

Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura

Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media

Reginaldo dos Santos Pedroso¹, Karen Regina Carim da Costa¹,
Joseane Cristina Ferreira¹ e Regina Celia Candido¹

RESUMO

A capacidade de *Cryptococcus spp* produzir melanina em meios contendo compostos fenólicos é amplamente utilizada na identificação destas espécies no laboratório. O objetivo do presente trabalho foi comparar a produção desse pigmento em quatro meios de cultura por *Cryptococcus sp*. Foram testadas 16 cepas de *Cryptococcus neoformans*, 17 de *Cryptococcus albidus*, 13 de *Cryptococcus laurentii*, e 2 de *Cryptococcus uniguttulatus* nos meios: ágar batata e cenoura, ágar alpiste, ágar semente de girassol e ágar L-dopa. A produção de melanina foi avaliada com base na pigmentação das colônias, e demonstrada em 5 dias de incubação por 93,8% das cepas de *Cryptococcus neoformans* nos meios ágar batata e cenoura, ágar semente de girassol e ágar L-dopa. Dos isolados de *Cryptococcus albidus*, 29,4% produziram o pigmento em ágar batata e cenoura e L-dopa, 11,8% em ágar alpiste, e 36% em ágar girassol. De *Cryptococcus laurentii*, 53,8% produziram em batata e cenoura e em semente de girassol, 61,5% em L-dopa, 84,6% em ágar alpiste. Somente uma cepa de *Cryptococcus uniguttulatus* produziu fracamente o pigmento em ágar batata e cenoura.

Palavras-chaves: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus laurentii*. *Cryptococcus albidus*. Melanina.

ABSTRACT

The capacity of *Cryptococcus spp* to produce melanin in media containing phenol compounds is widely used for identifying these species in the laboratory. The aim of the present study was to compare the production of this pigment by *Cryptococcus spp*. in four culture media. Sixteen strains of *Cryptococcus neoformans*, 17 of *Cryptococcus albidus*, 13 of *Cryptococcus laurentii* and two of *Cryptococcus uniguttulatus* were tested in the following media: potato-carrot agar, Niger seed agar, sunflower seed agar and L-dopa agar. The melanin production was evaluated on the basis of colony pigmentation. Its production after five days of incubation was demonstrated by 93.8% of the strains of *Cryptococcus neoformans* in the media of potato-carrot agar, sunflower seed agar and L-dopa agar. From the isolates of *Cryptococcus albidus*, 29.4% produced the pigment in potato-carrot agar and L-dopa agar, 11.8% in Niger seed agar and 36% in sunflower seed agar. From *Cryptococcus laurentii*, 53.8% produced the pigment in potato-carrot agar and sunflower seed agar, 61.5% in L-dopa agar and 84.6% in Niger seed agar. Only one strain of *Cryptococcus uniguttulatus* presented slight production of the pigment, in potato-carrot agar.

Key-words: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus laurentii*. *Cryptococcus albidus*. Melanin.

Cryptococcus neoformans é uma levedura capsulada, frequentemente envolvida em processos infecciosos pulmonares e do sistema nervoso central, como agente de meningite e meningoencefalite, principalmente em indivíduos imunocomprometidos¹⁴. Até pouco tempo, eram consideradas duas variedades, var. *neoformans* (compreendendo os sorotipos A e D) e var. *gattii* (sorotipos B e C). Atualmente, são duas espécies distintas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

A primeira, compreende os sorotipos A (var. *grubii*), D (var. *neoformans*) e AD, e a segunda, os sorotipos B e C^{3,9,10}.

As infecções causadas por *Cryptococcus neoformans* ocorrem com maior frequência em indivíduos com deficiência no sistema imunológico, enquanto que as por *Cryptococcus gattii* são observadas principalmente em indivíduos imunocompetentes¹⁴. Na literatura, também estão descritos casos de meningite, afecções pulmonares, abscessos e dermatomicoses causados por

1. Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Endereço para correspondência: Prof^ª Regina Celia Candido. Via do Café s/n, Bairro Monte Alegre, 14040-903 Ribeirão Preto, SP.

Tel: 55 16 3602-4251; Fax: 55 16 3602-4725

e-mail: rcandido@fcrfp.usp.br

Recebido para publicação em: 15/03/2007

Aceito em: 17/08/2007

outras espécies de *Cryptococcus*, como *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus uniguttulatus*^{7,15}. De acordo com Khawcharoenpom e cols⁸, *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii* juntos são responsáveis por 80% dos casos de criptococose causada por *Cryptococcus* não-*neoformans* e não-*gattii*.

A melanina é um importante fator de virulência para essas espécies, colaborando para a proteção do fungo contra danos oxidativos causados por fagócitos e radiações ionizantes, e ainda, pode proteger o patógeno contra a ação de agentes antifúngicos^{6,9,12,14,19}. A enzima fenol-oxidase pode ainda, atuar em diferentes substratos, como as catecolaminas que estão presentes no cérebro de mamíferos, além da adrenalina produzida pela supra-renal^{19,14}.

A produção de melanina é uma característica amplamente utilizada para a identificação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em laboratório. Este pigmento é revelado pela cor escura (marrom a preto) das colônias, quando o fungo cresce em meios que contêm compostos fenólicos ou difenólicos na sua composição, como ágar semente de girassol (*Helianthus annuus*), ágar alpiste (*Guizotia abyssinica*), ágar batata e cenoura, e meios quimicamente definidos, como ágar L-dopa e ágar ácido caféico. Alguns estudos recentes têm mostrado a produção do pigmento em agar semente de mostarda e em ágar pimenta malagueta^{4,11,15,18}.

A enzima fenol-oxidase ou lacase presente na levedura atua sobre esses substratos, gerando quinonas como produtos, que sofrem um processo de autopolimerização, transformando-se em melanina. Esta fica retida na parede celular do fungo, sendo responsável pela expressão do pigmento escuro mostrado pelas colônias¹. Outras espécies de *Cryptococcus* podem apresentar produção de melanina nesses meios, porém, de forma menos pronunciada que *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*⁵.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de melanina por diferentes espécies de *Cryptococcus* nos meios de cultura: ágar batata e cenoura, ágar alpiste, ágar semente de girassol e ágar L-dopa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste estudo 16 amostras de *Cryptococcus neoformans*, 17 de *Cryptococcus albidus*, 13 de *Cryptococcus laurentii* e 2 de *Cryptococcus uniguttulatus* mantidas na micoteca do laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os meios de cultura utilizados foram: ágar batata e cenoura, ágar alpiste, ágar semente de girassol e ágar L-dopa, contidos em placas de Petri.

A partir de culturas recentes dos microrganismos (incubadas a 30°C, por 72 horas, em ágar Sabouraud dextrose), foram preparadas suspensões em solução fisiológica, com turvação equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland, e semeadas quatro estrias radiais sobre a superfície dos meios de cultura, em duplicata. As placas foram incubadas a 30°C e observadas

diariamente até o décimo dia. A produção de melanina foi evidenciada pela coloração das colônias, sendo que as cepas com iguais intensidades de pigmentação foram agrupadas e classificadas conforme as cores apresentadas: ocre, amarelo-ouro, marrom claro, marrom e preto. A cepa *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 foi utilizada como controle positivo, e a cepa de *Candida albicans* ATCC 64548, como controle negativo para a produção de melanina.

RESULTADOS

Das 48 cepas avaliadas, 46,2% apresentaram melanina simultaneamente nos quatro meios estudados. A Tabela 1 mostra a produção do pigmento nos quatro diferentes meios.

Tabela 1 - Produção de melanina por *Cryptococcus* spp, nos meios L-dopa, batata e cenoura, alpiste e girassol.

Levedura (n°)	Meio	Produção de melanina	
		n°	%
<i>Cryptococcus neoformans</i> (16)	L-dopa	15	93,8
	batata e cenoura	15	93,8
	alpiste	14	87,5
	girassol	15	93,8
<i>Cryptococcus albidus</i> (17)	L-dopa	5	29,4
	batata e cenoura	5	29,4
	alpiste	2	11,8
	girassol	6	36,0
<i>Cryptococcus laurentii</i> (13)	L-dopa	8	61,5
	batata e cenoura	7	53,8
	alpiste	11	84,6
	girassol	7	53,8
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> (2)	L-dopa	0	0,0
	batata e cenoura	1	50,0
	alpiste	0	0,0
	girassol	0	0,0

Em 50% das cepas de *Cryptococcus neoformans*, a coloração escura das colônias foi observada em 24 horas de incubação, e todas apresentaram pigmentação evidente em 5 dias. Para *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii*, o pigmento só foi definido após 8 dias de incubação, sendo que os meios ágar batata e cenoura, ágar semente de girassol e ágar L-dopa foram os que melhor evidenciaram a coloração, mesmo que bem menos intensa que a ocorrida com *Cryptococcus neoformans*, numa tonalidade ocre a marrom claro, dependendo do meio considerado. Uma das cepas de *Cryptococcus uniguttulatus* mostrou cor ocre em ágar batata e cenoura.

DISCUSSÃO

A produção de melanina por isolados de *Cryptococcus neoformans* é bastante utilizada para identificação desta levedura nos laboratórios clínicos. Meios como ágar alpiste e semente de

girassol apresentam ácido caféico, além de outros constituintes desconhecidos, que servem de substrato para *Cryptococcus neoformans* na síntese de melanina^{2,16,17}.

Os meios L-dopa e semente de girassol foram os mais eficientes e demonstraram a pigmentação escura das colônias em menor período de tempo (24-72 horas). O ágar batata e cenoura apresentou mudança de tonalidade das colônias somente após 3 dias de incubação. Já o ágar alpiste apresentou pigmentação da colônia por volta do 8º dia, e apresentou maior dificuldade de interpretação, devido à discreta tonalidade ocre das colônias. Por outro lado, este meio produziu colônias intensamente mucóides. Hernández e cols⁴ estudaram a melanização de 86 cepas de *Cryptococcus neoformans* em ágar semente de girassol, encontrando 54,7% delas produzindo intenso pigmento, 37,2% um pigmento moderado, 5,8% fracamente pigmentada e 2 (2,3%) cepas não mostraram pigmentos melanóides, exibindo, no entanto uma coloração esverdeada das colônias. Segundo os autores, tal fato está relacionado à forte capacidade de assimilação de creatinina por essas cepas, promovendo a alcalinização do meio. Este fenômeno não foi observado em nosso estudo, visto que esta substância não fazia parte da composição do meio utilizado.

Em relação às outras espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus*, observou-se fraca produção de melanina por algumas delas, e em todas as ocasiões este pigmento foi observado após 8 dias de incubação. Ikeda e cols⁵ consideram que a atividade de fenol-oxidase por outras espécies do gênero *Cryptococcus* são sempre menores que em *Cryptococcus neoformans*. Segundo os autores, várias espécies clinicamente emergentes expressam a enzima fenol-oxidase e podem sintetizar melanina, ainda que em menor frequência. Este fato foi comprovado em nosso trabalho, e pode ser importante do ponto de vista clínico e epidemiológico, pois a melanina é um fator de virulência importante. No entanto, em termos de identificação de *Cryptococcus neoformans*, acreditamos que a produção de melanina nos meios L-dopa e semente de girassol em 24-72 horas é um bom indicador para a identificação presumtiva desta espécie. O meio L-dopa apresenta substrato definido para a enzima fenol-oxidase, e dessa forma, minimiza a ocorrência de reações enzimáticas com outros substratos ou de outras enzimas produzidas pelo fungo.

Como verificamos, os meios L-dopa, batata e cenoura, e semente de girassol foram os que apresentaram melhor desempenho para produção de melanina pelas cepas de *Cryptococcus neoformans* estudadas. Além disso, batata e cenoura e semente de girassol são de fácil preparo e custo reduzido. Considerando que a produção de melanina não é exclusiva desta espécie, é justificável a realização de outros testes no isolamento de leveduras sugestivas de *Cryptococcus* no laboratório clínico para a identificação segura dos isolados.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Kátia Santana Cruz, Universidade do Estado do Amazonas, pelas sugestões na preparação do ágar semente de

girassol. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de mestrado a Reginaldo dos Santos Pedroso.

REFERÊNCIAS

1. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Current Opinion Microbiology 3: 354-358, 2000.
2. Chaskes S, Tyndall RL. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. Journal of Clinical Microbiology 1: 509-514, 1975.
3. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall AF. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, a separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. Journal of Clinical Microbiology 37: 838-840, 1999.
4. Hernández ICV, Machín GM, Andreu CME, Zaragoza MTI. Pigmentación de cepas de *Cryptococcus neoformans* sobre agar semilla de girassol. Revista Cubana de Medicina Tropical 55: 119-120, 2003.
5. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology 40: 1214-1218, 2002.
6. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. Microbiology and immunology 47: 271-277, 2003.
7. Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcaemia. Mycoses 41: 277-280, 1998.
8. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. Infection 35: 51-57, 2007.
9. Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infection and Immunity 51: 218-223, 1986.
10. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Research 6: 574-587, 2006.
11. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de micologia médica. Editora Sarvier, São Paulo, 2002.
12. Levitz SM. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. Reviews of Infectious Diseases 13: 1163-1169, 1991.
13. McCurdy MD, Morrow JD. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. Southern Medical Journal 94: 65-66, 2001.
14. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clinical Microbiological Reviews 8: 515-548, 1995.
15. Nandhakumar B, Kumar CPG, Prabu D, Menon T. Mustard Seed Agar, a new medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology 44: 674, 2006.
16. Paliwal DK, Randhawa HS. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology 7: 346-348, 1978.
17. Polachek I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. Journal of Bacteriology 150: 1212-1220, 1982.
18. Stepanovic S, Vukovic D, Radonjic I, Dimitrijevic V, Svabic-Vlahovic M. Ground red hot pepper agar in the isolation and presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. Mycoses 45: 384-388, 2002.
19. Van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 3394-3400, 2002.