



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOÃO ANTÔNIO MIRANDA DE OLIVEIRA SOUZA

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Cryptococcus*
AMBIENTAIS NA CIDADE DO SALVADOR - BA

SALVADOR
2013

JOÃO ANTÔNIO MIRANDA DE OLIVEIRA SOUZA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Cryptococcus*
AMBIENTAIS NA CIDADE DO SALVADOR - BA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

SALVADOR

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

S729 Souza, João Antônio Miranda de Oliveira
Variabilidade genética de *cryptococcus* ambientais na cidade do Salvador – BA / João Antônio Miranda de Oliveira Souza – Salvador, 2013.
90 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Tânia Fraga Barros

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde - 2013.

1. *Cryptococcus*. 2. Genética. 3. *URA5*. 4. Pombo. 5. Epidemiologia. I. Barros, Tânia Fraga. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993

JOÃO ANTÔNIO MIRANDA DE OLIVEIRA SOUZA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Cryptococcus*
AMBIENTAIS NA CIDADE DO SALVADOR - BA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 07 de junho de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Tânia Fraga Barros – Orientadora


Doutora em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo,
UNIFESP, Brasil.

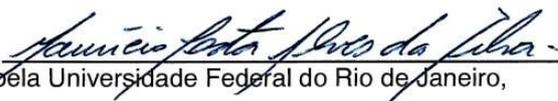
Universidade Federal da Bahia

Milton Ricardo de Abreu Roque


Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) pela Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Brasil.

Universidade Federal da Bahia

Maurício Costa Alves da Silva


Doutor em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,
UFRJ, Brasil.

Universidade Federal da Bahia

*Dedico esse trabalho a meus pais,
Erivaldo e Jussy Neide.*

Agradecimentos

Agradeço ao meu Deus todo poderoso que sempre me protegeu e iluminou, e sempre me guiou para encontrar o caminho certo. Dando-me força e espiritualidade para encarar os desafios da vida.

Agradeço aos meus pais pela confiança, empenho, amor, dedicação e atenção. Vocês são as pessoas mais incríveis que já conheci na vida. Minha admiração e meu respeito são imensuráveis. Amo vocês.

Aos meus irmãos, fontes de inspiração, que sempre estiveram presente nas horas difíceis, não me deixando desanimar e desistir. Me apoiando e me dando força para superar os obstáculos da vida. Amo vocês.

À pró Tânia, minha orientadora, que me acompanhou nesse que foi o momento mais importante para meu amadurecimento profissional e pessoal. Obrigado por ser orientadora, mãe, amiga e parceira. Sem você, nada disso seria possível.

Ao professor Edson Ruy, por acreditar no meu trabalho e por ter me ajudado a dar o primeiro passo para a área acadêmica.

Um agradecimento em especial à família Pirajá. Aos meus tios de coração Eduardo e Mariluce, que sempre estão presentes mesmo que estejamos distantes, e que me deram força para seguir em frente e vencer os obstáculos que a vida nos prega. Tia Mariluce, suas palavras de incentivo e força jamais serão esquecidas. Obrigado!

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) - UFBA, por terem dividido comigo as ansiedades e as glórias de nossas pesquisas, dividindo nosso dia-a-dia com muita serenidade e com total apoio, sempre!

Aos demais professores da UFBA, que permitiram o uso de equipamentos existentes em seus laboratórios, possibilitando o desenvolvimento das atividades, como tam-

bém apoiando sempre que necessário. Muito obrigado professoras Joice, Soraia, Elisângela, e professor Eudes.

As técnicas dos laboratórios e demais funcionários que sempre estiveram presente com palavras de apoio e de descontração.

Um abraço em especial a Mira. Uma pessoa que sempre esteve comigo, dividindo alegrias e tristezas. Nunca esquecerei dos nossos cafés da tarde.

Aos meus amigos e companheiros de toda hora: Douglas, Carol e André. Serei eternamente grato por tê-los em minha vida. Juntos, dividimos os melhores momentos. Vocês me deram força, incentivo, e motivação para correr atrás dos meus sonhos. Obrigado!

Aos meus colegas de mestrado, por dividirem comigo esse período tão difícil, porém tão importante para nossas vidas!

A CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado, sem a qual seria inviável a conclusão do curso. Obrigado!

*"Aqueles que passam por nós, não vão sós,
não nos deixam sós. Deixam um pouco de
si, levam um pouco de nós".*

Antoine de Saint-Exupéry

SOUZA, João Antônio Miranda de Oliveira. **Variabilidade genética de *Cryptococcus* ambientais na cidade do Salvador - BA**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO

Cryptococcus é uma levedura zoonótica, frequentemente associada a excretas de pombos e seu isolamento já é relatado em todo o mundo. Trata-se de uma levedura encapsulada, de forma globosa ou ovalada, que apresenta acentuado tropismo pelo sistema nervoso central. O principal problema é que o fungo permanece viável em excretas secas dessas aves por um longo período, tornando-se um reservatório de partículas infectantes passíveis de serem inaladas. O trabalho teve como objetivo caracterizar a variedade fenotípica e genética de *Cryptococcus* spp. ambientais da cidade de Salvador, Bahia. Para a execução desse estudo, 200 amostras de excrementos secos de pombos foram coletadas no solo entre novembro 2011 e fevereiro de 2012, em praças públicas, centro de distribuição de alimentos e no Porto da cidade de Salvador, Bahia. Foram adicionados 4mL de solução salina esterilizada, acrescida de cloranfenicol, para cada 1g de excreta. A mistura foi submetida à agitação em vortex por 3 minutos, e mantida em repouso por 60 minutos e, em seguida, diluições foram feitas. Foram aspirados 0,1 mL do sobrenadante e semeados com alça de Drigalski, de cada diluição, em placas de ASD contendo cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa de demanda de oxigênio a 28°C por até 21 dias. Colônias sugestivas foram repicadas em caldo uréia e analisadas com tinta da China para pesquisa de cápsula e micromorfológica com coloração de Gram. Após a identificação do gênero, as leveduras foram identificadas bioquimicamente por auxanograma, zimograma, crescimento a 37°C e repicadas em ágar Níger (*Guizotia abyssinica*), e CGB. Foram isoladas 37 leveduras, das quais 22 são da espécie *C. neoformans*, 4 de *C. gattii*, 5 de *C. albidus*, 3 de *C. uniguttulatus* e 3 da espécie *C. laurentii*. A determinação dos genótipos foi realizada utilizando a técnica de PCR-RFLP do gene *URA5* e foram verificados os perfis moleculares VNI (53,8%), VNIII (11,5%), VNIV (19,2%), VGII (7,7%), VGIII (3,8%) e VGIV (3,8%). A positividade para *Cryptococcus* nas amostras encontradas nos locais de estudo, associado ao grande número de pombos, apontam para a existência de riscos ambiental que devem servir de alerta aos órgãos de vigilância sanitária em Salvador. A identificação de espécies como *C. gattii*, *C. albidus*, *C. uniguttulatus* e *C. laurentii* em excretas de pombos evidencia a importância de novos estudos epidemiológicos para traçar os perfis de espécies de *Cryptococcus* que podem ser detectados de fontes ambientais em nossa cidade.

Palavras-chave: *Cryptococcus*; PCR-RFLP; *URA5*; pombo (*Columba livia*); epidemiologia ambiental.

SOUZA, João Antônio Miranda de Oliveira. **Genetic variability of environmental *Cryptococcus* in Salvador - BA**. 2013. 90 pp. Dissertation (Master in Biotechnology). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Cryptococcus is a zoonotic yeast that is often associated with pigeon droppings and its isolation is reported worldwide. It is an encapsulated yeast that has a global or oval shape and has marked tropism for the central nervous system. The main issue about this fungus is that it remains viable for a very long time even after the bird excreta is dried, becoming a reservoir of infectious particles that can be easily spread in the air and inhaled by humans. The study aimed to characterize the genetic and phenotypic variety of *Cryptococcus* spp in the city of Salvador, Bahia, Brazil. In this study, 200 samples of dried pigeon droppings were collected directly from the ground of public squares, center of food distribution and at the main harbor in Salvador, between November/2011 and February/2012. It was added 4 mL of sterilized saline with chloramphenicol for each gram of pigeon droppings. The solution was agitated with "Vortex" for 3 minutes. After 60 minutes standing still, the dilutions were made. It was collected 0.1 mL from the supernatant of each dilution and seeded with Drigalski spatula in ASD plates containing chloramphenicol. The plates were incubated in oxygen chamber at 28°C during 21 days. Suggestive colonies for *Cryptococcus* were picked and seeded again in urea broth, then analyzed with China ink and Gram stain to observe the presence of capsule and micromorphological structures, respectively. After the identification of the genus, the yeasts were identified biochemically by auxanogram, zymogram, growth at 37°C, subcultured in agar Niger (*Guizotia abyssinica*), and BGC. Thirty seven yeasts were isolated, of which 22 species were identified as *C. neoformans*, 4 *C. gattii*, 5 *C. albidus*, 3 *C. uniguttulatus* and 3 *C. laurentii*. The genotypes were determined by PCR-RFLP from the gene *URA5* and the molecular profiles found were: NIV (53.8%), VNIII (11.5%), VNIV (19.2%), VGII (7.7%), VGIII (3.8%) and VGIV (3.8%). Also, the identification of other species such as *C. gattii*, *C. albidus*, *C. uniguttulatus* and *C. laurentii* in pigeon droppings is a strong evidence of the importance of new epidemiological studies to trace species profiles of *Cryptococcus* that can be detected from environmental sources in this city. The percentage of positive samples for *Cryptococcus* associated with the large population of pigeons in Salvador shows the environmental risks and should serve as a warning to health surveillance agencies in Salvador.

Keywords: *Cryptococcus*, PCR-RFLP; *URA5*; pigeon (*Columba livia*); environmental epidemiology.

Lista de figuras

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 01 | Ciclo de vida do <i>Cryptococcus</i> spp. | 19 |
| Figura 02 | Ciclo de infecção da criptococose | 20 |
| Figura 03 | <i>Columba livia</i> | 26 |
| Figura 04 | Região paleártica | 27 |
| Figura 05 | Internações por micoses sistêmicas. Brasil, 2000 a 2007 | 33 |
| Figura 06 | Distribuição geográfica de genótipos de cepas de <i>Cryptococcus</i> ibero-americanas | 35 |
| Figura 7 | Praça Tomé de Sousa, Salvador - Bahia - Brasil. | 38 |
| Figura 8 | Praça do Campo Grande, Salvador - Bahia - Brasil. | 39 |
| Figura 9 | Porto de Salvador, Salvador - Bahia - Brasil. | 40 |
| Figura 10 | Central de Abastecimento da Bahia - CEASA | 41 |
| Figura 11 | Coleta de excretas de pombos na cidade de Salvador - Bahia - Brasil. | 42 |
| Figura 12 | Sítios de restrição das enzimas <i>HhaI</i> e <i>Sau96I</i> | 48 |
| Figura 13 | Morfologia de <i>Cryptococcus</i> sp. | 50 |
| Figura 14 | Coloração da tinta nanquim, demonstrando presença de cápsula | 50 |
| Figura 15 | Prova da enzima urease | 51 |
| Figura 16 | Provas de identificação de <i>Cryptococcus</i> do complexo <i>neoformans</i> . | 51 |
| Figura 17 | Provas bioquímicas para identificação de <i>Cryptococcus</i> spp. | 52 |
| Figura 18 | Espécies de <i>Cryptococcus</i> spp. isoladas de fezes de pombo, em Salvador, Bahia, 2013 | 55 |
| Figura 19 | Isolamento de <i>Cryptococcus</i> sp. em quatro praças da cidade de Salvador - Bahia, 2013 | 55 |
| Figura 20 | Produto da amplificação do gene <i>URA5</i> de cepas padrão de <i>Cryptococcus</i> em gel de agarose a 1,5%. | 57 |
| Figura 21 | Produto da amplificação do gene <i>URA5</i> de isolados ambientais de <i>Cryptococcus</i> em gel de agarose a 1,5 | 57 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 22 | Mapa de restrição do produto de PCR do gene <i>URA5</i> pelas enzimas <i>HhaI</i> e <i>Sau96I</i> dos padrões moleculares de <i>Cryptococcus</i> . | 58 |
| Figura 23 | Perfil de RFLP do gene <i>URA5</i> obtido por restrição dupla com <i>HhaI</i> e <i>Sau96I</i> de cepas padrão de <i>Cryptococcus</i> , em gel de poliacrilamida a 8% | 59 |
| Figura 24 | Perfil de RFLP do gene <i>URA5</i> por restrição dupla com <i>Sau96I</i> e <i>HhaI</i> de isolados ambientais de <i>Cryptococcus</i> em gel de poliacrilamida a 8%. | 60 |
| Figura 25 | Figura 25: Perfil de genótipos de <i>Cryptococcus</i> do complexo <i>neoformans</i> isolados de excretas de pombos em Salvador, BA. | 61 |

Lista de tabelas

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 01 | Unidades Formadoras De Colônia (UFC) por grama de fezes de pombos (<i>Columba livia</i>), em Salvador – Bahia | 49 |
| Tabela 02 | Provas bioquímicas de espécies de <i>Cryptococcus</i> do complexo <i>neoformans</i> isolados de fezes de pombo, na cidade de Salvador, Bahia | 53 |
| Tabela 03 | Perfil bioquímico de isolados de <i>Cryptococcus</i> não <i>neoformans</i> não <i>gattii</i> isolados de fezes de pombo, na cidade de Salvador, Bahia | 54 |
| Tabela 04 | Isolamento de <i>Cryptococcus</i> spp. ambientais por local estudado, Salvador, Bahia | 56 |

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1 Introdução | 13 |
| 2 Revisão de literatura | 15 |
| 2.1 Histórico | 15 |
| 2.2 Taxonomia e sistemática | 16 |
| 2.3 Morfologia e características bioquímicas | 16 |
| 2.4 Ciclo de vida e Transmissão | 18 |
| 2.5 Ecologia | 20 |
| 2.6 Fatores de virulência e patogenia | 23 |
| 3 <i>Columba livia</i> | 25 |
| 4 Criptococose | 28 |
| 4.1 Manifestações clínicas | 29 |
| 4.2 Diagnóstico laboratorial | 30 |
| 4.3 Tratamento | 31 |
| 5 Epidemiologia e caracterização molecular | 32 |
| 6 Objetivos | 37 |
| 6.1 Geral | 37 |
| 6.2 Específicos | 37 |
| 7 Material e métodos | 38 |
| 7.1 Locais de estudo | 38 |
| 7.2 Amostras biológicas | 41 |
| 7.2.1 Cepas padrão de leveduras | 41 |
| 7.2.2 Coleta de amostra de fezes de pombo | 42 |
| 7.2.3 Processamento da amostra | 42 |
| 7.3 Caracterização fenotípica | 43 |
| 7.3.1 Análise quantitativa | 43 |
| 7.3.2 Análise qualitativa | 43 |
| 7.3.2.1 Morfologia macroscópica | 43 |
| 7.3.2.2 Morfologia microscópica | 43 |
| 7.3.3 Identificação bioquímica | 44 |
| 7.3.3.1 Prova da urease | 44 |
| 7.3.3.2 Produção de melanina | 44 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 7.3.3.3 | Assimilação de carboidratos | 44 |
| 7.3.3.4 | Assimilação de nitrogênio | 45 |
| 7.3.3.5 | Fermentação de carboidratos | 45 |
| 7.3.4 | Crescimento a 37°C | 46 |
| 7.3.5 | Quimiotipagem | 46 |
| 7.4 | Estoque e manutenção dos isolados | 46 |
| 7.5 | Caracterização molecular | 46 |
| 7.5.1 | Extração de DNA | 47 |
| 7.5.2 | Amplificação do gene da Orotidina-monofosfato Pirofosforilase (URA5) | 47 |
| 7.5.3 | Polimorfismo de restrição por tamanho de fragmento associado à PCR (PCR - RFLP) do gene da orotidina-monofosfato pirofosforilase (URA5) | 47 |
| 7.5.4 | Construção do mapa de restrição do gene da orotidina-monofosfato pirofosforilase (URA5) | 48 |
| 8 | Resultados | 49 |
| 8.1 | Caracterização Fenotípica | 49 |
| 8.2 | Caracterização molecular | 57 |
| 9 | Discussão | 62 |
| 10 | Conclusões | 73 |
| 11 | Considerações finais | 74 |
| 12 | Perspectivas | 76 |
| | Referências | 77 |

1 INTRODUÇÃO

Cryptococcus é uma levedura patogênica cosmopolita, de forma globosa ou ovalada, envolvida por cápsula polissacarídica. Seu isolamento de amostras de origem ambiental é relatado em todo o planeta, principalmente de excretas de pombos (*Columba livia*). No entanto, diversos autores já isolaram esse patógeno de ocos de árvores, excretas de outras aves, folhas secas, poeira domiciliar, excretas de morcegos, frutos, pelo de animais e pele humana.

Atualmente, o ecossistema urbano tem se tornado cada vez mais propício para permanência de pombos, o que proporciona um acúmulo de excretas em diversos locais públicos, sendo considerada uma importante fonte de infecção para homens e animais. Pois, além da grande capacidade de proliferação e enorme adaptação, o principal problema é que *Cryptococcus* permanece viável nas fezes secas dessas aves por aproximadamente dois anos, o que as torna um reservatório de partículas infectantes passíveis de serem inaladas. Aliado a este fato, a população de pombos domésticos tem aumentado significativamente em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, tornando-se um problema ambiental e de saúde pública.

Na atualidade, com o advento da biologia molecular, existe uma preocupação epidemiológica com os isolados ambientais do *Cryptococcus* e com a perspectiva de uma intervenção em nível de prevenção da infecção e atuação em saúde pública. A técnica mais utilizada tem sido a de restrição do polimorfismo por tamanho de fragmento (*RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism*) com o gene da orotidina-monofosfato pirofosforilase (gene *URA*), porém outras metodologias já são citadas na literatura para caracterização molecular de isolados ambientais de *Cryptococcus* spp., como por exemplo, *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) fingerprinting* e *multilocus microsatellite typing (MLMT)*.

No que diz respeito a essa determinação molecular, o Brasil já apresenta, entre isolados clínicos e ambientais, todos os oito tipos moleculares existentes do gênero *Cryptococcus*. Na Bahia, estudo realizado com amostras clínicas de humanos, utilizando *RFLP* com o gene *URA5*, evidenciou a presença dos perfis moleculares VNI,

VNII e VGII. Entretanto, nada se tem descrito sobre identificação molecular dessa levedura de fontes ambientais em nosso estado.

Informações acerca da ecologia e epidemiologia molecular de cepas de *Cryptococcus* isoladas de excretas de pombos e de demais fontes ambientais são necessárias, para que seja entendida qual a sua real distribuição em nosso território, possibilitando intervir na infecção, e favorecer, conseqüentemente, para o tratamento e cura da criptococose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Cryptococcus neoformans foi primeiramente isolado de um suco de pêsego por Sanfelice (1894) na Itália. No mesmo ano, na Alemanha, Busse e Buschke, médicos, patologista e clínico, respectivamente, acompanharam o mesmo paciente portador de periostite crônica da tíbia. O agente causador dessa doença foi isolado por Busse e chamado de *Saccharomyces* sp., porém Buschke, avaliando o mesmo caso, pensou em se tratar de um protozoário. Esses dois médicos descreveram, pela primeira vez, aspectos da clínica, patologia e micologia da criptococose e seu agente, dados que se tornaram base fundamental para os estudos e descrições de casos subsequentes (LACAZ *et al.*, 2002; KWON-CHUNG e BENNETT, 1992 *apud* SANFELICE *et al.*, 1984).

Dois anos depois, Curtis isolou o fungo de lesão tumoral em humano e o denominou *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens*. Já Vuillemin, em 1901, considerou mais adequado enquadrar esta levedura no gênero *Cryptococcus*, estabelecido anteriormente por Kutzing (1833), já que não observou fermentação nem formação de ascósporos como estruturas de reprodução (*apud* LACAZ *et al.*, 2002; LAZÉRA *et al.*, 2004). Hansemann descreveu então, em 1905, o primeiro caso humano de meningoencefalite, caracterizada pela presença de lesões císticas gelatinosas, nas quais era visualizada a levedura. A partir de então, vários casos semelhantes foram descritos e Stoddard e Cutler, em 1916 nos Estados Unidos, denominaram o agente como *Torula histolytica*, gerando, portanto, grande confusão taxonômica (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992 *apud* HANSEMANN *et al.*, 1905).

Evans (1949) encontrou diferenças sorológicas entre isolados clínicos de *C. neoformans* e identificou os sorotipos A, B e C. Em 1950 foi proposta a designação *Cryptococcus neoformans* para o agente e o termo criptococose para a denominação da doença, iniciando nova fase de estudos em relação a este fungo (*apud* LAZÉRA *et al.*, 2004). Em 1955 foi demonstrada, por Emmons e colaboradores, a relação saprobiótica do *Cryptococcus* sp. com matéria orgânica rica em excretas de aves, principalmente fezes secas de pombos, ninhos e solos contaminados, constituindo habi-

tat natural do fungo (LAZÉRA *et al.*, 2004). Mais tarde, em 1966, Vogel descreveu o sorotipo D em um isolado (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

2.2 TAXONOMIA E SISTEMÁTICA

Taxonomicamente, leveduras do gênero *Cryptococcus* são pertencentes ao reino Fungi; filo Basidiomycota; classe Tremellomycetes; ordem Tremellales; família Tremellaceae. O gênero é composto por aproximadamente 70 espécies (CHEN *et al.*, 2013), sendo a maioria não reconhecida como patógeno em mamíferos. As duas principais espécies que representam o gênero *Cryptococcus* são *C. neoformans* e *C. gattii*, que juntas compõem o “complexo *neoformans*” (FINDLEY *et al.*, 2009).

C. neoformans, cosmopolita, ocorre com maior frequência em indivíduos com deficiência no sistema imunológico e *C. gattii* está limitado às regiões tropicais e subtropicais e frequentemente causa infecção em indivíduos imunocompetentes (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). Respectivamente, a primeira espécie compreende os sorotipos A (var. *grubii*), D (var. *neoformans*) e o híbrido AD, e a segunda os sorotipos B e C (FRANZOT, 1999; KWON-CHUNG, 1982; 1986; 1992; 2006; MITCHELL, 1995). Outras espécies de *Cryptococcus* podem, também, causar meningite, infecções pulmonares e abscessos, como exemplos, as espécies *C. laurentii*, *C. albidus* e *C. uniguttulatus* (McCURDY *et al.*, 2001), sendo que, de acordo com Khawcharoenporn e colaboradores (2007), *C. albidus* e *C. laurentii*, juntos, são responsáveis por 80% dos casos de criptococose causada por *Cryptococcus* não-*neoformans* e não-*gattii*. Mais espécies podem ser citadas, como: *C. aerius*; *C. aquaticus*; *C. curvatus*; *C. diffluens*; *C. dimennae*; *C. flavus*; *C. gastricus*; *C. luteolus* *C. macerans*; *C. magnus*; *C. oeirensis*; *C. podzolicus*; *C. skinneri*; *C. terreus*; *C. victoriae* (FINDLEY *et al.*, 2009).

2.3 MORFOLOGIA E CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Cryptococcus sp., forma assexuada do basidiomiceto *Filobasidiella* sp., é uma levedura de forma globosa ou ovalada, com diâmetro aproximado entre 2 a 8 µm (FA-

GANELLO *et al.*, 2006), de brotamento único ou múltiplo, que está envolvida por cápsula mucopolissacarídica cujo tamanho varia de 5 a 30µm (ZARAGOZA *et al.*, 2003), composta por três componentes principais, a glicuronoxilomanana (GXM), a galactoxilomanana (GalXM) e manoproteína (MP) (FRIES *et al.*, 1999). A GXM consiste de ácido glicurônico, xilose e manose; a GalXM é composta de galactose, xilose e manose e a MP contém manose como carboidrato predominante, e, em menor quantidade, galactose e xilose (MCFADDEN e CASADEVALL, 2001). Cerca de 90% do polissacarídeo capsular é GXM e diferenças nessa estrutura é a base para a separação dos isolados de *Cryptococcus* do complexo *neoformans* em cinco sorotipos: A, B, C, D e o híbrido AD (IKEDA *et al.*, 1985).

A fase teleomorfa do fungo, ainda não encontrada na natureza, foi induzida em laboratório e classificada por Kwon-Chung e colaboradores (1992) como *Filobasidiella neoformans*, correspondente ao anamorfo *C. neoformans* e *F. bacillispora* correspondente ao *C. gattii*. Nesse estágio, são evidentes as diferenças fenotípicas entre as espécies: em *F. neoformans* os basidiósporos são esféricos, elípticos ou cilíndricos com paredes rugosas; em *F. bacillispora* são baciliformes e com parede lisa.

Suas colônias em ágar Sabouraud dextrose, incubadas a 28°C por 72 horas, são lisas, brilhantes, podendo ser de cor creme, amarela, rosa ou laranja, de acordo com o tempo de incubação. Sua micromorfologia observada após coloração de Gram apresenta células leveduriformes redondas, ovoides e alongadas e em ágar fubá-tween 80, após 72 horas de incubação a 25-30°C revela ausência de filamentos, com blastoconídios isolados, aos pares ou em pequenas cadeias (LACAZ *et al.*, 2002; KURTZMAN e FELL, 1998).

A identificação laboratorial de leveduras do gênero *Cryptococcus* se baseia na análise de macro e micromorfologia citadas anteriormente, bem como na realização de provas bioquímicas como a detecção da cápsula polissacarídica e da enzima uréase, ausência de tubo germinativo e ausência de fermentação de carboidratos (LACAZ *et al.*, 2002).

No que diz respeito à identificação das espécies, leveduras do complexo *neoformans* assimilam, como fontes de carbono, açúcares como glicose, galactose, saca-

rose, dulcitol, maltose, trealose, xilose, rafinose, inositol e peptona como fonte de nitrogênio. Produzem melanina nos meios contendo substratos fenólicos como ágar sementes de Níger, num período de 48 h a 28°C em aerobiose e em ágar canavani-na glicina azul de bromotimol (C.G.B.) somente a espécie *C. gattii* apresenta potencial para crescimento, sendo possível, assim, diferenciar as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (LACAZ *et al.*, 1991). Em se tratando de outras espécies, há uma variação muito grande no perfil de assimilação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como em relação à capacidade de crescimento a 37°C, produção de melanina em meios contendo compostos fenólicos e assimilação de nitrato como fonte de nitrogênio (KURTZMAN, 2011; LACAZ *et al.*, 2002).

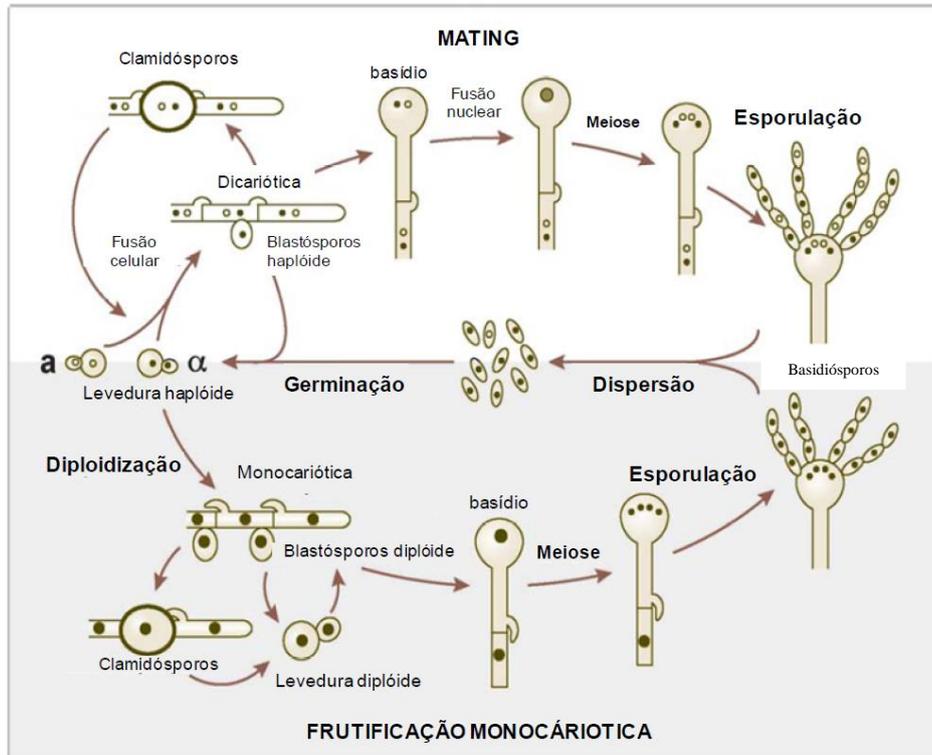
2.4 CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO

Enquanto a maioria dos organismos, que se reproduzem sexualmente, possui dois sexos ou “mating-types”, transições na sexualidade entre dois ou mais “mating-types” tem ocorrido no reino Fungi. A reprodução sexuada é bastante comum entre os fungos e o “mating-type” pode ocorrer em dois padrões: bipolar e tetrapolar. No sistema bipolar, um único locus *MAT* ocorre em dois alelos (a e α), que determinam a identidade da célula. Espécies com esse sistema são encontradas nas classes dos ascomicetos, basidiomicetos e zigomicetos (FINDLEY *et al.*, 2012).

A reprodução sexuada do complexo de espécies patogênicas de *Cryptococcus* envolve um sistema bipolar bem definido (Figura 01). A fusão entre duas células de “mating-type” opostos resulta na formação de uma hifa dicariótica. Em seguida, as hifas se diferenciam para formar basídios, nos quais ocorre a fusão nuclear e meiose. Na superfície dos basídios são formadas longas cadeias de basidiósporos a e α , que serão dispersos no ambiente, representando possíveis propágulos infectantes. Embora seja preferível uma reprodução entre “mating-types” diferentes, *Cryptococcus* pode reproduzir-se unissexualmente, em especial entre células α , para produzir células estáveis diplóides (α/α) ou células haplóides (α). Quando um isolado de sorotipo A cruza com outro de sorotipo D, a fusão celular ocorre normalmente, porém a meiose é impedida devido a diferenças genéticas entre os dois sorotipos, resultando num pequeno número de células haplóides viáveis. Entretanto, apesar

disso, algumas células híbridas AD podem se propagar por mitose como células diplóides mononucleadas (LIN *et al.*, 2008; FINDLEY *et al.*, 2012).

Figura 01: Ciclo de vida do *Cryptococcus* spp.

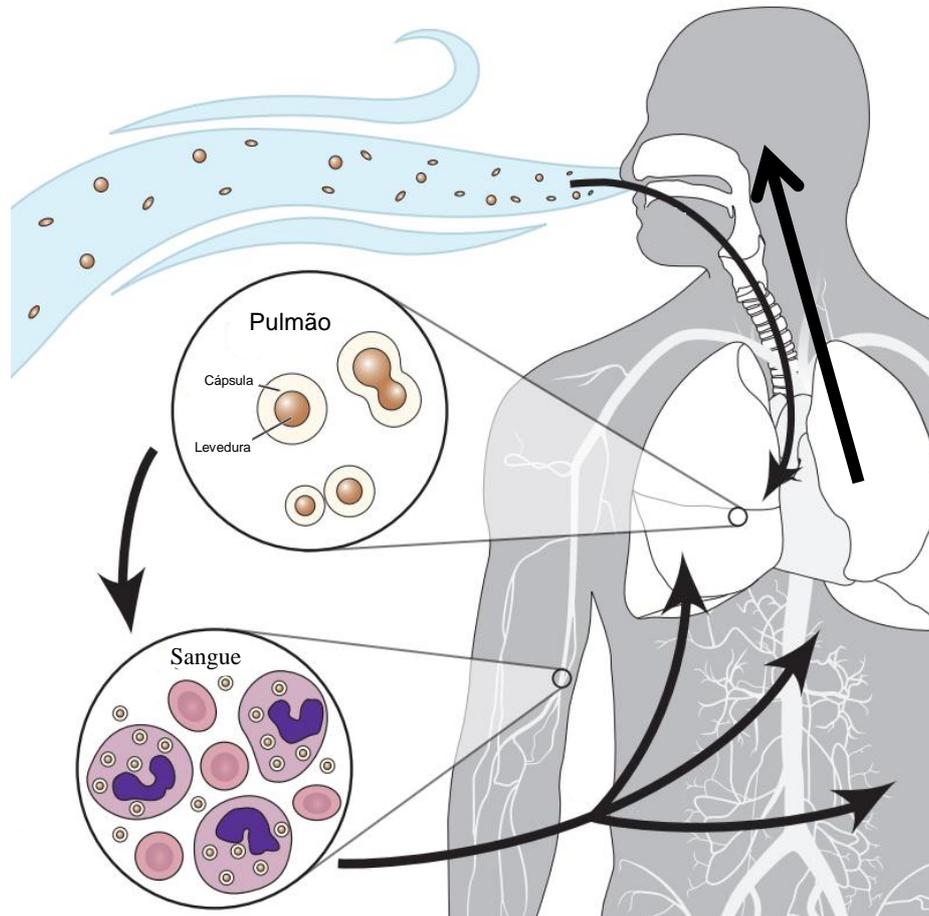


Fonte: LIN e HEITMAN, 2006 (adaptado).

A forma assexuada é predominantemente haploide e sua reprodução ocorre por brotamento, de forma que ocorre um prolongamento da célula mãe e a divisão do núcleo, formando uma célula filha idêntica à sua antecessora. (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; COUTINHO, 2006; XUE *et al.*, 2007).

A transmissão da criptococose ocorre após inalação de propágulos infectantes de *Cryptococcus*, fortemente presente em excretas de aves, principalmente de pombos, solos contaminados com essas excretas, ocos de árvores principalmente de eucalíptos, folhas flores e frutos em decomposição, que podem levar a primo-infecção pulmonar. Por disseminação pela via hematogênica, podem atingir outros órgãos e até mesmo o sistema nervoso central (SNC) devido ao seu característico neurotropismo (Figura 02) (BIVANCO *et al.*, 2006).

Figura 02: Ciclo de infecção da criptococose



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/fungal/cryptococcosis-gattii/causes.html> (modificado).

A presença maciça e a enorme adaptação dos pombos aos centros urbanos relacionam-se com a ubiquidade desse agente fúngico, que é facilmente isolado de fontes ambientais, inclusive de poeira domiciliar (PASSONI *et al.*, 1999).

2.5 ECOLOGIA

Leveduras do gênero *Cryptococcus* são cosmopolitas e podem ser encontradas em uma variedade de nichos ecológicos, como construções antigas, torres e sótãos de igreja, estábulos, porões, barracões, cavernas e buracos de tatus (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008), além de diversos substratos orgânicos como solo (GRA-

NADOS e CASTAÑEDA, 2005), fezes de morcegos e baratas, ninhos de vespa, suco de frutas (TRILLES *et al.*, 2003), flores (MIN *et al.*, 2012), microbiota intestinal de cavalo e de aves, leite, cavidade nasal, pele e pelos de cães e gatos, recintos de coelhos (CASADEVALL e PERFECT, 1998), além de vegetais em decomposição e folhas secas, ocos de várias espécies de árvores (LAZÉRA *et al.*, 1998; 2000; ALVAREZ, *et al.*, 2013), bem como da superfície do mar (CHANG *et al.*, 2008). No entanto alguns autores apontaram, desde a década de 50, como principais nichos de *Cryptococcus* as excretas de pombos, ovos e ninhos das mesmas, bem como solo contaminado com essas excretas (EMMONS *et al.*, 1951; LAZÉRA *et al.*, 2000; FILIÚ *et al.*, 2002; BARONI *et al.*, 2006). Entretanto, no Brasil, estudos já provaram que excretas de outros gêneros de aves podem também representar um substrato excelente para crescimento dessas leveduras, como pode ser lido em um estudo feito na cidade de Curitiba, no qual amostras de excretas secas, obtidas de passeriformes e psitacídeos de cativeiros, mostraram positividade significativa para recuperação de cepas de *Cryptococcus* sp. (CICCHON, 2006; LUGARINI *et al.*, 2008).

O isolamento de *Cryptococcus* no ambiente está intimamente ligado à existência de um habitat favorável ao crescimento dessas leveduras (NARDELLI *et al.*, 2005). Os fatores climáticos de cada região tais como umidade, temperatura, e índice de radiação solar, podem influenciar diretamente no desenvolvimento e na recuperação de cepas de *Cryptococcus* oriundas do ambiente (MONTENEGRO e PAULA, 2000; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005; QUINTERO *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de *Cryptococcus* em excretas de aves se deve possivelmente à grande quantidade de compostos ricos em nitrogênio que são encontrados nesses espécimes, o que favorece o seu crescimento (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CHEE e LEE, 2005). Além disso, o fungo também pode utilizar o ácido úrico e as purinas, presentes em abundância nesses excrementos, como fonte de nitrogênio, o que facilita a sua multiplicação (CASADEVALL; PERFECT, 1998; CHEE; LEE, 2005).

É frequentemente relatado que as excretas secas de aves oferecem um substrato orgânico mais favorável para o desenvolvimento do fungo que as fezes úmidas, pois possuem menor quantidade de bactérias e, desta forma, a competição pelo cresci-

mento é reduzida, contribuindo assim para a elevada densidade populacional de células de *C. neoformans* neste substrato (REOLON *et al.*, 2004). No entanto, apesar do isolamento de *Cryptococcus* ser abundante em excretas de pombos, a levedura dificilmente é isolada do aparelho digestório dessas aves (ROSARIO *et al.*, 2005; CAFARCHIA *et al.*, 2006). Sendo assim, a forma pela qual essas excretas se tornam infectadas ainda não foi completamente elucidada (FILIÚ *et al.*, 2002).

Poucos estudiosos conseguiram isolar *Cryptococcus* da cloaca de pombos (ROSARIO *et al.*, 2005). Essa ausência de isolamento decorre das más condições encontradas para o crescimento do fungo, possivelmente pela elevada temperatura corporal (41,5°C) destas aves e pela alta concentração de amônia presente nas fezes frescas, que alcaliniza o meio (SORREL; ELLIS, 1996; CASADEVALL; PERFECT, 1998; LIN e HEITMAN, 2006). Portanto, a multiplicação do fungo acontece nas excretas e estando num ambiente com falta de limpeza, acúmulo de excretas e aumento de temperatura, por meio do ar, o micro-organismo é capaz de contaminar as excretas adjacentes e assim se propagar (LIN e HEITMAN *et al.*, 2006; PEDROSO *et al.*, 2007; ROSARIO *et al.*, 2008).

No que diz respeito ao isolamento desse fungo de ocos de árvores, a forma como essa levedura se associa a plantas e de qual forma o ambiente influencia no seu ciclo de vida ainda intriga os pesquisadores. Acredita-se que o fungo, principalmente o *C. gattii*, estabeleça esse tipo de relação para completar seu ciclo biológico pelo processo de “*mating-type*”, já que foi observado que inositol e ácido indol-acético, existentes em plantas do gênero *Arabidopsis* e *Eucalyptus* estimulam a reprodução sexuada do fungo (XUE *et al.*, 2007).

Embora a distribuição geográfica da espécie *C. gattii* seja restrita (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008), e esta seja isolada com menor frequência a partir de excretas de aves, essa levedura já foi descrita em associação, principalmente, com árvores do gênero *Eucalyptus*, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais (SORREL; ELLIS, 1996; LAZÉRA *et al.*, 2000; RANDHAWA *et al.*, 2003; KIDD *et al.*, 2004; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2006). Na natureza, *C. gattii* foi isolado, primeiramente, no sul da Austrália, em associação ao *Eucalyptus camaldulensis* (ELLIS e PFEIFFER, 1990). Posteriormente, outras espécies de eucaliptos, tais como: *E. tereticor-*

nis, *E. rudis* e *E. gomphocephala*, bem como novas espécies vegetais, foram sugeridas como possíveis nichos ecológicos do fungo (ABEGG *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2007). No Brasil, *C. gattii* foi isolado de material vegetal em decomposição e ocos de árvores do gênero *Moquilea*, *Cassia* e *Ficus*, protegidos dos efeitos dessecatadores dos raios solares, evidenciando um possível habitat para o fungo (LAZÉRA *et al.* 1998; 2000; FORTES *et al.*, 2001; TRILLES *et al.*, 2003).

2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENIA

Os fatores que induzem a patogenicidade do *Cryptococcus* são divididos em dois grupos: um relacionado às características do estabelecimento de infecção e capacitação de sobrevivência no hospedeiro e outro relacionado aos fatores de virulência afetando o grau de patogenicidade (REOLON *et al.*, 2004).

Dentre os principais fatores de virulência, necessários para que *Cryptococcus* se instale em um determinado hospedeiro, sobreviva e cause doença, pode-se destacar: presença de cápsula polissacarídica (CHANG e KWON-CHUNG, 1994; PRA- TES *et al.*, 2013), capacidade de produzir melanina (JACOBSON e TINNEL, 1993), produção de manitol e assimilação do inositol (CASADEVALL e PERFECT, 1998), produção de urease (COX *et al.*, 2000), fosfolipase e protease (STEENBERGER e CASADEVALL, 2003) e capacidade de crescimento a 37°C (PERFECT, 2005).

A cápsula polissacarídica constitui o fator de virulência melhor caracterizado para definição do gênero *Cryptococcus*, pois permite a rápida identificação da levedura através do método clássico com a preparação da tinta Nanquim em líquido cefalorraquidiano (LCR) para diagnóstico de meningite criptocócica (ALSPAUGH *et al.*, 1998). Essa cápsula pode conferir sobrevivência, por proteger a levedura contra dessecação na natureza e, já no hospedeiro, inibir a fagocitose por células do sistema imunológico, além de ativar o sistema complemento, inibir a migração de leucócitos, e ainda, interferir na apresentação de antígenos e desregular a liberação de citocinas (PERFECT *et al.*, 2005). Entre os mecanismos que resultam neste fenômeno, encontra-se a interferência desses polissacarídeos na migração de leucócitos e neutrófilos por quimiotaxia devido à dessensibilização de seus receptores, impedin-

do que os mesmos deixem a circulação sanguínea, e migrem para o local da inflamação. Além disso, os polissacarídeos prejudicam a adesão de leucócitos durante a migração pelo endotélio, além de serem responsáveis também por aumentar a produção do anti-inflamatório interleucina 10 (IL-10) e induzir a perda de receptores para o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) na superfície dos neutrófilos (ELLERBROEK *et al.*, 2004).

A fenol oxidase produzida pelo *Cryptococcus* é uma enzima identificada na classe da lacase, que pode produzir melanina a partir de precursores como L-DOPA, dopamina e norepinefrina (EISENMAN *et al.*, 2007). A melanina tem a característica da insolubilidade e da resistência a substâncias químicas e enzimas. Dessa forma, e situada na parede celular, confere proteção contra radiação ultravioleta no ambiente, e, já no hospedeiro, pode proteger a levedura contra agentes oxidantes provenientes de células de defesa. Pode também interferir na suscetibilidade a drogas antifúngicas e proteção contra temperaturas extremas (BUCHANAN e MURPHY, 1998; STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003).

Já a presença da fosfolipase, enzima que hidrolisa ligações ésteres em glicerofosfolipídios, é indispensável na infecção pulmonar pelo *Cryptococcus*, pois, indiretamente, facilita a aderência da levedura ao epitélio pulmonar. Age sobre os substratos do hospedeiro liberando ácidos graxos, que atuam sobre as membranas celulares e no surfactante, expondo sítios de ligação para a levedura aderir, desestabilizando as células e provocando sua lise (GANENDREN *et al.*, 2006).

A enzima urease hidrolisa a uréia gerando amônia e carbamato e, em condições fisiológicas, resulta no aumento do pH (CURTIS *et al.*, 1994). Este aumento, produzido pelo hidróxido de amônia, gera injúria tecidual e favorece a sobrevivência da levedura no hospedeiro (MOBLEY *et al.*, 1991). É utilizada como uma ferramenta muito útil na identificação bioquímica de leveduras do gênero *Cryptococcus* (ZIMMER *et al.*, 1979; CANTEROS *et al.*, 2002).

Com respeito às proteinases, essas enzimas contribuem na virulência microbiana através da destruição de tecidos do hospedeiro e digestão de proteínas que são im-

portantes imunologicamente, como imunoglobulinas e complementos (LOOMES *et al.*, 1993; JANSEN *et al.*, 1995; KAMINISHI *et al.*, 1995).

De acordo com Sáez e colaboradores (2006), a criptococose é pleomórfica, possuindo marcante tropismo pelo SNC manifestando-se normalmente como meningite criptocócica em humanos, e tendo a imunossupressão celular como o principal fator predisponente. No entanto, segundo Ramos-Barbosa e colaboradores (2004), diversos órgãos e tecidos podem ser afetados, sendo a resposta tecidual à presença do *Cryptococcus* extremamente variável.

Nos indivíduos que se encontram em estado de supressão imunológica por corticoterapia ou outras doenças, pode haver um crescimento de massas gelatinosas dessa levedura em tecidos, devido à ausência da reação inflamatória. Em casos mais graves, disseminação da infecção para a pele, órgãos parenquimatosos e ossos. Já em indivíduos imunocompetentes ou com doença crônica, ocorre uma reação granulomatosa composta por macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas (KOMMERS *et al.*, 2005).

3 *Columba livia*

Pombos (*Columba livia*) são aves pertencentes ao reino Animalia, filo Chordata, classe Aves, ordem Columbiformes, família Columbidae, gênero *Columba*, espécie *C. livia*. São aves exóticas (Figura 03) introduzidas no Brasil no século XVI pelos portugueses. Em centros urbanos, essas aves apresentam uma expectativa de vida entre 3 a 5 anos, põem de 1 a 2 ovos por ninhada e podem ter 5 a 6 ninhadas anuais. A incubação de seus ovos leva em média 18 dias (BONINI *et al.*, 2003). Possuem o hábito de viver em bandos, abrigando-se e construindo seus ninhos em locais altos como prédios, torres, sótãos, beirais de janelas, árvores, etc., e alimentando-se preferencialmente de grãos, mas aproveitam bem os restos de alimentos e lixo encontrados em locais públicos, como praças e parques (CAMARGO e HÖFLING, 1987).

Figura 03: *Columba livia*



Fonte: o autor.

Sua habilidade em voar faz com que tenham uma boa arma para proteger a si mesmo, uma vez que eles, principalmente os selvagens, são uma das principais presas por uma gama incontável de pássaros raptorais, sendo falcões-peregrinos e gaviões os principais predadores naturais de pombos (BROWN *et al.*, 2012). Outros predadores comuns de pombos selvagens são gambás, guaxinins e corujas, e seus ovos podem ser capturados por gaivotas e corvos (ROOF *et al.*, 2001), porém nas cidades não há tantos predadores como na natureza (IBARAKI, 2012). No chão os adultos, filhotes, e seus ovos, correm o risco de serem vítimas de gatos selvagens e domésticos (LEV, 1977).

Pombos são aves com populações amplamente presentes e naturalizadas em todo o mundo. A pomba da rocha, que é seu ancestral, estava originalmente presente em penhascos no litoral, interior e ocidente da região paleártica (grego: *pale(o)*: velho; *ártico*: norte) e nas regiões do norte da Etiópia, bem como no subcontinente indiano (Figura 04) (GOODWIN *et al.*, 1983).

Figura 04: Região paleártica



Fonte: WIKIPÉDIA. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Regi%C3%A3o_pale%C3%A1rtica

Estas populações selvagens deram origem a raças domésticas como resultado da seleção artificial, tendo sido os pombos uma das primeiras aves submetida à domesticação (SOSSINKA, 1982). De acordo com Goodwin e colaboradores (1983), o sinantropismo de aves selvagens é principalmente uma consequência dos recursos alimentares disponíveis com o desenvolvimento da agricultura ou de outra forma, principalmente da presença de edifícios que constituem um habitat artificial em relação ao natural. Recursos alimentares e edifícios humanos são os principais fatores ecológicos que trazem aves selvagens para a maioria das cidades e vilas em todo o mundo (HAAG-WACKERNAGEL *et al.*, 2003), extensivamente nos habitats agrícolas e onde quer que o homem construa edificações adequadas para habitar, formando estável ou aumentando as populações em milhões de indivíduos como indicado pela *Bird Life International* (2004) (SAUER *et al.*, 2008).

Atualmente, o ecossistema urbano tem se tornado cada vez mais propício para permanência destas aves, o que proporciona um acúmulo de excretas em diversos locais públicos, sendo considerada uma importante fonte de infecção para homens e animais. Pois, além da grande capacidade de proliferação e enorme adaptação, o principal problema é que *Cryptococcus* permanece viável nas fezes secas dessas aves por aproximadamente dois anos, fato que as torna um reservatório de partículas infectantes passíveis de serem inaladas (BARONI *et al.*, 2006). Aliado a este fato, a população de pombos domésticos tem aumentado significativamente em diver-

sas partes do mundo, inclusive no Brasil, tornando-se um problema ambiental e de saúde pública (CERMENÕ *et al.*, 2006; ROSÁRIO *et al.*, 2008).

4 CRIPTOCOCOSE

Também chamada de torulose, blastomicose europeia, doença de Busse-Buschke, a criptococose é uma zoonose de natureza sistêmica de porta de entrada inalatória, causada pelas espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* (CASADEVALL e PERFECT, 1998; PRATES *et al.*, 2013). A doença possui alta taxa de morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e, na sua maioria, causada pelo sorotipo A (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CHEN *et al.*, 2013; UMEYAMA *et al.*, 2013).

A micose abrange duas entidades distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico: a criptococose oportunista, sendo cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, causada predominantemente pela espécie *C. neoformans*; e a criptococose primária, que acomete hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, causada predominantemente pela espécie *C. gattii*. Ambas causam meningoencefalite de evolução grave e fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins, suprarrenal, entre outros. A mortalidade por criptococose é estimada em 10% nos países desenvolvidos chegando a 43% nos país em desenvolvimento, e um tempo médio de sobrevida de 14 dias (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Atualmente outras espécies de *Cryptococcus*, como *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. uniguttulatus* e *C. luteolus*, são caracterizadas como patógenos humanos emergentes, sendo que as infecções por estas espécies ocorrem quase que exclusivamente em indivíduos imunocomprometidos, especialmente naqueles com deficiências da imunidade celular, como SIDA, doenças linfo proliferativas e doenças hematológicas malignas (KHAWCHAROENPORN *et al.* 2007; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; MIN *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2012; FELLNER *et al.*, 2013; UMEYAMA *et al.*, 2013).

4.1 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Nos seres humanos, o espectro da doença varia de colonização assintomática das vias aéreas a meningite e outras doenças graves. *Cryptococcus* é um oportunista que causa a doença, principalmente em pacientes imunocomprometidos, nos quais pode haver pouca inflamação e os sintomas podem ser leves, mesmo com doença extensa (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; ORMEROD *et al.*, 2013).

A infecção inicial ocorre geralmente nos pulmões, podendo estar acompanhada de doença respiratória ou alterações radiológicas, mas a maioria das infecções é assintomática (CHEN *et al.*, 2013). Pacientes imunocompetentes, podem apresentar tosse e dor pleurítica. A febre baixa, dispneia, perda de peso e mal-estar pode também ser visto. Na maioria das pessoas saudáveis, a infecção permanece limitada aos pulmões. Em pacientes imunocomprometidos, pneumonia ou síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) pode ocorrer. Após a infecção inicial pulmonar, a levedura pode espalhar-se para outros sistemas de órgãos, particularmente em doentes imunocomprometidos. A forma mais comum de criptococose disseminada é doença do SNC, particularmente meningite subaguda ou crônica e meningoencefalite (SEVERO *et al.*, 2009; COLOMBO *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2012). Dentre as várias manifestações clínicas que os pacientes com criptococose apresentam, a mais frequente e letal é a meningoencefalite (KWON-CHUNG, 1992; LINDENBERG *et al.*, 2008; LACAZ *et al.*, 2002).

Cryptococcus spp. também podem causar uma grande variedade de lesões da pele incluindo pápulas, vesículas, bolhas, úlceras, púrpura, semelhantes a tumores subcutâneos massas e abscessos. As lesões podem se assemelhar a outras doenças, incluindo acne, lipomas, sífilis, tuberculose e carcinoma de células basais. A celulite é comum em receptores de transplante de órgãos. Doença de pele pode ocorrer isoladamente em pessoas saudáveis, mas em pacientes imunocomprometidos sugere doença disseminada. Síndromes menos frequentes incluem osteomielite, artrite séptica, miocardite, hepatite, peritonite, abscessos renais, prostatite, miosite e gastroenterite. Em pacientes com síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), a invasão das glândulas suprarrenais pode causar insuficiência adrenal (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Casos de criptococose por *C. laurentii* descritos no homem incluem doença disseminada no SNC (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008), lesões na pele em adulto imunocompetente (JOHNSON *et al.*, 1998, FELLNER *et al.*, 2013), fungemia em neonato (KORDOSSIS *et al.*, 1998; PEDROSO *et al.*, 2010), fungemia em paciente com câncer refratário à terapia com fluconazol, pneumonia (UMEYAMA *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013) e infecção de orofaringe em paciente com leucemia e infecção cutânea (KUNOVA *et al.*, 1999; BAUTERS *et al.*, 2002; VLCHKOVA-LASHKOSKA *et al.*, 2004; SHANKAR *et al.*, 2006). Já a espécie *C. albidus* foi isolada de indivíduos com meningite (JOHNSON *et al.*, 1998), osteomielite, sepse e infecções de pele, pulmonar e ocular (KURTZMAN e FELL, 1998; ROSARIO *et al.*, 2005), e em animais, há relatos de infecção genital e ceratite micótica em equinos, e infecção sistêmica em cães (LOISON *et al.*, 1996; KORDOSSIS *et al.*, 1998; NARAYAN *et al.*, 2000; GARELICK *et al.*, 2004; LABRECQUE *et al.*, 2005).

4.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A criptococose é uma das micoses mais fáceis de diagnóstico por apresentar acentuado tropismo neurológico, abundância de elementos fúngicos no líquido e nas lesões, presença de cápsula característica, diagnóstico imunológico e coloração tecidual específica (LACAZ *et al.*, 2002; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). A verificação da presença de cápsula utilizando diferentes espécimes clínicos com o uso de tinta da China torna seu diagnóstico presuntivo rápido e confiável. A levedura pode ser encontrada ainda no escarro, lavado brônquico, pus de abscesso, urina, aspirados de medula óssea e de gânglios e fragmentos de tecidos, com grande sensibilidade (MOYSES *et al.*, 1995).

Segundo o Consenso em criptococose (2008), a cultura é o exame comprobatório da doença, mas a detecção dos antígenos capsulares pode ser feita por meio de testes imunológicos. *Cryptococcus* spp. apresentam bom crescimento em vários meios de cultivos, que não contenham cicloheximida, como por exemplo ágar sangue (AS), ágar-Sabouraud dextrose (ASD) e ágar infusão de cérebro-coração (BHI). Podem crescer na faixa de temperaturas entre 25°C e 37°C, mas a temperatura ótima de

crescimento é 30°C (KWON-CHUNG, 1992; ALSPAUGH *et al.*, 1998; LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM *et al.*, 2004).

A detecção de antígeno capsular polissacarídeo de *Cryptococcus* spp. pela aglutinação do látex pode ser realizada no sangue, urina, lavado brônquio-alveolar e no líquor. No entanto, na prática, a detecção de antígeno é feita no líquor e no soro. Estes são positivos em mais de 90% dos pacientes com meningite criptocócica. Nas infecções fora do SNC, estes espécimes fornecem menor positividade do teste (SWINNE *et al.*, 1992). A maioria dos falsos positivos ocorre em reação cruzada com fator reumatóide e, mais raramente, pode ocorrer reação cruzada com *Trichosporon* ou com contaminação. Testes imunológicos foram desenvolvidos para detecção tanto de antígenos como de anticorpos. O teste de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) detecta antígenos em títulos mais baixos e mais precocemente na infecção criptocócica. No entanto, o teste é mais demorado e laborioso. Os anticorpos em geral, não estão presentes durante a infecção ativa e podem aparecer durante o tratamento e com a recuperação do paciente (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; PERFECT *et al.*, 2010).

4.3 TRATAMENTO

Em imunocompetentes e imunocomprometidos a anfotericina B é utilizada em associação com a 5-fluocitosina, em infecções disseminadas, ou fluconazol e itraconazol, como alternativa para o tratamento de infecções cutâneas (BIVANCO *et al.*, 2006). Nas formas mais graves, principalmente acometendo o SNC, seja o paciente infectado ou não pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o tratamento é dividido em diferentes etapas: a fase de indução, que tem por objetivo negatização ou redução efetiva da carga fúngica, tendo como período mínimo de tratamento de duas semanas. A fase de consolidação, que compreende manutenção de negatividade micológica e normalização de parâmetros clínicos e laboratoriais, por pelo menos oito semanas. E então se segue com a fase de supressão, também chamada de manutenção, que dura no mínimo 1 ano, com tempo adicional variando de acordo com a condição do estado imune do hospedeiro (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). A resistência a drogas, como o fluconazol, é possível, principalmente du-

rante tratamentos supressivos prolongados como nos casos de meningite por *C. neoformans* (POSTERARO *et al.*, 2003).

5 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

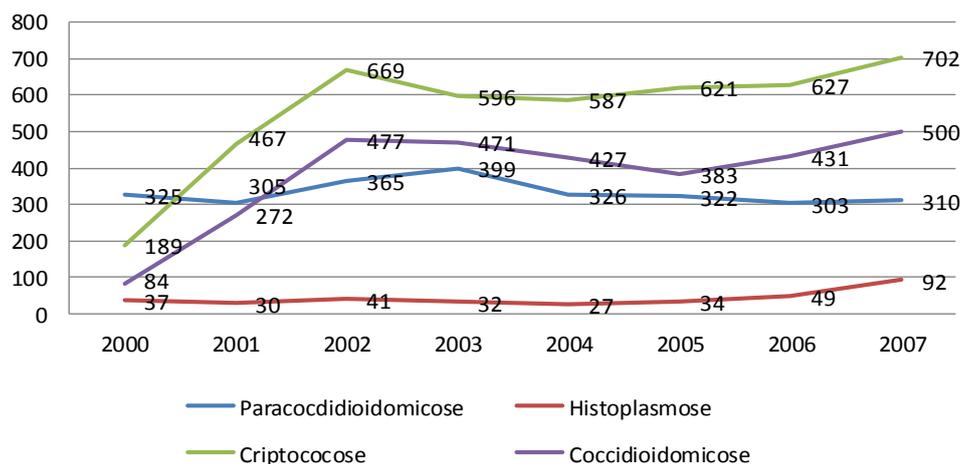
As diferenças epidemiológicas entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* foram demonstradas após estudo com 628 isolados clínicos provenientes de 97 laboratórios em todo o mundo. Foi observado que 100% dos isolados da Áustria, Alemanha, Bélgica, Dinamarca, França, Holanda, Itália, Japão e Suécia pertenciam a antes denominada var *neoformans* hoje, *C. neoformans*. Aproximadamente 85% dos isolados da Argentina, Canadá, Estados Unidos e Reino Unido pertenciam à espécie *C. neoformans* e os demais 15% à *C. gattii*. No Brasil, Austrália, Camboja, sul da Califórnia, Havaí, México, Nepal e em países da África Central, Paraguai, Tailândia e Vietnã, a prevalência de *C. gattii* variou entre 35 a 100%. Dentre todos os isolados estudados e identificados como *C. neoformans*, 70% pertenciam ao sorotipo A. O sorotipo D foi encontrado na Europa num percentual de 9% do total, sendo menos frequente em outras regiões do mundo. Da espécie *C. gattii*, o sorotipo B foi cinco vezes mais prevalente que o sorotipo C, sendo que a maioria dos isolados pertencentes ao sorotipo C era proveniente do sul da Califórnia (KWON-CHUNG e BENNETT, 2002). Vale ressaltar que em Vancouver (Canadá), há poucos anos atrás, houve um surto de criptococose causado por *C. gattii* KIDD *et al.*, 2004). A incidência de infecções por esta espécie, entre 1999 e 2003, esteve entre 8,5 a 37 casos por milhão de residentes por ano (HOANG *et al.*, 2004; FRASER *et al.*, 2005; UMEYAMA, *et al.*, 2013).

A distribuição mundial dos sorotipos demonstra que os isolados ambientais e clínicos do sorotipo A é cosmopolita (CASADEVALL e PERFECT, 1998), enquanto que B e C estão principalmente limitados a regiões tropicais e subtropicais. Entretanto, o nicho ecológico de *C. gattii* tem se expandido devido às descobertas dessa levedura em zonas de clima temperado (KIDD, 2004; ESCANDÓN, 2006). Já a ocorrência de *Cryptococcus* do sorotipo D é pouco relatada, exceto nos Estados Unidos (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2000), em alguns países da Europa (DROMER *et al.*, 1996) e nas regiões Sul e sudeste do Brasil, onde há pouco tempo foi isolado (RIBEIRO *et al.*, 2006; UMEYAMA, *et al.*, 2013).

No Brasil, a epidemiologia de sorotipo A, nas regiões Sul e Sudeste, reproduz a imagem observada em todo o mundo. Ao contrário, o sorotipo B é o agente mais frequente da criptococose na região nordeste (MEYER *et al*, 1999; NISHIKAWA *et al*, 2003). Porém, o trabalho de Matos e colaboradores (2012), na Bahia, mostrou que a espécie *C. neoformans* é a espécie de maior prevalência, enquanto que *C. gattii* aparece em 21% dos isolados clínicos.

A criptococose é a quarta maior causa de infecção oportunista em pacientes HIV positivo apresentando quadro de SIDA. E de acordo com dados do Ministério da Saúde, no período de 1980-1999, 4,5% das infecções oportunistas associadas a pacientes portadores de HIV foram causadas por *C. neoformans* e/ou *C. gattii* e no período de 2000 a 2007, dentre as infecções fúngicas, a criptococose foi a principal responsável pela morbidade e mortalidade destes pacientes (Figura 05) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999; 2012). Na maioria dos países a prevalência em pacientes de SIDA tem se mantido na faixa de 5 a 10% (CASADEVALL e PERFECT, 1998), enquanto este índice chega a 15-30% em alguns países africanos (MITCHELL e PERFECT, 1995).

Figura 05: Internações de pacientes HIV positivos por micoses sistêmicas. Brasil, 2000 a 2007.



Fonte: Ministério da Saúde, 2012.

No Rio Grande do Sul, Casali e colaboradores (2003) verificaram entre isolados clínicos e ambientais, que dentre 93 isolados obtidos de pacientes HIV-positivos, 91

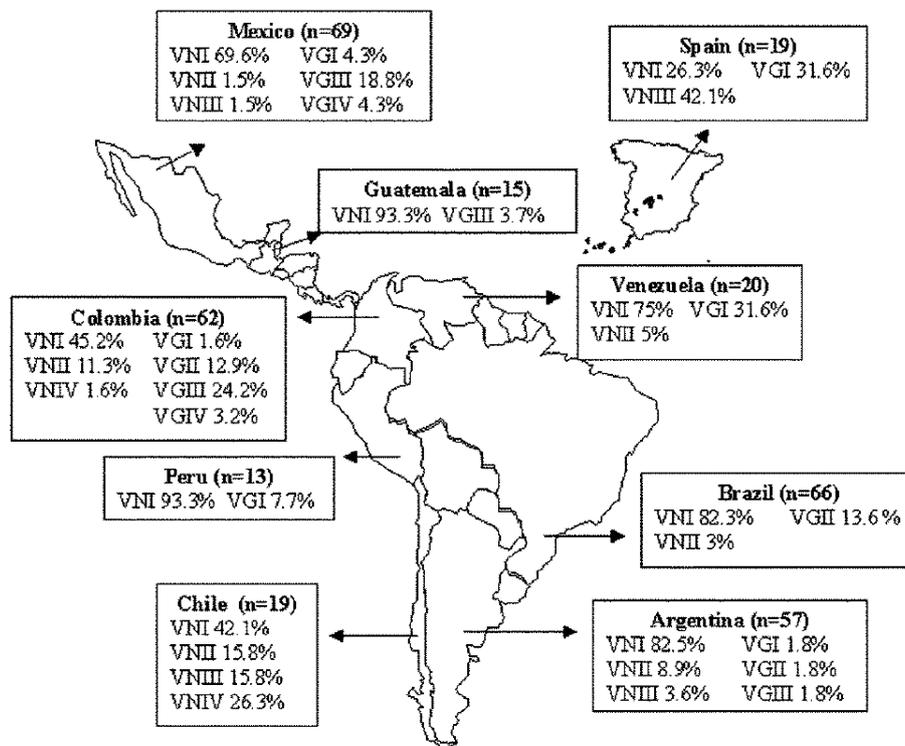
eram da espécie *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), o que concorda com os dados epidemiológicos nacionais e internacionais. Neste estudo 11 isolados de *C. gattii* (entre pacientes com e sem infecção pelo vírus HIV) foram identificados como sorotipo B. Entre os isolados ambientais, os nove isolados provenientes de eucaliptos foram identificados como *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e nenhum isolado do sorotipo B foi obtido de fonte ambiental. Outro estudo do mesmo grupo obteve 38 isolados de excretas de aves, destes, 33 foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e 5 como *C. gattii* (sorotipo B) sugerindo excretas de aves como fonte ambiental de infecção pelo sorotipo B neste estado (ABEGG *et al.*, 2006).

Espécies de *C. neoformans* são isoladas com maior frequência na Europa e América do Sul. No Brasil, por ser área endêmica desta espécie, há um grande interesse em se determinar os genótipos dos isolados deste fungo (KWON-CHUNG *et al.*, 1992; AOKI *et al.*, 1994; ROSENBAUM *et al.*, 1994; LAZÉRA *et al.*, 1998). Os estudos genotípicos utilizando reação da polimerase em cadeia associado ao polimorfismo de restrição por tamanho de fragmento (PCR-RFLP) do gene *URA5*, e PCR-*Fingerprinting*, realizados por Meyer e colaboradores (1999), conseguiram evidenciar oito genótipos, sendo 4 de *C. neoformans* que incluem VNI, VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A); VNIII (AD híbrido); VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo D); e 4 de *C. gattii*, sendo eles VGI, VGII, VGIII e VGIV (sorotipos B e C). Após as análises que reproduziram a metodologia desses autores, um estudo posterior contribuiu para mostrar que VGII era o grupo molecular responsável pelo surto na Ilha de Vancouver, no Canadá. Muitos estudos utilizando a classificação de Meyer *et al.* (1999) foram realizados em diversas partes do mundo. Na Índia, o genótipo VNI mostrou-se predominante ocorrendo em 89% dos 57 isolados clínicos, os genótipos VNIV e VGII também foram encontrados, com porcentagens de 2% e 9%, respectivamente (JAIN *et al.*, 2005).

No que diz respeito aos genótipos de *Cryptococcus* envolvidos no Brasil, Meyer e colaboradores (2003) realizaram estudo com 340 isolados clínicos, veterinários e ambientais, oriundos da Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México, Peru, Venezuela, Guatemala e Espanha. Nesse amplo estudo, foi relatado que 68.2% dos isolados pertenciam ao tipo molecular VNI (var. *grubii*, sorotipo A), o que concorda com estu-

dos epidemiológicos em todo o mundo, já que este genótipo é o mais relatado. Em uma proporção menor, 5.6% isolados do tipo VNII (var. *grubii*, sorotipo A); logo em seguida, 4.1% o tipo VNIII (sorotipo híbrido AD), com nove isolados possuindo polimorfismo no gene *URA5*; 1.8% do tipo VNIV (var. *neoformans*, sorotipo D); 3.5% VGI; 6.2% VGII; 9.1% VGIII, e 1.5% VGIV, com todos os sorotipos apresentados entre os genótipos moleculares para *C. gattii*, como mostrado abaixo (Figura 06).

Figure 06: Distribuição geográfica de genótipos de cepas de *Cryptococcus* Ibero-americanas.



Fonte: Meyer *et al.*, 2003. (n): número de cepas estudadas.

Na atualidade, com o advento da biologia molecular, existe uma preocupação epidemiológica com os isolados clínicos do *Cryptococcus* e com a perspectiva de uma intervenção em nível de prevenção da infecção e atuação em saúde pública. A técnica mais utilizada tem sido a utilizada por Meyer e colaboradores (1999) PCR-RFLP do gene *URA5*, porém outras metodologias já são citadas na literatura para caracterização molecular de isolados ambientais de *Cryptococcus* spp., como por exemplo,

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) fingerprinting (HAGEN *et al*, 2010) e *multilocus microsatellite typing (MLMT)* (ZHU *et al*, 2010; ORMEROD *et al.*, 2013). Poucos são os trabalhos de caracterização molecular de isolados ambientais de *Cryptococcus* spp. realizados no nosso país. Dentre eles vale citar o de Ribeiro e Ngamskulrungrroj (2008) que caracterizou o genótipo VNI no estado do Espírito Santo; o de Costa e colaboradores (2009), no estado do Pará, caracterizando os genótipos VGII, VNI e VNII e o de Ferreira-Pain e colaboradores (2010) que relata isolamento e caracterização dos genótipos VNI e VNII, no estado de Minas Gerais.

Existe uma preocupação com a epidemiologia de isolados de *Cryptococcus* de fontes ambientais em todo o mundo. Leveduras desse gênero podem permanecer viáveis em excretas de pombos por grandes períodos. Aves, essas, que se encontram cada vez mais em ambiente urbano.

Informações de estudos demonstrando isolamento de *Cryptococcus* em excretas de pombos e de demais fontes ambientais servirão de base para entender como essas leveduras se comportam no ambiente, qual a sua real distribuição entre as espécies, e também, contribuir na prevenção da infecção, como também no tratamento da criptococose em nosso país.

6 OBJETIVOS

6.1 GERAL

- Caracterizar a variedade fenotípica e genética de *Cryptococcus* spp. ambientais da cidade de Salvador, Bahia.

6.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência de *Cryptococcus* em excrementos de pombos (*Columba livia*) de 04 locais públicos da cidade do Salvador, Bahia.
- Isolar e identificar bioquimicamente as espécies de *Cryptococcus* de excretas de pombos (*Columba livia*) de 04 locais públicos da cidade do Salvador, Bahia;
- Determinar os genótipos das espécies do gênero *Cryptococcus* através da técnica de restrição do polimorfismo por tamanho do fragmento (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene *URA5*.
- Sugerir medidas de controle e prevenção de risco sanitário relacionado à zoonose de acordo com os resultados obtidos.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 LOCAIS DE ESTUDO

Quatro locais da cidade de Salvador foram selecionados para o estudo, os quais foram escolhidos segundo o critério observacional de elevada concentração de pombos e grande circulação de pessoas, aliado a proximidade desses animais com o homem durante o trânsito de pedestres.

A Praça Municipal Tomé de Sousa (PMTS) (Figura 07) está localizada no centro urbano de Salvador, com as coordenadas geográficas 12°58'28.35" Sul e 38°30'46.03" Oeste, e foi considerada como local de lazer e trânsito. Historicamente é a primeira Praça do Brasil e nela está localizado o Palácio Tomé de Souza, atual sede da prefeitura da cidade e de outras construções de épocas diferentes, como o Palácio Rio Branco, o Elevador Lacerda e a Prefeitura Municipal de Salvador.

Figura 07: Praça Tomé de Sousa, Salvador - Bahia - Brasil.



Fonte: SALTUR, EMPRESA SALVADOR TURISMO. **Praça Municipal**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Pal%C3%A1cio_Tom%C3%A9_de_Sousa>. Acesso em 02 nov 2010

A Praça do Campo Grande (PCG) (Figura 08), que também é caracterizada como local de lazer e trânsito, está localizada em um bairro central de mesmo nome e tem como coordenadas 12°59'15.21" Sul e 38°31'16.03" Oeste. Possui atividade cultural ativa, principalmente devido ao Teatro Castro Alves (TCA), ao Teatro Vila Velha, importantes colégios em suas adjacências e associações como a "Casa d'Itália", além de ser um local turístico da cidade, com grande visitação de turistas. (SALTUR, 2010).

Figura 08: Praça do Campo Grande, Salvador - Bahia - Brasil.



Fonte: O autor.

O porto de Salvador (PTS) (Figura 09) caracterizado como local de comércio, estocagem e distribuição de alimentos e outros produtos, de coordenadas 2°57'45.99" Sul e 38°30'27.91" Oeste, se encontra localizado no bairro do Comércio, na parte baixa da cidade. O porto sofreu intervenção Federal em 30 de novembro de 1970, sendo depois encampado pela União, conforme o Decreto nº 77.297, de 15 de março de 1976. Por fim, a sua administração passou à Companhia das Docas do Estado da Bahia, criada em 17 de fevereiro de 1977, como controlada da Empresa de Portos do Brasil S.A. (Portobras), extinta em 1990 que passou a ser denominada CODEBA - Companhia das Docas da Bahia (CODEBA, 2010).

Figura 09: Porto de Salvador, Salvador - Bahia - Brasil.



Fonte: CODEBA, COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA. **Porto de Salvador.**
Disponível em: <http://picasaweb.google.com/lh/photo/RSRdPIxee9_a_hnAkTkmjmA>.
Acessado em 02 fev 2012.

Por último, a Central de Abastecimento da Bahia (CEASA/BA) (Figura 10), caracterizada como local de comércio e distribuição de alimentos, e está localizada nas coordenadas 12°50'23.28" Sul e 38°22'08.03" Oeste, situada no Km 5,5 da rodovia Centro Industrial de Aratu (CIA) – Aeroporto. Foi fundada em março de 1973, com a finalidade de racionalizar e otimizar os processos de comercialização e abastecimento de produtos alimentícios, disponibilizando infraestrutura, gerenciamento, apoio logístico e serviços complementares, representando hoje o mais importante mercado atacadista de hortifrutigranjeiros da região, atendendo a supermercados, hotéis, restaurantes, hospitais e pequenos comerciantes. Possui uma área total de 934.118 m² sendo constituída por sete galpões, 194 boxes e 1.128 módulos de comércio de alimentos, além de 20 restaurantes, um módulo policial e um posto de combustível (EBAL, 2010).

Figura 10: Central de Abastecimento da Bahia



Fonte: EBAL, EMPRESA BAIANA DE ALIMENTOS S.A. - Mercados – **CEASA**. Disponível em: <http://fotosdecidadesbrasileiras.blogspot.com/2008/12/foto-de-salvador-ceasa-bahia.html>. Acessado em 20 nov 2010.

7.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

7.2.1 Cepas padrão de leveduras

Foram utilizadas cepas padrão de referência da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Candida albicans* 90028, *Candida krusei* 6258 e *Cryptococcus neoformans* 34872; bem como os padrões moleculares de *Cryptococcus* spp.: *Cryptococcus neoformans* WM 148 (VNI), *Cryptococcus neoformans* WM 626 (VNII), *Cryptococcus neoformans* WM 628 (VNIII), *Cryptococcus neoformans* WM629 (VNIV), *Cryptococcus gattii* WM 179 (VGI), *Cryptococcus gattii* WM 178 (VGII), *Cryptococcus gattii* WM 175 (VGIII), e *Cryptococcus gattii* WM 779 (VGIV). As cepas ATCC de *Candida* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (RJ), pelo Dr. Ivano de Filippis; enquanto os padrões moleculares de *Cryptococcus* foram doados pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (PA). Todas as cepas padrão fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de

Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da UFBA e estão conservadas na temperatura de -80°C .

7.2.2 Coleta de amostra de fezes de pombo

De cada local selecionado, foram coletadas 50 amostras de excrementos de pombos (*Columba livia*) com auxílio de espátulas de madeira descartáveis e esterilizadas (Figura 11), em tubos de plástico esterilizados, devidamente rotulados e previamente pesados. As amostras foram transportadas para o LPMC, sob-refrigeração.

Figura 11: Coleta de excretas de pombos na cidade de Salvador – Bahia – Brasil.



Fonte: O autor.

7.2.3 Processamento da amostra

Foram adicionados 4 ml de solução salina (0,85%) esterilizada, acrescida de cloranfenicol (0,4g/L), para cada 1g de excreta. A mistura foi submetida à agitação em vortex por 3 minutos, mantida em repouso por 60 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi separado. A 0,1 ml deste sobrenadante foram acrescidos 0,9 ml de solução salina esterilizada com cloranfenicol (0,4g/L) (diluição 10^{-1}) e esta operação foi repetida por mais outras duas vezes, para se obter as diluições 10^{-2} e 10^{-3} . Com auxílio de alça de Drigalski foram semeados 0,1mL do sobrenadante da mistura inicial, e das diluições 10^{-2} e 10^{-3} , em placas de ágar Sabouraud dextrose (ASD) contendo

cloranfenicol (0,05 g/L) (Acumedia®). As placas foram incubadas em estufa de demanda de oxigênio (BDO) a 28°C por até 21 dias de acordo com Casali e colaboradores (2003), com tempos de leitura intermediários de 72h, 5 dias, 10 dias e 15 dias.

7.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

7.3.1 Análise quantitativa

O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Cryptococcus* Isolados nas culturas, e com características semelhantes, foi determinado por grama de fezes, de cada amostra analisada.

7.3.2 Análise qualitativa

7.3.2.1 Morfologia macroscópica

Colônias suspeitas de *Cryptococcus* foram analisadas observando características como tamanho, brilho, consistência, coloração e bordas.

7.3.2.2 Morfologia microscópica

De toda colônia suspeita de *Cryptococcus*, foi realizada a coloração de Gram, para definir a morfologia microscópica da levedura e pesquisa de cápsula através da tinta Nanquim (LARONE, 2002), onde uma gota (50 µL) de suspensão da colônia suspeita foi homogeneizada a uma gota da tinta (50 µL), em uma lâmina de microscopia, e então cobertos com lamínula. O preparo foi observado em microscópio óptico com aumento de 100x e 400x e a presença de cápsula foi definida pela visualização de leveduras envoltas por um halo claro circundando as bordas da célula.

7.3.3 Identificação bioquímica

7.3.3.1 Prova da urease

Para a pesquisa da enzima urease a levedura foi semeada, com auxílio de uma alça inoculadora, em caldo uréia, o qual foi incubado, em estufa BDO, à temperatura de 28°C por até cinco dias (COX *et al.*, 2000). O resultado foi considerado positivo pela observação da mudança de coloração do meio de cultivo para o rosa e considerado negativo pela não alteração de cor original ou alteração para amarelo. A cepa de *C. albicans* ATCC 22018 foi utilizada como controle negativo e a de *C. neoformans* ATCC 34872 como controle positivo.

Após confirmação do gênero *Cryptococcus*, através das morfologias macro e microscópica, prova positiva da urease e presença de cápsula, os isolados foram submetidos à caracterização fenotípica através da realização das provas bioquímicas listadas abaixo para identificação da espécie:

7.3.3.2 Produção de melanina

A levedura foi semeada em placa de ágar Níger (*Guizottia abyssinica*) (dextrose 1,0 g, creatinina 1,0 g, ágar bacteriológico 15,0 g, fosfato de potássio monobásico 1,0 g, extrato de semente de Níger 200 ml, água destilada 800 ml) e após 48 horas de incubação a 28°C, foi avaliada a presença de pigmento colonial marrom indicando a produção de melanina (SIDRIM *et al.*, 2004). A cepa de *C. albicans* ATCC 22018 foi utilizada como controle negativo e a de *C. neoformans* ATCC 34872 como controle positivo.

7.3.3.3 Assimilação de carboidratos

A partir de um crescimento de 48h em ASD, foi preparada uma suspensão da levedura em água destilada esterilizada, cuja turvação foi ajustada à escala padrão 5 de McFarland. Um volume de 3 mL dessa suspensão foi homogeneizado em 30 mL de ágar base de nitrogênio-levedura (YNB) (sulfato de amônio 5g, fosfato de potássio

monobásico 1 g, sulfato de magnésio 0,5 g, ágar bacteriológico 20 g, água destilada 1000 ml) fundido a 45°C e, em seguida, distribuídos em uma placa de Petri esterilizada e vazia. Após solidificação, asépticamente sobre a superfície do meio, foram colocadas pequenas quantidades de fontes de carbono sob a forma de cristais de açúcares puros (glicose, sacarose, galactose, lactose, melibiose, celobiose, trealose, xilose, inositol, dulcitol, rafinose, maltose - SIGMA). As placas foram, então, incubadas a 28°C por 48h, em estufa BDO. A assimilação de cada açúcar foi verificada pela observação de halo de crescimento fúngico ao redor do açúcar estudado (LARONE *et al.*, 2002).

7.3.3.4 Assimilação de nitrogênio

Da suspensão leveduriforme, preparada no item 7.3.3.3, 1,0 mL foi homogeneizado em 10 mL de ágar base de carbono-levedura (YCB) (glicose 20 g, fosfato de potássio monobásico 1 g, sulfato de magnésio 0,5 g, ágar bacteriológico 20 g, água destilada 1000 mL) fundido a 45°C e, em seguida, distribuídos em uma placa de Petri esterilizada e vazia. Após solidificação, foram colocadas asépticamente, sobre a superfície do meio, pequenas quantidades de fontes de nitrogênio (peptona e nitrato de sódio - SIGMA). As placas foram, então, incubadas a 28°C por 48h, em estufa BDO. A assimilação de cada fonte de nitrogênio foi verificada pela observação de halo de crescimento fúngico ao redor da fonte de nitrogênio estudada (LARONE *et al.*, 2002).

7.3.3.5 Fermentação de carboidratos

Tubos de ensaio contendo 3 mL de meio base de fermentação (azul de bromotimol 0,04 g; extrato de levedura 4,5 g; peptona 0,5 g; água destilada 1000 mL), tubo de Durhan invertido e 1 mL de solução a 10% de cada carboidrato a ser estudado (glicose, galactose, lactose, sacarose, trealose e maltose) foram semeados com 1 mL da suspensão leveduriforme, preparada no item 7.3.3.4 e, então, incubados a 28°C por até 15 dias em estufa BDO. Um tubo sem adição de carboidrato foi utilizado como controle negativo de fermentação e a prova positiva foi dada pela observação da formação de bolha de ar dentro do tubo de Durhan, caracterizando presença de gás carbônico (CO₂) produzido pela fermentação do respectivo carboidrato (LARONE *et*

al., 2002).

7.3.4 Crescimento a 37°C

Com auxílio de uma alça inoculadora, os isolados foram semeados em ASD inclinado e incubados à temperatura de 37°C, para avaliação da capacidade de crescimento fúngico nessa temperatura, após o período de 48 horas (LACAZ *et al.*, 2002).

7.3.5 Quimiotipagem

Os isolados foram semeados em ágar Canavanina, Glicina Azul de Bromotimol (CGB) inclinado (10 g de glicina, 1 g de Fosfato de potássio monobásico, 1 g de sulfato de magnésio, 30 mg de sulfato de L-canavanina, 0,4g de azul de bromotimol, 64 mL de hidróxido de sódio 0,01N para 1000 mL de água destilada) e incubados a 28°C, por 48 horas, para diferenciação das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON-CHUNG *et al.*, 1982). A prova foi controlada com utilização das cepas padrão de *C. gattii* WM 779 e *C. neoformans* WM 628.

7.4 ESTOQUE E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

Após terem sido isolados e identificados, os isolados foram armazenados à temperatura de geladeira (4°C), em ASD em camada alta, e congeladas às temperaturas de -20°C e -80°C, em caldo Sabouraud contendo 20% de glicerol.

7.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

No momento da análise molecular, os isolados foram retirados do freezer, sub cultivados em placas de ASD e incubados em estufa BDO a 28°C, por 48 a 72 horas. A viabilidade do isolado foi confirmada pelo crescimento após incubação e a pureza confirmada pela realização da coloração de Gram.

7.5.1 Extração de DNA

O método de extração utilizado foi alternativo à metodologia do “fenol-clorofórmio”, de acordo com o descrito por Chaturvedi e colaboradores (2000), onde toda massa leveduriforme de uma placa de Petri, de 90 mm de diâmetro, com crescimento de 48 horas, foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4 mL de água Mili-Q esterilizada, formando uma suspensão espessa e homogênea. Dessa suspensão, foram aspirados 700 µL, os quais foram submetidos a banho de água fervente por 15 minutos e, imediatamente, colocados em banho de gelo.

7.5.2 Amplificação do gene da Orotidina-monofosfato Pirofosforilase (*URA5*)

A amplificação do gene *URA5* foi feita através da reação de polimerase em cadeia (PCR), com 5,0 µL do sobrenadante das células fervidas (item 7.5.1) para um volume final de reação de 50µL. Foram adicionados 50 ng de cada iniciador *URA5* (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTC GACTCCG3') e SJ01 (5' TTAAGACCTCTGAACA CCGTACTC3') de acordo com Meyer e colaboradores (2003), além de 3.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 1X Green buffer e 1,25 U da Taq DNA polimerase (GoTaq® - Promega). A reação foi realizada no Termociclador (Bio Rad – MyCycler) utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 61°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com extensão final de 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado, foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, após corrida eletroforética de 100 V por 50 minutos, em tampão Tris-borato EDTA 1X (pH 8,2) e, em seguida, corado em brometo de etídio e fotografado por fotodocumentador (Sistema Locus Biotecnologia - Pix Touch).

7.5.3 Polimorfismo de restrição por tamanho de fragmento associado à PCR (PCR - RFLP) do gene da orotidina-monofosfato pirofosforilase (*URA5*)

Após confirmação da amplificação, o produto da PCR foi digerido duplamente com as enzimas de restrição *Sau96I* (10 U/µL) (New England – BioLabs) e *HhaI* (20 U/µL)

(Invitrogen) a 37°C, por toda noite (MEYER *et al.*, 2003). Os fragmentos gerados foram separados em gel de poliacrilamida a 8%, numa corrida eletroforética de 60 V por 140 minutos, em tampão Tris-borato EDTA 1X. Após corrida, o gel foi corado em brometo de etídio, e observado e fotografado por fotodocumentador (Sistema Locus Biotecnologia -Pix Touch).

Os perfis de restrição dos isolados foram analisados visualmente e comparados com os perfis gerados pelas cepas dos padrões moleculares de *Cryptococcus* spp., bem como confirmados pelos mapas de restrição construídos de acordo com o item seguinte.

7.5.4 Construção do mapa de restrição do gene da orotidina-monofosfato pirifosforilase (*URA5*)

Sequências de nucleotídeos do gene *URA5* dos padrões moleculares foram obtidas do *Genbank* (*Pubmed*), com os respectivos números de acesso [WM148 (AJ555621); WM161 (AJ555833); WM178 (AJ555832); WM179 (AJ555831); WM628 (AJ555829); WM626 (AJ555828); WM629 (AJ555830); WM779 (AJ555834)] e, então, localizados os sítios de restrição para as enzimas *HhaI* e *Sau96I* (Figura 12). Os fragmentos gerados com esse estudo teórico geraram mapas de restrição de cada cepa padrão.

Figura 12: Sítios de restrição das enzimas *HhaI* e *Sau96I*



Fonte: O autor. (N): A, T, G ou C.

8 RESULTADOS

8.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Das 200 amostras coletadas no estudo, 18,5% (37/200) foram positivas para o gênero *Cryptococcus* e a análise quantitativa mostrou números que variaram de 50 a >35.000 UFC/g de excremento, como mostrado na tabela abaixo.

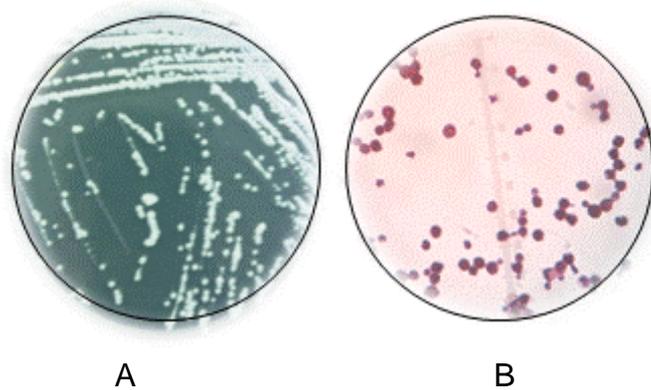
Tabela 01: Unidades Formadoras de Colônia (U.F.C.) por grama de fezes de pombos (*Columba livia*), em Salvador – BA.

| Amostra | Local | UFC/g | Amostra | Local | UFC/g |
|---------|--------------|---------|---------|-----------------|--------|
| 1 | Campo Grande | >35.000 | 19 | CEASA | 6.600 |
| 2 | Campo Grande | 2.200 | 20 | CEASA | 3.300 |
| 3 | Campo Grande | 3.300 | 21 | CEASA | 3.300 |
| 4 | Campo Grande | 500 | 22 | CEASA | 3.330 |
| 5 | Campo Grande | 50 | 23 | CEASA | 100 |
| 6 | Campo Grande | 2.330 | 24 | CEASA | 300 |
| 7 | Campo Grande | 40 | 25 | Praça Municipal | 13.300 |
| 8 | Campo Grande | 3.300 | 26 | Praça Municipal | 22.300 |
| 9 | Campo Grande | 10.000 | 27 | Praça Municipal | 14.000 |
| 10 | Campo Grande | 5.400 | 28 | Praça Municipal | 3.000 |
| 11 | Campo Grande | 1.000 | 29 | Praça Municipal | 2.500 |
| 12 | Campo Grande | 14.000 | 30 | Praça Municipal | 25.000 |
| 13 | Porto | 33.330 | 31 | Praça Municipal | 1.500 |
| 14 | Porto | 50 | 32 | Praça Municipal | 300 |
| 15 | Porto | 330 | 33 | Praça Municipal | 22.500 |
| 16 | Porto | 1.140 | 34 | Praça Municipal | 26.000 |
| 17 | CEASA | 20.000 | 35 | Praça Municipal | 500 |
| 18 | CEASA | 35.000 | 36 | Praça Municipal | 2.000 |
| | | | 37 | Praça Municipal | 200 |

Fonte: O autor. (>): Maior que.

A morfologia colonial de cada isolado suspeito demonstrou colônias de tamanho de médio a grande, brilhantes, de consistência mucóide, de coloração branca a bege e com bordas regulares, com aspectos de leite condensado (Figura 13 A) que, à coloração de Gram, se apresentaram como células leveduriformes redondas, coradas positivamente (Figura 13 B).

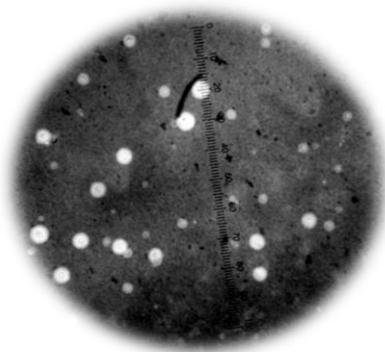
Figura 13: Morfologia de *Cryptococcus*



Fonte: O autor. (A) Colônias desenvolvidas em ágar Sabouraud dextrose; (B) Células redondas Gram positivas.

Para todas as colônias suspeitas, que apresentaram a descrição colonial descrita acima, o exame da pesquisa de cápsula foi positivo, tendo sido visualizado estruturas arredondadas de tamanho variável, algumas apresentaram brotamento único, envolvidos por halo claro ao redor da célula (Figura 14).

Figura 14: Coloração da tinta nanquim, demonstrando presença de cápsula.



Fonte: O autor.

O gênero *Cryptococcus* foi então definido somando as características morfológicas e de cápsula positiva, a prova da urease, a qual foi positiva para todos os isolados em estudo (Figura 15).

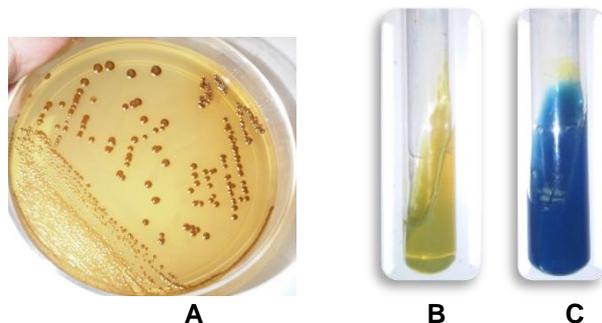
Figura 15: Prova da urease.



Fonte: O autor. (A) Prova negativa; (B) Prova positiva.

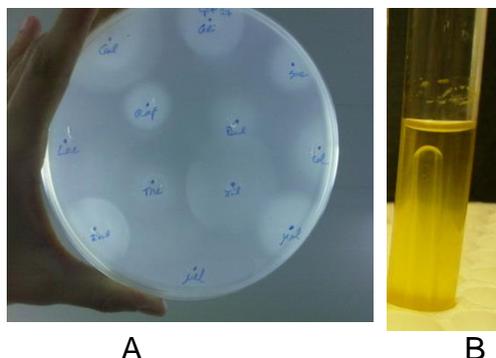
Dentre os isolados, 70% (26/37) apresentaram pigmento marrom ou negro após repique no ágar Níger (Figura 16A), caracterizando o complexo *neoformans*, cuja análise bioquímica mostrou semelhança fenotípica com relação às provas da termotolerância a 37°C e ausência de fermentação dos carboidratos (Figura 17B). Com relação à prova da assimilação de carboidratos (Figura 17A), alguns desses isolados apresentaram divergência somente com relação ao açúcar celbiose. Já com relação à quimiotipagem foi possível observar que 4 dos 26 isolados do complexo *neoformans* cresceram e alteraram a coloração do meio para a cor azul (Figura 16BC), indicando serem pertencentes a espécie *gattii* (Tabela 02).

Figura 16: Provas de identificação de *Cryptococcus* do complexo *neoformans*.



Fonte: O autor. (A) Morfologia de *Cryptococcus* do complexo *neoformans*, em ágar Níger; (B) Prova negativa de quimiotipagem em ágar CGB; (C) Prova positiva de quimiotipagem em ágar CGB.

Figura 17: Provas bioquímicas para identificação de *Cryptococcus* spp.



Fonte: O autor. (A) Assimilação de carboidrato, observada pela presença de halo de crescimento leveduriforme; (B) Não fermentação de carboidrato, observada pela ausência de bolha de CO₂ dentro do tubo de Durhan.

Os outros 30% (11/37) dos isolados não apresentaram pigmento marrom ou negro em ágar Níger, caracterizando isolados de espécies de *Cryptococcus* não pertencentes ao complexo *neoformans*. A análise bioquímica desses isolados mostrou diferenças fenotípicas com relação às provas de termotolerância e de assimilação de diferentes fontes de carboidratos (Tabela 03). Três dos 11 isolados que não fazem parte do complexo *neoformans* cresceram na temperatura de 37°. A utilização de açúcares como fontes de carbono, foi uma prova que variou um pouco, pois alguns isolados apresentaram assimilação negativa para lactose, melibiose e dulcitol, e outros, assimilação positiva para todos os açúcares (glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose, celobiose, inositol, xilose, rafinose e trealose). E com relação a utilização de fontes de nitrogênio, todos os isolados apresentaram positividade na assimilação da peptona, e para o nitrato de potássio (KNO₃) somente cinco isolados apresentaram positividade.

Tabela 02: Provas bioquímicas de espécies de *Cryptococcus* do complexo *neoformans* isolados de fezes de pombo, na cidade de Salvador, Bahia.

| Local de coleta | Número de isolados | Urease | Crescimento a 37°C | Ágar Níger | Ágar CGB | Assimilação | | | | | | | | | | | | Nitro | | Fermentação | | | | | | Espécie | |
|-----------------|--------------------|--------|--------------------|------------|----------|--------------|---------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|----------|--------|----------|----------|----------|--------------|---------|-------------|---------|----------|---------|-----------|----------|---------|----------------------|
| | | | | | | Carboidratos | | | | | | | | | | | | Carboidratos | | | | | | | | | |
| | | | | | | Glicose | Maltose | Sacarose | Lactose | Galactose | Melibiose | Celobiose | Inositol | Xilose | Rafinose | Trealose | Dulcitol | Peptona | Nitrato | Glicose | Maltose | Sacarose | Lactose | Galactose | Trealose | | |
| PCG | 10 | + | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. neoformans</i> |
| PTS | 04 | + | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. neoformans</i> |
| CEASA | 04 | + | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. neoformans</i> |
| | 04 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. gattii</i> |
| PMTS | 04 | + | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. neoformans</i> |

Fonte: O autor. (+) reação positiva; (-) reação negativa; (Nitro): Fontes de nitrogênio; (PCG): Praça do Campo Grande; (PTS): Porto de Salvador; (CEASA): CEASA; (PMTS): Praça Municipal Tomé de Sousa.

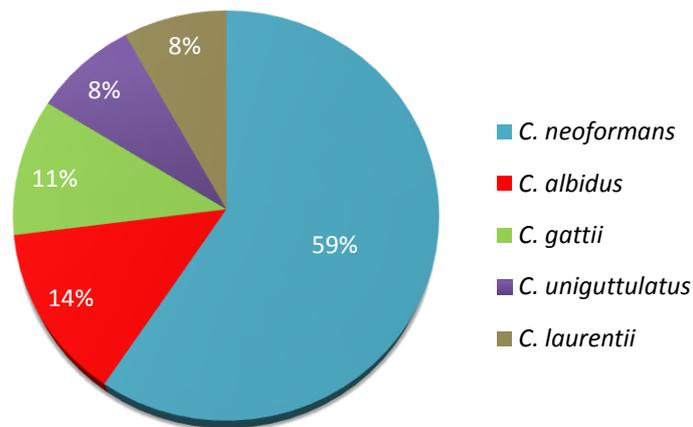
Tabela 03: Perfil bioquímico de isolados de *Cryptococcus* não pertencentes ao complexo *neoformans* isolados de fezes de pombo, na cidade de Salvador, Bahia.

| Local de coleta | Número de isolados | Urease | Crescimento 37°C | Ágar Níger | Ágar CGB | Assimilação | | | | | | | | | | | | | Nitro | | Fermentação | | | | | Espécies |
|-----------------|--------------------|--------|------------------|------------|----------|--------------|---------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|----------|--------|----------|----------|---------|-----------------|--------------|---------|-------------|----------|---------|-----------|---------------------|-------------------------|
| | | | | | | Carboidratos | | | | | | | | | | | Peptona | NO ₃ | Carboidratos | | | | | | | |
| | | | | | | Glicose | Maltose | Sacarose | Lactose | Galactose | Melibiose | Celobiose | Inositol | Xilose | Rafinose | Trealose | | | Dulcitol | Glicose | Maltose | Sacarose | Lactose | Galactose | Trealose | |
| PCG | 1 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. laurentii</i> | |
| | 1 | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. uniguttulatus</i> |
| PMTS | 2 | + | - | - | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. uniguttulatus</i> |
| | 2 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | <i>C. laurentii</i> |
| | 5 | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | * | - | - | - | - | - | - | <i>C. albidus</i> |

Fonte: O autor. (+) reação positiva; (-) reação negativa; (Nitro) Fontes de nitrogênio; (PCG) Praça do Campo Grande; (PTS) Porto de Salvador; (CEASA) Central de Alimentos da Bahia; (PMTS) Praça Municipal Tomé de Sousa.

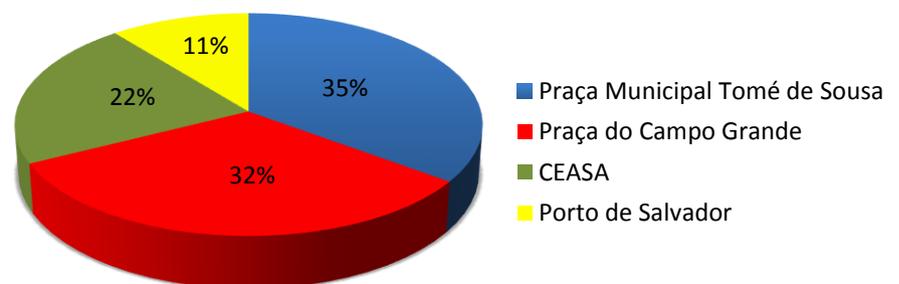
Como já foi dito anteriormente, 18,5% (37/200) das amostras foram positivas para o gênero *Cryptococcus* e de acordo com a identificação bioquímica, o perfil das espécies foi de 59,4% (22/37) de *C. neoformans*, 13,6% (05/37) de *C. albidus*, 10,8% (04/37) de *C. gattii*, 8,1% (03/37) de *C. uniguttulatus* e 8,1% (03/37) de *C. laurentii* (Figura 18). Estratificando essa positividade de isolamento entre os locais estudados, foi possível determinar 35,13% (13/37) da Praça Municipal Tomé de Sousa, 32,43% (12/37) da Praça do Campo Grande, 21,62% (08/37) da CEASA 10,81% (04/37) do Porto (Figura 19).

Figura 18: Espécies de *Cryptococcus* spp. isoladas de fezes de pombo, em Salvador, Bahia, 2013



Fonte: O autor.

Figura 19: isolamento de *Cryptococcus* sp. em quatro localidades da cidade de Salvador, Bahia, 2013



Fonte: O autor

Ao analisarmos os locais isoladamente, foi possível notar que a praça Municipal Tomé de Sousa foi o local que apresentou o maior percentual de isolamento de 26% (13/50), seguido da praça do Campo Grande com 24% (12/50), CEASA com 16% (08/50) e por fim o Porto de Salvador com somente 8% (4/50). Como pode ser visto na Tabela 04, a praça Tome de Souza foi o local que apresentou o isolamento de quatro espécies das cinco identificadas no estudo: *C. neoformans*, *C. laurentii*, *C. albidus* e *C. uniguttulatus*; a praça do Campo Grande três das cinco: *C. neoformans*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus*; a CEASA somente duas: *C. neoformans* e *C. gattii* e o porto de Salvador somente uma: *C. neoformans*. Dessa forma, foi possível diagnosticar que a espécie *C. neoformans* foi a espécie identificada nos isolados dos quatro locais do estudo; que as espécies *C. laurentii* e *C. uniguttulatus* em dois locais e que as espécies *C. gattii* e *C. albidus* somente em um dos locais, como mostrado na Tabela 04.

Tabela 04: Isolamento de *Cryptococcus* spp. ambientais por local estudado, Salvador, Bahia.

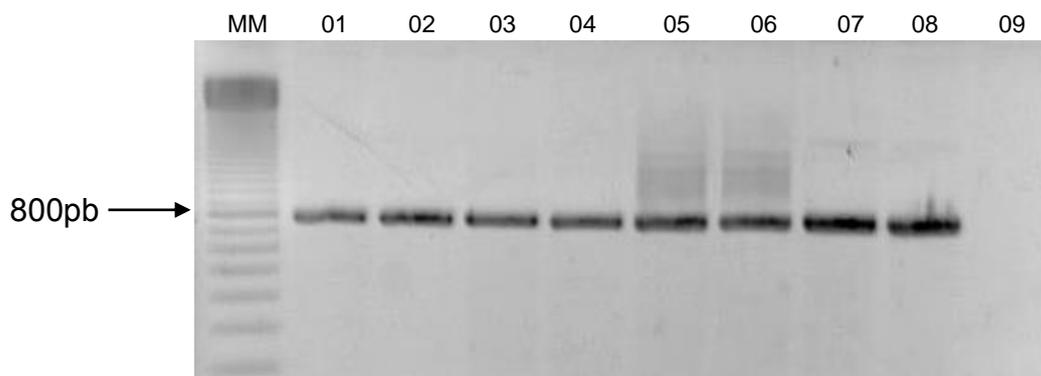
| Espécie \ Local | PCG | | PTS | | CEASA | | PMTS | | Total |
|-------------------------|-----|-------|-----|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | |
| <i>C. neoformans</i> | 10 | 45,45 | 4 | 18,18 | 4 | 18,18 | 4 | 18,18 | 22 |
| <i>C. gattii</i> | - | | - | | 4 | 100 | - | | 4 |
| <i>C. laurentii</i> | 1 | 25 | - | | - | | 2 | 75 | 3 |
| <i>C. albidus</i> | - | | - | | - | | 5 | 100 | 5 |
| <i>C. uniguttulatus</i> | 1 | 25 | - | | - | | 2 | 75 | 3 |
| Total | 12 | 32,43 | 4 | 10,81 | 8 | 21,62 | 13 | 35,13 | 37 |

Fonte: O autor. (PCG) Praça do Campo Grande; (PTS) Porto de Salvador; (CEASA) Central de Alimentos da Bahia; (PMTS) Praça Municipal Tomé de Sousa.

8.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

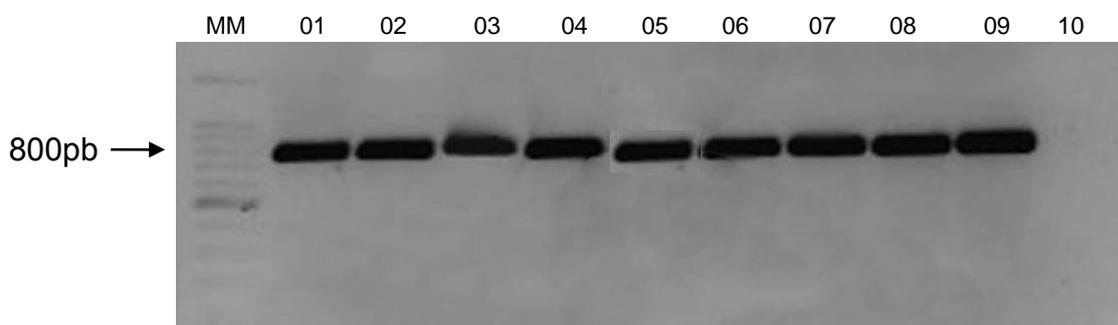
O gene *URA5* foi amplificado com sucesso a partir do DNA das cepas padrão moleculares de *Cryptococcus* (Figura 20) e dos isolados pertencentes ao complexo *neoformans*, *C. neoformans* e *C. gattii* como mostra figura representativa (Figura 21), com produtos de tamanho aproximado de 800 pares de bases. No entanto, para os isolados de espécies distintas do complexo *neoformans* o gene não foi amplificado, após várias tentativas.

Figura 20: Produto da amplificação do gene *URA5* de cepas padrão de *Cryptococcus* em gel de agarose a 1,5%.



Fonte: O autor. (MM) Marcador de peso molecular (Amersham – 100bp); 01-08 cepas padrão WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNIII), WM629 (VNIV), WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 175 (VGIII), WM 779 (VGIV), respectivamente; 09- controle negativo.

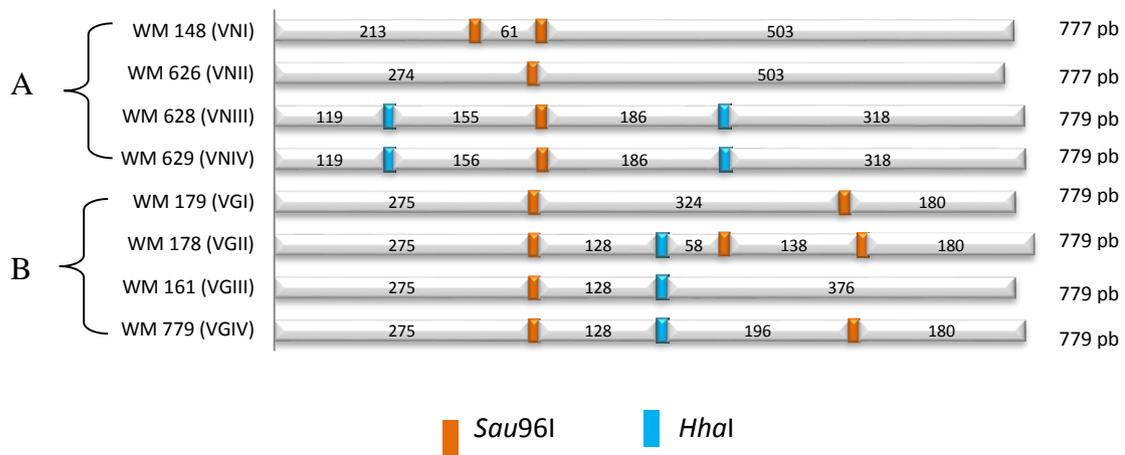
Figura 21: Produto da amplificação do gene *URA5* de isolados ambientais de *Cryptococcus* em gel de agarose a 1,5%.



Fonte: O autor. MM: Marcador de peso molecular Promega (100pb); isolados ambientais de *C. neoformans* (01 a 04); *C. gattii* (05 a 09); Controle negativo (10).

O estudo teórico da restrição dupla, com as enzimas *Sau96I* e *HhaI*, nas sequencias do gene *URA5* das cepas padrão foi possível gerar mapas com distintos perfis de restrição (Figura 22) para conferir com os perfis gerados nos géis.

Figura 22: Mapa de restrição do produto de PCR do gene *URA5* pelas enzimas *Sau96I* e *HhaI* dos padrões moleculares de *Cryptococcus*.



Fonte: O autor. (pb): pares de bases. (A): *C. neoformans*; (B): *C. gattii*

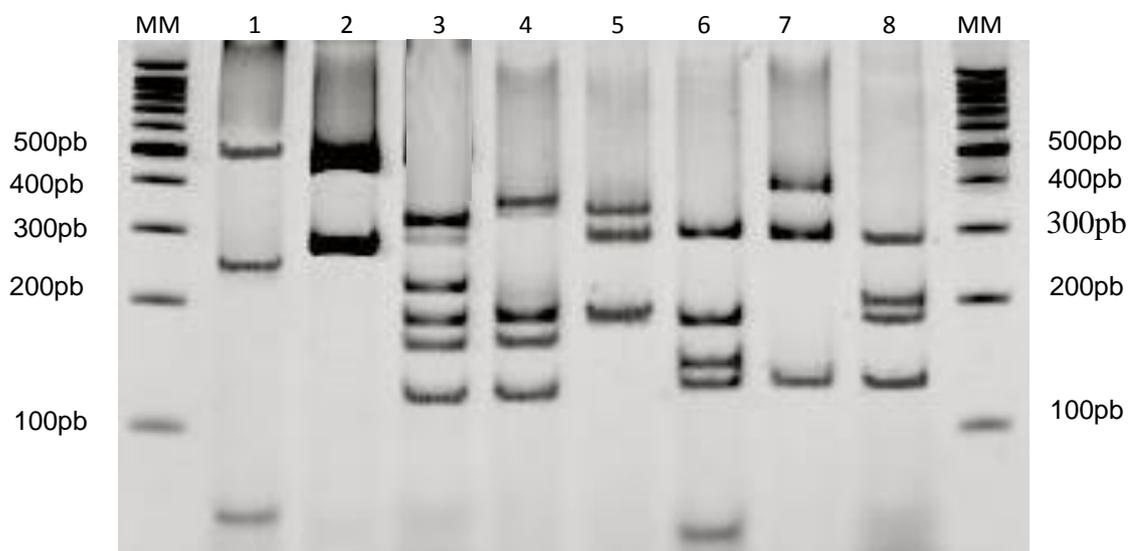
Na sequencia do padrão molecular WM 148 (VNI) nenhum sítio de restrição para a enzima *HhaI* foi encontrado, porém para a enzima *Sau96I* dois sítios foram localizados, gerando um perfil com três fragmentos de 61, 213 e 503 pares de base. Para a sequencia do padrão WM 626 (VNII) precede a mesma análise, com apenas um sítio para a enzima *Sau96I*, gerando um perfil de dois fragmentos de 274 e 503 pares de base. Quando o estudo foi feito nas sequencias dos padrões WM 628 (VNIII) e WM629 (VNIV), foram encontrados dois sítios para a enzima *HhaI* e somente um para *Sau96I*, exatamente nos mesmos locais, e esses cortes que levaram a um perfil idêntico, para as duas sequencias, de quatro 4 fragmentos de 119, 156, 186 e 318 pares de base (Figura 22 A).

Para os genótipos de *C. gattii* foram encontrados perfis distintos dos padrões moleculares de *C. neoformans*. Na sequencia do padrão WM 179 (VGI) somente a enzima *Sau96I* apresentou restrição, com dois sítios gerando um perfil de três fragmentos de 275, 324 e 180 pares de base. Um perfil com cinco fragmentos, de 58, 128, 138, 180 e 275 pares de base, foi desenhado para a sequencia do padrão WM 178 (VGII), pois foram encontrados três sítios para a enzima *Sau96I* e somente um para

a enzima *HhaI*. As duas enzimas juntas, com um sítio cada, geraram um perfil de três fragmentos de tamanhos de 128, 275 e 376 pares de base quando a sequência do padrão WM 161 (VGIII) foi analisada. Por fim, no estudo da sequência do padrão WM 779 (VGIV), foram encontrados três sítios, dois para a enzima *Sau96I* e um para a enzima *HhaI*, com um perfil de quatro fragmentos de aproximadamente 128, 180, 196 e 275 pares de bases (Figura 22 B).

Após corrida do gel (Figura 23), observou-se que, para os genótipos de *C. neoformans*, cada padrão gerou um perfil distinto. Foi observado um perfil de três fragmentos para o padrão WM 148 (VNI) de aproximadamente 50, 220 e 500 pares de base; para o padrão WM 626 (VNII), perfil de dois fragmentos de aproximadamente 260 e 500 pares de base; cinco bandas estimadas em 120, 160, 170, 210 e 310 pares de base para o padrão WM 628 (VNIII) e quatro fragmentos de aproximadamente 120, 160, 170 e 330 para o genótipo WM629 (VNIV) (Figura 23).

Figura 23: Perfil de RFLP do gene *URA5* obtido por restrição dupla com *Sau96I* e *HhaI* de padrões moleculares *Cryptococcus*, em gel de poliacrilamida a 8%.



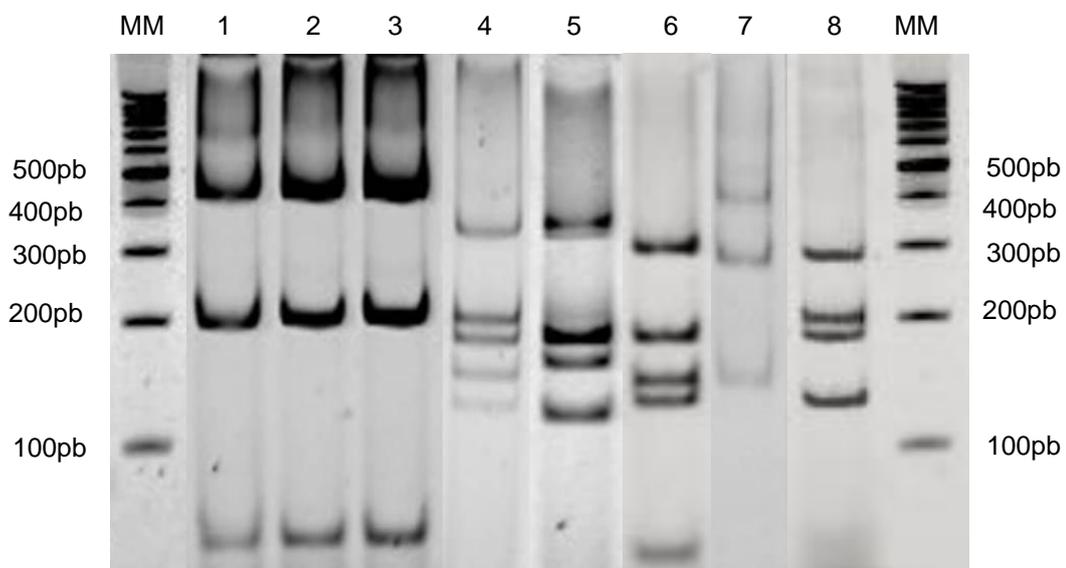
Fonte: O autor. (MM) Marcador de peso molecular (Promega–100bp); 01-08 cepas padrão WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNIII), WM629 (VNIV), WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 175 (VGIII), WM 779 (VGIV), respectivamente.

Para os genótipos de *C. gatti*, semelhantemente ao estudo teórico, foram gerados perfis distintos de PCR-RFLP do gene *URA5* com as enzimas *Sau96I* e *HhaI*. Três

fragmentos de aproximadamente 180, 280 e 320 pares de base, foram observados para o padrão WM 179 (VGI); um perfil de cinco bandas estimadas em 50, 130, 140, 200 e 260 pares de base para o genótipo WM 178 (VGII); um de três fragmentos aproximados em 120, 280 e 380 pares de base para o padrão WM 175 (VGIII) e quatro fragmentos de tamanhos aproximados a 120, 180, 200 e 280 pares de base para o padrão WM 779 (VGIV) (Figura 23).

Quando a análise foi feita com os 26 isolados do complexo *neoformans*, 14 deles apresentaram perfis semelhantes, os quais geraram três fragmentos de aproximadamente 50, 200 e 500 pares de base; três isolados apresentaram perfil com bandas estimadas em 120, 160, 170, 210 e 310 pares de base; cinco isolados geraram um perfil com quatro fragmentos de aproximadamente 120, 160, 170 e 330 pares de base; dois isolados apresentaram bandas de aproximadamente 50, 130, 140, 200 e 260 pares de base; um isolado gerou três fragmentos aproximados em 120, 280 e 380 pares de base; um gerou quatro fragmentos de tamanhos aproximados a 120, 180, 200 e 280 pares de base, como pode ser observado na Figura 24.

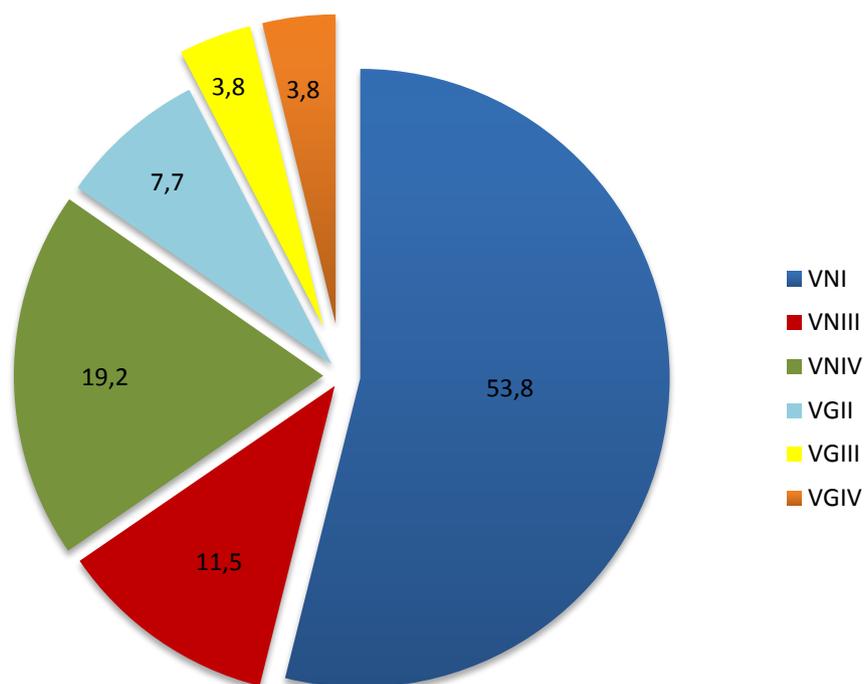
Figura 24: Perfil de RFLP do gene *URA5* por restrição dupla com *Sau96I* e *HhaI* de isolados ambientais de *Cryptococcus* em gel de poliácridamida a 8%.



Fonte: O autor. (MM) Marcador de peso molecular (Promega – 100bp); Isolados ambientais de *Cryptococcus* sp. (01 a 03): VNI. (04): VNIII. (05): VNIV. (06): VGII. (07): VGIII. (08): VGIV.

Desta forma, foi possível caracterizar os isolados de *Cryptococcus* do complexo *neoformans* em 53,8% (14/26) com genótipo VNI; 19,2% (05/26) como genótipo VNIV, e 11,5% (03/26) genótipo VNIII, 7,7% (02/26) como genótipo VGII, 3,8% (01/26) como genótipo VGIII e 3,8% (01/26) do genótipo VGIV, como mostrado abaixo.

Figura 25: Perfil de genótipos de *Cryptococcus* do complexo *neoformans* isolados de excretas de pombos em Salvador, BA.



Fonte: O autor.

9 DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho mostram que o percentual de isolamento de leveduras do gênero *Cryptococcus* de 18,5%, em fezes de pombos em quatro locais de grande circulação de pessoas da cidade de Salvador, foi considerado por nós um valor alto. Fato que nos remete a uma preocupação em nível de saúde pública, tendo em vista ser essa levedura um fungo oportunista com grande potencial patogênico.

Vários autores demonstraram diferentes frequências de isolamento da levedura proveniente de amostras ambientais, como excrementos de pombos e de outras aves, ocos de árvores, vegetais, folhas caídas, dentre outros. As informações a cerca da frequência de isolamento do fungo, em diferentes partes do mundo, contribuem para avaliar epidemiologicamente o gênero *Cryptococcus*, além de favorecer o entendimento dos fatores que possam estar relacionados a sua sobrevivência e desenvolvimento nos diferentes ambientes.

Um trabalho realizado na Colômbia, com isolamento de *Cryptococcus* em excretas de pombos, relata um percentual acima do encontrado no presente estudo, com a presença de 49,6% de *Cryptococcus* em 119 amostras de excretas de pombos, demonstrando forte positividade em perímetro urbano e grande importância de empreender campanhas para evitar o acúmulo de excretas desses animais (CAICEDO *et al.*, 2000). Esse percentual e o do presente estudo foram superiores aos encontrados por Lopez-Martinez e colaboradores (1995), na cidade do México, e Granados e colaboradores (2005), em Bogotá, com 9,5% e 7,9%, respectivamente, ambos de excretas secas de pombos.

O desenvolvimento de *Cryptococcus* em excretas de aves está ligado à presença de um ambiente favorável ao crescimento deste fungo, através da sua adaptação bioquímica, que lhe confere a habilidade de assimilação de creatinina e também do ácido úrico e das purinas como fonte de nitrogênio, compostos esses, em abundância nesse nicho ecológico (NARDELLI *et al.*, 2005), bem como a fatores climáticos que favoreçam seu desenvolvimento, como altos índices de umidade relativa do ar, calor excessivo, e proteção aos altos índices de insolação.

Rosário e colaboradores (2010) estudaram *swabs* do Inglúvio e excretas de pombos em gaiolas, nas ilhas Canárias, mostrando 24,47% de isolamento de *Cryptococcus* em amostras dos Inglúvios, com a frequência de 9,66% para a espécie *C. neoformans*, 7,2% para *C. uniguttulatus*, 6,9% para *C. albidus* e 0,6% para *C. laurentii*. Já nas amostras de excretas, o isolamento foi de quase o dobro, 47,13%, com frequência de 33,9% de *C. neoformans*, 5,17% de *C. uniguttulatus*, 4,59% de *C. laurentii* e 3,44% de *C. albidus*. O perfil desse estudo é bastante semelhante ao perfil traçado nesse estudo, pois também foi possível isolar e identificar *C. neoformans*, *C. albidus*, *C. uniguttulatus* e *C. laurentii*.

No Brasil, são poucos os estudos que abordam isolamento ambiental de *Cryptococcus* e os percentuais de isolamento da levedura são bastante variados. Na região Sul, Reolon e colaboradores (2004), na capital do Rio Grande do Sul, apresentaram 100% de isolamento em amostras de excretas de pombos de cinco praças. Para os autores essa elevada prevalência ambiental traz à luz a questão de minimizar o risco de exposição à microfocos de *C. neoformans* em locais de circulação pública através da vigilância das condições de higiene e limpeza de excretas, aeração, iluminação ventilação adequadas, bem como monitorização de locais de riscos.

No mesmo estado, porém, somente a partir de amostras de excretas de diversas espécies de aves do Parque Zoológico, Abegg e colaboradores (2006) obtiveram um percentual de 18,2%, semelhante ao presente estudo, identificando porém as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Já no estado do Paraná, Lugarini e colaboradores (2008) mostram uma positividade maior de 25,53% de isolamento, somente da espécie *C. neoformans* de fezes, cloaca e Inglúvio de passeriformes e psittaciformes de cativeiros. Esse isolamento de *Cryptococcus* da cloaca dessas aves, no entanto, vem de encontro aos trabalhos de Rosário e colaboradores (2005) e Cafarchia e colaboradores (2006) que não tiveram o mesmo sucesso e, dessa forma, não confirmam a hipótese de colonização desses pássaros por *Cryptococcus*. Sorrel e Ellis (1996) e Lin e Heitman (2006) explicam esse resultado negativo pela má condição de crescimento do fungo, possivelmente pela elevada temperatura corporal das aves, que gira em torno de 42°C.

Dos trabalhos da região Sudeste, o de Passoni e colaboradores (1998), no Rio de Janeiro, de forma contrária, mostra 3,4% de positividade em amostras de excretas coletadas de aves em cativeiro, como canários, periquitos e outros psitacídeos, indi-

cando uma correlação significativa entre a presença de aves em cativoiro no ambiente doméstico e a probabilidade de sua contaminação por *C. neoformans*.

Mais recentemente, Baroni e colaboradores (2006), avaliando a presença de *C. neoformans* em igrejas do Rio de Janeiro, detectaram 37,8% em amostras de fezes de pombos e em de 4,9% em amostras de ar. Pode ser que a ocorrência da levedura nas torres das igrejas e nas áreas adjacentes possa estar relacionada às condições ambientais que favorecem ao crescimento do fungo, como temperatura moderada do ar, grande quantidade de excreta de pombos, e abrigo contra a radiação solar.

Uma positividade de 26,3% foi demonstrada em excretas de pombos na cidade de São Paulo para a espécie *C. neoformans*. O estudo também isolou *C. gattii* de folhas caídas e troncos de árvores em decomposição do Parque do Ibirapuera, onde existem exemplares de *Eucalyptus camaldulensis*, um habitat natural para essa espécie. Esses resultados chamam atenção que ambas as espécies estão presentes no ambiente urbano da cidade de São Paulo em locais onde um grande número de pessoas circula diariamente (MONTENEGRO e PAULA, 2000).

No interior do estado de São Paulo, na cidade de Santos, Soares e colaboradores (2005) isolaram *C. neoformans* var. *grubii* em 13,9%, *C. albidus* em 12,6% e *C. laurentii* em 8,9% de excretas de pombos e somente a espécie *C. albidus* em 5,4% de amostras de ar. Porém, na Cidade de Votuporanga, Rezende e colaboradores (2008) não conseguiram isolamento em amostras de excretas de pombos. Já em Ribeirão Preto, Pedroso e colaboradores (2009) mostraram percentuais de 36,5% de *C. neoformans* (12 de excretas e 3 de amostras do ar), 36,5% de *C. albidus* (12 de excretas e 3 de amostras do ar), 22% de *C. laurentii* (7 de excretas e 2 de amostras do ar) e 4,9% de *C. uniguttulatus* (somente de excretas).

Baltazar e Ribeiro (2008) apresentam percentuais pequenos, em relação aos apresentados acima, de 1,2% de *C. neoformans*, 1,2% de *C. gattii* e 0,6% de *C. laurentii*, na cidade de Vitória no estado do Espírito Santo, mostrando que espécies não pertencentes ao complexo *neoformans* já vem sendo isoladas de amostras de madeira.

Os estudos das cidades de Santos, Ribeirão Preto e Vitória corroboram este estudo com relação ao isolamento de espécies não pertencentes ao complexo *neoformans*

trabalho já que apresentam isolamento de *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus* em excretas de pombos, juntamente com espécies do complexo *neoformans*.

Andrade-Silva e colaboradores (2010) obtiveram um percentual alto de *C. neoformans* (43,8%) e *C. laurentii* (23,3%) isoladamente e um percentual menor de 10,9% das duas espécies juntas em excretas de pombos coletadas em áreas externas do hospital da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba no estado das Minas Gerais. Além de isolarem *C. laurentii* de detritos de árvores em 45% das amostras do estudo.

O isolamento de *C. neoformans* não é relatado somente em excretas de pombos. Em Campo Grande, Mato Grosso, Filiú e colaboradores (2002) isolaram *C. neoformans* em 50%, das amostras de excretas de aves, como canário-belga, canário-doreino, canário-da-terra-verdadeiro, periquito-australiano, calopsita, agapornis, mandarim, pombo-rabo-de-leque, pombo-africano e papagaio. E em Goiás, na cidade de Goiânia, Kobayashi e colaboradores (2005) também apresentam a espécie *C. neoformans* em 20,3% em amostras fecais de pombos e em 14,3% em amostras de eucaliptos.

Na região norte do país, somente um artigo do estado do Pará, mostra a presença de *C. gattii* e *C. neoformans* em apenas onze amostras ambientais na cidade de Belém (COSTA *et al.*, 2009)

Na região nordeste, Costa e colaboradores (2009), na cidade de Fortaleza, estado do Ceará, identificaram 27,8% de *C. neoformans* e 8,3% de *C. laurentii* de excrementos de pombos; porém nenhum isolado de amostras provenientes da cloaca. Na Bahia, Santana e Costa (2007) mostram que isolaram 50% de *C. neoformans* de fezes de pombos de locais públicos de Salvador. Apesar desse percentual ser mais elevado do que o apresentado em nossos resultados, os autores somente conseguiam isolar a espécie *C. neoformans*.

No estudo que deu origem a este trabalho, Souza e colaboradores (2010) demonstraram um percentual menor (12%) de isolamento de *Cryptococcus* a partir de fezes de pombo coletadas nos mesmos locais estudado no presente estudo, porém os autores identificaram dois isolados de *C. gattii*, um na Praça Municipal Tomé de Souza e outro na CEASA, fato que caracteriza o primeiro isolamento dessa espécie de fon-

te ambiental em nosso estado e corrobora este estudo que isolou *C. gattii* de amostras da CEASA. Os isolados da espécie *C. neoformans* foram encontrados com percentuais semelhantes aos deste trabalho no porto de Salvador e na CEASA, acima na Praça Municipal Tomé de Sousa, 29% frente a 18,18%, e bem abaixo na Praça do Campo Grande, 29% frente a 45,45%.

Os resultados aqui apresentados trazem à luz o isolamento de cinco diferentes espécies de *Cryptococcus* de locais públicos associadas a excretas de pombos, o que leva a crer que essas espécies estão se propagando pela cidade e encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento. O isolamento de *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus* é o primeiro a ocorrer no estado da Bahia, evidenciando nicho biológico propício para demais espécies do gênero e a necessidade de novos estudos, envolvendo outros tipos de amostras, como do ar atmosférico, excretas de demais aves, e de ocos de árvores, para traçar a epidemiologia de novas espécies consideradas patógenos emergentes, possibilitando uma maior vigilância ambiental dessas leveduras. Somado a isso, *C. gattii* foi, pela segunda vez, isolado desse tipo de amostras na Bahia, desmistificando a ideia de que essa espécie está somente relacionada a ocos de árvores. Além disso, *C. gattii* foi novamente isolado da CEASA, dessa vez, em quatro amostras e não somente em uma, como anteriormente, o que sugere uma área possivelmente endêmica para esta espécie.

Muitos trabalhos já evidenciaram a constante presença de *C. neoformans* em excretas de aves, e por muito tempo, a espécie *C. gattii* foi estritamente associada a árvores de *Eucalyptus camaldulensis* (ELLIS e PFEIFFER, 1990). Os primeiros relatos de *C. gattii* de amostras clínicas humanas originaram das regiões tropicais e subtropicais, incluindo partes da África, Europa, Austrália, Estados Unidos e América do Sul. Isso representou uma impressão de longa data que a espécie seria um patógeno limitado a região tropical e subtropical (FROMTLING *et al*, 1982; KWON-CHUNG e BENNETT, 1984; SORRELL, 2001). Apesar de também ser capaz de assimilar a creatinina, *C. gattii*, geralmente, não está associado às excretas de aves, devido, possivelmente, à regulação diferenciada de enzimas responsáveis por esse metabolismo (CASALI *et al.*, 2003).

Entretanto, outros recentes isolamentos em países de regiões temperadas como Estados Unidos, Canadá, Europa e Ásia têm expandido as áreas de incidência de *C. gattii* (SORRELL *et al.*, 2001). Essa espécie tem sido relatada em diversas partes do

mundo, como Argentina, Áustria, Brasil, Canadá, China, Índia, Itália, Japão, Coréia do Sul, Holanda, Espanha, África do Sul, Reino Unido, Estados Unidos e República Democrática do Congo, e esta lista aumenta a cada ano. Porém, o estudo de Cogliatti (2013) mostra que, em todo o mundo, *C. neoformans* é definitivamente mais frequente, podendo chegar a oito vezes mais que *C. gattii* (88,6% versus 11,4%).

Staib e colaboradores (1964) já haviam demonstrado que a ocorrência de *C. neoformans* e outras espécies do gênero em excretas de aves não é acidental, já que as purinas, especialmente ácido úrico, a xantina e guanina, componentes da urina, são em maior ou menor grau assimilados por todas as espécies. Além de ter sido demonstrada a associação saprofítica de *C. neoformans* com madeira em decomposição, o que antes era associado somente à espécie *C. gattii* (CASADEVALL e PERFECT, 1998; LEVITZ *et al.*, 1991).

A concentração desse fungo nas excretas também remete a uma preocupação. A média de UFC/grama de excreta foi de 10.238,4 para a Praça Municipal, sendo que este local também foi o que mais apresentou índice de isolamento para a levedura (13/37). A CEASA apresentou média de 8.987,5 UFC/g, o Porto 8.712,5 UFC/g e a Praça do Campo Grande apresentou 6.422,6 UFC/g. São valores muito altos, demonstrando uma alta concentração de *Cryptococcus* nos locais estudados. Essa análise evidencia a necessidade de medidas de controle e prevenção nos locais estudados, reforçando o perigo que excretas de pombos representa em meio a população nos diversos locais públicos.

Alguns autores defendem ainda a ideia de que excretas de aves não infectadas se tornariam infectadas quando expostas ao ar que contenha células aero solubilizadas de *Cryptococcus* (CASADEVALL e PERFECT, 1998). Baseado nessa hipótese, Krockenberger e colaboradores (2002), em seus estudos, observaram que coalas sem colonização nasal por *C. gattii*, quando transferidos para locais com alta prevalência ambiental dessa espécie, tornavam-se persistentemente colonizados. Fato que pode dar suporte a suposição de contaminação ambiental das excretas, mesmo havendo necessidade de novas pesquisas para que essa hipótese possa ser confirmada.

Com relação à exposição humana a excretas de animais, alguns trabalhos já relatam a criptococose associada a esse fato, como o de Nosanchuk e colaboradores (2000),

que descreveram a ocorrência da criptococose em uma paciente que sofrera transplante renal e estabelecia contato com uma cacatua (ave da ordem dos psitaciforme, pertencente à família Cacatuidae).

Já Shrestha e colaboradores (2004) relataram a transmissão zoonótica de criptococose pulmonar, a partir de uma calopsita (ou caturra, *Nymphicus hollandicus*, ave que pertence à ordem dos psitaciformes e à família Cacatuidae) a um paciente recebendo terapia com inibidor de TNF alfa (antagonista de fator de necrose tumoral alfa).

Lagrou e colaboradores (2005) reportaram um caso de meningite criptocócica em paciente imunocompetente do sexo feminino após exposição a excretas de ave de estimação da espécie Pega-rabuda (ou Pega-rabilonga, da família Corvidae) e observaram que ambos os isolados clínicos e da excreta da ave apresentavam similaridade bioquímica, cariotípica e genética. Esses autores ilustraram, ainda, que não é necessário o contato direto com aves de estimação para propiciar uma exposição ao agente e, mesmo em contatos limitados, pode-se evidenciar a aquisição da doença, até mesmo em pessoas imunocompetentes.

Narayan e colaboradores (2000) relataram criptococose cutânea por *C. albidus* em humanos que apresentava doença de base. Já Labrecque e colaboradores (2005) relataram o primeiro caso documentado de infecção sistêmica por essa mesma espécie em um cão da raça Pinscher.

O isolamento de *C. laurentii* como agente causador de criptococose também é raro. Em Lisboa, ao estudar 46 cães com quadro de otite por levedura, constatou-se que 13,1% apresentaram essa espécie como agente etiológico (BERNARDO *et al.*, 1998). Em aves da espécie *Lamprotornis chalybaeus*, essa levedura foi associada à perda de plumagem (DECOSTERE *et al.*, 2003). Cheng e colaboradores (2001) relataram um caso de fungemia em neonato causada por *C. laurentii*, que também foi responsável por um caso de meningoencefalite em paciente com HIV (MANFREDI *et al.*, 2006).

Shankar e colaboradores (2006), na Índia, relatam um caso de criptococose pulmonar causada por *C. laurentii* em um paciente diabético que estava em tratamentos antirretroviral para HIV e também para tuberculose. A baciloscopia revelou células

leveduriformes capsuladas que foram identificados como *C. laurentii*. Naquele mesmo país, Kulkarni e colaboradores (2012) reportaram um caso de paciente com criptococose cutânea primária causada por *C. laurentii* após transplante renal na cidade de Bangalore.

Pan e colaboradores (2012) apresentaram um caso de meningite criptocócica que ocorreu na China, causada por *C. uniguttulatus* resistente a azóis e fluocitosina, evidenciando cepas já com mecanismos de resistência frente aos antifúngicos mais empregados para o tratamento da doença.

Apesar do grande interesse, a identificação de espécies de *Cryptococcus* de origem ambiental, em todo o mundo são, raramente, sujeitas a análise molecular. Sendo que informações aprofundadas como estas podem ajudar a entender quais genótipos podem estar envolvidos em determinadas regiões, bem como entender melhor o potencial de virulência, susceptibilidade frente a antifúngicos, e manifestações clínicas das doenças que estas cepas podem causar. Faz-se necessário, então, cada vez mais, identificar espécies de *Cryptococcus* em nível molecular, para que seja possível traçar um perfil epidemiológico adequado para essa levedura e contribuir para a vigilância ambiental dessas leveduras.

Não é de hoje que autores demonstram interesse na identificação de genótipos de *Cryptococcus*. Em 1999, Meyer e colaboradores ao traçarem um perfil de isolamento para genótipos de *C. neoformans* em países como o Brasil, Estados Unidos, Argentina, Itália, Índia, países do sul da África, Tailândia, Papua Nova Guiné, Nova Zelândia e Austrália, evidenciaram que a maioria dos isolados pertenciam ao genótipo VNI (78%), seguido de 18% de VNII, 3% de VNIV e 1% de VNIII. Até aquele momento, estudos apresentavam discreta identificação genotípica, sendo a Austrália o único país a já apresentar todos os tipos moleculares para *C. neoformans*.

Já Springer e Chaturved (2010), ilustraram a presença global de genótipos da espécie *C. gattii*, onde já se percebia que, entre isolamento clínico e ambiental, essa espécie já estava muito mais evidente. É o que podemos ver nas Américas, Europa, Países do sul da África, Austrália e Nova Zelândia e Sul da Ásia. Esse estudo serviu para demonstrar que os genótipos VGI e VGII são prevalentes em todo o mundo, enquanto que VGIII e VGIV apresentam menor isolamento.

Hoje, o que a literatura aponta, são vários genótipos em todo o globo, reflexo do emprego de várias técnicas de identificação molecular, como as técnicas de PCR, RAPD, RFLP, e AFLP, ou do retrato de uma real dispersão de leveduras de *Cryptococcus* em todo o mundo. Meyer e Trilles (2010) mostraram que a infecção pelos quatro tipos moleculares existentes de *C. gattii* é substancialmente menos comum, em torno de 20%, enquanto que as infecções causadas pelos também quatro tipos moleculares de *C. neoformans* se distribuem nos 80% restantes. Os resultados desse estudo mostram que a predominância de 53,8% para o genótipo VNI corrobora aos estudos Meyer e colaboradores (1999) e Meyer e Trilles (2010), que genotiparam o VNI por todo o mundo.

Na realidade, o genótipo da espécie *C. gattii* passou a ser investigado após um surto de criptococose no Canadá. Esse estudo mostra que dos 95,2% dos isolados clínicos, 83,3% dos isolados veterinários e todos os isolados ambientais o genótipo encontrado foi do tipo VGII (KIDD *et al.*, 2004). Prevalência que se repete em de *C. gattii* isolados de fontes ambientais do Canadá e noroeste dos Estados Unidos (KIDD *et al.*, 2007) e no sudoeste de Porto Rico (LOPERENA-ALVAREZ *et al.*, 2010).

Na Colômbia, Escandón e colaboradores (2006) já encontram outros tipos moleculares e relatam que, dos *Cryptococcus* isolados de excretas de pombos, 98,2% foram do genótipo VNI e 1,8% do VNII. Já dos isolados obtidos de material vegetal e do solo a frequência foi de 53,5% do tipo VGII, 28,7% do VNI, 11% do VGIII, 6,3% do VGIV e 0,5% do VGI.

Frasés e colaboradores (2008), na Espanha, mostram uma frequência de 84,7% de *C. neoformans* em contraste aos 15,3% de *C. gattii*, de fontes diversas. Nesse estudo foi possível observar que o genótipo VNI é de fato o mais frequente, com 33%, seguido de 28,9% de VNIII, 14,4% de VGI, 12,4% de VNIV e 11,3% de VNII.

De um estudo amplo desenvolvido com amostras ambientais e clínicas provenientes de diversos estados brasileiros, os autores observam que de forma global foi possível detectar os tipos moleculares mais comuns no País são VNI (64,0%) e VGII (21,0%). Porém, quando os dados são estratificados por macro regiões, essa frequência é observada de forma diferente, pois nas regiões Norte e Nordeste do país o predomínio é de VGII, em torno de 64%; e para as regiões Centro-Oeste, Sudeste

e Sul o mais frequente, de fato, é o VNI, por volta de 75,4%. Os outros genótipos foram encontrados em menor proporção (TRILLES *et al.*, 2008)

O tipo molecular VGII encontrado na presente pesquisa é predominante na região Norte e Nordeste do Brasil (SANTOS *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2009), em Porto Rico (LOPERENA-ALVAREZ *et al.*, 2010), no noroeste dos Estados Unidos (KIDD *et al.*, 2007) e coincide com o tipo responsável pelo surto no Canadá (KIDD *et al.*, 2004), sugerindo assim a possibilidade de dispersão do *Cryptococcus gattii* VGII pelo continente americano partindo do Canadá e estando presente até mesmo na região Centro-Oeste do Brasil. Os tipos VGIII e VGIV também foram relatados.

Dados nacionais de caracterização genotípica de *Cryptococcus* de amostras ambientais são escassos. Alguns estudos demonstram a prevalência de VNI e VGII mesmo em fontes ambientais (LUGARINI *et al.*, 2008; TRILLES *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010). Entretanto outros tipos como o VGI e VNII também tem sido descritos (ABEGG *et al.*, 2006; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2010).

Essa tipagem é também evidenciada em Casali e colaboradores (2003), no Rio Grande do Sul, que determinaram os genótipos de *C. neoformans*, de fontes clínicas e ambientais, em 83,9% de VNI 7,3% de VNIV; e todos os isolados da espécie *C. gattii* como VGIII. Já Ribeiro e Ngamskulrungraj (2008), no estado do Espírito Santo, e Diniz e colaboradores (2009), no estado de São Paulo, constataram que 100% dos isolados pertenciam ao tipo molecular VNI, seja em amostras de excretas de pombos ou de fontes ambientais diversas, respectivamente. O mesmo foi verificado em Uberaba, Minas Gerais, quando Ferreira-Pain e colaboradores (2010), em excretas de pombos, detectaram que 95% dos isolados apresentaram genótipo VNI e 5% VNII. Esses últimos autores, ao estudarem sete isolados da espécie *C. laurentii* verificaram perfis semelhantes entre si e específicos, não permitindo fazer distinção entre essas espécies.

O mesmo tipo molecular entre os isolados clínicos e ambientais pode sugerir uma associação entre excretas de pombos e fonte de contaminação no meio ambiente. É o que mostra o estudo de Souza e colaboradores (2010), em Goiânia, que investigaram isolados de origem clínicas, obtidas a partir do líquido cefalorraquidiano de pacientes com SIDA, e de origem ambientais, isoladas de excretas de pombos e de ár-

vores de eucalipto. O trabalho mostra a determinação molecular de VNI, *C. neoformans* var. *grubii*, em isolados clínicos e ambientais, enquanto o tipo VGIII, *C. gattii*, somente em isolados clínicos.

Costa e colaboradores (2009), no estado do Pará, foram uns dos primeiros autores a reportarem a ocorrência molecular de VNI e VGII de amostras ambientais. No entanto, Freire e colaboradores (2012) investigando isolados de pacientes internados em hospital no estado do Amazonas apresentou que 68,4% foram do tipo VNI, 29,8% do VGII e 1,8% do tipo VNII. Esses dois estudos podem servir de base para comprovar que os perfis de isolamento ambiental são, em sua maioria, semelhantes aos identificados em pacientes, o que faz levar a crer que estes possam ser os grandes responsáveis pelas infecções e humanos.

Na Bahia, a determinação genotípica de *Cryptococcus* havia sido realizada, até então, somente para leveduras de origem clínica. Matos e colaboradores (2012) caracterizaram *Cryptococcus* oriundos de casos de meningite em humanos e mostraram 98% de *C. neoformans* como VNI, 2% como VNII, e 100% dos isolados de *C. gattii* pertencentes ao genótipo VGII, dados que corroboram estes resultados. Esses dois genótipos, VNI e VGII, parecem apresentar uma virulência maior que outros, já que mesmo com demais genótipos nessa cidade, estes são relatados como os principais associados à infecção em todo o mundo.

10 CONCLUSÕES

1. A positividade para *Cryptococcus* nas amostras encontradas nos locais de estudo, Porto, CEASA, Praça Municipal Tomé de Souza e Praça do Campo Grande, associado ao grande número de pombos (*Columba livia*), apontam para a existência de riscos sanitário/ambiental que devem servir de alerta aos órgãos de vigilância sanitária em nosso estado.
2. Esse trabalho traz pela primeira vez a identificação de *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus* de excretas de pombos (*Columba livia*).
3. A presença de *C. gattii* em fezes de pombos, pela segunda vez, isolado na Central de Abastecimento de Salvador, derruba a teoria de que essa espécie está somente relacionada a ocos de árvores e que esse local deve ser observado como um possível local endêmico para aquela espécie.
4. A identificação molecular evidenciou a existência de seis genótipos de *Cryptococcus* em nossa cidade, sendo eles VNI, VNIII, VNIV, VGII, VGIII e VGIV. Esse é o primeiro estudo de caracterização molecular de *Cryptococcus* isolados de fontes ambientais em nosso estado.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento do número de casos de micoses invasivas nos últimos anos, também devido ao aumento do número de doentes imunocomprometidos, como é o caso dos doentes infectados com o vírus HIV e doentes transplantados, entre outros, tem feito com que estas infecções se tornem cada vez mais relevantes para a saúde pública. A criptococose é uma das micoses mais comuns e letais nos doentes com SIDA.

Cryptococcus já vem sendo uma levedura frequentemente isolada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. De longa data, essa levedura é responsável, em nosso país, por uma considerável morbimortalidade em pacientes com comprometimento imunológico, bem como também em pacientes imunocompetentes. E com o aumento da incidência da SIDA, dos transplantes de órgãos, e de demais doenças de base, esse problema pode trazer prejuízos a saúde dos brasileiros. Associado a isso, a maciça presença de pombos em diversas partes do nosso país reflete na possibilidade desta levedura estar espalhada pelos centros de distribuição e comércio de alimentos, praças públicas, praias e avenidas de diversas cidades do Brasil.

As ações de redução do risco de contaminação por *Cryptococcus*, nas áreas estudadas, de forma geral, envolvem a adoção de medidas que primariamente atuem na redução dos vetores do fungo. Tais medidas passam fundamentalmente pela erradicação dos recursos responsáveis pela manutenção das populações de pombos como disponibilidade alimentar, fontes de água e locais de abrigo. Associado a essas, medidas de higiene e limpeza adequada dos locais de deposição das excretas também são fundamentais para a redução da proliferação do fungo em questão, com posterior monitoramento das medidas mencionadas.

Além disso, e talvez mais importante, seja necessária a implantação de um programa de alta abrangência tratando de aspectos que promovam uma conscientização da população, para que os cidadãos entendam o real problema que essa levedura pode trazer, e assim, evitar alimentar ou oferecer abrigo a pombos e demais aves que possam apresentar excretas com potencial para desenvolvimento de *Cryptococcus*.

A redução dos efetivos dessas aves, através de controle e manejo das populações, somente seria recomendada em situações extremas, caso as medidas mencionadas anteriormente não surtisse efeito e fossem esgotadas todas as demais formas de controle empregadas. Para isso, trata a Instrução Normativa Nº 141 de 19 de dezembro de 2006 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que regulamenta o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva, onde populações de espécies sinantrópicas podem ser declaradas nocivas pelos órgãos federal ou estadual do meio ambiente ou, ainda, pelos órgãos da saúde e agricultura, quando assim acordado com o órgão do meio ambiente. A eliminação direta de indivíduos das espécies nocivas deve ser efetuada somente quando tiverem sido esgotadas as medidas de manejo ambiental competente nos respectivos Estados.

A compreensão dos aspectos ecológicos de *Cryptococcus* pode fornecer dados importantes de como as partículas infecciosas são produzidas, e como é a propagação de leveduras no ambiente, além de um melhor entendimento da interação do fungo com o meio ambiente, e o porquê de novas espécies estarem surgindo. Contudo, mais estudos devem ser conduzidos no intuito de melhor estabelecer tais características, e poder traçar um perfil epidemiológico do fungo, contribuindo com informações que possam ser aplicadas em prol da saúde através da vigilância sanitária e ambiental.

12 PERSPECTIVAS

1. Apresentar às autoridades da vigilância sanitária e ambiental do nosso estado, os resultados mostrados nesse trabalho, demonstrando a importância em alertar a população sobre a presença de patógenos emergentes em excretas de pombos;
2. Avaliar a susceptibilidade antifúngica dos isolados ambientais de *Cryptococcus*;
3. Dar continuidade ao estudo de isolados ambientais do complexo *neoformans*, em nível molecular determinando os sorotipos e “*mating type*”;
4. Dar continuidade ao estudo caracterizando os isolados ambientais do complexo não *neoformans*, em nível molecular determinando através da análise da região ITS1, 5.8S e ITS2, bastante conservada em fungos;
5. Estabelecer correlações entre isolados ambientais e isolados provenientes de casos clínicos de Salvador.

REFERÊNCIAS

- ABEGG, M.A; CELLA, F.L; FAGANELLO, J; VALENTE, P; SCHRANK, A; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v.161, n.2, p.83-91, 2006.
- ALSPAUGH, J. A; PERFECT, J. R; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein α subunit GPA1 and cAMP. **Genes e Development**, v.11, p. 3206–3217,1998.
- ALVAREZ, C; BARBOSA, GG; OLIVEIRA, RVC; MORALES, BP; WANKE, B; LAZÉRA MS. Techniques for the detection of pathogenic *Cryptococcus* species in wood decay substrata and the evaluation of viability in stored samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n.1, p.126-129, 2013.
- ANDRADE-SILVA, L; FERREIRA-PAIM, K; SILVA-VERGARA, ML; PEDROSA, AL. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. **Fungal Biol**, v.114, n.5-6, p. 438-345, 2010.
- AOKI S, ITO-KUWA S, NAKAMURA K, KATO J, NINOMIYA K, VIDOTTO V. Extracellular proteolytic of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol**, v.128, n.3, p.143-150, 1994.
- BALTAZAR, L M; RIBEIRO, M A. First isolation of *Cryptococcus gattii* from the environment in the State of Espírito Santo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 5., p.449-453, 2008.
- 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 churchtowers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.**, v.48, n.2, p. 71-75, 2006.
- BAUTERS, TG; SWINNE, D; BOEKHOUT, T; NOENS, L; NELIS, HJ. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. **Mycopathologia**, v.153, n. 3, p.133-5, 2002.
- BERNARDO *et al.*,: A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisbon. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, n. 3, p. 163-165, 1998.
- BIVANCO, F.C; MACHADO, C.D.S; MARTINS, E.L. Criptococose cutânea. **Arq. Méd. ABC**, v. 31, n. 2, p.102-9, 2006.
- BONINI, RK. Pombos em áreas urbanas. In: **Reunião anual do instituto biológico**. São Paulo, SP: O Biológico, v. 60, n.2, 2003.
- BROWN, A. *Birds of prey 'will kill off pigeon racing'*. **The Scotsman**. [s.n] [s.d], 2005. In news.scotsman.com. Acessado em 18 abril 2013. Disponível em: <http://www>

.scotsman.com/news/scottish-news/top-stories/birds-of-prey-will-kill-off-pigeon-racing-1-1092443

BUCHANAN, K. L. e MURPHY, J. W.: What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? **University of Oklahoma Health Sciences Center**. Oklahoma City, Oklahoma, USA. v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.

CAFARCHIA, C., ROMITO, D., IATTA, R., CAMARDA, A., MONTAGNA, M. T., OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Medical Mycology**, n. 44, p.485-492, 2006.

CAICEDO LD, MI ALVAREZ, CE LLANOS e D MOLINA. *Cryptococcus neoformans* em excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. **Colombia Méd.** v. 27, p.106-109, 1996.

CASADEVALL, A., PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: **American Society for Microbiology Press**, 1998.

CASALI, A.K; GOULART, L; ROSA E SILVA, L.K; RIBEIRO, A.M; AMARAL, A.A; ALVES, S.H; SCHRANK, A; MEYER, W; VAINSTEIN, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.405-15, 2003.

CHANG, Y.C; KWON-CHUNG, K.J. Complementation of a capsule deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol. Cell. Biol.**, v.14, n. 7, p. 4912-4919. 2004.

CHANG, CF; LEE, CF; LIU, SM. *Cryptococcus keelungensis* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from the sea-surface microlayer of the north-east coast of Taiwan. **Int J Syst Evol Microbiol**, n.58, v. 12, p. 2973-6, 2008.

CHEE, H.; LEE, K.B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. **Journal of Microbiology**, v.43, n.5, p.469- 72, 2005.

CHEN, M; PAN, WH; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus gattii* infections in China: extent of the problem? **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n.2, p.203-5. 2013.

CHENG MF, CHIOU CC, LIU YC, WANG HZ, HSIEH KS. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **J Clin Microbiol.**, v. 39, n.4, p.1608-11, 2001.

CICHON, M. **Suscetibilidade a drogas antifúngicas de isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans*, procedentes da cidade de Curitiba e região metropolitana, Paraná, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), 38 f. Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

CODEBA, COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA. **Porto de Salvador**. Disponível em: <http://picasaweb.google.com/lh/photo/RSRdPIxee9_a_hnAkTkmjmA>. Acessado em 02 fev 2012.

COGLIATI HINDAWI. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Hindawi Publishing Corporation**. Scientica, v. 2013, 23 p. [s.n], 2013.

COLOMBO, TE; SOARES, MM; D'ÁVILLA, SC; NOGUEIRA, MC DE; ALMEIDA, MT. Identification of fungal diseases at necropsy. **Pathol Res Pract**. v.15, n. 208, p. 549-52. 2012.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p.524-544, 2008.

COSTA, SPGE; LAZÉRA, MS; SANTOS, WRA; MORALES, BP; BEZERRA, CCF; NISHIKAWA, MM; BARBOSA, GG; TRILLES, L; NASCIMENTO, JLM; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.4, p.662-664, 2009.

COUTINHO, GIOVANE. **Fatores de virulência e resistência a antifúngicos de amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus neoformans***. 2006. 126 fl. ilus, tab, graf. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de estado da Saúde. São Paulo; s.n., 2006.

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, n. 2, p. 443-448, 2000.

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

DINIZ, MARTINS; NELSON, JOSÉ. ***Cryptococcus neoformans* de fontes ambientais e bioprospecção de extratos de plantas com atividade saneante**. Tese (Doutorado) 138f. Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Araraquara, 2009.

DROMER, F; MATHOULIN. S; DUPONT, B; LETENNEUR, L. e RONIN, O. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. French Cryptococcosis Study Group. **Clin. infect. Dis.**, n.23, p.91-96, 1996.

EBAL, EMPRESA BAIANA DE ALIMENTOS S.A. - Mercados – **CEASA**. Disponível em: <http://fotosdecidadesbrasileiras.blogspot.com/2008/12/foto-de-salvador-ce-asa-bahia.html>. Acessado em 20 nov 2010.

EISENMAN, H. C; MUES, M; WEBER, S. E., FRASES, S. et al., *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. **Microbiology**, n. 153, p.3954–3962, 2007.

ELLERBROEK, P.M; WALENKAMP, A. M; HOEPELMAN, A. I; COENJAERTS, F. E. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Curr. Med. Chem.**, v.2, n.11, p.253-266, 2004.

ELLIS, D. H. e PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. **J. Clin. Microbiol.** v.28, p.1642-1644, 1990.

EMMONS, CW. *Isolation of Cryptococcus neoformans* from soil. **J. Bact.**, n. 62, p.685-690, 1951.

ESCANDÓN, P; SÁNCHEZ. A; MARTINEZ, M; MEYER, W. e CASTAÑEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. **FEMS Yeast Res.**, n. 6, p. 625-635, 2006.

EVANS, EE. An immunologic comparison of 12 strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). **Proc Soc Exp Biol Med.**, v.71, p.644-6, Aug 1949.

FAGANELLO, J; ARRUDA, W; SCHRANK, A; VAINSTEIN, MH. An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. **J Microbiol Methods.**, v. 64, p.416-9, 2006.

FELLNER *et al.*: Trichotillomania in a young male complicated by tinea capitis associated with *Cryptococcus laurentii* and *Candida parapsilosis*. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, n.6, p. 71–73, 2013.

FERREIRA-PAIM, K; ANDRADE-SILVA, L; MORA, DJ; PEDROSA, AL; RODRIGUES, V; SILVA-VERGARA, ML. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycoses**, v. 54, p. 294–e300. 2010.

FILIÚ, WFO; WANKE, B; AGÜENA, SM. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.**; v.35,n.6, p. 591-595, 2002.

FINDLEY, K; RODRIGUEZ-CARRES, M; METIN B., KROISS J.: Phylogeny and Phenotypic Characterization of Pathogenic *Cryptococcus* Species and Closely Related Saprobic Taxa in the Tremellales. **EUKARYOTIC CELL**, v. 8, p. 353–361, 2009.

FINDLEY, K; SUN, S; FRASER, JÁ; HSUEH, YP; AVERETTE, AF; LI, W; DIETRICH, FS; HEITMAN, J. Discovery of a modified tetrapolar sexual cycle in *Cryptococcus amyloletus* and the evolution of *MAT* in the *Cryptococcus* species complex. **PLoS Genet.** 2012. V. 8., n. 2: e1002528. doi:10.1371/journal.pgen.1002528

FORTES, S. T., LAZÉRA, M. S., NISHIKAWA, M. M., MACEDO, R. C., WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, v.44, p.137-140, 2001.

FRANZOT, S.P; SALKIN, I.F; CASADEVALL, A.F. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, a separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 838-840, 1999.

FRASER, JÁ; GILES, SS; WENINK, EC; GEUNES-BOYER, SG; WRIGHT, JR; DIEZMANN, S; ALLEN, A; STAJICH, JE; DIETRICH, FS; PERFECT, JR; HEITMAN, J.: Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v.27, n.437, p. 1360-4, 2005.

FRASES, S; PONTES, B; NIMRICHTER, L; VIANA, NB; RODRIGUES, ML; CASADEVALL, A.: Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. **Proc Natl Acad Sci**, v. 27, n.106(4). p.1228-33, 2009.

FREIRE, AK DOS SANTOS; BENTES, A; DE LIMA, SAMPAIO I; MATSUURA, AB; OGUSKU, MM; SALEM, JI; WANKE, B DE; SOUZA, JV. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, n. 55, p.145-50, 2012.

FRIES, BC; GOLDMAN, DL; CHERNIAK, R; JU, R; CASADEVALI, A. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. **Infect Immun.**, n.67, p.6076-83, 1999.

FROMTLING, RA; SHADOMY, S; SHADOMY, HJ; DISMUKES, WE. Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in nonendemic areas. **J Clin Microbiol.**, n.16, p. 408–10; 1982.

GARELICK, JM; KHODABAKHSH, AJ; LOPEZ, Y; BAMJI, M; LISTER, M. Scleral ulceration caused by *Cryptococcus albidus* in a patient with acquired immune deficiency syndrome. **Cornea.**; n.23, p. 730-1, 2004.

GOODWIN, D. **Pigeons and Doves of the World**. 3rd edition. Cornell University Press, ISBN 0801414342, New York. 1983.

GRANADOS, DP; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microb Ecol.** n. 49, p. 282-90, 2005.

GRANADOS , D. P; CASTAÑEDA, E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992–2004, **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, pp. 636–644, 2006.

HAGEN, F; ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F. Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. **BMC Infectious Diseases**, 10:289. 2010.

HANSEMANN, D. V; UBER, EINE; BISHER ,NIGHT; BEOBACHTETE, GEHIRNER; KRANKUNG DURCH HEFEN. Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 9:21–24, 1905 *apud* KWON-

CHUNG, K. J., AND J. E. BENNETT. *Cryptococcosis*, p. 397–446. In **Medical mycology**, 16th ed. Lea e Febiger, Philadelphia. 1992.

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

HOANG, LM; MAGUIRE, JÁ; DOYLE, P; FYFE, M; ROSCOE, DL.: *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **J Med Microbiol.**; v.53, p.935-40, 2004.

IBARAKI Controle de Pragas e desentupimento. **Pombo Doméstico (*Columba livia*)**. 2012. Acessado em 18 abril 2013. Disponível em: <http://www.ibaraki.com.br/pombo-pombos-pombo-domestico.htm>

IKEDA, R; NISHIKAWA, A; SHINODA, T; FUKAZAWA, Y. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. **Microbiol Immunol**, v. 29, n.10, p.981-91. 1985.

JACOBSON, E. S. e TINNELL . Antioxidant function of fungal melanin. **Journal of Bacteriology** . v.175, p.7102–7104, 1993.

JAIN, N; WICKES, BL; KELLER, SM; FU, J; CASADEVALL, A; JAIN, P; RAGAN, MA; BANERJEE, U; FRIES, BC.: Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. **J Clin Microbiol**; vol. 43, n. 11, p.573–574, 2005.

JONHSON, L.B; BRADLEY, SF; KAUFFMAN, CA. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. **Mycoses**, n. 41, p. 277-280, 1998.

KHAN, ZU; RANDHAWA, HS; KOWSHIK, T; CHOWDHARY, A; CHANDY, R. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. **J Antimicrob Chemother**. v.60, n.2, p.312-6, 2007.

KHAWCHAROENPORN, T; APISARNTHANARAK, A; MUNDY, L. M. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v.35, p.51-57, 2007.

KIDD, S.E; HAGE, F; TSCHARKE, R.L. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)**, v.101, p.17258-17263, 2004.

KIDD, SE; CHOW, Y; MAK, S; BACH, PJ; CHEN, H; HINGSTON, AO; KRONSTAD, JW; BARLETT, 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 Environ Microbiol**, v.73, p.1433-1443, 2007.

KOBAYASHI, C. C. B. A; HASIMOTO, E; SOUZA, L. K; FERNANDES, O. F. L; BRITO, S. C. A; SILVA, A. C; SOUSA, E. D; SILVA, M. R. R. Characterization of *Cryptococcus neoformans*

mans isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 203-207, 2005.

KORDOSSIS, T; AVLAMI, A; VELEGRAKI, A; STEFANO, L; GEORGAKOPOULOS, G; PAPALAMBROU, C; LEGAKIS, N. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. **Med Mycol**, v. 36, p. 335-339, 1998.

KROCKENBERGER, M.B; CANFIELD, P.J; MALIK, R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by *C. n. var. gattii* and investigation of environmental sources. **Medical Mycology**, v.40, p.263-272, 2002.

KULKARNI, A; SINHA, M; ANANDH, U. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus laurentii* in a renal transplant recipient. **Saudi J Kidney Dis Transpl.**, v.23, n.1, p.102-105, 2012.

KUNOVA, A; KRČMERY, V. Fungaemia due to thermophilic cryptococci: 3 cases of *Cryptococcus laurentii* bloodstream infections in cancer patients receiving antifungals. **Scand J Infect Dis.**, v.31, p. 3, p.328, 1999.

KURTZMAN, CP; FELL, JW. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Scientific BV, 1005p. 1998.

KÜTZING, F.T. **Algarum aquae dulcis Germanicarum**, Decas III. 1833 apud LACAZ, C.S; PORTO, E.; *et al.*, Tratado de Micologia Médica. São Paulo: Sarvier, 2002.

KWON-CHUNG, K.J; BENNETT, JE. Cryptococcosis. In: KWON-CHUNG, K. J., BENNETT, J. E. **Medical Mycology**, Philadelphia P. A., Lea e Febiger, p. 397-446, 1992.

KWON-CHUNG, K.J; BENNETT, JE. Epidemiologic differences between the varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, n.120, p.123-130, 1984.

KWON-CHUNG, K.J; BOEKHOUT, T; FELL, J.W. e DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. basillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v.51, p. 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K.J; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v.6, p.574-587, 2006.

LABRECQUE, O; SYLVESTRE, D; MESSIER, S.: Systemic *Cryptococcus albidus* Infection in a Doberman Pinscher. **J Vet Diagn Invest.**, v.17, n.6, p.598-600, 2005.

LACAZ, C. S.; PORTO, MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. rev. e ampl. São Paulo, Sarvier, 695 p. 1991.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; *et al.*, **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, ed. 9, 2002.

LAGROU, K; VAN ELDERE, J; KEULEERS, S; HAGEN, F; MERCKX, R; VERHAEGEN, J; PEETERMANS, W. E; BOEKHOUT, T. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, p. 385-388, 2005.

LARONE, D. H. **Medically Important Fungi, a Guide to Identification**. Washington, DC: ed. American Society for Microbiology Press, ed. 4. 2002.

LAZÉRA, MS; CAVALCANTI, MA; TRILLES, L; NISHIKAWA, MM; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medic Mycol**, v. 36, p.119-122, 1998.

LAZÉRA, M.S; SALMITO CAVALCANTI, M.A; LONDERO, A.T; TRILLES, L; NISHIKAWA, M.M; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v.38, p.379-83, 2000.

LAZÉRA, M. S; IGREJA, R. P; WANKE, B. **Criptococose**. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA M. F. G. *Micologia Médica: À luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 89-101, 2004.

LEITE, DP JR; AMADIO, JV; MARTINS, ER; SIMÕES, AS; YAMAMOTO, AC; LEAL-SANTOS, FA; TAKAHARA, DT; HAHN, RC. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **J Occup Med Toxicol**. v.8, n.7, p.11, 2012.

LEVI, WENDELL. **The Pigeon**. Sumter, S.C.: Wendell Levi Publishing Company, Inc, 1977.

LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **RID**. v. 1, p. 1163–1169, 1991.

LIN, X; NIELSEN, K; PATEL, S; HEITMAN, J. Impact of mating type, serotype, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun.**, v.76, n.7, p.2923-38, 2008.

LINDENBERG, A. S. C; CHANG, M. R., *et al.* Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 50, n.2, p.75-78, 2008.

LOISON, J; BOUCHARA, JP; GUEHO, E DE; GENTILE, L; CIMON, B; CHENNEBAULT, JM; CHABASSE, D. First report of *Cryptococcus albidus* septicaemia in an HIV patient. **J Infect.**, v.33, n.2, p.139-40, 1996.

LOPERENA-ALVAREZ, Y; REN, P; LI, X; SCHOONMAKER-BOPP, DJ; RUIZ, A; CHATURVEDI, V; RIOS-VELAZQUEZ, C. Genotypic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. **Mycopathologia**, v.170, n.4, p.279-85, 2010.

LUGARINI, C; GOEBEL, C. S; CONDAS, L. A. Z; MURO, M. D; FARIAS, M. R; FERREIRA, F. M; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine BIRD Excreta in the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.166, p.61-69, 2008.

MANFREDI R., FULGARO C., SABBATANI S., LEGNANI G. e FASULO G. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. **AIDS Patient Care and STDs.**, v.20, n.4, p. 227-232, 2006.

MARQUES SA, BASTAZINI I JR, MARTINS AL, BARRETO JA, BARBIERI D'ELIA MP, LASTÓRIA JC, MARQUES ME. Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients. **Int J Dermatol**, v. 51, n. 7, p. 780–784. 2012

MATOS, C. S.; ANDRADE, S. A; OLIVEIRA, N. S; BARROS, T. F. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n,7, p.1647-1652, 2012.

McCURDY, M.D; MORROW, J. D. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. **Southern Medical Journal**, v.94, p. 65-66, 2001.

MCFADDEN, D. C; DE JESUS, M; CASADEVALL, A. The Physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 1868-1875, 2006.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S. *et al.* Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. infect. Dis.** v,9, p. 189-195, 2003.

MEYER e TRILLES. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans* C. *gattii* species complex. **Showcase on Research**, v, 41, n 1, p189-195, 2010.

MEYER, W; MARSZEWSKA, K; AMIRMOSTOFIAN, M. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v.20, p.1790-1799, 1999.

MIN, JH; KANG, MG; RYU, JJ; LEE, HB; KIM, CM; KIM, HK; LEE, JS. Two New Species of *Cryptococcus* sp. and *Candida* sp. from Wild Flowers in Korea. **Mycobiology**, v.40, n.4, p. 255-7, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012: **Vigilância e Epidemiológica Da Criptococose**. Brasília, DF. abril de 2012.

MITCHELL, T.G; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiological Reviews**, v.8, p.515-548, 1995.

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

MOYSES, NETO M; MUGLIA, V; BATISTA, MSPN; PISI, TM; SABER, LTS; FERRAZ, AS. Infecção por fungos e transplante renal: análise nos primeiros 500 pacientes transplantados no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.17, n. 19, p.162-170, 1995.

NARAYAN; S; BATTI, K; COLLOBY, P; TAN, CY. Cutaneous *Cryptococcus* infection due to *C. albidus* associated with Sézary syndrome. **Br J Dermatol.** v.143, n.3, p.632-4, 2000.

NARDELLI, V; CELINA, P; MATA-ESSAYAG, S; COLELLA, M.T; ROSELLÓ, A; HARTUNG DE CAPRILES, C; LANDAETA, M. E; OLAIZOLA, C. M. S. Identification of *Cryptococcus neoformans* isolates using Staib agar without creatinine. **Kasmera**, v. 33, p. 102-108, 2005.

NISHIKAWA, M.M; LAZERA, M.S; BARBOSA, G.G. *et al.* Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J. clin. Microbiol.**, v.41, p.73-77, 2003.

NGAMSKULRUNGROJ, P; SERENA, C; GILGADO, F; MALIK, R; MEYER, W. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.2, p. 251-258, 2011.

NOSANCHUK, J. D; SHOHAM, S; FRIES, B. C; SHAPIRO, D. S; LEVITZ, S. M; CASADEVALL, A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, p. 205-208, 2000.

ORMEROD, KL; MORROW, CA; CHOW, EW; LEE, IR; ARRAS, SD; SCHIRRA, HJ; COX GM; FRIES, BC; FRASER, JA. Comparative Genomics of Serial Isolates of *Cryptococcus neoformans* Reveals Gene Associated with Carbon Utilization and Virulence. **Investigation**, v.3, P. 675-686, 2013.

PAN, W *et al.* Resistance of Asian *Cryptococcus neoformans* serotype A is confined to few microsatellite genotypes. **PLoS One**, v.7, n.3, p.328-68, 2012.

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

PASSONI, L.F.C. *et al.*, *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med Mycol**, v. 36, n.9, 305-11, 1998.

PEDROSO, R. S; PENATTI, M. P. A; MAFFE, C. M. L. Infecções Causadas por *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii*: Implicações Clínicas e Identificação laboratorial. **NewsLab**, v. 17, n. 102, p. 96-102. 2010.

PEDROSO, R. S; COSTA, KRC; FERREIRA, JC; CANDIDO, RC. Evaluation of melanina roduction by *Cryptococcus* species in four diferente cultura media. **Rev Soc Bras de Med Trop**, v. 40, n.5, p.566-568, 2007.

PERFECT, JR; DISMUKES, WE; DROMER, F; GOLDMAN, DL; GRAYBILL, JR; HAMILL, RJ; HARRISON, TS; LARSEN, RA; LORTHOLARY, O; NGUYEN, MH; PAPPAS, PG; POWDERLY, WG; SINGH, N; SOBEL, JD; SORRELL, TC. Clinical practice guidelines for the management of *cryptococcal* disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**. v.1, n.50, p.291-322, 2010.

PERFECT, JR; BAHN, YS; COX, GM; HEITMAN, J. Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. **Curr Biol.**, v.22, n.15, p. 2013-20, 2005.

POSTERANO, B; SSANGUINETTI, M., *et al.* Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, *CnAFR1*, involved in the resistance to fluconazole. **Mol. Microbiol.**, v.47, n.2, p.357-371, 2003.

PRATES RA, FUCHS; BB, MIZUNO; K, NAQVI; Q, KATO IT. Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS ONE** 8(1): e54387, doi:10.1371/journal.pone.0054387.

QUINTERO, E; CASTAÑEDA, E; RUIZ, A. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca – Colômbia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p.93-8, 2005.

RANDHAWA, H. S; KOWSHIK, T; KHAN, Z. U. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/ New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 41, p. 189-197, 2003.

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

REZENDE, C.; MUNHÓZ, C. J. M. Investigação Ambiental de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Votuporanga. **NewsLab** – ed. 87, p. 88-93. 2008.

RIBEIRO, A. M; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n.6, p.315-320, 2008.

RIBEIRO, A.M; SILVA, L.K; SCHRANK, I.S. *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. **Med. Mycol.**, v.44, p. 707-713, 2006.

ROOF, J. 2001. "Columba livia" (On-line), **Animal Diversity Web**. Acessado em 18 de abril, 2013. Disponível em: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Columba_livia.html

ROSARIO, I; SORO, G; DÉNIZ, S; FERRER, O; ACOSTA, F; PADILLA, D; ACOSTA, B. Presence of *C. albidus*, *C. laurentii* and *C. uniguttulatus* in crop and droppings of pigeon lofts (*Columba livia*). **Mycopathologia**, v.169, n.4, p.315-9, 2010.

ROSARIO, I; HERMOSO DE MENDOZA, M; DENIZ, S; SORO, G; ALAMO, I; ACOSTA, B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. **Myco- ses**, Berlin, v.48, n.6, p. 421-424, 2005.

ROSARIO, I; ACOSTA, B; COLOM, F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus spp*. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, p.13-18, 2008.

ROSENBAU, R; GONÇALVES, AJR. Clinical epidemiological study of 171 cases cryptococcosis. **Clin Infect Dis**, v.18, p.369-380, 1994.

SALTUR, EMPRESA SALVADOR TURISMO. **Praça Municipal**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Pal%C3%A1cio_Tom%C3%A9_de_Sousa>. Acesso em 02 nov 2010.

SANFELICE *et al.*, (1894) In: KWON-CHUNG, K. J., BENNETT, J. E. **Medical Mycology**, Philadelphia P. A., Lea e Febiger, p. 397-446, 1992.

SANTANA, L.S; COSTA, M. S. F; DE QUEIROZ, L. A. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901) em excretas de pombos no perímetro urbano de Salvador, Bahia, Brasil. **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, v.7, n.2,p. 170-175: 2007.

SANTOS, WALLACE RAIMUNDO A DOS. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-818, 2008.

SAUER, J. R; HINES, J. E. e FALLON, J. The North American Breeding Bird Survey, Results and Analysis 1966-2007. Version 5.15. **USGS Patuxent Wildlife Research Center**, Laurel, MD. 2008.Acessado em 18 abril 2013. Disponível em <http://www.mbr-pwrc.usgs.gov/bbs/>.

SEVERO, CB; GAZZONI, AF; SEVERO, LC. Chapter. Pulmonary cryptococcosis. **J Bras Pneumol.**, v.35, n.11, p.1136-44, 2009.

SHANKAR EM, KUMARASAMY N, BELLA D, RENUKA S, KOWNHAR H, SUNITI S, RAJAN R, RAO UA. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. **Can Respir J**, v.13. n.5, p.275-8, 2006.

SHRESTHA, R. K; STOLLER, J. K; HONARI, G; PROCOPI, G. W; GORDON, S.M. Pneumonia due to *Cryptococcus neoformans* in a patient receiving infliximab: possible zoonotic transmission from a pet cockatiel. **Respiratory Care**, v. 49, p. 606-609, 2004.

SIDRIM, J.J.C; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SOARES, M. C. B; PAULA, C. R; DIAS, A. L. T; CASEIRO, M. M; PINTO DA COSTA, S. O. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 31-36. 2005.

SORRELL, TC; CHEN, SC; RUMA, P; MEYER, W; PFEIFFER, TJ; ELLIS, DH; BROWNLEE, AG. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **J Clin Microbiol**; v.34, n.5, p.1253-60, 1996.

SORRELL TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol**; v.39, p.155-68, 2001.

SOSSINKA, R. Domestication in birds. **Avian biology**, v. 6, p. 373-403, 1982.

SOUZA, LKH; FERNANDES, OFL; KOBAYASHI, CCBA; PASSOS, XS; COSTA, CR; LEMOS, JÁ; SOUZA-JUNIOR, AH; SILVA, MRR. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, n.47, p. 253-256, 2005.

SOUZA, J.A.M.O; FÉLIX, E. R. S.; BARROS, T. F. **Investigação de *Cryptococcus sp* em excretas de pombos (*Columba livia*) na cidade de salvador – BA, e riscos da contaminação humana.** Trabalho de Conclusão de Curso, 61 f. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil, 2010.

SPRINGER, D. J., e CHATURVEDI, V. Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**. V.16, n.1, p. 14-20, 2010.

STAIB F *et al*.: Saprophytic life of *Cryptococcus neoformans*. **Ann Soc Bel de MédTrop**, v.4, p.611-18, 1964.

STEENBERGEN, J.N. e CASADEVALL, A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) isolates in New York City. **J. clin. Microbiol.**, v. 38, p.1974-1976, 2000.

STEENBERGER J. N; CASADEVALL, A. The origen and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes infect**, v.5, p.667-675, 2003.

SWINNE, D., De Vroey C. Detection of circulating capsular polysaccharide antigen from *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2521, 1992.

TRILLES, L; LAZÉRA, M; WANKE, B; THEELEN, B; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical Mycology**, v.41, p.383-90, 2003.

TRILLES, L; LAZÉRA, M. S; WANKE, B; OLIVEIRA, R. V; BARBOSA, G. C; NISHIKAWA, M. M; MORALES, B. P; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus*

neoformans and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 455-462, 2008.

UMEYAMA, T; OHNO, H; MINAMOTO, F; TAKAGI, T; TANAMACHI, C; TANABE, K; KANEKO, Y; YAMAGOE, S; KISHI, K; FUJII, T; TAKEMURA, H; WATANABE, H; MIYAZAKI, Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. **Jpn J Infect Dis**. v. 66, n.1, p.51-5, 2013.

VLCHKOVA-LASHKOSKA, M; KAMBEROVA, S; STAROVA, A; GOLEVA-MISHEVSKA L, TSATSA-BILJANOVSKA, N; JANEVSKA, V; PETROVSKA, M. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in a human immunodeficiency virus-negative subject. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v.18. n.1, p.99-100, 2004.

VUILLEMIN *et al.*, (1901) *apud* LACAZ, C.S; PORTO, E.; *et al.*, **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

XUE, C; TADA, Y. DONG, X.; HEITMAN J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell Host Microbe**, v. 1, p. 263-262, 2007.

ZARAGOZA, O; TABORDA, CP; CASADEVALL, A. The efficacy of complement mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. **Euro J Immunol.**; v.33, n.3, p.1957-67, 2003.

ZHU, Y; WANG, X; CUI, J; HUANG, X; GU, J. Proteomic analysis of human umbilical vein endothelial cells incubated with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Mycoses**, n.54, p.336-343, 2010.