenzimas também foi observada, o que constitui fator importante para a patogenicidade proporcionada pela levedura (31), principalmente em pacientes humanos (8, 9, 20, 30) ou animais imunossuprimidos (1, 23, 28). Em animais, diversos fatores podem ser associados à cryptococose, como debilidade, desnutrição, uso prolongado de corticosteróides e infecções virais como cinomose, imunodeficiência e leucemia felinas (23). Em cães, a criptococose é mais rara quando se compara sua ocorrência em felinos (16) e a imunossupressão promove maior susceptibilidade nessa espécie.

CONCLUSÕES

A atividade enzimática dos quatro isolados de *Cryptococcus* verificada em nosso trabalho não nos possibilita uma discussão estatística, mas podemos afirmar que o maior potencial de virulência manifestado nos diferentes mecanismos utilizados pelo microrganismo, associado a possíveis quadros de imunossupressão, aumenta a possibilidade de penetração e infecção dos diferentes tecidos do hospedeiro.

ABSTRACT

Protease and phospholipase production of *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* and *C. laurentii* isolates

Cryptococcosis is an opportunistic systemic mycosis, which may affect humans and various animal species, especially in cases of immunosuppression. The infection may be acquired through inhalation and by hematogenous route; the yeast has the ability to reach and colonize the central nervous system. The aim of this survey was the isolation of the *Cryptococcus neoformans* yeast from central nervous system of dogs in Rio de Janeiro city. Periodic collections were made from brain samples at the Rabies Diagnosis Laboratory in Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman in Mangueira, Rio de Janeiro. The isolation, the identification of this yeast and the evaluation of protease and phospholipase production were performed at the Laboratory of Environmental and Pathogenic Yeasts of the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A medium containing bovine serum albumin was used to evaluate protease production and to evaluate the production of phospholipase. The medium used consisted of egg yolk and CaCl_2 . According to the results obtained of the 166 clinical samples from dogs, we found four positive samples; one of these was positive for *Cryptococcus laurentii*, two were positive for *Cryptococcus*

neoformans; and one for *Cryptococcus gattii*; all of them produced protease and phospholipase.

KEY WORDS: Phospholipase. Protease. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. *Cryptococcus laurentii*.

REFERÊNCIAS

1. Baroni FA. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizados em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro: fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. [Tese de Doutorado em Microbiologia – ICB/USP], 2001.
2. Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, Gambale W. *Cryptococcus neoformans* isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 78: 71-75, 2006.
3. Bernardo FM, Martins HM, Martins ML. A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisbon. *Rev Ibero Micol* 15: 163-165, 1998.
4. Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis* 4: 71-83, 1998.
5. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, 1998.
6. Chaskes S, Tyndall RL. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para and ortho-diphenols effect of the nitrogen source. *J Clin Microbiol* 1: 509-514, 1975.
7. Decostere A, Hermans K, De Baer T, Pasmans F, Haesebrouck F. First report on *Cryptococcus laurentii* associated with feather loss in a glossy starling (*Lamprotornis chalybaeus*). *Avian Pat* 32: 309-311, 2003.
8. Fernandes OFL, Silva MRB, Ribeiro EL, Costa MR, Costa TR, Silva MV, Rodrigues AB, Quirino HM. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolamentos em pacientes com aids no estado de Goiás. *Rev Patol Trop* 28: 49-55, 1999.
9. Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 75-78, 2000.
10. Da Silva G, Baroni FA, Viani FC, Ruiz LS, Gandra RF, Auler ME, Gambale W, Paula CR. Virulence profile of strains of *Cryptococcus neoformans* var. *grubbi* evaluated by experimental infection in Balb/c mice and correlation with a exoenzyme activity. *J Med Microbiol* 55: 139-142, 2006.
11. Grecco FB, Moreno G. Cryptococose felina- relato de um caso em Cuiabá – Mato Grosso. In: *Resumo do XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária - ENAPAVE*. (Botucatu, Brasil), 2003. p.124.
12. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Bioch Polonica* 56: 211-224, 2009.
13. Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JA, Bartlenti KH. Characterization of Environmental Sources of the Human and Animal Pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl env microbiol* 73: 1433-1443, 2007.
14. Lazera MS, Igreja RP, Wanke B. Criptococose. In: Sidrim JJC & Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 2004.
15. Lavelly J, Lipsitz D. Fungal infections of the central nervous system in the dog and the cat. *Clinic Tech Small Anim Pract* 20: 212-219, 2005.
16. Marcasso RA, Sierra S, Arias BMV, Bracarense APRFL, Vamamura AAM, Biasi F, Lopes BA, Amude AM, Cortêz DEA. Criptococose no sistema nervoso de cães - relato de três casos. *Semina: Ciências Agrárias* 26: 229-238, 2005.

17. Martins DB, Barbosa ALT, Cavalheiro A, Lopes STA, Santurioiv JM, Schossler JE, Mazzan A. Diagnóstico de criptococose canina pela citologia aspirativa por agulha fina. *Ciência Rural* 38: 826-829, 2008.
18. Netto TR, Repetti CFS, Reimberg T. Relato de caso – criptococose canina. *Arq Bras Vet Zôo* 57: 24, 2005.
19. Nuruden TA, Ahearn DG. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 10: 724-729, 1979.
20. Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 45: 299-305, 2003.
21. Pereira ACC, Coutinho SDA. 2003. Criptococose em cães e gatos – uma revisão. *Clin Vet* 45: 24-32, 2003.
22. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection os phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-17, 1982.
23. Queiroz JPAF, Souza DN, Lage RA, Santos AG. Criptococose – uma revisão. *Acta Vet Bras* 2: 32-38, 2008.
24. Ruchel R, Tegeler R, Trost MA. Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 233-244, 1982.
25. Santagelo RT, Nouri-Sorhabi MH, Sorrell TC, Cagney M, Chen SC, Kuchel PW, Wright LC. Biochemical and functional characterization of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *J Med Microbiol* 48: 731-740, 1999.
26. Silva EG, Baroni FA, Viani FC, Ruiz LS, Gandra RF, Auler ME, Dias ALT, Gambale W, Paula CR. Virulence profile of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* evaluated by experimental infection in Balb/c mice and correlation with exoenzyme activity. *J Med Microbiol* 55: 139-142, 2006.
27. Staib F. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.) (Farbereaktion für *C. neoformans*). *Zeit Hyg* 148: 466-475, 1962.
28. Tiches D, Vite CH, Dayrell-Hart B, Steinberg SA, Gross S, Lexa F. A case of canine central nervous system cryptococcosis: management with fluconazole. *J Am Anim Hosp Ass* 34: 145-151, 1998.
29. Vidotto V, Sinicco A, Di Faria D, Cardaropoli S, Aok S, Ito-Kuwa S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 136: 119-123, 1996.
30. Vidotto V, Leone R, Sinicco A, Ito-Kwuia S, Criseo G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bord droppings. *Mycopathologia* 142: 71-76, 1998.
31. Vidotto V, Melhen M, Pukinskas S, Aoki S, Carraral C, Pugliesel A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. *Rev Iber Micol* 22: 29-33, 2005.

PRÓXIMOS EVENTOS NA ÁREA DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

MEETINGS TO BE HELD ON THE AREA OF TROPICAL PATHOLOGY AND PUBLIC HEALTH

O ensino da parasitologia, Encontro Regional Rio de Janeiro da Sociedade Brasileira de Parasitologia, UNIRIO, Rio de Janeiro, 21 de junho de 2010. Informações: www.funrio.org.br

XIII Simpósio Internacional de terapêutica em hepatite viral, Salvador, BA, 14 a 17 de julho de 2010. Informações: www.hepatologiadomilenio.com.br

62ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), Natal, RN, 25 a 30 de julho de 2010. Informações: www.sbpnet.org.br/natal

International Congress for Parasitology (ICOPA), Melbourne, Austrália, 15 to 20 august 2010. Information: www.icopaxii.org

Entomol4, Recife, PE, 13 de setembro de 2010. Informações: www.cpqam.fiocruz.br/entomol4.

Neglected Protozoan diseases. Institut Pasteur, Paris, France, 24th september 2010. Information: www.pasteur.fr/eu-conference-nepodi

XXIV Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de Protozoología, Ascochinga, Córdoba, Argentina, 4 al 6 de octubre de 2010. Informaciones: secretaria-sap@protozoologia.org.ar

12th International Symposium on Schistosomiasis, Rio de Janeiro, RJ, 5 a 8 de outubro de 2010. Information: opieri@ioc.fiocruz.br

XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia e XXXVI Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em doença de Chagas, Foz do Iguaçu, PR, 25 a 27 de outubro de 2010.

26ª Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e 14ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Uberaba, MG, 26 a 29 de outubro de 2010. Informações em: www.chagasleish2010.ioc.fiocruz.br

10th International Symposium Yersinia 2010, Recife, PE, 23 to 28th October 2010. Information: www.factos.com.br/yersinia2010.

59th Annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Atlanta, Georgia, USA, 3rd to 7th November, 2010. Information: www.astmh.org/meetings

XVIII International Congress for Tropical Medicine and malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, Rio de Janeiro, September 2012.