

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

AMANDA CRISTINA ARAÚJO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptococcus* spp. A PARTIR DE
AMOSTRAS AMBIENTAIS DO ENTORNO DE HOSPITAIS DA CIDADE DE BELO
HORIZONTE**

Belo Horizonte

2022

AMANDA CRISTINA ARAÚJO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptococcus* spp. A PARTIR DE
AMOSTRAS AMBIENTAIS DO ENTORNO DE HOSPITAIS DA CIDADE DE BELO
HORIZONTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dr. Susana Johann
Coorientadora: Profa. Dra. Kelly Moura Keller

Belo Horizonte

2022

043

Araújo, Amanda Cristina.

Isolamento e identificação de *Cryptococcus spp.* a partir de amostras ambientais do entorno de hospitais da cidade de Belo Horizonte [manuscrito] / Amanda Cristina Araújo. – 2022.

132 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dr. Susana Johann. Coorientadora: Profa. Dra. Kelly Moura Keller.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Cryptococcus*. 3. Ecoepidemiologia. 4. Hospitais. I. Johann, Susana. II. Keller, Kelly Moura. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE AMANDA CRISTINA ARAÚJO

Nº REGISTRO: 2020659276

Às 14:00 horas do dia **04 de abril de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Rafael Wesley Bastos (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), Profa. Dra. Susana Johann (orientadora) e Kelly Moura Keller (coorientadora), para julgar o trabalho final **“Isolamento e identificação de *Cryptococcus* spp. a partir de amostras ambientais do entorno de hospitais da cidade de Belo Horizonte.”**, da aluna **Amanda Cristina Araújo**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Susana Johann - orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 04 de abril de 2022

Membros da banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Dr. Rafael Wesley Bastos

De acordo:

Profa. Dra. Susana Johann

(Orientadora)

Kelly Moura Keller

(Coorientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 06/04/2022, às 09:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 06/04/2022, às 09:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Moura Keller, Professora do Magistério Superior**, em 06/04/2022, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Wesley Bastos, Usuário Externo**, em 06/04/2022, às 14:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Susana Johann, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 06/04/2022, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1322883** e o código CRC **62ADE384**.

Dedico este trabalho
a minha falecida avó, Maria Ferreira, que
empenhou seus últimos anos de vida para que
eu pudesse concluir os estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por conseguir finalizar o trabalho em meio a uma pandemia mesmo com as perdas e obstáculos impostos durante a jornada.

Agradeço aos meus pais, Marisa e Derci, por todo o carinho e dedicação incondicional, pelo apoio nos momentos de crise e por não desistirem de mim nos momentos mais difíceis.

Agradeço a equipe da GAB-Vet, Graciela, Mel e Ana, por me receber com tanto carinho e por me confiar o projeto que daria início a essa jornada.

Ao LAMICO por me receber desde a iniciação científica e por me ensinarem que o laboratório pode ser mais que um simples local de trabalho. Agradeço principalmente Kelly, Lauranne e Gabriela por todo o carinho, cuidado e ensinamentos.

Agradeço também ao grupo dos Antifúngicos, principalmente Lorena e Glenda que estiveram presentes, não apenas no convívio diário, mas no suporte experimental e emocional.

Agradeço a minha orientadora Susana pela confiança em me receber mesmo sem conhecer meu trabalho. A todos os colegas do laboratório que se tornaram amigos, em especial Eldon, Gisele, Flávia e Angela, que foram verdadeiros anjos na rotina laboratorial, tornando o trajeto mais leve, alegre e reduzindo a ansiedade do percurso.

Agradeço aos membros da comissão examinadora, Nalu, Rafael e Danielle por aceitarem participar desta importante etapa de minha trajetória acadêmica e por colaborarem com a elaboração deste trabalho.

A todos aqueles que, embora não tenham sido citados aqui, contribuíram de alguma forma para a minha formação e educação durante toda a minha vida, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Cryptococcus spp. são leveduras encapsuladas, cosmopolitas, globalmente distribuídas e frequentemente associadas a excretas de aves. As principais espécies de importância clínica são o chamado complexo *Cryptococcus gattii/neoformans*, entretanto, outras espécies também são reportadas como causadoras de doenças em pacientes com ou sem comprometimento imunológico, sendo o primeiro grupo mais comumente afetado. Algumas destas espécies são, atualmente, reclassificadas em gêneros como *Papiliotrema* sp., *Kwoniella* sp. e *Naganishia* sp.. Estudos ecoepidemiológicos são importantes para o mapeamento e prevenção de riscos associados a doenças uma vez que contemplam, não só o agente infeccioso, mas também a ecologia do agente, seus carreadores, bem como os mecanismos ambientais, demográficos, regionais ou socioeconômicos que possam interferir na distribuição do microrganismo e propagação da infecção. Deste modo, o presente estudo teve por objetivo a verificação da presença e a relação destas leveduras com o ambiente e o potencial risco a elas associado. As coletas foram realizadas no entorno de cinco hospitais da cidade de Belo Horizonte com considerável fluxo de pacientes imunossuprimidos. O material coletado foi submetido a processamento e isolamento de leveduras e estas identificadas por biologia molecular e avaliadas quanto a termotolerância, melanização e produção de enzimas como proteinase, fosfolipase, urease e catalase. Dentre os isolados, apesar de não terem sido encontrados representantes do complexo *gattii/neoformans*, houve um percentual positivo de 17,54% (50/285) para outras espécies que também podem ser consideradas de crescente relevância clínica. No entorno dos hospitais de Belo Horizonte foram encontradas as leveduras dos gêneros *Papiliotrema* (66% - 33/50), *Naganishia* (18% - 9/50), *Kwoniella* (14% - 7/50) e *Hannaella* (2% - 1/50) sendo estes divididos entre as espécies *Papiliotrema laurentii* (34,00% - 17/50), *Papiliotrema terrestris* (20,00% - 10/50), *Papiliotrema flavescens* (4,00% - 2/50), *Papiliotrema rajasthanensis* (2,00% - 1/50), *Naganishia albida* (8,00% - 4/50), *Naganishia diffluens* (4,00% - 2/50), *Naganishia cerealis* (2,00% - 1/50), *Kwoniella heveanensis* (14,00% - 7/50) e *Hannaella luteola* (2,00% - 1/50). *P. laurentii* e *K. heveanensis* estiveram presentes em todos os hospitais e, considerando os testes de virulência, *P. laurentii* foi a única espécie com representantes positivos em 7 dos 9 testes aplicados (20% - 10/50). Estes resultados nos mostram que, embora menos comuns em relatos de casos e pesquisas científicas, espécies não pertencentes ao complexo *C. gatti/neoformans* e atualmente reclassificadas podem apresentar fatores de virulência e condições de dispersão favoráveis ao microrganismo em uma possível infecção do hospedeiro.

Palavras-chave: *Cryptococcus* sp., *Papiliotrema* sp., *Kwoniella* sp., *Naganishia* sp.,
ecoepidemiologia, hospitais, Belo Horizonte

ABSTRACT

Cryptococcus spp. are encapsulated, cosmopolitan, globally distributed yeasts frequently associated with bird excrements. The main species of clinical importance are the so-called *Cryptococcus gattii/neoformans* complex, however, other species are also reported to cause disease in patients with or without immunological impairment, the first group being most commonly affected. Some of these species are currently reclassified into genera such as *Papiliotrema* sp., *Kwoniella* sp. and *Naganishia* sp. Ecoepidemiological studies are important for the mapping and prevention of risks associated with diseases since they contemplate not only the microorganism. Thus, the present study aimed to verify the presence of these yeasts and their relationship with the environment and the potential risk associated with them. The samples were collected from five hospitals in the city of Belo Horizonte, with a considerable flow of immunosuppressed patients. The collected material was submitted to processing and isolation of yeasts, which were identified by molecular biology and evaluated for thermotolerance, melanization and production of enzymes such as proteinase, phospholipase, urease and catalase. Among the isolates, although no representatives of the *C. gattii/neoformans* complex were found, there was a positive percentage of 17,54% (50/285) for other species that can also be considered of increasing clinical relevance. In the Belo Horizonte hospitals surroundings, yeasts of the genera *Papiliotrema* (66% - 33/50), *Naganishia* (18% - 9/50), *Kwoniella* (14% - 7/50) and *Hannaella* (2% - 1/50) were found, being divided among the species *Papiliotrema laurentii* (34,00% - 17/50), *Papiliotrema terrestris* (20,00% - 10/50), *Papiliotrema flavescens* (4,00% - 2/50), *Papiliotrema rajasthanensis* (2,00% - 1/50), *Naganishia albida* (8,00% - 4/50), *Naganishia diffluens* (4,00% - 7/50), *Naganishia cerealis* (2,00% - 1/50), *Kwoniella heveanensis* (14% - 7/50) and *Hannaella luteola* (2,00% - 1/50). *P. laurentii* and *K. heveanensis* was present in all hospitals and, considering the virulence tests, *P. laurentii* was the only species with positive representatives in 7 of the 9 tests applied (20% - 10/50). These results show us that, although less common in case reports and scientific research, species not belonging to the *C. gattii/neoformans* complex and currently reclassified may present virulence factors and favorable dispersal conditions for the microorganism in a possible host infection.

Keywords: *Cryptococcus* sp., *Papiliotrema* sp., *Kwoniella* sp., *Naganishia* sp.,
ecoepidemiology, hospitals, Belo Horizonte

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução cronológica das espécies de <i>Cryptococcus</i>	25
Figura 2. Mapa do Brasil mostrando as duas macrorregiões (macrorregiões Norte e Sul) e a distribuição dos tipos moleculares e número de isolados de acordo com os estados envolvidos no estudo: AM: Amazonas; BA: Bahia; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo.	33
Figura 3. Principal forma de transmissão de <i>Cryptococcus</i> spp.....	45
Figura 4. Esquema de coleta de amostras.....	65
Figura 5. Crescimento de <i>P. laurentii</i> considerado (+) e de <i>P. terrestris</i> considerado (+++) em placa de SDA a 40°C tras	68
Figura 6. a) Ação da enzima urease: meio positivo (roxo/rosa), meio acidificado (amarelo) e meio com coloração original (alaranjado). b) Ação parcial da enzima urease demonstrada no segundo tubo em comparação ao tubo controle (primeiro tubo).....	71
Figura 7. Ação da enzima catalase: Início do processo de aparecimento de bolhas imediatamente após a aplicação do peróxido de hidrogênio 10 volumes	72
Figura 8. Hospitais sorteados para coleta de material	76
Figura 9. Relação percentual entre os isolados positivos para as leveduras de interesse e a umidade relativa do ar aferida no momento da coleta do material em campo. Valores de Umidade relativa aferidos: 36, 38, 42 e 49%.	83
Figura 10. Relação percentual entre os isolados positivos para as leveduras de interesse e a temperatura em graus Celsius (°C) aferida no momento da coleta do material em campo.	83
Figura 11. Relação percentual entre os pontos de coleta e os isolados de interesse positivos.....	84
Figura 12. Crescimento das leveduras de interesse nas temperaturas de 27, 40 e 50°C em meio SDA.	88
Figura 13. Potencial de melanização das leveduras de interesse em meio ágar semente de niger a 37 e 40°C. . 74 Figura 16. Potencial de melanização das leveduras de interesse em meio ágar semente de niger a 37 e 40°C.	88
Figura 14. Melanização – Imagem comparativa de <i>P. laurentii</i> entre os meios SDA e semente de niger. No primeiro a levedura apresenta textura mais seca e coloração em tons de branco-bege. No segundo, ao contrário, passa a ser viscosa e apresenta coloração marrom	90

Figura 15. a- Placa apresentando crescimento das colônias em meio Yeast Carbon Base (YCB). b- Adição da coloração negro de amido. c- Ação da enzima proteinase evidenciada com a coloração negro de amido	91
Figura 16. Mapa de calor - amostras de interesse com seus resultados individuais e somatório dos testes positivos	95
Figura 17. Escala de cor do mapa de calor	96
Figura 18. Percentual dos isolados recuperados em relação à umidade relativa do ar registrada no dia de coleta do substrato de isolamento – Percentuais de Umidade do ar registrados: 36, 38, 42 e 49%.	97
Figura 19. Percentual dos isolados recuperados em relação à umidade relativa do ar registrada no dia de coleta do substrato de isolamento – Percentuais de Umidade do ar registrados: 36, 38, 42 e 49%.	98
Figura 20. Proporção de positivos por grupo amostral.....	99
Figura 21. Distribuição das espécies identificadas	100
Figura 22. a- <i>Papiliotrema laurentii</i> cultivado em ágar semente de níger a 37°C. b- <i>Papiliotrema laurentii</i> cultivado em ágar SDA a 37°C.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variações, sorotipos capsulares e genótipos moleculares de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	23
Tabela 2. Nova classificação do gênero <i>Cryptococcus</i>	24
Tabela 3. Resumo dos tipos moleculares de <i>Cryptococcus</i> sp. e sua distribuição global.	32
Tabela 4. Tipos moleculares de <i>Cryptococcus</i> sp. da América Latina com destaque para a proporção dos isolados encontrados no Brasil em relação ao total	32
Tabela 5. Relação entre as características de BH e as predileções de <i>Cryptococcus</i> spp.....	34
Tabela 6. Recomendações de tratamento e dosagem segundo Guia de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde	36
Tabela 6.1. Formas de tratamento e dosagem para as formas de criptococose pulmonar leve a moderada	36
Tabela 6.2. Recomendações de tratamento e dosagem para as formas graves de criptococose (meningite criptocócica; pneumonia criptocócica grave; criptococemia), segundo grupos de risco	37
Tabela 6.2.1. Esquema para tratamento da criptococose grave em pessoas vivendo com HIV/AIDS.....	37
Tabela 6.2.2. Esquema para tratamento da criptococose grave em indivíduos transplantados de órgão sólido, transplantados hematológicos e doenças hematológicas	38
Tabela 6.2.3. Esquema para tratamento da criptococose grave em indivíduos aparentemente imunocompetentes.....	38
Tabela 7. Resumo - Material ambiental coletado: formas de preservação até processamento	62
Tabela 8. Cálculo Amostral	63
Tabela 9. Cálculo da densidade demográfica para escolha dos pontos de coleta iniciais	63
Tabela 10. Cálculo da densidade demográfica da região de coleta e a relação percentual com o total planejado	64
Tabela 11. Especificações dos hospitais selecionados	77

Tabela 11.1. Especificações - Hospital Risoleta Tolentino Neves	77
Tabela 11.2. Especificações - Hospital Evangélico	77
Tabela 11.3. Especificações - Hospital Paulo de Tarso	77
Tabela 11.4. Especificações - Santa Casa BH/Hospital São Lucas.....	78
Tabela 11.5. Especificações - Hospital Eduardo de Menezes	78
Tabela 12. Resumo das condições climáticas registradas nos dias de coleta.....	79
Tabela 13 Resumo dos isolados encontrados no entorno dos hospitais de Belo Horizonte – Relação entre nomenclatura atual e a nomenclatura adotada anteriormente	80
Tabela 14 Detalhamento dos isolados encontrados no entorno dos hospitais de Belo Horizonte com seu local de coleta e informações do <i>Genbank</i>	81
Tabela 15. Percentuais de isolamento por material coletado em relação ao gênero e espécie de estudo.	85
Tabela 16. Resultados dos testes de termotolerância nas temperaturas de 37, 40 e 50°C em meio ágar SDA.	86
Tabela 17. Resultados dos testes de melanização nas temperaturas de 37 e 40°C em meio ágar semente de níger	89
Tabela 18. Resultados dos testes da ação da enzima proteinase na temperatura de 28°C em meio YPD	91
Tabela 19. Resultados dos testes da ação da enzima urease na temperatura de 31°C em meio ágar ureia	93
Tabela 20. Relação de isolados por ponto de coleta	98
Tabela 21. Relação de isolados com alto índice de testes positivos por ponto de coleta	99
Tabela 22. Relação percentual quanto à categoria e quanto ao total coletado	100
Tabela 23. Distribuição das espécies identificadas em relação aos pontos de origem....	101
Tabela 24. Relação de isolados com alto índice de testes positivos por substrato coletado	101

LISTA DE SIGLAS

ANB	Anfotericina B
AIDS	Sigla em inglês para a síndrome da imunodeficiência adquirida
AM	Amazonas
ATCC24065	<i>American Type Culture Collection - C. gattii</i> ATCC24065
ATCC24067	<i>American Type Culture Collection - C. neoformans</i> ATCC24067
AW	Clima tropical, segundo classificação de Köppen
BA	Bahia
BH	Belo Horizonte
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio – Estufa para incubação
<i>C. albidus</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
<i>C. arboriformis</i>	<i>Cryptococcus arboriformis</i>
<i>C. bacillisporus</i>	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
<i>C. curvatus</i>	<i>Cutaneotrichosporon curvatus</i>
<i>C. decagattii</i>	<i>Cryptococcus decagattii</i>
<i>C. deneoformans</i>	<i>Cryptococcus deneoformans</i>
<i>C. deuterogattii</i>	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>
<i>C. diffluens</i>	<i>Cryptococcus diffluens</i>
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. humicola</i>	<i>Cryptococcus humicola</i>
<i>C. laurentii</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
<i>C. livia</i>	<i>Columba livia</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>C. tetragattii</i>	<i>Cryptococcus tetragattii</i>
<i>C. unigutulatus</i>	<i>Cryptococcus unigutulatus</i>
Cata.	Catalase
CCP	Criptococose cutânea primária
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CO ₂	Dióxido de carbono
COVID-19	Doença infecciosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2

D1/D2	Domínios da subunidade maior do DNA ribossomal.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Mistura dos quatro dideoxynucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) utilizado nos processos de PCR
E	Erro padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EV	Escola de Veterinária
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
FLC	Fluconazol
Fosf.	Fosfolipase
G	Unidade de medida – Grama
GalXM	Galactoxilomanana
(GTG) ₅	Iniciador para amplificação de região com repetição em <i>Tandem</i>
GXM	Glucuronoxilomanana
GYMP	Caldo Glucose Peptona Extrato de Malte e Levedura
H.	Hospital
H. EM / HEM	Hospital Eduardo de Menezes
H. EV / HEV	Hospital Evangélico
H. PT / HPT	Hospital Paulo de Tarso
H. RN / HRN	Hospital Risoleta Neves
H. SC / HSC	Hospital Santa Casa
Hab/ Km ²	Número de habitantes por quilômetro quadrado
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> / Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV+	Paciente positivo para o vírus da imunodeficiência humana
HIV-	Paciente negativo para o vírus da imunodeficiência humana
HV	Hospital Veterinário
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ID	Código/Identificador

IDSa	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
<i>K. heveanensis</i>	<i>Kwoniella heveanensis</i>
Kg	Unidade de medida – Quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
Km ²	Unidade de medida – Quilômetro quadrado
LAMICO	Laboratório de Micologia e Micotoxinas
m	Unidade de medida – Metro
M	Unidade de medida – Mol
mg	Unidade de medida – Miligrama
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Unidade de medida – Mililitro
mM	Unidade de medida – Milimolar
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MP	Manoproteínas
MT	Mato Grosso
n	n amostral
Nº	Número
<i>N. albida</i>	<i>Naganishia albida</i>
<i>N. cerealis</i>	<i>Naganishia cerealis</i>
<i>N. diffluens</i>	<i>Naganishia diffluens</i>
<i>N. friedmannii</i>	<i>Naganishia friedmannii</i>
<i>N. liquefaciens</i>	<i>Naganishia liquefaciens</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
ng	Unidade de medida – Nanograma
p	Proporção de resultados favoráveis da variável na população
<i>P. diffluens</i>	<i>Papiliotrema diffluens</i>
<i>P. flavescens</i>	<i>Papiliotrema flavescens</i>
<i>P. laurentii</i>	<i>Papiliotrema laurentii</i>
<i>P. rajasthanensis</i>	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>
<i>P. terrestris</i>	<i>Papiliotrema terrestris</i>

p/v	Relação peso/volume
PA	Pará
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Piauí
pmol	Unidade de medida – Picomol
Prot.	Proteinase
Pz	Formação de zonas de precipitação
q	Proporção de resultados desfavoráveis na população
rDNA	DNA ribossomal
RMBH	Região metropolitana de Belo Horizonte
RR	Roraima
Rpm	Unidade de medida – Rotações por minuto
SDA	<i>Sabouraud dextrose</i> agar
SARS-CoV-2	Vírus pertencente à família Coronaviridae
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
SISBio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SUS	Sistema único de Saúde
SMMA	Secretaria Municipal de Meio Ambiente
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
sp.	Abreviatura de espécie
spp.	Abreviatura de espécies
Termo.	Termotolerância
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Ure.	Urease
V	Unidade de medida – Volt
Var.	Variante

VET	Veterinária / Escola de Veterinária
V/V	Relação volume/volume
YCB	<i>Yeast Carbon Base</i>
YPD	<i>Yeast extract – Peptone – Dextrose</i>
$Z_{\alpha/2}$	Valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente 1,96 (95%)
μL	Unidade de medida – Microlitro
μm	Unidade de medida – Micrômetro
$^{\circ}\text{C}$	Unidade de medida – Graus celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1. <i>Cryptococcus</i> spp.	22
2.1.1. TAXONOMIA	22
2.1.2. OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Cryptococcus</i>	26
2.2. FATORES DE VIRULÊNCIA	26
2.2.1. CÁPSULA	26
2.2.2. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS	27
2.2.3. MELANIZAÇÃO	29
2.2.4. TERMOTOLERÂNCIA	29
2.2.5. SECREÇÃO DE ENZIMAS E D-MANITOL	30
2.3. EPIDEMIOLOGIA DE <i>Cryptococcus</i> sp.	31
2.3.1. FORMAS CLÍNICAS	34
2.3.2. TRATAMENTO E RESISTÊNCIA	35
2.4. INTERAÇÃO <i>Cryptococcus</i> -HOSPEDEIRO	40
2.4.1. HOSPEDEIRO HUMANO	43
2.4.2. HOSPEDEIRO ANIMAL	51
3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	59
3.1. PROBLEMA	60
3.2. HIPÓTESES	60
4. OBJETIVOS	60
4.1. OBJETIVO GERAL	60
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
5. MATERIAL E MÉTODOS	61
5.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS	61
5.1.1. ASPECTOS ÉTICOS	61
5.1.2. COLETA	62
5.1.3. PROCESSAMENTO INICIAL	65
5.1.4. IDENTIFICAÇÃO INICIAL	66
5.2. CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL	67
5.2.1. CRIOPRESERVAÇÃO	67
5.2.2. ESCOLHA DOS ISOLADOS	67
5.2.3. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA	68

5.2.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	72
6. RESULTADOS	76
6.1. HOSPITAIS	76
6.2. COLETAS	79
6.2.1. SELEÇÃO DOS ISOLADOS	79
6.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	80
6.4. CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS	83
6.5. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA	86
6.5.1. ANÁLISE DOS RESULTADOS	97
7. DISCUSSÃO	102
8. CONCLUSÃO	106
9. PERSPECTIVAS	106
REFERÊNCIAS	108
APÊNDICES	122
ANEXOS	128

1. INTRODUÇÃO

Com os avanços da medicina e consequente melhora dos tratamentos médicos é possível observar o aumento da longevidade de populações de risco como pacientes imunossuprimidos. Tal avanço pode estar intimamente relacionado ao aumento de outras doenças que acabam surgindo em decorrência de fatores preexistentes ou da baixa imunológica do hospedeiro. Esse cenário é observado no aumento dos casos de micoses sistêmicas que estão atreladas, por exemplo, ao avanço nos tratamentos de pacientes portadores do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (LIU *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2017).

As micoses sistêmicas possuem diferentes características quanto a epidemiologia e distribuição geográfica, entretanto, fatores de risco como transplante de órgãos, doenças autoimunes, uso de quimioterápicos, terapias com altas ou prolongadas doses de corticoides, a já citada SIDA, entre outros fatores, podem aumentar ou agravar a incidência destas infecções no hospedeiro (LIU *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2017; MONTOYA, *et al.* 2021; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

A criptococose está entre as micoses invasivas mais frequentemente diagnosticadas, pertencendo ao gênero *Cryptococcus*. É considerada a principal causa de meningoencefalite fúngica, afetando indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes. Seus níveis de mortalidade tornam-se acentuados em grupos de risco, principalmente em indivíduos portadores do vírus HIV. A infecção por essa levedura também pode apresentar outras formas clínicas de manifestação, acometendo órgãos como pulmões, promovendo quadros de fungemia ou, ainda, lesões em ossos, pele e tecidos moles (MORETTI *et al.*, 2008; MONTOYA, *et al.* 2021; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

Outro fator importante acerca da criptococose é a relação do fungo causador da doença com as excretas de aves e quirópteros. Essa relação é possível devido a presença de creatinina, ácido úrico, purinas e xantinas, utilizadas e consideradas como um importante fator de crescimento para o microrganismo (TENCATE *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; MENDES, 2018). Podem permanecer viáveis no solo por mais de dois anos (QUEIROZ *et al.*, 2008) e possuem fatores de virulência que corroboram para esta viabilidade, bem como para invasão e infecção do tecido hospedeiro (BOVERS *et al.*, 2008; DERENGOWSKI, 2011).

Apesar da disponibilidade de fármacos antifúngicos, esta doença ainda apresenta taxas de mortalidade consideráveis, fazendo-se necessário o conhecimento epidemiológico, seus dispersores e, ainda, a manutenção de rastreamento/monitoramento destas leveduras de modo a evitar riscos a ela associados (MONTOYA, *et al.* 2021).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Cryptococcus* spp.

Cryptococcus spp. é um gênero de fungo de hábito saprofítico e nicho ecológico relacionado, principalmente, a cascas ou cavidades de árvores, madeira em decomposição, excretas de pássaros, solo e outras matérias orgânicas sendo *C. gattii* menos presente em excretas de aves.(BARBOSA *et al.*, 2006; SEVERO *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2015; SIMÕES, 2017; FARRER *et al.*, 2021; MONTOYA *et al.*; 2021)e, embora mundialmente distribuído, seu histórico de estudos é relativamente recente e permanece com algumas lacunas a serem preenchidas (BOVERS *et al.*, 2008).

As leveduras do gênero *Cryptococcus* são consideradas cosmopolitas e apresentam características que as tornam agentes de grande importância em micologia médica. São haplóides, encapsuladas, reproduzindo-se predominantemente por brotamentos sendo uni ou bibrotantes (reprodução assexuada) e podem estar presentes em uma gama de ambientes (FILIÚ *et al.*, 2002; DERENGOWSKI, 2011; ROCHA *et al.*, 2014; FARRER *et al.*, 2021; MONTOYA *et al.*; 2021).

2.1.1. TAXONOMIA

Cryptococcus spp. era dividido em aproximadamente 75 espécies sendo duas as principais devido ao seu potencial patogênico para humanos e animais (SEVERO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2014; MONTOYA *et al.*; 2021). Dentre estas, *C. neoformas* tem conhecido caráter oportunista, estando relacionada a quadros de infecção em indivíduos imunocomprometidos (PEREIRA *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2014). Seu isolamento ocorre frequentemente em amostras de sangue e urina dos pacientes e seu índice de letalidade costuma ser expressivo (CONTIN *et al.*, 2010). Além disso, se estabelece em dois reservatórios naturais distintos: as excretas de aves, sendo os pombos (*Columba livia*) os mais citados, e restos de árvores em decomposição. *C. gattii* está mais relacionado a infecções em indivíduos hígidos e possui distribuição mais restrita a regiões de clima tropical e subtropical além de estreita relação com árvores e plantas em decomposição, sendo as árvores de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) o reservatório mais comum e mais estudado (FILIÚ *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2014; FARRER *et al.*, 2021; FIRACATIVE *et al.*, 2021). Esta variedade usualmente ocasiona consolidações pulmonares, sendo mais facilmente detectada no

escarro. Seu tratamento costuma ser mais prolongado e, por vezes, demanda cirurgia pulmonar ou cerebral, entretanto, seu índice de letalidade é menor que em *C. neoformans* (CONTIN *et al.*, 2010).

As espécies mais estudadas deste complexo são comumente classificadas em cinco sorotipos capsulares – classificação baseada nas reações de aglutinação dos antígenos dos polissacarídeos capsulares – e oito genótipos moleculares – classificação baseada nas diferenças das estruturas capsulares e de DNA conforme tabela abaixo (SEVERO *et al.*, 2009; MONTOYA *et al.*; 2021).

Tabela 1. Variações, sorotipos capsulares e genótipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*

Espécie	Variação	Sorotipo capsular	Genótipo molecular
<i>C. neoformans</i>	<i>Grubii</i>	A	VNI
	<i>Grubii</i>	A	VNII
		AD (híbrido)	VNIII
	<i>neoformans</i>	D	VNIV
<i>C. gattii</i>	<i>Gattii</i>	B	VGI
	<i>Gattii</i>	B	VGII
	<i>Gattii</i>	B	VGIII
	<i>Gattii</i>	C	VGIV

Fonte: Adaptado de Trilles *et al.*, 2008, Severo *et al.*, 2009; e Colombo *et al.*, 2015.

Entretanto, estudos mais recentes propõem a alteração da classificação acima citada. Para HAGEN e colaboradores (2015), após levantamento de dados embasados em pesquisas bibliográficas e realização de estudos genotípicos e fenotípicos, foi apresentada relevante heterogeneidade genética entre as espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii*. Com base nessa diversidade, os autores propuseram a criação de uma nova nomenclatura contendo sete espécies as quais nomearam *C. neoformans*, *C. deneoformans*, *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuteroformans*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*, além de seus híbridos *C. neoformans x C. deneoformans*, *C. neoformans x C. gattii* e *C. deneoformans x C. gattii*.

Em contraponto, kwon-Chung e colaboradores (2017) acreditam que, embora seja necessário o estudo e descoberta das diferenças entre as leveduras, nem sempre essas divergências biológicas serão clinicamente relevantes ou facilmente identificáveis no contexto cotidiano. Desta forma, nomear cada clado como uma espécie separada poderia, além de gerar certa instabilidade na nomenclatura do grupo, ser passível de atrito e/ou confusões de

identificações futuras devido a manutenção dos nomes *C. gattii* e *C. neoformans* dentro das novas espécies criadas. Para tanto, os autores sugerem o uso de “complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans*” e “complexo de espécies de *Cryptococcus gattii*” como etapa intermediária até se conhecer melhor as características dos fungos estudados de modo a evitar demasiado transtorno. Citam ainda que tal procedimento já foi adotado para manter a estabilidade nomenclatural em outras situações como no caso do complexo de espécies *Fusarium* e o complexo de espécies *Scedosporium*.

Posteriormente, o gênero sofreu nova reclassificação, tendo alteração em nomenclaturas de espécies fora do complexo *gatti/neoformans*. Essas alterações ocorreram com base em sete genes diferentes e fez com que espécies como a antiga *Cryptococcus laurentii* se tornasse sinônimo de *Papiliotrema laurentii*. Algumas espécies de interesse médico foram reclassificadas e incluídas nos gêneros *Papiliotrema* e *Naganishia*, outras incluídas ao gênero *Kwoniella* (LIU *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A referida alteração das nomenclaturas pode ser observada na tabela 2 e um breve histórico de *Cryptococcus* spp. na figura 1.

Tabela 2. Nova classificação do gênero *Cryptococcus*

ANTIGA	ATUAL
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	<i>Naganishia adeliensis</i>
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	<i>Naganishia albidosimilis</i>
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Naganishia albida</i>
<i>Cryptococcus cerealis</i>	<i>Naganishia cerealis</i>
<i>Cryptococcus diffluens</i>	<i>Naganishia diffluens</i>
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	<i>Naganishia liquefaciens</i>
<i>Cryptococcus flavescens</i>	<i>Papiliotrema flavescens</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Papiliotrema laurentii</i>
<i>Cryptococcus mangaliensis</i>	<i>Papiliotrema mangaliensis</i>
<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>
<i>Cryptococcus terrestris</i>	<i>Papiliotrema terrestris</i>
<i>Cryptococcus heveanensis</i>	<i>Kwoniella heveanensis</i>

Fonte: Adaptado de Liu *et al.*, 2015; e Oliveira *et al.*, 2021.

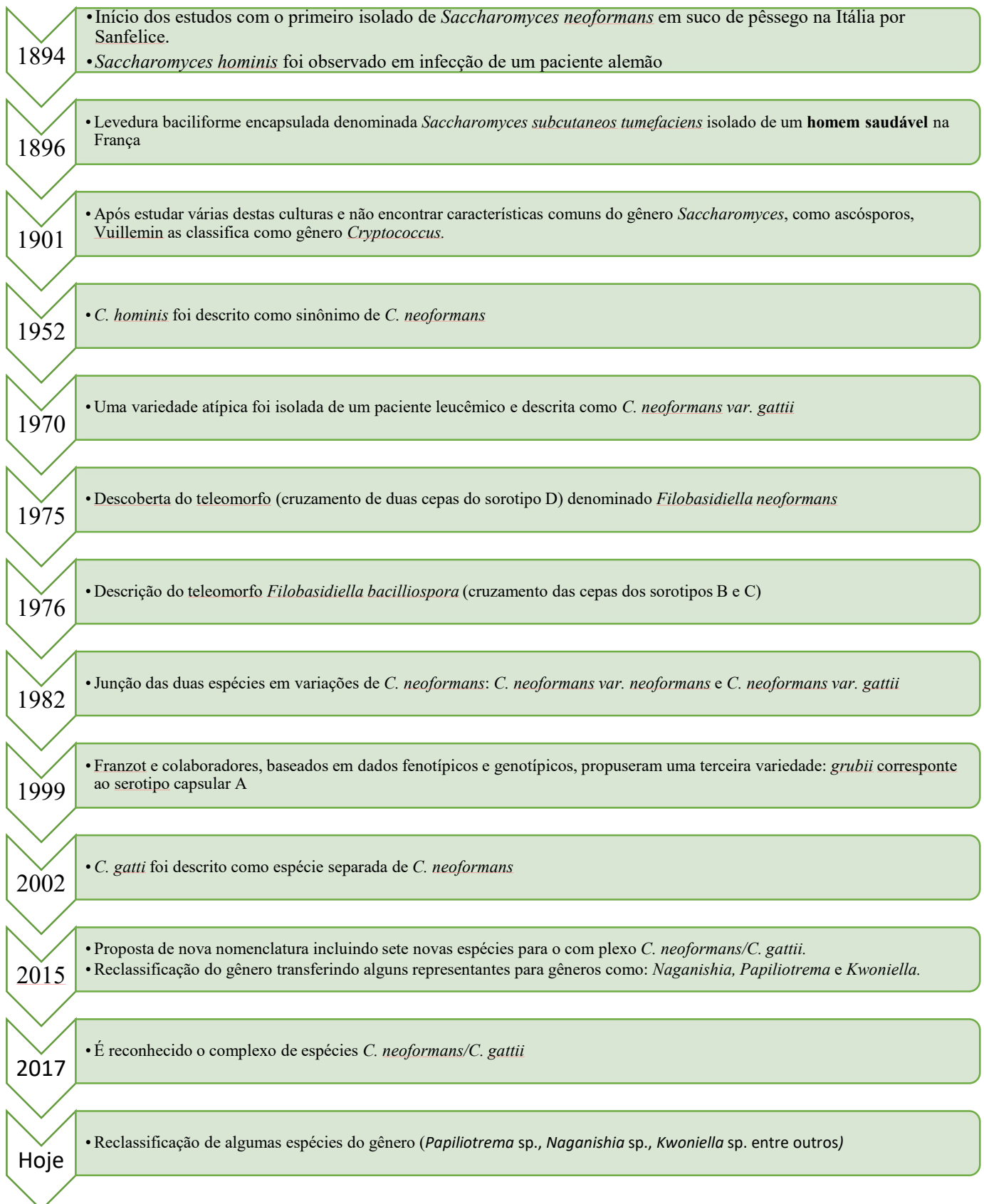


Figura 1. Evolução cronológica das espécies de *Cryptococcus*.

Fonte: Adaptado de Bovers *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2015; e Oliveira *et al.*, 2021

2.1.2. OUTRAS ESPÉCIES DE *Cryptococcus*

Apesar de não pertencerem ao chamado complexo *C. gattii/C. neoformans* e de terem sofrido reclassificação nos últimos anos, algumas espécies podem também apresentar risco a saúde humana e animal em maior ou menor grau. (FERNANDES *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Johnson e colaboradores (1998), já relatavam a capacidade destas espécies não pertencentes ao complexo *gattii/neoformans* em ocasionar infecções clínicas variando de lesões cutâneas a fungemia. Os pesquisadores atribuíam aos casos de fungemia a aquisição de forma nosocomial, na qual os fômites hospitalares teriam papel fundamental neste processo.

Leveduras como *Papiliotrema laurentii*, *Naganishia albida*, *Vanrija humicola* e *Cutaneotrichosporon curvatus*, todas pertencentes anteriormente ao gênero *Cryptococcus*, podem ser considerados patógenos emergentes em pacientes com algum grau de imunossupressão. Estas espécies são responsáveis por manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas a fungemia, esta última bastante comum para *P. laurentii* (MORETTI *et al.*, 2008; LIU *et al.*; 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Menos comum, mas ainda de interesse, algumas das leveduras citadas anteriormente, como *P. laurentii* ou mesmo *C. neoformans*, podem desenvolver um caso de criptococose cutânea primária, na qual a infecção da pele ocorre sem que haja qualquer acometimento dos órgãos internos. Ainda que mais prevalente em pacientes com certo grau de comprometimento imunológico, pode também acometer indivíduos hígidos (MOLINA-LEYVA *et al.*, 2013; SANCHES *et al.*, 2018).

2.2. FATORES DE VIRULÊNCIA

2.2.1. CÁPSULA

As leveduras de *Cryptococcus* spp. possuem envoltório constituído por uma cápsula espessa de polissacarídeos antigênicos sendo a glucuronoxilomanana (GXM) responsável por cerca de 90% de sua constituição. A GXM é composta basicamente por ácido glicurônico, xilose e manose e as diferenças em sua estrutura são a base para a sorotipagem dos isolados. Este polissacarídeo é responsável por potencializar a infecção, inibindo a resposta inflamatória e a fagocitose, além de reprimir tanto a imunidade humoral quanto a celular (CONTIN *et al.*, 2010; DERENGOWSKI, 2011; MONTROYA, *et al.* 2021).

Ainda estão presentes a galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (MP). A GalXM é composta de galactose, xilose e manose e possui propriedades antigênicas de particular interesse. As MP são constituídas por manose como carboidrato predominante, entretanto, não há muita informação sobre sua estrutura e função (DERENGOWSKI, 2011).

A cápsula deste microrganismo permite adaptação a tensões extremas como indisponibilidade de nutrientes, alterações de pH, e temperatura, estresse osmótico, alterações de concentração de oxigênio atmosférico ou dióxido de carbono (CO₂), presença de drogas antifúngicas ou sinais relacionados à biologia do hospedeiro. Desta forma, além de protegê-lo contra dessecação em ambiente natural, utiliza-se também dessa configuração capsular nos tecidos do hospedeiro infectado, fato que o torna único entre os fungos patogênicos (REOLON *et al.*, 2004; CONTIN *et al.*, 2010; MONTOYA, *et al.* 2021).

Sua cápsula atua na resistência à fagocitose mediada por macrófagos, neutrófilos e monócitos. A junção dos constituintes de sua cápsula faz com que este patógeno desempenhe vários efeitos imunomodulatórios sobre a resposta do hospedeiro, não só na inibição da fagocitose, mas também na supressão da imunidade mediada por células T e tolerância imunogênica (QUEIROZ *et al.*, 2008). A alteração do tamanho e densidade da cápsula deste fungo está diretamente relacionada à capacidade de fagocitose dos macrófagos hospedeiros e a ausência desta característica em determinadas cepas são fatores que as tornam menos virulentas entre as demais (MONTOYA, *et al.* 2021).

A cápsula é citada como fator de interferência que atua na resistência à fagocitose mediada por macrófagos, neutrófilos e monócitos. Atua também de modo a interferir na presença dos componentes do complemento impossibilitando a ligação aos receptores CR3 dos leucócitos. A reação causada por seus polissacarídeos prejudica a resposta leucocitária interferindo na migração de leucócitos e neutrófilos por quimiotaxia devido à dessensibilização de seus receptores. Essa ação faz com que estas células (leucócitos e neutrófilos) não consigam deixar a circulação sanguínea e, conseqüentemente, migrar até o local da inflamação (REOLON *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2008).

2.2.2. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Uma de suas características é a capacidade de transpor determinadas barreiras para garantir a infecção no hospedeiro. Atualmente estudos apontam três tamanhos distintos (relacionados ao diâmetro) para a levedura em questão, sendo: (1) Célula média: medindo

aproximadamente 4-7 μ m; (2) Micro células: menores ou iguais a 1 μ m; (3) Célula gigante ou titã: maiores ou iguais a 11 μ m, com algumas chegando a 100 μ m. Cada uma dessas variações possui características diferentes que contribuem para virulência e manifestação clínica da doença (MONTROYA, *et al.* 2021).

Desta forma, a levedura, ainda que dessecada, teria dificuldades em transpor as barreiras do sistema respiratório e depositar-se nos alvéolos pulmonares, sendo necessário que ocorresse o processo de opsonização para mediar a fagocitose no organismo hospedeiro (KRONSTAD, *et al.*, 2011; MONTROYA, *et al.* 2021). Entretanto, além desta via, há a produção de formas infectantes viáveis em diâmetros menores que 4 μ m através da reprodução sexuada do basidiomiceto *Cryptococcus* spp., em que ocorre a liberação de basidiósporos de tamanhos entre 1,8 a 3 μ m capazes de realizar a transposição com deposição alveolar e concretizar o crescimento fúngico nos tecidos do hospedeiro (REOLON *et al.*, 2004).

Ao se instalar no ambiente pulmonar a levedura é capaz de aumentar consideravelmente seu tamanho para assegurar sua sobrevivência no local, seja como forma de defesa ao estresse local ou proteção contra antifúngicos (MONTROYA, *et al.* 2021). Essas células aumentadas podem chegar a 100 μ m e são denominadas células titânicas. Os sinais que as induzem incluem condições de limitação de nutrientes, baixa densidade celular e limitações de oxigênio (ZARAGOZA, 2019). O papel destas células na infecção do hospedeiro ainda é pouco elucidado, entretanto, é relatado seu envolvimento em processos que contribuem para a evasão imunológica além de não serem facilmente fagocitadas devido ao seu tamanho (ESHER, *et al.*, 2018; TREVIJANO-CONTADOR, *et al.*, 2018)

As alterações no tamanho da levedura podem vir acompanhadas de alterações da estrutura de sua cápsula, envolvendo proporções de componentes da parede celular de modo a aumentar sua espessura e, eventualmente, sua virulência, uma vez que haveria interferência em fatores como reconhecimento da célula pelo hospedeiro ou mesmo dificuldade na fagocitose (MONTROYA, *et al.* 2021).

Além disso, células titânicas podem influenciar, embora ainda não se conheça o mecanismo de ação, as leveduras circunvizinhas que permaneceram inalteradas, conferindo-as resistência a fagocitose (ESHER, *et al.*, 2018).

Enquanto as células titânicas são mais presentes nos pulmões, as microcélulas são mais aparentes no cérebro visto que aquelas ajudam na sobrevivência e na patogênese enquanto estas desempenham funções mais relacionadas à disseminação e fuga do sistema imune do hospedeiro (MONTROYA, *et al.* 2021).

Outra forma de evasão do sistema imune é a formação das chamadas pseudo-hifas. Essa alteração morfológica contribui com os fatores de virulência auxiliando na adesão e penetração de mucosas e tecidos além da disseminação pelo organismo hospedeiro (ZARAGOZA, 2019; PADILLA, 2021). Lee e colaboradores (2012) demonstram que este evento está relacionado ao crescimento invasivo. Entretanto, ressaltam que este evento é um padrão de crescimento reversível em *C. neoformans*, mas um evento genético mutacional em *C. gatii*.

2.2.3. MELANIZAÇÃO

A melanina é um pigmento sintetizado por polimerização oxidativa de compostos fenólicos e tem sua síntese catalisada por uma fenoxidase intracelular, caracterizada como uma lacase e, embora sua formação não seja essencial à infecção humana, contribui para fatores indiretos como a termotolerância (MONTROYA, *et al.* 2021).

Esta enzima tem como cofator os íons de cobre e ferro e utiliza catecolaminas, dentre elas dopamina e epinefrina, como substrato desta reação (REOLON *et al.*, 2004; DERENGOWSKI, 2011).

Muitos fungos patogênicos produzem melanina (DERENGOWSKI, 2011). No caso de *Cryptococcus* spp. esse pigmento está presente na parede celular do fungo conferindo à célula proteção contra reações oxidativas, radiação UV e ao ataque das células de defesa do organismo hospedeiro (REOLON *et al.*, 2004).

Além disso, é citada como importante fator de proteção contra os radicais livres produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro durante a infecção, podendo também, eventualmente, desempenhar papel imunomodulador, desencadeando uma resposta pro- ou anti-inflamatória no hospedeiro (REOLON *et al.*, 2004; DERENGOWSKI, 2011).

2.2.4. TERMOTOLERÂNCIA

Apesar de sua preferência por ambientes de baixa temperatura (tabela 2), *Cryptococcus* spp. faz parte de um grupo de microrganismos que possui a capacidade de crescer também em temperaturas entre 35 e 40°C. Para um microrganismo ser reconhecido como um microrganismo termotolerante é necessário que cresça a cerca de 37°C, numa concentração de gás carbônico de aproximadamente de 5% e pH entre 7,3 e 7,4 (REOLON *et al.*, 2004; DERENGOWSKI, 2011).

Até o momento, é citado que apenas o complexo *C. gattii/C. neoformans* possui tal característica dentre os componentes do gênero atingindo crescimento a temperaturas superiores a 37°C (DERENGOWSKI, 2011; ARAÚJO JR *et al.*, 2015; ESHER, *et al.*, 2018; CUELLAR, 2021)

2.2.5. SECREÇÃO DE ENZIMAS E D-MANITOL

A secreção de enzimas extracelulares ativas, como proteases, fosfolipases e urease, são fatores que contribuem para a virulência, por danificar e/ou degradar moléculas hospedeiras como forma de obtenção de nutrientes ou, ainda, para combater a resposta imune e se disseminar pelo hospedeiro. A ausência dessas enzimas é associada à redução da virulência embora não caracterize a perda completa de sua patogenicidade, visto que essa está relacionada a outros fatores de virulência (MONTOYA, *et al.* 2021).

A enzima urease é secretada pelo fungo como resultado de sua ação metabólica em condições normais de crescimento tanto no meio ambiente quanto em quadros patológicos (REOLON *et al.*, 2004; CONTIN *et al.*, 2010).

Sabe-se que esta enzima é responsável por auxiliar na inativação do sistema do complemento além de facilitar a levedura no processo de invasão do sistema nervoso central por via hematogênica (REOLON *et al.*, 2004; PEDROSO, 2008; CONTIN *et al.*, 2010). Além disso, a urease é responsável pela hidrólise da ureia para produção de amônia e carbamato, tornando-se assim uma ferramenta útil na regulação do pH além de poder causar danos às membranas das células hospedeiras (MONTOYA, *et al.* 2021).

Além da urease, as proteases também atuam como fator de virulência para *C. neoformans*, cujo mecanismo de patogenicidade é o início da invasão dos tecidos do hospedeiro e da destruição das proteínas de cunho imunológico (REOLON *et al.*, 2004; DERENGOWSKI, 2011). As fosfolipases são hidrolases contendo fosfolípídeos como substratos, tem sua atuação relacionada a sobrevivência e replicação das leveduras no interior de fagócitos para a disseminação fúngica e na manutenção da morfologia celular e integridade da parede fúngica, além de ser essencial para a expressão fenotípica de múltiplos fatores de virulências como, por exemplo, crescimento a 37°C e produção de melanina (REOLON *et al.*, 2004; DERENGOWSKI, 2011). As fosfolipases também estão relacionadas ao aumento da adesão das leveduras às células epiteliais dos pulmões do hospedeiro além de hidrolisar as ligações de éster para penetrar nos tecidos citados (MONTOYA, *et al.* 2021).

Outras características que contribuem para sua virulência incluem o metabolismo de polióis. *C. neoformans* é capaz de produzir, *in vitro* e durante infecção, o poliol D-manitol que pode ser utilizado ou secretado pelo fungo. Este secretado apresenta-se como osmólito ou antioxidante durante o processo da infecção e sua produção no local da infecção é responsável pelo aumento da resistência ao estresse provocado por choque térmico, diferenças osmóticas, dano por formas reativas de oxigênio (REOLON *et al.*, 2004; DERENGOWSKI, 2011).

2.3. EPIDEMIOLOGIA DE *Cryptococcus* sp.

Cryptococcus spp. é um fungo de hábito saprofítico e mundialmente distribuído (BOVERS *et al.*, 2008). As leveduras do gênero são consideradas cosmopolitas e apresentam características que as conferem notável importância clínica. São haplóides, encapsuladas, reproduzindo-se predominantemente por brotamentos sendo uni ou bibrotantes (reprodução assexuada) e podem estar presentes em uma gama de ambientes (FILIÚ *et al.*, 2002; DERENGOWSKI, 2011; ROCHA *et al.*, 2014). Já sua forma sexuada, denominada *Filobasidiella neoformans*, para *C. neoformans* ou *Filobasidiella bacilliospora*, para *C. gattii*, é marcada pela presença de basidiósporos, o que enquadra o gênero como representante do Filo Basidiomycota (BOVERS *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2008; DERENGOWSKI, 2011).

Edwards e colaboradores (2021), através de estudo comparativo e relacional, demonstram a distribuição mundial dos tipos moleculares de *Cryptococcus* sp., demonstrando constância na distribuição dos casos e tipos moleculares ao longo dos continentes além da identificação de uma nova variação - *C. gattii* VGV - a partir de fontes ambientais na África. No entanto, as demais informações permanecem conforme os dados apresentados por Cogliati (2013).

No total foram avaliadas mais de 69 mil amostras sendo 62.239 provenientes de material clínico e 6.783 de coleta ambiental. Proporcionalmente, Ásia e África foram os representantes mais significativos em termos percentuais sendo, cada um, responsável por 28% (aproximadamente 19.600 amostras) das amostras e a Oceania o menos significativo com apenas 4% (2.518 amostras) COGLIATI (2013).

Estudos realizados na América Latina apontam como principais tipos moleculares VNI (mundialmente distribuído) e VGII (característico de regiões tropicais/subtropicais). Firacative e colaboradores (2018) fazem a análise desses estudos e demonstram a perspectiva do continente apresentado na tabela 4 em contraponto ao quadro 3 com o compilado de estudos globais (FIRACATIVE *et al.* 2018).

Tabela 3. Resumo dos tipos moleculares de *Cryptococcus* sp. e sua distribuição global.

Anamórfico	<i>Cryptococcus neoformans</i>			<i>Cryptococcus gattii</i>	
Teleomórfico	Filobasidiella neoformans			Filobasidiella bacilliospora	
Sorotipos	A		D	AD	B C
Variedades	var. <i>grubii</i>		var. <i>neoformans</i>		<i>C. gattii</i>
Tipos moleculares	VNI-VNII	VNBI-VNBII-VGV	VNIII-VNIV		VGI-VGII VGIII-VGIV
Distribuição	mundial	África	Europa		Tropical/subtropical
Hospedeiro	Imunocomprometido			Imunocompetente	
Tipo de patógeno	Oportunista			Primário	
Reservatórios naturais	Excretas de aves e restos de árvores e plantas em decomposição			Cascas e cavidades de árvores	
Detecção facilitada	Sangue e urina			Escarro	
Índice de letalidade	Mais expressivo			Menos letal	
Características	Maior afinidade por SNC			Apresenta consolidações pulmonares.	

Fonte: Adaptado de SEVERO *et al.*, 2009; CONTIN *et al.*, 2010; FERNANDES, 2010; FILIÚ *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2014; DESJARDINS *et al.*, 2017; FARRER *et al.*, 2019.

Tabela 4. Tipos moleculares de *Cryptococcus* sp. da América Latina com destaque para a proporção dos isolados encontrados no Brasil em relação ao total

a	Brasil	VNI	VNII	VNIII	VNIV	VGI	VGII	VGIII	VGIV	Total
	Clínico	695	38	-	-	19	269	18	-	1.039
	Ambiental	301	8	1	23	7	215	-	-	555
	Veterinário	-	-	-	-	-	5	-	-	5
	Total	996	46	1	23	26	489	18	0	1.599
	América Latina	VNI	VNII	VNIII	VNIV	VGI	VGII	VGIII	VGIV	Total
	Clínico	1.717	107	25	22	50	339	90	9	2.359
	Ambiental	639	9	1	23	33	322	83	11	1.121
	Veterinário	0	0	0	0	1	5	0	0	6
	Total	2.356	116	26	45	84	666	173	20	3.486
b	Brasil	VNI	VNII	VNIII	VNIV	VGI	VGII	VGIII	VGIV	Total
	Clínico	19,94%	1,09%	-	-	0,55%	7,72%	0,52%	-	29,80%
	Ambiental	8,63%	0,23%	0,03%	0,66%	0,20%	6,17%	-	-	15,92%
	Veterinário	-	-	-	-	-	0,14%	-	-	0,14%
	Total	28,57%	1,32%	0,03%	0,66%	0,75%	14,03%	0,52%	0,00%	45,87%
	América Latina									Total
	Clínico	49,25%	3,07%	0,72%	0,63%	1,43%	9,72%	2,58%	0,26%	0,67671
	Ambiental	18,33%	0,26%	0,03%	0,66%	0,95%	9,24%	2,38%	0,32%	0,32157
	Veterinário	-	-	-	-	0,03%	0,14%	-	-	0,00172
	Total	67,58%	3,33%	0,75%	1,29%	2,41%	19,10%	4,96%	0,57%	100%

Valores apresentados (a) em números absolutos e (b) em percentual.

Fonte: Adaptado de FIRACATIVE *et al.* 2018.

Trilles e colaboradores, conforme classificação baseada no complexo de espécies *C. gattii/C. neoformans*, demonstram a presença das espécies e seus genótipos moleculares de acordo com a região do país através de estudo realizado em 2008. Este estudo demonstra que em MG (figura 2) estão presentes os dois genótipos moleculares de maior virulência (VNII e

VGII), fazendo-se necessária maior atenção em caso de possibilidade de contato com tal microrganismo.

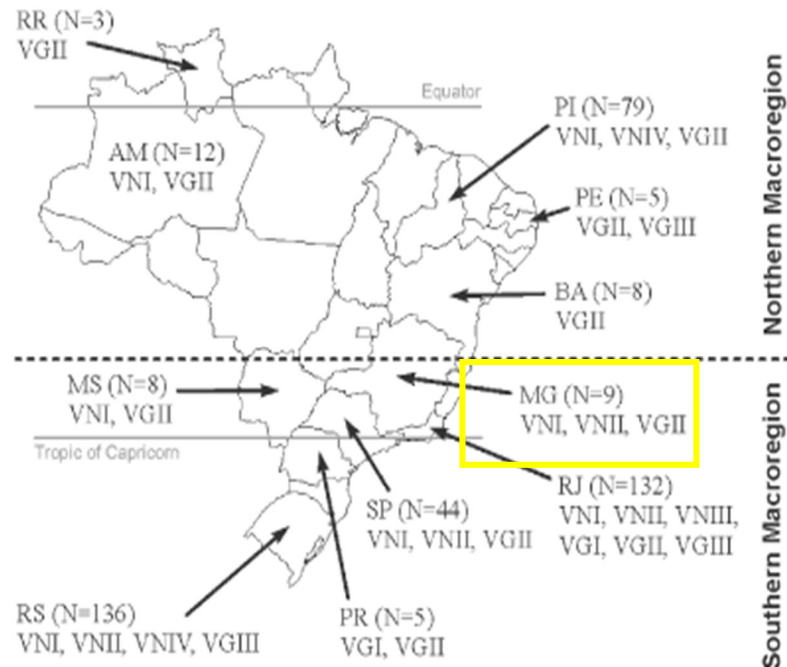


Figura 2 - Mapa do Brasil mostrando as duas macrorregiões (macrorregiões Norte e Sul) e a distribuição dos tipos moleculares e número de isolados de acordo com os estados envolvidos no estudo: AM: Amazonas; BA: Bahia; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo.

Fonte: Adaptado de Trilles *et al.*, 2008.

O desenvolvimento de microrganismos associados a excretas de aves e quirópteros já é conhecido, entretanto o fator que o torna possível e/ou facilitado é a presença de creatinina, ácido úrico, purinas e xantinas, utilizadas e consideradas como um importante fator de crescimento (TENCATE *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; MENDES, 2018). Com base nisso, características físicoquímicas do solo aliadas ao enriquecimento por excretas de aves e quirópteros, desenvolvem um perfeito meio de cultura para crescimento, desenvolvimento e disseminação de fungos com potencial patogênico, entre eles, *Cryptococcus* spp. (TENCATE *et al.*, 2012).

Fatores nutricionais não são os únicos envolvidos no processo de proliferação de microrganismos e a cidade de Belo Horizonte (BH) e sua Região metropolitana (RMBH) oferecem algumas das condições favoráveis para crescimento de *Cryptococcus* spp. como a faixa de temperatura média e as condições de umidade adequadas ao fungo, como apresentado na tabela 5 (COLOMBO *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2018).

Tabela 5. Relação entre as características de BH e as predileções de *Cryptococcus* spp.

	Altitude	Umidade	Temperatura	Clima
Fungo	2000 a 3000m	Alta	< 30 °C	Frio
BH	852m	69,70%	19,6 – 21,1 °C	Aw

Legenda: Aw: Clima tropical, segundo classificação de Köppen; Cwa: Clima temperado quente, segundo classificação de Köppen.

Obs.: 1. Dados de BH obtidos através das médias do ano de 2019 segundo INMET. **2.** Altitude em relação ao nível do mar. **3.** BH possui predominantemente clima Aw, entretanto, algumas cidades da RMBH possuem clima Cwa, como Ibitié, por exemplo.

Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados do INMET, COLOMBO *et al.*, 2015, MARTINS *et al.*, 2018, e portal da prefeitura de Belo horizonte.

2.3.1. FORMAS CLÍNICAS

A Criptococose é uma micose de natureza sistêmica, normalmente, adquirida via inalação de propágulos fúngicos e, do ponto de vista clínico, é dividida em três entidades distintas:

- Criptococose oportunista - cosmopolita, associada a condições de imunossupressão do hospedeiro. É, predominantemente, causada por *C. neoformans* (MORETTI *et al.*, 2008)
- Criptococose primária – endêmica em áreas tropicais e subtropicais, ocorre em hospedeiro aparentemente hígido e é causada, predominantemente, por *C. gattii* (MORETTI *et al.*, 2008)
- Criptococose cutânea primária (CCP) - desde 2003 reconhecida como entidade clínica distinta, na CCP ocorre a infecção da pele sem que haja acometimento de órgãos internos. Há maior incidência em pacientes imunocomprometidos, mas seu desenvolvimento em indivíduos hígidos também é bem documentado (SANCHES *et al.*, 2018). Apesar de pouco comum, são descritos casos de CCP causados por *C. neoformans*, *C. gatti* (MARQUES *et al.*, 2012; SANCHES *et al.*, 2018) e, até mesmo, por *P. laurentii* (MOLINA-LEYVA *et al.*, 2013).

Segundo Moretti e colaboradores (2008), a mortalidade pela doença é estimada em 10% nos países desenvolvidos chegando a 43% nos países em desenvolvimento. Sendo que, tanto a criptococose oportunista quanto a primária podem, eventualmente, desencadear meningoencefalite, de evolução grave e fatal, acompanhada ou não, de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renal, entre outros.

A meningoecefalite é a apresentação mais comum da doença, ocorrendo em mais de 80% dos casos, sendo ela isolada ou associada ao comprometimento pulmonar. Sua apresentação pode se dar como meningite ou meningoecefalite aguda ou subaguda ou, ainda, em casos mais raros, apresentando lesões focais únicas ou múltiplas no SNC simulando neoplasias. Eventualmente, associado à doença, podem ocorrer cistos mucinosos, dilatação dos espaços de *Virchow-Robin*, meningite circunscrita, criptococoma, forma granulomatosa miliar, realce meníngeo, ependimite, ventriculite e hidrocefalia (MORETTI *et al.*, 2008).

O comprometimento pulmonar é a segunda forma mais frequente, após o acometimento do sistema nervoso central. A lesão pulmonar primária, pode ser observada nas três zonas pulmonares radiológicas (cortical, medular ou cernal) e é, em geral, nodular, gelatinosa e que, raramente, evoluiu para calcificação (MORETTI *et al.*, 2008; SANCHES *et al.*, 2018; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

Geralmente atreladas ao desenvolvimento de um quadro clínico de acometimento do SNC podem ocorrer manifestações de criptococose ocular, cutânea, óssea e prostatite criptocócica. Os diagnósticos oftalmológicos, em maioria, estão relacionados a casos de coriorretinite. Já a criptococose óssea, pode ocorrer de forma assintomática ou em na forma disseminada da micose. A prostatite criptocócica está relacionada ao trato geniturinário e é menos comum, entretanto, pode haver casos de acometimento deste sistema em forma de pielonefrite, prostatite e mais raramente epididimite e orquite. Por fim, a criptococose cutânea, em geral, representa um marcador de doença disseminada, entretanto, é possível a inoculação direta e acometimento único deste tecido. (MORETTI *et al.*, 2008; SANCHES *et al.*, 2018; ZAVALA; BADDLEY, 2020; MONTROYA *et al.*, 2021).

2.3.2. TRATAMENTO E RESISTÊNCIA

Em 2000, a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) publicou pela primeira vez o guia de diretrizes para o manejo da criptococose, tendo uma versão atualizada em 2010. O tratamento não difere quanto ao microrganismo, é levada em consideração o órgão/tecido acometido seu grau de comprometimento e o estado imune do paciente (MORETTI *et al.*, 2008; PERFECT *et al.*, 2010).

Segundo o guia de vigilância em saúde do Ministério da Saúde, o tratamento de infecções do sistema nervoso central (SNC) consiste em três etapas: indução, consolidação e manutenção. Para a indução, o tratamento se baseia na utilização de anfotericina B

acrescida ou não de flucitosina com doses que variam de acordo com peso do paciente e grau de acometimento. Essa etapa possui duração variável podendo atingir um período de duas a seis semanas para infecção disseminada (MORETTI *et al.*, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2021).

Para a etapa de consolidação é utilizado fluconazol por, pelo menos, oito semanas nos casos de meningoencefalite. E, por fim, a manutenção corresponde a utilização de Fluconazol por um período não inferior a seis meses (MORETTI *et al.*, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2021).

Nos casos de doença pulmonar são utilizados Fluconazol, Voriconazol, Posaconazol, ou Itraconazol, com dosagens variáveis em decorrência do grau de acometimento podendo ser utilizados pelo período de seis a doze meses. (MORETTI *et al.*, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2021).

Para casos de acometimento cutâneo, de próstata e de olhos, em geral, ocorre a disseminação hematogênica fazendo com que tais eventos devam ser considerados e avaliados conforme os protocolos indicados para as formas de doença grave, mesmo que a manifestação clínica sugira doença localizada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Entretanto, nos casos cutâneos isolados pode-se, além de adotar a terapia convencional, avaliar a necessidade de intervenção cirúrgica (MORETTI *et al.*, 2008).

O resumo esquemático dos tratamentos, baseado em recomendação da quinta edição do guia de vigilância em saúde do Ministério da Saúde, está descrito na tabela 6.

Tabela 6. Recomendações de tratamento e dosagem segundo Guia de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

Tabela 6.1. Formas de tratamento e dosagem para as formas de criptococose pulmonar leve a moderada

Esquemas (via oral)	Duração do tratamento
Primeira escolha:	
Fluconazol 400 mg/dia	Pelo menos 6 a 12 meses
Alternativas (sem ordem de prioridade)^a:	
Itraconazol (200 mg, 2x/dia) Voriconazol (200 mg, 2x/dia) Posaconazol comprimidos (300 mg, 2x/dia, durante 1 dia; depois, 300 mg/dia)	Pelo menos 6 a 12 meses

^a Sugestões alternativas aceitáveis no tratamento da forma pulmonar, caso o fluconazol não esteja disponível ou exista contraindicação para seu uso.

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2021.

Tabela 6.2. Recomendações de tratamento e dosagem para as formas graves de criptococose (meningite criptocócica; pneumonia criptocócica grave; criptococemia), segundo grupos de risco

Tabela 6.2.1. Esquema para tratamento da criptococose grave em pessoas vivendo com HIV/AIDS

Esquema para tratamento da criptococose grave em pessoas vivendo com HIV/AIDS	
Indução:	Duração
Preferencial:	
Formulação lipídica de anfotericina B 3mg a 5 mg/kg/dia mais flucitosina 100 mg/kg/dia.	Pelo menos 2 semanas
Alternativas:	
<p>i) Se presença ou predisposição de dano renal: anfotericina B lipossomal 3 mg/kg/dia, ou complexo lipídico de anfotericina B 5 mg/kg/dia mais flucitosina 100 mg/kg/dia.</p> <p>ii) Se anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B e flucitosina não disponíveis: anfotericina B desoxicolato 1 mg/kg/dia mais fluconazol 1.200 mg/dia.</p> <p>iii) Se contraindicação e/ou indisponibilidade para uso de anfotericina B desoxicolato, anfotericina B lipossomal e complexo lipídico de anfotericina B: flucitosina 100 mg/kg/dia mais fluconazol 1.200 mg/dia.</p> <p>iv) Se indisponibilidade de formulação lipídica de anfotericina B + dificuldade para monitoramento laboratorial de toxicidade medicamentosa: anfotericina B desoxicolato 1 mg/kg/dia mais flucitosina 100 mg/kg/dia, durante uma semana, seguidas de fluconazol 1.200 mg/dia, durante mais uma semana.</p>	Pelo menos 2 semanas
Consolidação:	
fluconazol 400 mg a 800 mg/dia.	Pelo menos 8 semanas
Manutenção:	
fluconazol 200 mg/dia.	Pelo menos 1 ano

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2021.

Tabela 6.2.2. Esquema para tratamento da criptococose grave em indivíduos transplantados de órgão sólido, transplantados hematológicos e doenças hematológicas

Esquema para tratamento da criptococose grave em indivíduos transplantados de órgão sólido, transplantados hematológicos e doenças hematológicas	
Indução:	Duração
Preferencial:	
Anfotericina B lipossomal 3 mg/kg/dia, ou complexo lipídico de anfotericina B 5 mg/kg/dia mais flucitosina 100 mg/kg/dia.	Pelo menos 2 semanas
Alternativas:	
i) Se anfotericina B lipossomal e complexo lipídico de anfotericina B não disponíveis : anfotericina B desoxicolato 0,7 mg a 1 mg/kg/dia mais flucitosina 100 mg/kg/dia.	Pelo menos 2 semanas
ii) Se flucitosina não disponível : anfotericina B lipossomal 3 mg/kg/dia ou complexo lipídico de anfotericina B 5 mg/kg/dia.	Pelo menos 4 a 6 semanas
Consolidação:	
fluconazol 400 mg a 800 mg/dia.	Pelo menos 8 semanas
Manutenção:	
fluconazol 200 mg a 400 mg/dia.	Pelo menos 6 a 12 meses

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2021.

Tabela 6.2.3. Esquema para tratamento da criptococose grave em indivíduos aparentemente imunocompetentes.

Esquema para indivíduos aparentemente imunocompetentes	
Indução:	Duração
Preferencial:	
Anfotericina B lipossomal 3 mg/kg/dia, ou complexo lipídico de anfotericina B 5 mg/kg/dia mais flucitosina 100 mg/kg/dia.	Pelo menos 4 semanas
Alternativas:	
i) Se anfotericina B lipossomal e complexo lipídico de anfotericina B não disponíveis : anfotericina B desoxicolato 0,7 mg a 1 mg/kg/dia mais flucitosina 100 mg/kg/dia.	Pelo menos 4 semanas
ii) Se flucitosina não disponível : anfotericina B lipossomal 3 mg/kg/dia ou complexo lipídico de anfotericina B 5 mg/kg/dia.	Pelo menos 6 semanas
Consolidação:	
fluconazol 400 mg a 800 mg/dia.	Pelo menos 8 semanas
iii) Se anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B e flucitosina não disponíveis : anfotericina B desoxicolato 0,7 mg a 1 mg/kg/dia.	Pelo menos 6 semanas
Manutenção:	
fluconazol 200 mg/dia	Pelo menos 6 a 12 meses

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2021.

Existem diversos relatos na literatura sobre a resistência dos isolados de *Cryptococcus* ao fluconazol. Alves e colaboradores (1997) apresentam um caso de homem de 30 anos HIV+, com tuberculose e histórico de abuso de drogas intravenosas com duas internações em um período de quatro meses com isolamento de *C. neoformans* de líquido cefalorraquidiano. O acompanhamento do tratamento e da terapia antifúngica na segunda internação demonstrou possível desenvolvimento de resistência secundária ao fluconazol.

Corroborando com os estudos de Alves e colaboradores (1997), Posterano *et al.*, (2003) relatam que, embora a anfotericina B e os chamados “azóis” sistêmicos sejam drogas antifúngicas altamente ativas contra *C. neoformans*, é comum ocorrer repetição da infecção fúngica sendo, portanto, uma doença de difícil manejo. Estes autores sugerem que o paciente deve ser bem assistido para evitar as recaídas e que um mecanismo ativo de efluxo de drogas pode estar envolvido no desenvolvimento da resistência aos “azóis” no caso desse patógeno humano.

Em trabalho realizado para o teste de antifúngicos disponíveis para utilização no Brasil - polienos (anfotericina B) e azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol) - foram utilizadas amostras de *Cryptococcus* spp. isoladas de pacientes do Hospital Clínico de Uberlândia no período entre 2004 e 2013. Após correlação dos achados com os pacientes acometidos, foi constatada a prevalência da criptococose em pacientes do sexo masculino, HIV+ que, apesar da terapia medicamentosa apropriada, em sua maioria veio a óbito. No entanto, dentre os isolados, todos apresentaram suscetibilidade *in vitro* aos agentes antifúngicos testados e *C. neoformans* var. *grubii* (genótipo VNI) foi a levedura de maior destaque (AGUIAR *et al.*, 2017).

Em estudo com amostras clínicas e ambientais previamente identificadas entre *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII e apenas uma amostra sem genótipo definido, foi observado um percentual de 77% de resistência ao fluconazol entre os isolados clínicos e 60% entre os ambientais. Se comparado entre os grupos moleculares, 80% dos isolados resistentes pertenciam a *C. neoformans* VNI e apenas 16% a de *C. gattii* VGII. O isolado clínico sem identificação genotípica também possuía resistência (ROCHA *et al.*, 2014).

Embora o avanço da medicina e a ampliação ao acesso a tratamento e terapias médicas, incluindo antirretrovirais, tenha proporcionado uma diminuição significativa de diversas doenças nas últimas décadas – incluindo a própria infecção criptocócica –, estudos apontam que, por volta de 2014 ainda havia cerca de 223.000 casos de meningite criptocócica ao redor do mundo e cerca de 180.000 mortes resultantes de criptococose associada ao HIV (CARLSON *et al.*, 2021; MORALES-LÓPEZ; GARCIA-EFFRON, 2021).

Em decorrência disto, drogas antifúngicas foram amplamente difundidas no tratamento desta doença. As mais comuns empregadas no tratamento da criptococose são: o Fluconazol (FLC) um medicamento da classe dos triazólicos, de efeito fungistático, e Anfotericina B (ANB), uma droga da classe dos polienos e de efeito fungicida (CARLSON *et al.*, 2021; FRANCISCO *et al.*, 2021).

O FLC, por se tratar de uma droga de efeito fungistático, previne o crescimento fúngico inibindo a enzima lanosterol 14 α -demetilase, codificada por ERG11, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. O fungo resistente a esta droga, normalmente, apresenta mutações no gene ERG11. A AMB, por sua vez, pertence à classe dos polienos e é comumente utilizada no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Por se tratar de uma droga de efeito fungicida, ao contrário do FLC, a AMB atua de modo a eliminar as células fúngicas diretamente ligados ao ergosterol na membrana plasmática, não apenas interrompendo a via de biossíntese do ergosterol (CARLSON *et al.*, 2021).

Ambos levam à geração de estresse oxidativo em fungos devido à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), embora este efeito seja mais expressivo quando utilizada AMB. Além do estresse oxidativo, outros fatores ambientais podem influenciar a eficiência da terapia antifúngica, sendo relatado que as células de *C. neoformans* tratadas com FLC desenvolvem colônias resistentes mais facilmente quando incubadas em YPD (em comparação ao YNB) e quando a temperatura está abaixo de 35°C sendo o efeito oposto demonstrado quando as células são tratadas com AMB. O efeito de temperatura não apresenta tal reciprocidade sendo ambos mais afetados aos medicamentos quando a temperatura é elevada (CARLSON *et al.*, 2021).

Além da importância da observação dos fatores ambientais e sua influência, é importante citar que, em contraste à FLC, AMB apresenta toxicidade significativa para os seres humanos sendo, portanto, utilizada dentro do ambiente hospitalar e com certa parcimônia nos tratamentos a que ela é indicada (MORETTI *et al.*, 2008; CARLSON *et al.*, 2021).

2.4. INTERAÇÃO *Cryptococcus*-HOSPEDEIRO

Criptococose ou doença criptocócica são alguns dos nomes dados ao agrupamento de infecções causadas por leveduras do gênero *Cryptococcus* sp. Este patógeno teve maior notoriedade com o advento da AIDS na década de 80 e se manifesta, entre outras formas, por meio de pneumonia ou meningite (FRANCISCO *et al.*, 2021). Por possuir distribuição global estima-se que, anualmente, ocorram 223.100 novos casos e mais de 181.000 mortes em decorrência de doenças causadas por esse microrganismo – principalmente em pacientes

infectados pelo HIV – dentre os quais cerca de dois quartos destes valores (162.500 novos casos e 135.900 mortes) estejam concentrados na África subsaariana (EDWARDS *et al.*, 2021; HONG *et al.*, 2021).

Em estudo de revisão apresentado em 2021, novamente a prevalência do sexo masculino aliada ao comprometimento do sistema imunológico foi relatada. Além disso, afirma-se que, na América Latina, cerca de 3,7 milhões de pessoas vivem com HIV, das quais aproximadamente 40% não têm acesso à terapia antirretroviral. Aliado a essas informações, é acrescido o dado de que, só no ano de 2019 foram registrados 120 mil novos casos de infecções pelo vírus, representando um aumento de 7% dos novos diagnósticos em relação ao ano anterior (FIRACATIVE *et al.*, 2021).

YU e colaboradores (2010) reiteram a alta taxa de mortalidade associada a este microrganismo e destacam a propensão desta levedura em crescer dentro do parênquima cerebral, especificamente o espaço subaracnóide. Em seu trabalho, estes pesquisadores abordam o ciclo de vida da doença criptocócica contendo seis estágios principais ou locais de infecção/doença: (1) Início da infecção nos pulmões; (2) Sobrevivência e proliferação de leveduras dentro do pulmão; (3) Dormência das leveduras em granulomas hospedeiros; (4) Reativação de uma infecção latente ou dormente; (5) Disseminação através do sangue, tecidos, e barreira hematoencefálica; e, finalmente; (6) Proliferação das leveduras no cérebro, parênquima e espaço subaracnóide.

No referido trabalho também são abordados outros aspectos da doença criptocócica. Segundo os pesquisadores o estudo se baseou na fase de proliferação, estágio no qual a levedura é mais encontrada no organismo hospedeiro, com enfoque no sistema nervoso central (SNC) visto que o local e o referido estágio clínico são comumente associados no cotidiano hospitalar. (YU *et al.*, 2021).

Com relação ao SNC, mais especificamente o espaço subaracnóide, relatam ser o espaço corporal de maior relevância clínica para a infecção fúngica por *Cryptococcus* sp. Quando a infecção atinge este espaço é, geralmente, o momento em que o paciente busca por ajuda médica. Entretanto, a referida fase implica em um acentuado avanço da infecção e a doença, por vezes, se torna fatal para o hospedeiro (YU *et al.*, 2021).

A infecção humana e animal, normalmente, ocorre através da inalação de partículas fúngicas aerolizadas que, após instalação no pulmão pode percorrer três caminhos (BARBOSA *et al.*, 2006; FARRER *et al.*, 2021):

- Acometimento pulmonar assintomático (cerca de 1/3 dos casos) apenas com achados radiológicos ao acaso. Estes casos normalmente ocorrem em pacientes imunocompetentes.
- Pacientes sintomáticos apresentando quadros de febre, tosse, dor torácica, perda de peso e escarro purulento. É ainda um quadro de importante atenção aos pacientes que apresentam situação de comprometimento imunológico, podendo a criptococose ser grave e rapidamente progressiva.
- Devido ao seu forte tropismo pelo sistema nervoso central o quadro pode evoluir, (levando-se em consideração o sistema imunológico do paciente, a quantidade inalada e também a cepa envolvida) para um quadro de meningite fúngica.

O fungo pode atingir o SNC de diferentes maneiras devido a sua capacidade de transpor a barreira hematoencefálica através de três mecanismos atualmente descritos (ESHER, *et al.*, 2018):

- (i) a passagem direta de leveduras de vida livre através das células endoteliais;
- (ii) a manipulação das junções estreitas da barreira hematoencefálica, podendo ser potencializadas através da utilização de drogas como a metanfetamina, por exemplo;
- (iii) e o mecanismo denominado “cavalo de Tróia”, no qual as leveduras se utilizam das células fagocíticas para transpor a barreira hematoencefálica.

Entretanto, o desenvolvimento e intensidade da doença está relacionado a diversos fatores que podem ser definidos como fatores humanos, fatores ligados ao fungo ou, ainda, fatores de relação hospedeiro x fungo. (MONTROYA, *et al.* 2021)

- Fatores humanos: idade, sexo biológico, etnia, fatores genéticos, status imunológico, doenças de base, coinfeções, HIV/AIDS, transplantes, drogas/doenças imunossupressoras, duração da infecção antes do diagnóstico, duração da infecção antes da terapia antifúngica, entre outros.

- Fatores de relação hospedeiro x fungo: localização geográfica, tempo de exposição, relação/interação humana com a natureza, resposta imune x adaptação fúngica, são exemplos desta relação.

- Fatores relacionados ao fungo: neste quesito, podem ser citados exemplos como espécie, tipo molecular, plasticidade do genoma, virulência, suscetibilidade a antifúngicos, interações microbiológicas e interações celulares.

Embora mal compreendida, há certa predileção pelo sexo masculino, sendo representada por cerca de 61-80% dos casos de criptococose. Estudos recentes demonstram que pode haver relação com hormônios ligados ao sexo biológico que fazem com que as fêmeas apresentem

maior potencial de fagocitose das leveduras se comparado aos macrófagos dos machos estudados. Os monócitos periféricos sanguíneos também têm maior proliferação de células fúngicas e, além disso, a testosterona também pode ter influência na produção de melanina se comparado ao estradiol. Em contraponto, as crianças costumam ser menos acometidas, porém, quando ocorre, a proporção entre sexo masculino e feminino se mantém. (MONTROYA, *et al.* 2021).

2.4.1. HOSPEDEIRO HUMANO

Em humanos, a resposta tecidual à presença do fungo é diversa sendo que, em indivíduos imunossuprimidos, a reação inflamatória pode estar ausente, permitindo o crescimento de massas gelatinosas da levedura nos tecidos ou, em casos de imunossupressão grave, havendo disseminação para pele, órgãos parenquimatosos e ossos. Em indivíduos imunocompetentes ou com doença prolongada, é induzida reação granulomatosa composta por macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas (KOMMERS *et al.*, 2005; FIRACATIVE *et al.*, 2018; MONTROYA, *et al.* 2021).

Martins e colaboradores (2011) citam *C. neoformans* como o principal agente causador da criptococose no Brasil sendo amplamente distribuído no país e comumente relacionado a quadros de micose sistêmica em pacientes com SIDA, ocupando a terceira colocação nas causas de infecção oportunista do SNC nesses pacientes.

C. gattii, ao contrário, atua principalmente como patógeno primário em hospedeiro sem comprometimento celular, sem distinção entre crianças e adultos jovens, e ocorrem predominantemente nas regiões Norte e Nordeste, sendo, portanto, considerado endêmico dos estados do Amazonas (AM), Pará (PA), Roraima, Piauí (PI), Pernambuco e Bahia. (TRILLES *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2011)

Conhecido principalmente por seu caráter oportunista, este fungo é capaz de ocasionar doenças em diversos órgãos, sobretudo pulmões e sistema nervoso central (SNC), entretanto, casos de endocardite, pielonefrite, artrite, osteomielite e prostatite já foram descritos (SANCHES *et al.*, 2018; FIRACATIVE *et al.*, 2018). O SNC se torna o local mais comumente envolvido na criptococose devido sua afinidade e tropismo pela região. Embora *C. gatti* e *C. neoformans* apresentem relatos de envolvimento do SNC, é descrito que as infecções ocasionadas por *C. gattii* estão mais relacionadas à doença pulmonar focal do que disseminação para o SNC e, quando esta ocorre, se dá em forma de abscessos cerebrais focais não apresentando, em geral, infecções generalizadas do sistema. Tal predileção poderia estar

relacionada às necessidades nutricionais, que poderiam ser supridas nos tecidos pulmonares por *C. gattii* e no líquido cefalorraquidiano e/ou tecidos da região dos gânglios da base por *C. neoformans* (CORRÊA *et al.*, 2002; ESHER, *et al.*, 2018).

Também conhecida como torulose ou blastomicose européia a criptococose é ainda considerada uma importante doença oportunista e possui significativa taxa de morbidade e mortalidade entre os indivíduos HIV positivos (DARZÉ *et al.*, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2008; SOUZA; SOUSA 2018; FIRACATIVE *et al.*, 2021; MONTOYA *et al.*, 2021). Os casos de confirmação da doença e de seus agravos tem aumento expressivo em consonância ao surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e ao advento de terapias imunossupressoras, sendo o primeiro considerado, atualmente, o fator predisponente de maior importância epidemiológica (FERNANDES *et al.*, 2016; FIRACATIVE *et al.* 2018, FIRACATIVE *et al.*, 2021; MONTOYA *et al.*, 2021).

No Brasil, atualmente, sua manifestação em nível de SNC levanta a suspeita de SIDA uma vez que até 10% dos pacientes HIV positivos chegam a desenvolver quadros da doença (LARSSON *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2016).

Nos animais os casos de imunossupressão, embora nem sempre se consiga estabelecer a relação direta de causa-efeito, também são relatados e infecções virais como a leucemia viral felina (FeLV), imunodeficiência adquirida viral felina (FIV) além de neoplasias podem ser fatores predisponentes aos animais (LARSSON *et al.*, 2003).

Apesar do chamado complexo *C. neoformans/C. gatti* ser o principal causador da enfermidade, outras espécies do gênero podem estar envolvidas nas infecções, embora com menor frequência (FERNANDES *et al.*, 2016). Em pacientes com algum grau de imunossupressão, podem ser considerados patógenos emergentes as leveduras: *C. (Papiliotrema) laurentii*, *C. (Naganishia) albidus*, *C. (Vanrija) humicola* e *C. (Cutaneotrichosporon) curvatus*. Estas espécies são responsáveis por manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas a fungemia, esta última bastante comum para *C. (Papiliotrema) laurentii* (MORETTI *et al.*, 2008)

Além disso, desde 2003 reconhecida como entidade clínica distinta, a criptococose cutânea primária tem como definição a infecção da pele por fungos do gênero sem que haja acometimento de órgãos internos e, ainda que mais prevalente em pacientes imunocomprometidos, há registros bem documentados de seu desenvolvimento em indivíduos hígidos (SANCHES *et al.*, 2018).

A infecção se inicia, na maioria dos casos, por via respiratória (figura 3), através da inalação de propágulos fúngicos em suspensão (BOVERS *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2008;

DERENGOWSKI, 2011). Entretanto, as células da levedura possuem tamanho incompatível com a inalação e posterior penetração nos alvéolos, sendo os basidiósporos os mais eficazes em causar a infecção (BOVERS *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2008).

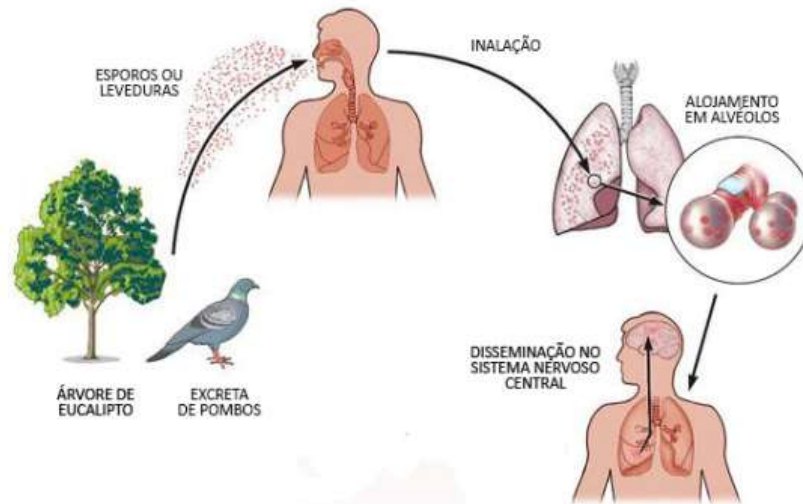


Figura 3: Principal forma de transmissão de *Cryptococcus* spp.
Fonte: Ministério da Saúde.

Após a inalação, quando presente nos pulmões, a infecção pode se tornar latente em decorrência da contenção do patógeno em granulomas ou evoluir para a forma aguda da doença. Desta forma, no espaço alveolar o fungo encontra a primeira linha de defesa do hospedeiro: os macrófagos alveolares, capazes de internalizar rapidamente as leveduras. Tal processo é seguido pela acidificação do fagossomo e fusão deste ao lisossomo. Entretanto, embora o ambiente intracelular não seja o mais adequado, as leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. são capazes de se manter e realizar a replicação nestas condições. Isso se torna fundamental para o microrganismo uma vez que os macrófagos podem translocar-se do pulmão para outros órgãos, servindo assim como carreadores da infecção (DERENGOWSKI, 2011).

Em estudo retrospectivo com pacientes do Hospital das Clínicas de Minas Gerais entre 2000 e 2013 foi possível realizar algumas inferências demográficas com relação à neurocriptococose. Dos 603.000 pacientes admitidos no hospital neste período, cerca de 0,13% apresentavam diagnóstico da doença sendo esta mais prevalente em homens e menos frequente em pacientes acima de 60 anos de idade. A doença esteve presente em associação com SIDA (Síndrome da imunodeficiência adquirida) em 57,5% dos casos, com internação prévia (relacionada à quimio e corticoterapia, transplante, cirurgias para ressecção de neoplasias) em 52,5% dos casos, com doença cardiovascular hipertensiva sistêmica em 17,5% dos casos, com

cirurgia prévia em 15% dos casos e com tuberculose em 5% dos casos. Para os pacientes analisados, a taxa de letalidade foi de 25% (GOUVEIA *et al.*, 2018).

Como referenciado anteriormente, a infecção primária em humanos é, em maior parte, pulmonar e resultante da inalação de propágulos de fonte ambiental em tamanhos compatíveis com a deposição alveolar. Tais propágulos normalmente são associados a presença constante de excretas de aves, como pombos e psitacídeos. Em trabalho realizado por Passoni e colaboradores (1998) foram analisadas casas de pessoas, sabidamente HIV positivas, com e sem criptococose e um grupo de pessoas sem doença aparente. As coletas de excrementos de aves (livres ou em gaiolas), solo, detritos orgânicos e poeira após varredura do chão foram analisadas e os isolados de *C. neoformans* foram mais significativos em excrementos de aves que em poeira interna ou amostras de ambiente externo. Com isso, o estudo enfatiza a importância da atenção a ambientes com aves, neste especificamente não eram pombos, entretanto a levedura apareceu com maior frequência em habitações com associação aves-humanos. Além disso, ficou comprovada a maior taxa de criptococose em pacientes com presença do fungo verificada em sua residência se comparado aos que não havia essa confirmação (ambos HIV positivo).

Outro trabalho realizado com pacientes com meningite diagnosticados entre 2008 e 2010 de Teresina/Piauí, demonstram através da análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição do gene URA5 a predominância do genótipo VNI de *C. neoformans* em pacientes HIV positivos e genótipo VGII de *C. gattii*, principalmente em pacientes HIV negativos. Tal situação, segundo autores, reafirma a ocorrência endêmica de criptococose primária induzida por *C. gattii* VGII e infecção precoce por criptococos (MARTINS *et al.*, 2011).

Na cidade de Porto Alegre, *C. neoformans* foi isolado de 100% (88) das amostras coletadas e avaliadas de excretas de pombos em distintas praças da cidade com concentrações de até mais de 10 mil unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de material semeado o que, além de confirmar a presença do fungo, demonstra o risco inerente de dispersão de propágulos pelo ar e posterior inalação (REOLON *et al.*, 2004).

Em Salvador, no Hospital Couto Maia, através da análise de prontuários de 104 casos de meningoencefalite criptocócica ocorridos entre 1972 a 1996 e analisados aspectos demográficos, clínicos e laboratoriais, foram identificados fatores predisponentes em 15 pacientes sendo 12 com AIDS, 1 com diabetes mellitus, 1 com hepatite crônica ativa em uso de corticoide há 1 ano e 1 com doença de Hodgkin e uso de corticoide há 2 anos, entretanto, a maioria dos pacientes não apresentava condições predisponentes como facilitadoras de

infecções oportunistas. Apesar de pouco comum, cerca de um terço dos casos atendidos neste relato ocorreram em indivíduos com idade inferior a 15 anos sem apresentar qualquer tipo de fator predisponente (DARZÉ *et al.*, 2000).

No Hospital Clínico da Universidade Federal de Uberlândia, de forma retrospectiva, 41 pacientes diagnosticados com criptococose entre 2004 e 2013 tiveram seus dados avaliados. 85% dos pacientes eram HIV positivos. O isolamento do fungo foi obtido através do líquido cefalorraquidiano (LCR) de 21 pacientes (51%); 19,5% apresentavam fungemia e em 24% o agente foi isolado do LCR e do sangue simultaneamente. Entre as manifestações da doença, a meningoencefalite foi a mais frequente (75%) e, apesar de ser realizado o tratamento adequado, a taxa de mortalidade no estudo foi de 58,5%. O genótipo VNI (sorotipo A, var. *Grubii*) esteve presente em 97,5% dos isolados e apenas um isolado de *C. gattii* VGI foi obtido todos apresentando suscetibilidade aos antifúngicos testados (fluconazol, voriconazol, anfotericina B e 5-flucitosina) (AGUIAR *et al.*, 2017).

Através do estudo com onze crianças entre os anos de 1992 e 2000, de idade média de 8,8 anos, imunocompetentes apresentando quadro de infecção do SNC causadas por *C. gattii* foram levantados os sintomas mais comuns apresentados, sendo eles: dor de cabeça, febre, rigidez da nuca, náusea e vômito. Neste relato, todos os pacientes apresentaram alterações em seus exames de tomografia, como nódulos hipodensos, nove apresentavam ainda atrofia difusa, seis apresentavam hidrocefalia e cinco apresentavam hidrocefalia coexistente com atrofia difusa. Apesar de a criptococose ser uma infecção pediátrica oportunista infrequente e ser de maior prevalência em crianças infectadas pelo HIV, a região Nordeste do Brasil é citada como altamente endêmica da doença em crianças devido a presença de *C. gattii*. (CORRÊA *et al.*, 2002)

Em estudo realizado entre janeiro de 2008 e julho de 2010 no Instituto Natan Portella de Doenças Tropicais em Teresina (PI), 63 pacientes diagnosticados com meningite criptocócica, tiveram informações epidemiológicas, clínicas e laboratoriais analisadas por meio de seus prontuários médicos. Assim como trabalho relatado por Sanches *et al.*, (2018) os pacientes eram predominantemente do sexo masculino e HIV positivos (HIV+). As idades oscilavam entre 7 e 72 anos, sendo todos os pacientes HIV+ acima de 23 anos.

A doença criptocócica é citada como sendo a terceira causa mais comum de infecções fúngicas invasivas em receptores de transplantes de órgãos sólidos (no caso deste fungo específico os mais acometidos são os transplantados de fígado, rins e pulmões) podendo se desenvolver em forma de pneumonia ou meningite. Nesses casos pode ocorrer ainda o quadro

de fungemia, quando há disseminação linfohematogênica decorrente de um foco pulmonar aberto ou subclínico. (Simões, 2017)

Em relato de caso, uma paciente do sexo feminino de 44 anos fazendo uso crônico de corticosteroide sem prescrição médica descreveu aparição de lesão em face lateral do braço esquerdo, sendo diagnosticada como criptococose cutânea. É citado ainda neste trabalho uma revisão com 21 pacientes imunocompetentes com criptococose cutânea onde o maior percentual se concentrava em indivíduos do sexo masculino com idade avançada em que, grande parte destes, relatava a exposição a excrementos de aves, eucaliptos ou traumatismos antes da infecção. (SANCHES *et al.*, 2018)

Entretanto, embora a maior parte dos estudos relacionem apenas o complexo *C. neoformans/C. gattii* como os causadores da criptococose, além de frisar seu caráter oportunista e a relação de ascensão da enfermidade com o surgimento da SIDA em 1980, estudos recentes demonstram a necessidade de ampliação do conhecimento acerca destes microrganismos.

Inicialmente pode-se levantar situações como as descritas por Barbosa *et al.*, (2006) em que uma paciente com sorologia negativa para o vírus da imunodeficiência humana e sem qualquer outra causa de imunossupressão obteve diagnóstico de *C. neoformans* através de biopsia transbrônquica e do lavado broncoalveolar.

Além disso, leveduras outrora pertencentes ao gênero, vêm sendo relatadas e demonstrando sua importância clínica, como apresentado no trabalho de Morales-López e Garcia-Effron (2021) que descrevem, através de levantamento maciço de dados, a frequência com que estas apareceram em artigos de grandes diretórios ao longo dos anos. De 46 artigos individuais foram avaliadas infecções causadas por espécies denominadas “raras” sendo as mais encontradas: *Cryptococcus (Vanrija) humicola / humicolus* (16), *Cryptococcus (Filobasidium) uniguttulatum* (8), *Cryptococcus (Cutaneotrichosporon) curvatus* (6).

Apesar de o levantamento apresentar tais leveduras como as mais recorrentes, é citado que, fora do complexo habitual, 80% dos casos clínicos notificados podem ser atribuídos a *Papiliotrema laurentii* e *Naganishia albida* juntos (KHAWCHAROENPORN *et al.*, 2007). Nesse contexto, Gharehbolagh e colaboradores (2017), apresentaram um relato de caso de tratamento bem sucedido de um iraniano de 26 anos com lesão cutânea superficial na axila. A lesão, inicialmente identificada e tratada como pitíriase versicolor foi, na verdade, causada por *N. albida*. Tal agente pode, eventualmente, ser responsável por infecções superficiais e, no caso específico, pôde ser tratado por itraconazol via oral.

Em pacientes renais dependentes de diálise as infecções fúngicas têm se tornando cada vez mais frequentes e com consideráveis taxas de morbimortalidade, sendo *Cryptococcus* o

segundo gênero mais presente, responsável por 6% dos casos neste grupo. Em estudo de pacientes HIV negativos com infecções fúngicas, 16 casos de dependentes de diálise foram identificados e analisados. Destes, *C. neoformans* correspondiam a (68,7%, 11/16), *C. laurentii* (12,5%, 2/16), *C. albidus* (12,5%, 2/16) e *C. arboriformis* (6,3%, 1/16) (HONG *et al.*, 2017).

Também é relatado que, em infecções fúngicas causadas por fungos não pertencentes ao complexo *C. gattii/C. neoformans*, a apresentação clínica é semelhante ao complexo mas os resultados do teste do antígeno criptocócico (CrAg) são frequentemente negativos e os padrões de susceptibilidade antifúngica dessas espécies são caracterizados por CIMs (Concentrações inibitórias mínimas) mais elevados. (HONG *et al.*, 2017).

Cryptococcus albidus, sinônimo de *Naganishia albida*, não é comumente associado a quadros de infecções em indivíduos hígidos. Choe e colaboradores (2020) relatam um caso de criança imunossuprimida com quadro de fungemia causado pelo fungo. Além disso, apresentam um levantamento bibliográfico com os casos disponíveis de ocorrência da doença no qual identificaram 20 casos de infecção invasiva e 2 de doença não invasiva para os quais:

- 80% (16/20) dos pacientes de doença invasiva possuíam algum transtorno crônico subjacente ou haviam recebido terapia imunossupressora;
- 40% (8/20) dos pacientes de doença invasiva apresentaram quadro de fungemia;
- 30% (6/20) dos pacientes de doença invasiva apresentaram infecção do sistema nervoso central
- A taxa de mortalidade apresentada foi de, aproximadamente, 40% (8/20).

Liu e colaboradores (2014) também apresentaram um relato de encefalite criptocócica causada por *N. albida* em um paciente HIV positivo. Em paralelo, apresentam uma revisão bibliográfica que demonstra a presença de outros casos semelhantes e, a partir dela, relatam o percentual de óbitos acima de 50% para a enfermidade. A principal causa de morte está associada a compressão do tronco cerebral em que, mesmo na sobrevivência, os pacientes costumam sofrer atrofia óptica, hidrocefalia, mudança de personalidade e até demência.

Naganishia liquefaciens (*Cryptococcus liquefaciens*) foi responsável por um caso de meningite associada a *Mycobacterium tuberculosis* na Guatemala. O caso ocorreu com um paciente do sexo masculino, de 31 anos, positivo para HIV (CONDE-PEREIRA, *et al* 2015).

Cheng e colaboradores (2001) abordam relato de caso de bebê prematuro, com idade gestacional de 27 semanas, com fungemia causada por *Papiliotrema laurentii* (*C. laurentii*). O tratamento ocorreu com a retirada o cateter venoso central e utilização de anfotericina B como medicamento antifúngico, obtendo bons resultados.

Os autores reforçam a importância dos fômites como disseminadores do microrganismo no ambiente hospitalar e destacam mais quinze casos em humanos associados ao microrganismo. O estudo envolve pacientes de idades variadas sendo 2 prematuros e os demais com idades oscilando entre 13 e 61 anos. Destes, sete apresentam caso de fungemia e apenas um evoluiu para o óbito (CHENG, *et al* 2001).

Furman-Kuklińska e colaboradores (2009) descrevem um caso de fungemia causado por *Papiliotrema laurentii* (*C. laurentii*) em jovem em uso de imunossupressores em decorrência de glomerulonefrite membranoproliferativa. Inicialmente o paciente foi submetido a terapia antifúngica com uso de fluconazol. Entretanto, apesar da medicação, ainda foram observados quadro de febre séptica e exames de sangue microbiológicos positivos após 3 semanas de tratamento. Desta forma, a terapia foi redirecionada para o uso de itraconazol, sendo este acompanhado por cinco semanas para confirmação da efetividade do tratamento.

Há relato, ainda, de um homem, de 59 anos, HIV negativo, agricultor com exposição prévia a excrementos de pombos, sendo este o único fator de risco identificável. O paciente apresentou quadro de meningoencefalite causada por *P. laurentii*. É importante citar que, em algumas regiões, esta espécie pode ser utilizada como um pesticida biológico para evitar a decomposição de frutas, aumentando o risco da população rural.

Com a pandemia de COVID-19 foram descritos vários casos de infecções secundárias relacionadas a vírus, bactérias e fungos. Dentre os últimos, surgiram casos de infecção por *Cryptococcus* spp. após contaminação inicial por SARS-CoV-2. (GHANEM; SIVASUBRAMANIAN, 2021) Uma das possíveis explicações para esse fato pode ser a utilização de medicamentos imunossupressores e/ou imunomoduladores que aumentam o risco da aquisição de doenças oportunistas e essa tem sido uma das vias de tratamento adotada para a Covid-19. (ALEGRE-GONZÁLEZ, *et al*, 2021; GHANEM, SIVASUBRAMANIAN, 2021; THYAGARAJAN, *et al*, 2021)

Alegre-González e colaboradores relatam um caso de paciente do sexo masculino, 78 anos, com histórico passado de diabetes mellitus tipo 2, pressão alta e doença renal crônica, com teste negativo para HIV. Reafirmam a ausência de imunossupressão prévia à Covid-19 e o desenvolvimento de um quadro de infecção fúngica grave após tratamento com corticosteroides. Foi realizado isolamento a partir de cultura sanguínea confirmando a presença de *C. neoformans*.

Ghanem e Sivasubramanian descrevem um caso de meningite criptocócica grave desenvolvida em paciente caucasiana, do sexo feminino, 73 anos e sem histórico prévio de

doenças de base. O diagnóstico ocorreu uma semana após o tratamento da infecção por SARS-CoV-2 com dexametasona.

Thyagarajan e colaboradores (2021) também relataram caso de homem imunocompetente de 75 anos, hispânico, com histórico de diabetes mellitus, hipertensão, obesidade e osteoartrite em cenário de pneumonia associada à COVID-19 e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). O paciente citado veio a óbito em decorrência de um quadro de fungemia causado por *C. neoformans*.

Papiliotrema laurentii também foi relatado em associação a SARS-CoV-2. Paciente do sexo feminino, 54 anos, com características de obesidade, *diabetes mellitus* tipo 2, cardiopatia e hipertensão prévios apresentou sintomas como tosse e dispneia, evoluindo para insuficiência respiratória e fungemia por *P. laurentii* (FILHAO et al., 2022).

Além das características já mencionadas, Gouveia e colaboradores (2018) sugerem apenas a presença de imunossupressão como fator favorável ao crescimento e desenvolvimento do microrganismo no hospedeiro. Entretanto, estudos apresentam maior incidência da doença em pacientes do sexo masculino e essa predileção é comprovada por alguns autores. (CHEN *et al.*, 2016; FANG *et al.*, 2017; HONG *et al.*, 2017)

Os casos citados enfatizam a importância de se considerar os agentes causadores de doença criptocócica menos comuns, mas emergentes.

2.4.2. HOSPEDEIRO ANIMAL

Assim como nos seres humanos, a criptococose em animais ocorre mais comumente quando há comprometimento na imunidade celular (KOMMERS *et al.*, 2005). Entretanto, é possível encontrar com facilidade na literatura casos de animais imunocompetentes que também desenvolveram a doença. A contaminação também pode ser dar de forma assintomática como, por exemplo, em casos de basidiósporos transportados em suas cavidades nasais sem necessariamente ocorrer infecção (MALIK *et al.*, 1997; FERNANDES *et al.*, 2016).

No caso de animais, a infecção também pode ser adquirida por inalação de propágulos fúngicos comprometendo principalmente o sistema respiratório e, ocasionalmente, atingindo sua forma disseminada (KOMMERS *et al.*, 2005). Além disso, Larsson e colaboradores (2003) citam como porta de entrada provável a extremidade distal do membro torácico direito de um cão que, através de lambedura constante, haveria disseminado para a região cefálica e posteriormente migrado para os globos oculares e pelo sangue.

2.4.2.1. CÃES E GATOS

Sua distribuição mundial afeta também os animais. A criptococose é mais comumente associada aos gatos, apresentando uma frequência 7 a 10 vezes maior que em cães, principalmente se associada às infecções virais como o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) (KOMMERS *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007).

Em felinos as lesões cutâneas são as mais comuns juntamente com linfadenopatia regional e é incomum o comprometimento sistêmico, principalmente a nível pulmonar. São comuns as lesões na região na cabeça como erosões e úlceras (nasais, linguais, palatinas, gengivais, labiais, podais e no leito ungueal) causando o chamado “nariz de palhaço” e, em cerca de um quarto dos gatos infectados a via linfática pode ser atingida fazendo com que a infecção alcance o SNC (LARSSON *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007).

No caso dos cães, geralmente afeta animais imunossuprimidos ou com doenças debilitantes, de grande porte, com idade média de 3 anos, não sendo relacionada ao sexo. O envolvimento do SNC ocorre em cerca de 50-80% dos casos, depressão e anorexia são comuns, comprometimento dos olhos também é mais acentuado. Entretanto, outros órgãos também podem estar envolvidos em quaisquer dos casos sendo lesões cutâneas e pulmonares menos frequentes (HONSHO *et al.*, 2003; LARSSON *et al.*, 2003; MARCASSO *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007).

Cães e gatos podem ser também apenas portadores de basidiósporos em sua cavidade nasal, sem manifestar sintomas clínicos, antígenos criptocócicos em seu soro ou mesmo leveduras ou patologia significativa em suas biopsias nasais, o que reafirma a não infecção por *C. neoformans* (MALIK *et al.*, 1997).

Em 2003, Larsson e colaboradores descreveram pela primeira vez no Brasil um caso de criptococose canina com acometimento oftálmico e dermatopático, com diagnóstico *intra-vitam*. O animal da raça Pastor Alemão, fêmea, 33,1 Kg, com 2 anos, atende as condições propostas por Honsho e colaboradores (2003) e, segundo estudo, havia se infectado através do contato com dejetos de pombos (*Columba livia*) desenvolvendo quadro tegumentar e ósseo com posterior isolamento de *C. neoformans*.

No mesmo ano, Honsho e colaboradores (2003) demonstraram o caso de um cão Boxer, macho, com 2 anos e 11 meses com tratamento prévio de antibióticos e doses imunossupressoras de corticoides para controlar a doença inflamatória intestinal crônica. Acredita-se que o ponto focal tenha ocorrido no trato gastrointestinal, com posterior

disseminação pela via hematogênica. Os autores citam ainda a corticoterapia como uma das possíveis principais causas do agravamento e disseminação da infecção.

Marcasso e colaboradores, em 2005, apresentam o relato de três cães que também atendem as condições de Honsho e colaboradores (2003). Um macho, sem raça definida, 1 ano, 29 kg; um macho, Fila brasileiro, 4 anos, 21,3 Kg e uma fêmea, labrador, 2 anos e nove meses, 23,7 Kg. Todos apresentavam alterações pulmonares, síndrome neurológica multifocal anorexia, disfagia, apatia, desidratação de leve a severa e alterações oculares em decorrência da criptococose.

Fernandes e colaboradores, em 2016, realizaram estudo para demonstrar a importância da presença de pombos, seus ninhos e excretas como fonte de infecção de criptococose. O estudo investigou a presença de *C. neoformans* em ninhos, poeira e secreção nasal de cães e gatos em porções da cidade do Rio de Janeiro com alta população de *C. livia*, animais domésticos e humanos com grande interação no ambiente. O trabalho foi baseado em 150 amostras coletadas (40 de ninhos, 30 de secreção nasal de cães, 30 de secreção nasal de gatos e 50 de poeira) das quais obtiveram 12 positivas para ninhos, 1 para secreção de cães, 2 de gatos e 15 de poeira, totalizando 30 amostras positivas. Esse estudo comprova a relação da presença das aves com a disseminação via poeira e infecção dos animais além da presença de *C. neoformans* na nasofaringe de animais aparentemente saudáveis.

É importante ressaltar que não existe comprovação de risco para humanos no manuseio de animais infectados (FERREIRA *et al.*, 2007). Entretanto, tais animais podem representar um indicador da presença do microrganismo no ambiente em que estão inseridos.

2.4.2.2. PASSERIFORMES E PSITACIFORMES

O Brasil possui grande biodiversidade, sendo a ornitológica a terceira maior dentre todos os países, atrás apenas da Colômbia e Peru (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2017) e é também conhecida a relação entre as excretas destas aves e o crescimento fúngico (FERREIRA *et al.*, 2007). O hábito de manutenção de aves em cativeiro normalmente está atrelado a utilização de forrações para depósitos destas excretas, sendo as folhas de jornal as mais utilizadas para esta finalidade seguidas de folhas plásticas e areia. O hábito de utilização da primeira apresenta menor índice de isolamento de *Cryptococcus* spp. se comparado às demais devido a facilidade da troca e conseqüentemente melhor higienização da cobertura e sem tantos resíduos que possam fornecer condições para o crescimento dos fungos (PEREIRA *et al.*, 2014).

Pereira e colaboradores (2014) realizaram coletas de excretas do fundo de gaiolas de aves de *petshops* de 25 estabelecimentos do município do Rio de Janeiro. As espécies mais encontradas nestes estabelecimentos e selecionadas para coleta foram: pombo (*Columba* spp.), rolinha diamante (*Geopelia cuneata*), agapornis (*Agapornis* spp.), calopsita (*Nymphicus hollandicus*), periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), mandarim (*Taeniopygia guttata*), diamante de gould (*Chloebia gouldiae*), canário belga (*Serinus canaria*), manon (*Lonchura domestica*), calafate (*Padda oryzivora*) e star finch (*Neochmia ruficauda*). No total foram coletadas 1.268 amostras destes estabelecimentos, sendo 85 destas positivas. Após sorogrupagem, 54 isolados foram classificados como pertencentes ao sorogrupo AD (*C. neoformans*) e dois isolados classificados como sorogrupo BC (*C. gattii*).

Em estudo realizado na área central da cidade de Campo Grande (MS) com 20 amostras de excretas, em distintos ambientes entre lojas de aves, escola, domicílio e raspados de excretas encontradas em solo de ambiente aberto, foram obtidos 10 isolados de *C. neoformans* sorotipo A, referentes a 3 dos 10 pontos de coleta amostrados. Neste estudo todas as amostras coletadas se tratavam de material envelhecido e seco e correspondiam a uma gaiola ou viveiro, contendo de 4 a 27 aves, agrupadas segundo sua espécie, sem divisão entre machos e fêmeas, sendo os animais com isolamento positivo: canário belga (*Serinus canaria*), periquito australiano (*Melopsittacus unolulatus*), calopsita (*Psittacidae*), agapore (*Psittacidae*), mandarim (*Psittacidae*), pombo rabo de leque (*Columba* sp), pombo burguesinho (*Columba* sp) (FILIÚ *et al.*, 2002).

O desenvolvimento da doença em aves é pouco descrito devido sua alta resistência a este patógeno. Sua elevada temperatura corporal, entre 41,5 e 43°C, acaba por inibir o crescimento de *Cryptococcus* spp. raramente desenvolvendo quadros de criptococose (FILIÚ *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2014).

Embora menos comum, um surto de criptococose foi descrito em criatório de São Paulo, onde sete aves vieram a óbito em decorrência da disseminação da doença. Os sintomas comuns observados foram incoordenação, paralisia progressiva e dificuldade de voar. Em análises realizadas nos psitacídeos foram encontradas leveduras encapsuladas em diversos tecidos como bico, coana, seio, pulmões, sacos aéreos, coração, fígado, baço, rins, intestino e sistema nervoso central além de dois casos em esfregaços de fezes com tinta da china. Foi relatada alta titulação de antígeno criptocócico no soro de um dos pássaros afetados com aumento expressivo durante o tratamento culminando em seu óbito. As leveduras foram isoladas da massa nasal, fezes e fígado de uma ave e *C. neoformans* var. *gattii* sorotipo B foi identificado com testes

bioquímicos, fisiológicos e sorológicos. A cepa em questão se mostrou resistente ao fluconazol (RASO *et al.*, 2004).

Na Austrália também foram descritos 15 casos de criptococose aviária em papagaios de cativeiro. Nessas aves a doença se manifestou de forma invasiva localizada do trato respiratório superior resultando em sinais semelhantes à rinite micótica com envolvimento de estruturas contíguas à cavidade nasal, como bico, seios nasais, coana, espaço retrobulbar e palato (MALIK *et al.*, 2003).

2.4.2.3. POMBOS URBANOS (*Columba livia*)

Apesar de *Cryptococcus* spp. serem constantemente descritos em associação com as fezes dos pombos ou, ainda, como colonizadores naturais da mucosa do papo (FILIÚ *et al.*, 2002) ou do intestino destas aves (FARRER *et al.*, 2021), não há muitos relatos do desenvolvimento da doença nestes animais. São descritos dois casos nos continentes Americano e Europeu além de um pombo australiano com desenvolvimento da doença subcutânea minimamente invasiva (MALIK *et al.*, 2003).

Na cidade do Rio de Janeiro (RJ), amostras de dez igrejas e seu entorno foram coletadas pelo período de um ano. Houve isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* em 9 das 10 igrejas nas amostras de excretas de pombos e em 6 igrejas nas amostras de ar. Além disso, houve isolamento de amostras de solo, insetos (besouros), ovos, ninhos de pombos e penas (BARONI *et al.*, 2006).

Em estudo realizado em Ribeirão Preto (SP) por Silva e Divani (2008), de 68 amostras ambientais de “pools” de fezes de pombos, foram encontrados *Cryptococcus* sp. em 75% das amostras (n =51). Os isolados foram identificados como *C. laurentii* (n=43), *C. unigutulatus* (n=3), *C. laurentii* associado com *C. albidus* (n=4) e *C. unigutulatus* associado com *C. laurentii* (n=1).

É importante ressaltar que *C. laurentii* juntamente a *C. albidus* são responsáveis por cerca de 80% dos casos de criptococose causada por *Cryptococcus* não-*neoformans* e não – *gattii* (KHAWCHAROENPORN *et al.*, 2007).

Assim como *C. laurentii*, embora não faça parte do complexo mais estudado de espécies de *Cryptococcus*, relato de caso publicado em 2007 por Serda Kantarcioğlu *et al.* (2007), demonstra a presença de *C. diffluens* causando lesões subcutâneas semelhantes às de esporotricose. Neste relato o paciente, jovem e do sexo masculino, também negativo para HIV,

relatou viagem a trabalho para o deserto do Turcomenistão dois meses antes de as lesões subcutâneas aparecerem, sendo relatadas lesões cutâneas frequentes durante a viagem. Neste estudo, a espécie foi identificada através de métodos moleculares.

Os animais podem se contaminar através do contato com os pombos e seus excrementos. O homem pode ser infectado com risco associado principalmente à presença das fezes de *Columba livia* em janelas e ar condicionados, bem como em locais de manuseio e preparo de alimentos. Profissionais de serviços gerais (higienização, manutenção) têm risco mais acentuado (FISHER *et al.*, 2016), pois se expõem às fezes com maior frequência e intensidade, de forma direta durante suas atividades.

A coleta de mais de um tipo de amostra já foi realizada por vários pesquisadores e permite inferir algumas relações entre o fungo e seu possível carreador: o pombo (*C. livia*). (BARONI *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2016). No bairro de Ricardo de Albuquerque, no Rio de Janeiro, *C. neoformans* foi isolado com uma frequência de 30% tanto nos ninhos de pombos como na poeira de áreas circunvizinhas ao conglomerado espacial destas aves. Além disso, também esteve presente na secreção nasal de cães e gatos reforçando a relação do material de ninhos e da poeira ao redor desse ambiente para a manutenção do agente no perímetro (FERNANDES *et al.*, 2016).

A correlação com a época de coleta de excretas de pombos e os isolados obtidos também pode ser realizada. Estudos demonstram, por exemplo, maior taxa de isolamento no mês de novembro, período da primavera no Brasil em detrimento de baixas taxas de isolamento no verão, onde as altas temperaturas podem inibir o crescimento de *C. neoformans* ou até causar a inativação celular durante esta temporada (BARONI *et al.*, 2006).

A recuperação do fungo em insetos coprófagos que vivem em proximidade aos pombos urbanos pode demonstrar mais uma forma de transporte da levedura por grandes distâncias, assim como a análises de ninhos das aves, embora pouco realizadas, também ajudam a compor essa história. O transporte de *C. neoformans* também pode ser realizado através dos bicos, pés e penas dos pombos (BARONI *et al.*, 2006). Apesar de não ser conhecida a exata a origem destes fungos, uma vez que não é isolado do trato intestinal de aves, devido à dificuldade de sobrevivência pela temperatura e competição microbiana (FILIÚ *et al.*, 2002).

Porém, é relatado que o fungo pode permanecer viável nas fezes de pombo por muitos anos, se não exposto diretamente a luz solar, tornando-se um reservatório de partículas infectantes passíveis de inalação (BARONI *et al.*, 2006; BOVERS *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2008). Têm sido crescentes os estudos, como os de Contin e colaboradores (2010), em que, de 30 amostras de excretas de pombos coletadas de dez pontos distintos em Caratinga/MG

(entre igrejas, escolas e pontos centrais da cidade) foram obtidos isolados de *C. neoformans* em 100% dos locais selecionados com 27 das amostras positivas.

Desta forma, não havendo medidas preventivas específicas e diretamente relacionadas à criptococose, é importante a geração de conteúdo para demonstração do risco e posterior conscientização da comunidade. Apenas com o controle de nidificação, destinação adequada dos resíduos, controle da disponibilidade de alimentação será feito o controle da população de aves e, conseqüentemente, da dispersão do microrganismo (NUNES, 2003).

2.4.2.4. QUIRÓPTEROS

Assim como as aves, os morcegos são hospedeiros de uma gama de microrganismos. Isso pode estar relacionado, entre outros fatores, a seu habitat. Em estudo realizado com 98 morcegos, com material obtido através de vísceras congeladas dos animais (83 amostras -85%) e fezes frescas dos quirópteros capturados através de rede de neblina (15 amostras – 15%), foi possível verificar o isolamento de *Cryptococcus* spp. TENCATE *et al.*, 2012).

Mendes (2018) também se utilizou da metodologia de Tencate e colaboradores (2012) com algumas modificações e, em seus estudos, analisou amostras de intestino, pulmões, fígado, e fezes dos morcegos. De 48 quirópteros capturados no município de Sinop-MT três amostras de pulmão/fígado, uma de intestino/fezes e uma de fezes secas foram positivas para *Cryptococcus* spp.

2.4.2.5. OUTROS ANIMAIS

Além de passeriformes e psitaciformes, como peças fundamentais na cadeia de crescimento do fungo em meios urbanos e dos casos crescentes de criptococose canina e felina, podemos citar também a ocorrência da doença em outros animais, embora este fato seja menos comum.

Um achado incidental de criptococose pulmonar granulomatosa causada por *C. neoformans* em equino foi relatado por Kommers e colaboradores (2005). O animal apresentava histórico de laminite crônica e ocorreu após a necropsia, na qual foram encontrados múltiplos nódulos macios e gelatinosos distribuídos aleatoriamente nos pulmões e, em análise histológica, cavidades císticas preenchidas de leveduras circundadas por um halo claro (KOMMERS *et al.*, 2005).

No semiárido nordestino também foi apresentado um relato de caso envolvendo criptococose causada por *C. neoformans*. Um bovino foi diagnosticado após apresentar sintomas diversos que evoluíram para decúbito lateral, movimentos de pedalagem, nistagmo, ausência do reflexo anal e de flexão dos membros. (GALIZA *et al.*, 2010).

Na região Sul do Brasil, um caprino com histórico de transporte prolongado foi encaminhado para necropsia após apresentar sintomas como dispneia, secreção nasal e tosse. Avaliando os achados clínicos, patológicos e moleculares, o diagnóstico de pneumonia por *C. neoformans* foi estabelecido pelos autores (BIANCHI *et al.*, 2018).

Um ovino com histórico de traumatismo na cabeça há cerca de 15 dias, recorreu a atendimento na Clínica de Bovinos no Campus Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PE) após aumento de volume na região interna da cavidade nasal direita. Realizadas análises macro e microscópicas, os achados clínicos e anatomopatológicos indicaram um caso de criptococose nasal em ovino (SILVA *et al.*, 2009).

Apesar do pouco conhecimento acerca da patologia em suínos, é relatado que estes animais quando acometidos pela criptococose podem apresentar sinais clínicos severos, envolvendo casos de tosse e corrimento nasal associados a sinais inespecíficos. Em necropsia, lesões múltiplas de pneumonia granulomatosa progressiva são comuns e comprometimento em outros órgãos também podem estar presentes (FERREIRO *et al.*, 2007).

Algumas doenças fúngicas, como a criptococose, costumam ser negligenciadas. Desta forma, os relatos sobre animais de produção se mostram fundamentais para reforçar a importância do conhecimento destas doenças uma vez que seus sinais clínicos são pouco evidentes (SILVA *et al.*, 2009). Esta falta de sinais clínicos ou semelhança aos de outras enfermidades faz com que seu tratamento seja realizado de forma incorreta podendo levar o animal à imunossupressão e conseqüente agravamento do caso ou, ainda, que seja encontrada de forma incidental apenas durante exame necroscópico (MARCASSO *et al.*, 2005; KOMMERS *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2009).

Os Kiwis marrons (*Apteryx australis mantelli*) também já foram relatados com histórico de criptococose, sendo descritos dois óbitos por pneumonia criptocócica difusa na Nova Zelândia e um na Austrália por ampla disseminação da doença. (MALIK *et al.*, 2003)

Devido a sua estreita relação com eucaliptos, *C. gatti* está amplamente inserido em um ambiente muito utilizado por coalas (*Phascolarctos cinereus*). Em estudo de 2002 foi descrita a progressão da colonização da cavidade nasal de um coala para invasão tecidual. É relatado ainda que a antigenemia criptocócica foi detectada em 28 coalas saudáveis de três regiões diferentes indicando a existência da colonização da cavidade nasal e do potencial risco

associado aos animais além da necropsia de dez animais com antigenemia positiva e confirmação das lesões criptocócicas em locais distintos. Ainda durante o trabalho, um coala desenvolveu meningoencefalite criptocócica enquanto outro desenvolveu pneumonia criptocócica apenas seis meses após o estudo (KROCKENBERGER *et al.*, 2002).

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e a viabilidade de microrganismos associados a excretas de aves e quirópteros já vem sendo amplamente estudados (TENCATE *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; MENDES, 2018). Atualmente, a relação entre as fezes secas de aves, incluindo *C. livia*, e a presença de isolados de *Cryptococcus* são muito bem descritas. Sabe-se que *Cryptococcus* spp. além de estar presente neste substrato pode permanecer viável para contágio por longos períodos. (REOLON *et al.*, 2004). Além disso, também podem estar presentes em ocos de árvores e seus restos em decomposição, sendo as árvores de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) o reservatório mais comum e mais estudado (FILIÚ *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2014).

Essas leveduras são consideradas cosmopolitas e apresentam características que as tornam agentes de grande importância em micologia médica podendo estar presentes em uma gama de ambientes (FILIÚ *et al.*, 2002; DERENGOWSKI, 2011; ROCHA *et al.*, 2014). Atrelado a isso estão seus possíveis carreadores, os pombos urbanos (*C. livia*), com importante papel na veiculação mecânica das leveduras através de penas, pés e fezes secas (NUNES, 2003; BARONI *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2017).

Estas aves possuem predileção por nidificação em hospitais e escolas, devido à proximidade com o homem e a facilidade na busca por alimento. Tal inclinação pode, inevitavelmente, aproximar o microrganismo de pessoas com sistema imunológico mais vulnerável podendo elevar os riscos de infecção (NUNES, 2003; GONÇALVES, 2017)

Desta forma, o presente estudo visa conhecer melhor o microrganismo e sua ecoepidemiologia. A referida ciência permitirá a identificação dos locais de maior incidência e possíveis focos de contaminação viabilizando o delineamento de um perfil de incidência do microrganismo no entorno de hospitais da região de Belo Horizonte, bem como seus fatores de virulência de modo a antever riscos associados a população imunossuprimida que utiliza os hospitais das regionais de BH.

3.1. PROBLEMA

A levedura encapsulada denominada *Cryptococcus* spp. está frequentemente associada aos pombos urbanos (*Columba livia*) que, atualmente, devido a condições ótimas de temperatura, alimento e abrigo, desenvolvem altas taxas de reprodução durante todo o ano. O aumento destas aves e, conseqüentemente de suas excretas, proporciona maior dispersão da levedura em locais como escolas e hospitais (NUNES, 2003; GONÇALVES, 2017).

Desta forma é importante a manutenção de estudo amplo e rastreável da incidência destas leveduras, seja em associação às aves ou em árvores e seus detritos, de modo que se possa conhecer as formas de contaminação a que a população belorizontina possa estar exposta.

3.2. HIPÓTESES

Com a conhecida predileção de pombos urbanos (*C. livia*) por nidificação em hospitais e escolas, devido à proximidade com o homem e a facilidade na busca por alimento, é esperado o aumento de excretas e, conseqüentemente, a elevação da presença do microrganismo no entorno destes locais. A utilização de árvores para empoleiramento também seria fator de dispersão e interação entre os nichos de *Cryptococcus* spp. Desta forma, espera-se detectar a presença de *Cryptococcus* spp., em quantidades significativas, no entorno de hospitais de Belo Horizonte.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença e variabilidade genética das leveduras sugestivas de *Cryptococcus* spp. isoladas de amostras ambientais do entorno de hospitais da cidade de Belo Horizonte de modo a descrever espécie e fatores de virulência. Pretende-se, a partir destes dados, traçar o cenário da cidade quanto ao microrganismo e antever riscos a ele associados.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o mapeamento das regionais de BH segundo a densidade demográfica de modo a amostrar os pontos com maior probabilidade de incidência de pombos urbanos (*C. livia*);

- Listar e selecionar os hospitais de Belo Horizonte, MG, e/ou seu entorno com maior incidência de pacientes imunossuprimidos de modo a realizar amostragem da regional a qual pertence;
- Coletar amostras ambientais do entorno dos hospitais selecionados;
- Investigar a presença de *Cryptococcus* spp. nas amostras coletadas nesses ambientes e identificar as espécies isoladas utilizando ferramentas de biologia molecular;
- Avaliar os fatores de virulência das leveduras de interesse, tais como: termotolerância, melanização e atividades das enzimas proteinase, fosfolipase, urease e catalase.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS

A realização do presente estudo se baseou em amostras ambientais provenientes de hospitais e/ou seu entorno de modo a representar as regionais de BH. Os locais foram selecionados de acordo com sua especialidade e conseqüente fluxo de pacientes imunossuprimidos. Ao total, foram coletadas amostras de cinco hospitais, cujas regionais foram selecionadas aleatoriamente por sorteio, de modo a representar o espectro da cidade na busca de um possível perfil para o todo.

5.1.1. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi iniciado como piloto em 2018 e apresentado previamente a partir do trabalho de conclusão de curso intitulado: “*Estudo da população de pombos da escola de veterinária da UFMG: avaliação ambiental e isolamento de Cryptococcus spp*”, desta forma, possui aprovação inicial pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), gerando o registro N°361/2018 (ANEXO 1) e pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio sob número de inscrição SISBio 66535-2 (ANEXO 2).

A priori, foi solicitada a atualização destas autorizações para dar seqüência aos estudos com as aves (ANEXOS 4 e 5), uma vez que se pretendia dar continuidade ao projeto com a captura e análise de órgãos de pombos urbanos (*C. livia*) das regionais de BH. Entretanto, em decorrência da pandemia de COVID-19 e suas conseqüências diretas e indiretas (como

fechamento de laboratórios e o risco de contágio durante as coletas em hospitais), foi necessária a adoção de medidas para adequação do projeto frente ao cenário percebido.

O planejamento de captura das aves foi adiado para pesquisa posterior e houve aumento do número inicial de coletas ambientais. Para o atendimento dos novos propósitos do trabalho, o projeto foi submetido ao cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob nº A4A790E (ANEXO 6).

5.1.2. COLETA

O material ambiental foi coletado, apesar de suas limitações, de modo a amostrar a cidade de Belo Horizonte e ocorreu segundo Baroni e colaboradores (2006), com modificações. As amostras coletadas, bem como o n amostral estão descritos abaixo:

Tabela 7. Resumo - Material ambiental coletado: formas de preservação até processamento

Material	Forma de coleta	Preservação
Fezes secas	Raspado do material	Microtubos estéreis a temperatura ambiente
Cascas de árvores	Cascas soltas com pinça ou raspado de tronco	Sacos estéreis a temperatura ambiente
Solo/Detritos	Coleta com espátula	Tubos Falcon estéreis a temperatura ambiente

Fonte: Elaborado pela autora.

Posto isso, o material coletado teve seu n amostral baseado nos dados do projeto piloto alinhado a outros trabalhos anteriormente publicados, de modo a traçar o possível perfil de coleta do microrganismo (FILIÚ *et al*, 2002; MEZZARI *et al*, ARAÚJO JR *et al*, 2015; 2014; SANTOS *et al*, 2019) resultando no cálculo de 57 amostras por ponto de coleta (MIOT, 2011), sendo estes distribuídos e coletados conforme se segue:

Tabela 8. Cálculo Amostral

N amostral	246
Positivos	44
Fórmula:	$n = [(Z\alpha/2 \cdot \sqrt{p \cdot q}) / e]^2$
Z α	1,96
E	0,05
p	0,18
q	0,82
n	56,42
n	57,00

Fonte: Elaborado pela autora com base nos cálculos de Sampaio, 2007.

Inicialmente, os pontos de coleta haviam sido demarcados de acordo com a densidade demográfica e a presença de hospitais que realizam o tratamento/acompanhamento de enfermidades relacionadas ao agravamento da doença criptocócica (como as especialidades de: oncologia, infectologia, doenças pulmonares, entre outros) conforme abaixo:

Tabela 9. Cálculo da densidade demográfica para escolha dos pontos de coleta iniciais

	POPULAÇÃO ESTIMADA (2020)	POPULAÇÃO PROPORCIONAL	ÁREA (Km ²)	ÁREA PROPORCIONAL (Km ²)	DENSIDADE PROPORCIONAL (hab/Km ²)	PONTOS DE COLETA
VENDA NOVA	281.526	0,11	29,27	0,09	847,28	1
CENTRO-SUL	301.269	0,12	31,85	0,1	906,7	2
NOROESTE	284.561	0,11	30,17	0,09	856,41	2
OESTE	327.569	0,13	36,06	0,11	985,85	2
LESTE	253.243	0,1	27,98	0,08	762,16	1
NORDESTE	308.251	0,12	39,46	0,12	927,71	2
NORTE	225.127	0,09	32,67	0,1	677,54	1
BARREIRO	299.970	0,12	53,6	0,16	902,79	2
PAMPULHA	240.048	0,1	51,21	0,15	722,45	1
TOTAIS	2.521.564	1	332,27	1	7.588,90	14,00
DENSIDADE PROPORCIONAL GERAL			.=População estimada total / área total		7.588,90	

Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.

Entretanto, com o advento da pandemia de COVID-19 e as restrições relacionadas ao tempo, entrada nos hospitais ou mesmo de recursos, foi preciso o reajuste e realização de apenas um ponto de coleta por regional e a realização de amostragem aleatória através de sorteio de cinco regionais para amostragem das demais conforme tabela 10.

Tabela 10. Cálculo da densidade demográfica da região de coleta e a relação percentual com o total planejado.

	POPULAÇÃO ESTIMADA (2020)	POPULAÇÃO PROPORCIONAL	ÁREA (Km ²)	ÁREA PROPORCIONAL (Km ²)	DENSIDADE PROPORCIONAL (hab/Km ²)	PONTOS DE COLETA
VENDA NOVA	281.526	0,11	29,27	0,09	847,28	1
CENTRO-SUL	301.269	0,12	31,85	0,1	906,7	1
NORTE	225.127	0,09	32,67	0,1	677,54	1
BARREIRO	299.970	0,12	53,6	0,16	902,79	1
PAMPULHA	240.048	0,1	51,21	0,15	722,45	1
TOTAIS	1.347.939	0,54	199	0,60	4.057	5
% DO TOTAL	53%	54%	60%	60%	53%	36%

Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.

As coletas foram realizadas em distâncias nunca inferiores a 2m entre os pontos de coleta de modo a ampliar a variabilidade das amostras uma vez que, principalmente para o caso das excretas, pode-se observar certa predileção das aves por determinados locais e as coletas próximas poderiam trazer certo viés aos resultados.

Cascas de árvores: As amostras de cascas de árvores foram coletadas com auxílio de pinças e bisturi estéreis, acondicionadas em sacos de coleta, também estéreis, e rotuladas adequadamente de acordo com local e data. O peso médio das amostras obtido foi de aproximadamente 4g.

Foram amostradas sete árvores por hospital tendo, cada uma, cascas e/ou raspados retirados de três pontos distintos e armazenados individualmente, contabilizando 21 amostras por hospital e 105 considerando os cinco hospitais (figura 4).

Solo/Detritos: as amostras de solo/detritos foram coletadas com auxílio de espátulas estéreis, acondicionadas em tubos tipo Falcon estéreis embalados individualmente e, posteriormente, rotuladas adequadamente de acordo com local e data. O peso médio das amostras obtido foi de aproximadamente 4g.

Foram realizadas coletas em 15 pontos distintos de cada hospital totalizando 75 amostras (figura 4).

Excretas: as amostras de excrementos de pombos foram coletadas através de raspagem com espátulas e bisturis estéreis, acondicionadas em micro tubos também estéreis e rotuladas adequadamente de acordo com local e data. O peso médio das amostras obtido foi de aproximadamente 0,5g.

Foram realizadas coletas em 21 pontos distintos de cada hospital totalizando 105 amostras (figura 4).

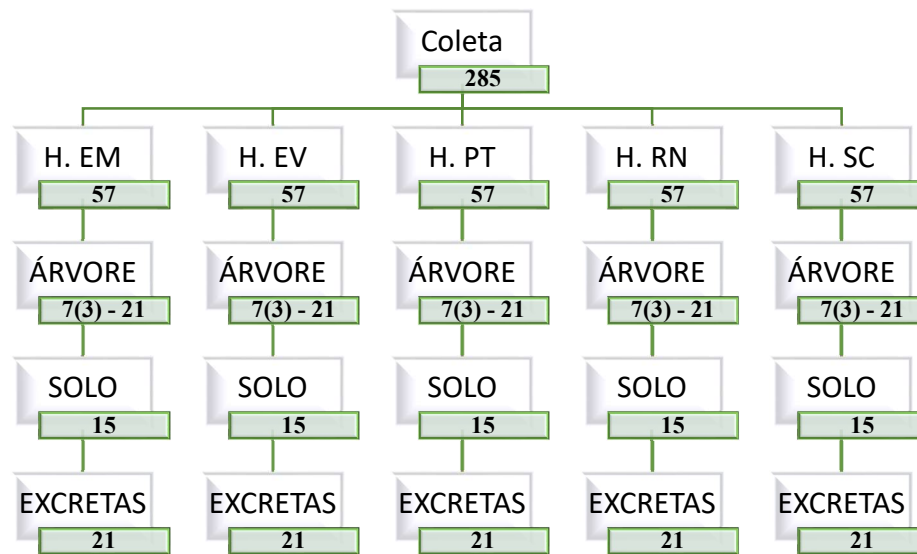


Figura 4. Esquema de coleta de amostras

H. EM – Hospital Eduardo de Menezes; H. EV – Hospital Evangélico; H. PT – Hospital Paulo de Tarso; H. RN – Hospital Risoleta Neves; H. SC – Hospital Santa Casa.

Valores entre parênteses representam o número de amostras coletado por árvore – resultando no valor final de 21 amostras.

Fonte: Elaborado pela autora

5.1.3. PROCESSAMENTO INICIAL

As amostras foram levadas e processadas inicialmente no laboratório de Micologia e Micotoxinas – LAMICO - da Escola de Veterinária da UFMG seguindo metodologia de REOLON *et al.*, 2004 e SYAKALIMA. *et al.*, 2019 com modificações.

As amostras de excretas de pombos (*Columba livia*) foram processadas em capela de fluxo laminar sendo realizada a suspensão de cerca de 1g do material homogeneizado em 9ml de solução fisiológica estéril acrescida de cloranfenicol 0,04% (ou proporções). O conteúdo permaneceu a 31°C em agitação em *Shaker overnight*. Após este período, as amostras foram retiradas e mantidas em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi aspirado e 0,1ml semeado em placa de *petri* nos meios ágar semente de níger (*Guizotia abyssinica*) e *Sabouraud dextrose* agar (SDA). As placas foram incubadas em estufa à temperatura aproximada de 31°C e observadas diariamente por até sete dias.

As cascas/raspados de árvores também foram processadas em fluxo laminar. Para isto, foram separadas duas amostras por árvore para processamento em salina (0,9% + 0,04% cloranfenicol) e uma para processamento em caldo *Sabouraud*. A solução salina foi escolhida por se tratar de uma substância estéril, inerte e que atua apenas como veículo para preparo e/ou transporte de amostras, as mantendo viáveis durante os procedimentos de trabalho.

Para as amostras processadas em salina foram pesados aproximadamente 4g do material e inseridos em tubo Falcon contendo, aproximadamente, 36mL de salina estéril. O tubo foi mantido a 31°C em agitação em *Shaker overnight*. Após este período, as amostras foram retiradas do equipamento e permaneceram em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi aspirado e 500 µl foram semeados em placa de *petri* nos meios ágar níger e SDA. Para o caldo foi pesado aproximadamente 2g do material e inserido em tubo Falcon contendo aproximadamente 40mL caldo *Sabouraud* estéril. O tubo foi levado para agitação a 31°C por 48h ou até que se formasse sedimentação de leveduras. Havendo fungos filamentosos, estes eram retirados da superfície com o auxílio de uma ponteira estéril e, utilizando uma alça de inoculação ou ponteira estéreis, as leveduras eram acessadas no fundo do tubo e semeadas nos meios níger e SDA.

As amostras de solo/detritos seguiram processamento semelhante ao das cascas de árvore processadas em salina. Foi pesado aproximadamente 4g do material e inserido em tubo Falcon contendo aproximadamente 50mL de salina estéril acrescida de cloranfenicol (0,04%). O tubo foi colocado em agitação a 31°C em *Shaker overnight*. Após este período, permaneceu em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi aspirado e 500 µl foram semeados em placa de *petri* nos meios ágar níger e SDA.

O período de observação de sete dias foi utilizado uma vez que o cultivo de *Cryptococcus* spp. a partir de fezes de aves é mais lento e tardio se comparado a leveduras de outros gêneros ou em comparação a fungos filamentosos, principalmente os do Filo Zygomycota que acabam por ocupar toda a extensão da placa e inviabilizam em pouco tempo a utilização da mesma. (SILVA; DIVANI, 2008).

Havendo crescimento leveduriforme, as colônias lisas, úmidas, brilhantes e de coloração de tons creme a marrom eram então repicadas na forma de estrias em placa de ágar níger para isolamento e posterior obtenção de subcultivos (REOLON *et al.*, 2004).

5.1.4. IDENTIFICAÇÃO INICIAL

Devido ao alto número de isolados iniciais, a caracterização e segmentação se deu de forma fenotípica, sendo as leveduras agrupadas de acordo com a coloração, aspecto na placa e demais características macroscópicas.

Após o procedimento, as amostras seguiram para novos repiques (para confirmação de isolamento das colônias) criopreservação e testes moleculares e bioquímicos no Laboratório de

Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

5.2. CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL

Após processamento inicial na EV/UFMG, os isolados ambientais de interesse seguiram para certificação da pureza e identificação no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas.

5.2.1. CRIOPRESERVAÇÃO

Os isolados ambientais, provenientes das etapas anteriores, sugestivos de pertencerem ao gênero *Cryptococcus* spp. foram repicados sucessivas vezes em *Sabouraud dextrose agar* (SDA) acrescido de cloranfenicol, de modo a verificar seu isolamento, e incubados em estufa BOD a 31°C.

Em seguida, os isolados foram inoculados em 2mL de caldo GYMP (glicose 2g, extrato de levedura 0,5g, extrato de malte 1g, NaH₂PO₄ 0,2g, cloranfenicol 0,01g, água destilada 100mL) e incubados por 48 -72 horas a 25°C. Após esse período, foi transferido o volume de 800µL de cada amostra para tubos criogênicos estéreis e acrescidos de 200µL de glicerol esterilizado. Os criotubos foram devidamente identificados e armazenados em freezer -80 de modo a manter a viabilidade das amostras durante o período de pesquisa. As caixas contendo os criotubos, também previamente identificadas, foram inseridas na Coleção de Culturas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos a Universidade Federal de Minas Gerais. As leveduras foram depositadas como biorrepositório, sendo confidenciais e possuindo a finalidade exclusiva de pesquisa acadêmica não podendo ser destinadas a terceiros.

5.2.2. ESCOLHA DOS ISOLADOS

Após isolamento e criação de banco de amostras devidamente identificado, foi necessária a escolha de um grupo de trabalho para dar seguimento ao projeto devido a questões de disponibilidade tempo e recursos influenciados diretamente pela pandemia de COVID-19.

Para a escolha foram levadas em consideração as características fenotípicas do gênero *Cryptococcus* spp. como coloração e aspecto/textura das colônias. Devido a indisponibilidade

de auxílio e o curto tempo de execução se tornaria inviável o exame direto de cerca de 300 amostras. Desta forma, foram selecionadas as leveduras com coloração marrom e creme amarronzada e, dentre as colônias brancas e amareladas, foram selecionadas as colônias de textura viscosa com ou sem brilho.

5.2.3. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA

5.2.3.1. TERMOTOLERÂNCIA

Os isolados fúngicos selecionados foram submetidos a testes de crescimento em diversas temperaturas. Para tal, as leveduras foram previamente cultivadas em (SDA) por um período de 48 horas em temperatura de 31°C. Posteriormente, cerca de duas a cinco colônias foram transferidas para um tubo de ensaio estéril contendo solução salina 0,85% e a transmitância desta suspensão foi determinada em espectrofotômetro a 530nm. Para o experimento o inóculo foi padronizado acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente a uma solução-padrão 0,5 da escala de *McFarland*, correspondente a uma concentração fúngica de 1×10^6 a 1×10^5 células/mL (CLSI, 2002).

Em seguida, três microlitros desta suspensão foram inoculados em meio SDA e a placa foi mantida em fluxo laminar até que o volume adicionado secasse completamente. Posteriormente, as placas foram incubadas nas temperaturas de 37°C, 40°C e 50°C durante 10 dias sendo a primeira observação realizada após 48h e as demais a cada 24h.

O procedimento descrito foi realizado em triplicata e repetido em dois ensaios com intervalo de um mês entre os experimentos.

A avaliação dos resultados se deu de forma visual de modo que, desde o primeiro dia, foram atribuídas escalas comparativas sendo (-) para leveduras que não apresentavam qualquer sinal de crescimento e variações que vão de (+) a (++++) para definir a intensidade de crescimento da levedura na placa conforme figura abaixo.

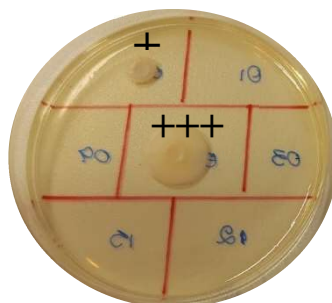


Figura 5. Crescimento de *P laurentii* considerado (+) e de *P. terrestris* considerado (+++) em placa de SDA a 40°C

Fonte: Registros fotográficos da autora

5.2.3.2.PRODUÇÃO DE MELANINA

Assim como na avaliação de termotolerância, os isolados foram previamente cultivados em SDA por um período de 48 horas em temperatura de 31°C e, posteriormente, diluídos em solução salina 0,85% com realização de ajustes para a concentração fúngica segundo solução-padrão 0,5 da escala de *McFarland*.

Em seguida, três microlitros desta suspensão foram inoculados em meio ágar semente de níger no qual espécies de *Cryptococcus* crescem e desenvolvem colorações em tons de marrom. As placas foram mantidas em fluxo laminar até que o volume adicionado secasse completamente e, posteriormente, incubadas nas temperaturas de 37°C e 40°C durante 10 dias. Após a primeira análise, realizada com 48h, as demais foram realizadas a cada 24h por todo o período de 10 dias.

O procedimento descrito foi realizado em triplicata e repetido em dois ensaios com intervalo de um mês entre os experimentos. A avaliação dos resultados se deu de forma visual de modo que, desde o primeiro dia, foram atribuídas escalas comparativas sendo (-) para leveduras que não apresentavam qualquer sinal de variação em sua coloração e variações que vão de (+) a (++) para definir a intensidade de coloração das colônias nas placas de ágar níger em comparação ao apresentado em placas contendo o meio SDA.

5.2.3.3.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PROTEINASE

Assim como nos testes anteriores, os isolados foram previamente cultivados em SDA por um período de 48 horas em temperatura de 31°C e, posteriormente, diluídos em solução salina 0,85% com realização de ajustes para a concentração fúngica segundo solução-padrão 0,5 da escala de *McFarland*.

Em seguida, três microlitros desta suspensão foram inoculados em meio *Yeast Carbon Base* (YCB). YCB é um meio sólido contendo 11,7g de albumina de soro bovino, 1,0g de extrato de levedura, e 2,0g de albumina de soro bovino em 100ml de água. O meio tem seu pH ajustado para 5,0 durante o preparo e é esterilizado por meio de filtração. Após o processo de filtração, o líquido é acrescido de solução de ágar esterilizada em autoclave (18g de ágar em 900ml de água destilada) e pode ser vertido em placas de *petri*.

As placas foram mantidas em fluxo laminar até que o volume adicionado secasse completamente e, posteriormente, incubadas por sete dias a 28°C e a proteólise da albumina de

soro bovino foi visualizada após a coloração com negro de amido (negro de amido, 1g; ácido acético glacial, 199ml; água destilada, 100ml).

O procedimento descrito foi realizado em triplicata e em ensaio único. A atividade de proteinase foi classificada como (-) quando não houve formação de halo, (+), quando houve a proteólise ao redor da colônia entre 1 e 2 mm e (++) , quando a descoloração do ágar excedeu 3-5 mm ao redor da colônia.

5.2.3.4.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOLIPASE

Novamente, os isolados foram previamente cultivados em SDA por um período de 48 horas em temperatura de 31°C e, posteriormente, diluídos em solução salina 0,85% com realização de ajustes para a concentração fúngica segundo solução-padrão 0,5 da escala de *McFarland*. Em seguida, três microlitros desta suspensão foram inoculados em meio *ágar gema de ovo* (4% de gema de ovo foram adicionados ao meio ágar Sabouraud dextrose (Difco) com 1M de cloreto de sódio e 5 mM de cloreto de cálcio), as placas foram mantidas em fluxo laminar até que o volume adicionado secasse completamente e, posteriormente, incubadas por 10 dias a 37°C.

O procedimento descrito foi realizado em triplicata em ensaio único. A formação de zonas de precipitação (Pz) ao redor das colônias seriam consideradas como indicativo da produção da enzima.

5.2.3.5.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA UREASE

Para os testes de atividade da enzima urease os isolados foram previamente cultivados em SDA por um período de 48 horas em temperatura de 31°C. As colônias foram semeadas por estriamento, com o auxílio de uma alça bacteriológica de 1µL, em tubos inclinados contendo meio ágar ureia (peptona 1 g, glicose 1 g, NaCl 5 g, KH₂PO₄ 2 g, ureia 20 g, vermelho de fenol 0,012 g, ágar 18 g, água destilada qsp 1000mL, pH 6,8) e, posteriormente, incubadas na temperatura de 31°C durante 48h. Após a primeira análise, as demais foram realizadas a cada 24h em um período de 3 dias.

Esse meio é um indicador de produção da enzima urease baseado em sua viragem de coloração (figura 6). Quando o microrganismo hidrolisa a ureia em seus processos metabólicos, há a formação de amônia e essa reação faz com que o meio se torne mais alcalino. Essa alteração

é percebida através da alteração de coloração detectada pela mudança no indicador de pH vermelho de fenol que faz com que, o meio antes em tons de amarelo-alaranjado, passe a apresentar cor rosa-arroxeadada (COX *et al.*, 2000).

O procedimento descrito foi realizado em triplicata e em ensaio único. A avaliação dos resultados se deu de forma visual de modo que, desde o primeiro dia, foram atribuídas escalas comparativas sendo (-) para os tubos que permaneceram na coloração original, (*) para os tubos que acidificaram e, conseqüentemente se tornaram mais amarelados e, por fim, escalas que vão de (+) a (++++) para os tubos que alcalinizaram e, em decorrência disto, possuíam viragem da coloração original para um tom arroxeadado sendo a intensidade da coloração um indicativo do grau de hidrólise da ureia e atividade de urease (COX *et al.*, 2000).

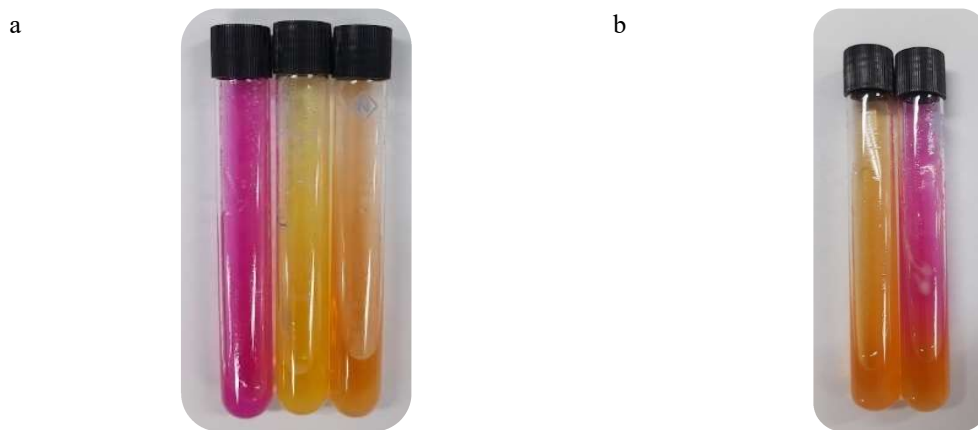


Figura 6. a) Ação da enzima urease: meio positivo (roxo/rosa), meio acidificado (amarelo) e meio com coloração original (alaranjado). b) Ação parcial da enzima urease demonstrada no segundo tubo em comparação ao tubo controle (primeiro tubo).

Fonte: Registros fotográficos da autora

5.2.3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE

Para os testes de atividade da enzima catalase os isolados foram previamente cultivados em SDA por um período de 48 horas em temperatura de 31°C. Após este período, uma colônia de cada isolado foi selecionada e transferida para uma lâmina de vidro e a reação da catalase foi avaliada após a adição de uma gota de peróxido de hidrogênio 10 volumes sobre cada colônia de forma individual. A produção de bolhas de gás foi considerada uma reação positiva.

O procedimento descrito foi realizado em triplicata e a avaliação dos resultados se deu de forma visual, sendo atribuído (-) para aos isolados que não apresentassem formação de bolhas de gás e (+) aos isolados que apresentaram, conforme figura abaixo.



Figura 7. Ação da enzima catalase: Início do processo de aparecimento de bolhas imediatamente após a aplicação do peróxido de hidrogênio 10 volumes.

Fonte: Registros fotográficos da autora

5.2.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.2.4.1. EXTRAÇÃO DNA TOTAL

A extração do DNA total foi realizada conforme o trabalho descrito por Ferrer e colaboradores (2001). As linhagens de *C. neoformans* ATCC24067 e *C. gattii* ATCC24065 foram utilizadas como controle.

Uma colônia de cada isolado foi repicada em SDA e incubada por 48 horas a 31°C. Após crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise [Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005M, NaCl 0,1M e SDS 1% (p/v)] e incubadas em banho-maria a 65°C por 50 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) aos tubos e os mesmos foram homogeneizados 20 vezes por inversão e centrifugados a 14800 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo previamente identificado, ao qual se adicionou isopropanol (v/v). Os tubos permaneceram em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitação do DNA.

Após este processo, os tubos foram novamente centrifugados a 13200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e, ao pellet formado, adicionado 200 µL de etanol 70% sendo novamente centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então novamente descartado por inversão e o processo anterior repetido.

Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente *overnight* para evaporação completa do etanol. Após essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 50µL de tampão Tris-EDTA 0,1M (TE) pH 8,0. Todos os produtos obtidos foram quantificados em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e estocados a -20°C até a sua utilização.

5.2.4.2. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO O INICIADOR (GTG)₅

Após extração, os isolados foram submetidos à análise molecular por meio de PCR utilizando-se o iniciador (GTG)₅ (5'- CTGGCTTGGTGTATG-3') de acordo com Meyer e colaboradores (1993) para confirmação do agrupamento genotípico das leveduras.

Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Thermo Fisher Scientific), 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 M (Thermo Fisher Scientific), 1,0 µL de dNTP 10 mM, 2,0 µL do iniciador (GTG)₅ a 10 pmol/ µL (MWG Biotech), 100 a 250 ng de DNA e 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/L (Thermo Fisher Scientific) e o volume final completado com água deionizada.

Para as reações de PCR utilizou-se o termociclador Eppendorf flexlid nexus SXle. O programa de ciclagem consiste de uma desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 93° C por 45 segundos, anelamento a 50° C por 2 minutos e extensão a 72° C por 1 minuto, a extensão final a 72° C por 6 minutos.

Ao final das reações, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5 X (54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0). Os amplicons são previamente corados com solução de GelRed (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França). Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo, sendo um isolado de cada grupo molecular selecionado para sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal utilizando os iniciadores ITS₁ e NL₄.

5.2.4.3. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO OS INICIADORES ITS₁ e NL₄

Os isolados selecionados na fase anterior foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA utilizando os iniciadores ITS₁ (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e NL₄ (GGTCCGTGTTTCAAGACGG), segundo Lachance e colaboradores (1999).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador ITS₁ e NL₄ 10 µmol-1, 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0

μL de MgCl_2 25 mM, 2,0 μL de dNTP 10 mM, 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada.

As reações de PCR são realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf), seguindo: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 20 minutos a 120 V. As bandas são coradas previamente com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

5.2.4.4.PURIFICAÇÃO DOS AMPLICONS

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA de forma que, para 47 μL do produto da PCR sejam adicionados 11,75 μL de EDTA 125 mM e 141 μL de etanol absoluto (Merck). Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 14.000 rpm durante 25 minutos sendo o sobrenadante descartado e o precipitado acrescido de 120 μL de etanol 70%, sendo posteriormente homogeneizado por inversão.

Após o processo anterior, foi realizada nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos sendo novamente o sobrenadante descartado e o restante do etanol secado por 20 minutos a 37°C.

Desta forma, o DNA foi ressuscitado em 10 μL de água para injeção esterilizada sendo o produto obtido dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

5.2.4.5.REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Após purificação dos amplicons, os produtos obtidos foram sequenciados utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730.

A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied 5 Biosystems, EUA) com preparação adequada a um volume final de 10 μL (1 μL do iniciador (5

$\mu\text{mol-1}$), 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μL de Big Dye, 1 a 5 μL de DNA (de modo que a reação final contenha entre 15 e 20 ng) e água para injeção esterilizada para completar o volume, se necessário).

O programa de ciclagem utilizado apresenta uma desnaturação inicial a 36°C por um minuto, 36 ciclos de anelamento a 96°C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50°C e quatro minutos de extensão final a 60°C.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1,0 μL de EDTA 125 mM, 1,0 μL de acetato de sódio 3M e 50 μL de etanol absoluto (Merck) foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente.

Decorrido o período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Em seguida, foram adicionados 100 μL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado por inversão. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 rpm durante um segundo.

Na sequência, a placa foi mantida em repouso durante 20 minutos para evaporação do etanol residual. O DNA precipitado das amostras em cada poço foi então ressuscitado em 10 μL de formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA) e a placa armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730.

5.2.4.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

As sequências obtidas pelo sequenciamento com os *primers* ITS₁/NL₄ foram analisadas quanto a qualidade através do *Electropherogram quality analysis* (EMBRAPA) e, também, através do *software Automatic DNA Sequence Assembler*. Posteriormente, foram identificadas na plataforma *GenBank Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* e os dados gerados foram compilados e analisados através de Microsoft Excel (2010).

6. RESULTADOS

6.1. HOSPITAIS

Inicialmente era prevista a coleta em hospitais de todas as regionais, sendo esses distribuídos em numeração não uniforme em decorrência da densidade demográfica de cada localidade. Entretanto, para adequação ao novo cenário em meio a pandemia de COVID-19, foram realizados sorteios para selecionar, aleatoriamente, hospitais que pudessem representar os demais, podendo o trabalho seguir mesmo com as novas restrições de tempo, transporte e recursos decorrentes do cenário vivido (figura 8).

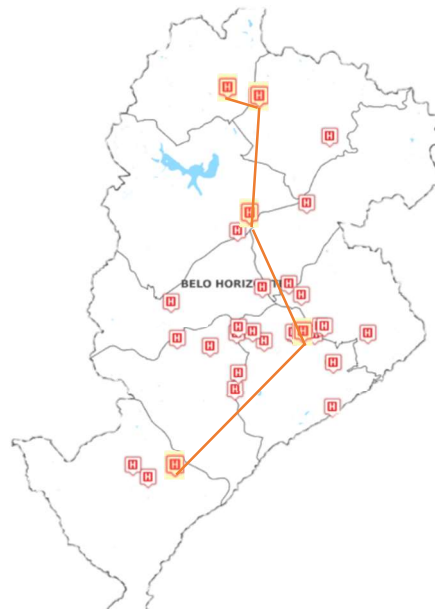


Figura 8. Hospitais sorteados para coleta de material

Fonte: Adaptado de <<https://bhmap.pbh.gov.br/>>

Apesar de ter havido sorteio para definição dos pontos finais de coleta, a escolha inicial se baseou em aspectos como: especialidades clínicas, fluxo de pessoas no hospital, atendimento total ou parcial ao Sistema único de Saúde (SUS) e o tratamento de doenças que se relacionavam com a criptococose direta ou indiretamente, estando inicialmente, por exemplo, o Hospital da Baleia (hospital com centro oncológico e nefrológico) e o Hospital Julia Kubitschek (hospital público que presta atenção especializada para portadores das doenças denominadas raras ou complexas, com foco em doenças do sistema respiratório) no roteiro de coletas. Após as limitações e redefinição de roteiro, os sorteios estabeleceram as coletas nos seguintes hospitais:

Tabela 11. Especificações dos hospitais selecionados**Tabela 11.1.** Especificações - Hospital Risoleta Tolentino Neves
HOSPITAL RISOLETA TOLENTINO NEVES

Regional:	Norte	Data de coleta:	21/06/2021
Especialidade:	<ul style="list-style-type: none"> • Cirurgia / Neurocirurgia • Infectologia • Medicina Intensiva Adulta • Nefrologia • Neonatologia • Neurologia 	<ul style="list-style-type: none"> • Obstetrícia • Ortopedia e Traumatologia • Psiquiatria • Radiologia • Urologia 	
Importante:	<ul style="list-style-type: none"> • 100% SUS, filantrópico, funcionamento 24 horas/dia • 69 mil atendimentos urgência/emergência no ano - quase 8 mil atendimentos no Cecovid (900 internações Covid-19) 		

Fonte: Adaptado de <<https://www.hrtn.fundep.ufmg.br/institucional/>>

Tabela 11.2. Especificações - Hospital Evangélico
HOSPITAL EVANGÉLICO – CENTRO DE NEFROLOGIA

Regional:	Venda Nova	Data de coleta:	21/06/2021
Especialidade:	<ul style="list-style-type: none"> • Hemodiálise • Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua (CAPD) • Diálise Peritoneal Automática (DPA) • Acompanhamento pré transplante renal • Acompanhamento pós transplante renal • Diálise Externa • Consultas Nefrológicas • Biopsia Renal 		
Importante:	<ul style="list-style-type: none"> • Hospital filantrópico • Atende mais de 2000 pacientes portadores de Doença Renal Crônica, encaminhados, em sua maioria, pelo SUS. 		

Fonte: Adaptado de <https://aebmg.org.br/he/home/?page_id=100>

Tabela 11.3. Especificações - Hospital Paulo de Tarso
HOSPITAL PAULO DE TARSO

Regional:	Pampulha	Data de coleta:	28/06/2021
Especialidade:	<p>Hospital de transição com o seguinte perfil de pacientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pessoas idosas ou adultos com dependência funcional. • Pessoas com situações transitórias de dependência, associada ou não a patologias múltiplas. • Pessoas que sofrem de uma doença em situação terminal. • Pessoas com doenças crônicas evolutivas e dependência funcional grave por doença física ou psíquica, progressiva ou permanente. • Pessoas que sofrem de alguma síndrome de demência. 		
Importante:	<ul style="list-style-type: none"> • Hospital privado com 68 leitos SUS e 45 leitos de Saúde Suplementar 		

Fonte: Adaptado de <<https://lp.redepaulodetarso.com.br/>>

Tabela 11.4. Especificações - Santa Casa BH/Hospital São Lucas
SANTA CASA BH / HOSPITAL SÃO LUCAS

Regional:	Centro-Sul	Data de coleta:	05/07/2021
Especialidade:	<ul style="list-style-type: none"> • Centro cirúrgico • Centro de diagnóstico e tratamento • Centro de nefrologia • Centro de transplantes • Clínica de olhos • Pediatria - clínica e cirúrgica • Quimioterapia e radioterapia • Unidade de tratamento intensivo adulto e pediátrica 		
Importante:	<ul style="list-style-type: none"> • Recebe pacientes de 80% dos municípios mineiros • Maior prestadora de serviços ao SUS em Minas Gerais • 23 mil cirurgias por ano • 22 mil sessões de quimioterapia por ano • 250 transplantes por ano • 51 mil sessões de radioterapia por ano 		

Fonte: Adaptado de <<https://santacasabh.org.br>>

Tabela 11.5. Especificações - Hospital Eduardo de Menezes
HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES

Regional:	Barreiro	Data de coleta:	05/07/2021
Especialidade:	<ul style="list-style-type: none"> • CTI adulto • Unidade de internação adulto em infectologia e dermatologia • Hospital Dia HIV • Ambulatório de dermatologia • Ambulatório de infectologia • Ambulatório trans • Atendimento odontológico 		
Importante:	<ul style="list-style-type: none"> • Assistência hospitalar de média e alta complexidade e ambulatorial • Especializado em infectologia e dermatologia sanitária • Atuação em epidemias e eventos de interesse em saúde pública • aperfeiçoamento profissional e produção em pesquisas. • Primeiro hospital mineiro integralmente destinado ao atendimento da COVID-19 		

Fonte: Adaptado de <<http://www.fhemig.mg.gov.br/>>

6.2. COLETAS

As informações relacionadas ao campo onde foram realizadas as coletas foram registradas para correlações conforme tabela abaixo:

Tabela 12. Resumo das condições climáticas registradas nos dias de coleta

HOSPITAL	TEMPO	UMIDADE	°C	Dia	Mês
H. Risoleta Neves	Ensolarado	42%	22°C	21	6
H. Evangélico	Ensolarado	42%	24°C	21	6
H. Paulo de Tarso	Ensolarado	49%	20°C	28	6
H. Eduardo de Menezes	Ensolarado	38%	17°C	5	7
Santa Casa	Ensolarado	36%	20°C	5	7

Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.1. SELEÇÃO DOS ISOLADOS

Após o processamento das amostras foi gerado um banco de isolados de 361 leveduras. Foram adotados os aspectos fenotípicos como critério de seleção, uma vez que se tratava de um número considerável de isolados e o experimento ocorreu em um período atípico, em que a pandemia de COVID-19 acabou inviabilizando acesso aos locais de coleta, laboratórios, tempo de trabalho ou mesmo recursos.

Desta forma, inicialmente as colônias foram categorizadas conforme coloração e sua intensidade, textura e sua intensidade, tamanho da colônia e brilho. A partir disso, colônias com aspectos morfológicos destoantes do comumente descrito para *Cryptococcus* spp. foram retiradas e armazenadas para estudos posteriores. Foram retiradas leveduras com tons de rosa/laranja mais intensos ou leveduras brancas de aspecto muito seco na placa, gerando um banco de amostras inicial de 174 leveduras.

Após a seleção inicial, foi utilizada a reação de amplificação a partir do iniciador (GTG)₅ para agrupamento dos isolados através de *fingerprint*, no qual leveduras com perfil de bandas idêntico foram reunidas conforme descrito gerando 108 agrupamentos de leveduras. Após agrupamento e reações de sequenciamento, apenas 47 leveduras seguiram para os testes bioquímicos.

6.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Após sequenciamento, todas as sequências obtidas com os primers ITS₁/NL₄ foram analisadas na plataforma *GenBank Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) gerando a relação apresentada no quadro 13 e detalhada no quadro 14:

Tabela 13. Resumo dos isolados encontrados no entorno dos hospitais de Belo Horizonte – Relação entre nomenclatura atual e a nomenclatura adotada anteriormente

CLASSIFICAÇÃO ATUAL	CLASIFICAÇÃO ANTIGA	QUANTIDADE
<i>Hannaella luteola</i>	<i>Cryptococcus luteolus</i>	1
<i>Kwoniella heveanensis</i>	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	7
<i>Naganishia</i> sp.	<i>Cryptococcus</i> sp.	2
<i>Naganishia albida</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>	4
<i>Naganishia cerealis</i>	<i>Cryptococcus cerealis</i>	1
<i>Naganishia diffluens</i>	<i>Cryptococcus diffluens</i>	2
<i>Papiliotrema</i> sp.	<i>Cryptococcus</i> sp.	3
<i>Papiliotrema flavescens</i>	<i>Cryptococcus flavescens</i>	2
<i>Papiliotrema laurentii</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	17
<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	1
<i>Papiliotrema terrestris</i>	<i>Cryptococcus terrestris</i>	10
TOTAL	-	50
Outras leveduras identificadas*	-	37
TOTAL		87

*Detalhamento nos apêndices (1 e 2)

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 14. Detalhamento dos isolados encontrados no entorno dos hospitais de Belo Horizonte com seu local de coleta e informações do Genbank.

Código do Isolado	ID Coleção	Fonte de isolamento	Local de Coleta	Identidade	Gaps	Genbank match	Espécies
1	SDH28	Solo/detritos	H. Evangélico	359/359(100%)	0/359(0%)	MT543206.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
2	EXH83	Excretas	H. Eduardo de Menezes	291/291(100%)	0/291(0%)	KY108740.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
3	EXH17	Excretas	H. Risoleta Neves	472/473(99%)	0/473(0%)	NG_058327.1	<i>Kwoniella heveanensis</i>
6	SDH19	Solo/detritos	H. Evangélico	295/295(100%)	0/295(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
9	SDH22	Solo/detritos	H. Evangélico	383/383(100%)	0/383(0%)	NG_058351.1	<i>Naganishia diffluens</i>
12	EXH13	Excretas	H. Risoleta Neves	472/472(100%)	0/472(0%)	KY108740.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
15	SDH21	Solo/detritos	H. Evangélico	471/472(99%)	0/472(0%)	KY108747.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
19	EXH34	Excretas	H. Evangélico	479/479(100%)	0/479(0%)	KY108738.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
21	EXH43	Excretas	H. Paulo de Tarso	475/475(100%)	0/475(0%)	KY108740.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
25	EXH26	Excretas	H. Evangélico	470/470(100%)	0/470(0%)	KY108740.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
41	ARH48	Árvores	H. Paulo de Tarso	413/413(100%)	0/413(0%)	LC383360.1	<i>Naganishia sp.</i>
42	ARH49	Árvores	H. Paulo de Tarso	455/455(100%)	0/455(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
43	EXH18	Excretas	H. Risoleta Neves	456/456(100%)	0/456(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
45	ARH27	Árvores	H. Evangélico	495/495(100%)	0/495(0%)	NG_058351.1	<i>Naganishia diffluens</i>
52	ARH93	Árvores	Santa Casa	511/511(100%)	0/511(0%)	MT632029.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
64	SDH68	Solo/detritos	Santa Casa	511/511(100%)	0/511(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
65	ARH44	Árvores	H. Risoleta Neves	503/509(99%)	0/509(0%)	LC176937.1	<i>Papiliotrema sp.</i>
91	SDH39	Solo/detritos	H. Paulo de Tarso	562/564(99%)	0/564(0%)	NG_058327.1	<i>Kwoniella heveanensis</i>
111	EXH32	Excretas	H. Evangélico	490/493(99%)	0/493(0%)	NG_042480.1	<i>Naganishia cerealis</i>
113	ARH25	Árvores	H. Evangélico	368/368(100%)	0/368(0%)	NG_058327.1	<i>Kwoniella heveanensis</i>
131	ARH92	Árvores	Santa Casa	496/496(100%)	0/496(0%)	MT632029.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
135	EXH40	Excretas	H. Evangélico	515/515(100%)	0/515(0%)	KY108740.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
139	SDH41	Solo/detritos	H. Paulo de Tarso	512/512(100%)	0/512(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
142	SDH11	Solo/detritos	H. Risoleta Neves	407/407(100%)	0/407(0%)	NG_058366.1	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>
144	SDH36	Solo/detritos	H. Paulo de Tarso	505/507(99%)	0/507(0%)	MN299299.1	<i>Papiliotrema sp.</i>

Continua

Continuação

145	SDH39	Solo/detritos	H. Paulo de Tarso	552/552(100%)	0/552(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
148	SDH22	Solo/detritos	H. Evangélico	514/514(100%)	0/514(0%)	MT632029.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
162	EXH63	Excretas	H. Paulo de Tarso	272/272(100%)	0/272(0%)	KY106964.1	<i>Naganishia albida</i>
163	SDH32	Solo/detritos	H. Paulo de Tarso	431/431(100%)	0/431(0%)	KY106964.1	<i>Naganishia albida</i>
167	ARH39	Árvores	H. Evangélico	478/478(100%)	0/478(0%)	MK110248.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
182	SDH20	Solo/detritos	H. Evangélico	456/457(99%)	0/457(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
187	SDH7	Solo/detritos	H. Risoleta Neves	517/517(100%)	0/517(0%)	MT632029.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
188	SDH7	Solo/detritos	H. Risoleta Neves	432/440(98%)	0/440(0%)	NG_058327.1	<i>Kwoniella heveanensis</i>
199	EXH31	Excretas	H. Evangélico	282/283(99%)	0/283(0%)	MW663844.1	<i>Naganishia sp.</i>
201	EXH62	Excretas	H. Paulo de Tarso	460/460(100%)	0/460(0%)	NG_055717.1	<i>Naganishia albida</i>
203	EXH20	Excretas	H. Risoleta Neves	557/559(99%)	0/559(0%)	LC333504.1	<i>Papiliotrema sp.</i>
204	ARH103	Árvores	Santa Casa	479/479(100%)	0/479(0%)	NG_058327.1	<i>Kwoniella heveanensis</i>
216	ARH25	Árvores	H. Evangélico	473/473(100%)	0/473(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
236	ARH103	Árvores	Santa Casa	459/459(100%)	0/459(0%)	MT632029.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
253	EXH95	Excretas	Santa Casa	499/499(100%)	0/499(0%)	NG_058327.1	<i>Kwoniella heveanensis</i>
265	SDH6	Solo/detritos	H. Risoleta Neves	360/360(100%)	0/360(0%)	AJ555466.1	<i>Hannaella luteola</i>
267	ARH39	Árvores	H. Evangélico	567/567(100%)	0/567(0%)	MK110248.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
286	ARH69	Árvores	H. Eduardo de Menezes	244/244(100%)	0/244(0%)	NG_058327.1	<i>Kwoniella heveanensis</i>
351	SDH37	Solo/detritos	H. Paulo de Tarso	448/450(99%)	0/450(0%)	KY108735.1	<i>Papiliotrema flavescens</i>
354	SDH31	Solo/detritos	H. Paulo de Tarso	484/484(100%)	0/484(0%)	KY108744.1	<i>Papiliotrema terrestris</i>
355	SDH67	Solo/detritos	Santa Casa	458/458(100%)	0/458(0%)	MT632029.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
356	EXH87	Excretas	Santa Casa	499/499(100%)	0/499(0%)	KY106964.1	<i>Naganishia albida</i>
357	SDH68	Solo/detritos	Santa Casa	480/481(99%)	0/481(0%)	MT632029.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>
359	SDH56	Solo/detritos	H. Eduardo de Menezes	312/329(95%)	1/329(0%)	KY108734.1	<i>Papiliotrema flavescens</i>
360	EXH82	Excretas	H. Eduardo de Menezes	456/456(100%)	0/456(0%)	MT632029.1	<i>Papiliotrema laurentii</i>

Fonte: Elaborado pela autora

6.4. CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS

Embora tenhamos poucos parâmetros para assegurar a relação, é possível perceber a alteração no número de isolados em relação às mudanças de umidade e temperatura aferidas no dia de coleta do material do estudo, conforme apresentado nos gráficos abaixo:

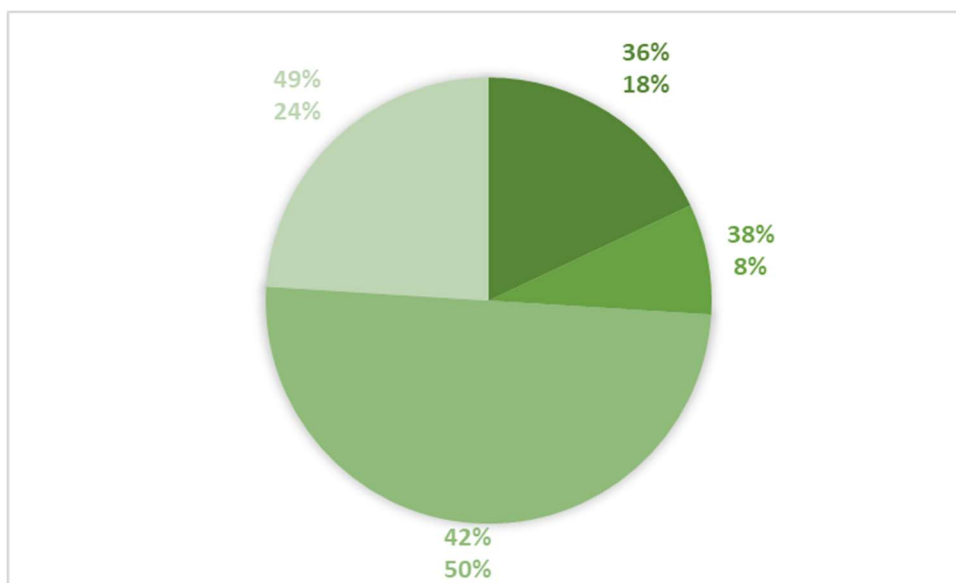


Figura 9. Relação percentual entre os isolados positivos para as leveduras de interesse e a umidade relativa do ar aferida no momento da coleta do material em campo. Valores de Umidade relativa aferidos: 36, 38, 42 e 49%.

Fonte: Elaborado pela autora

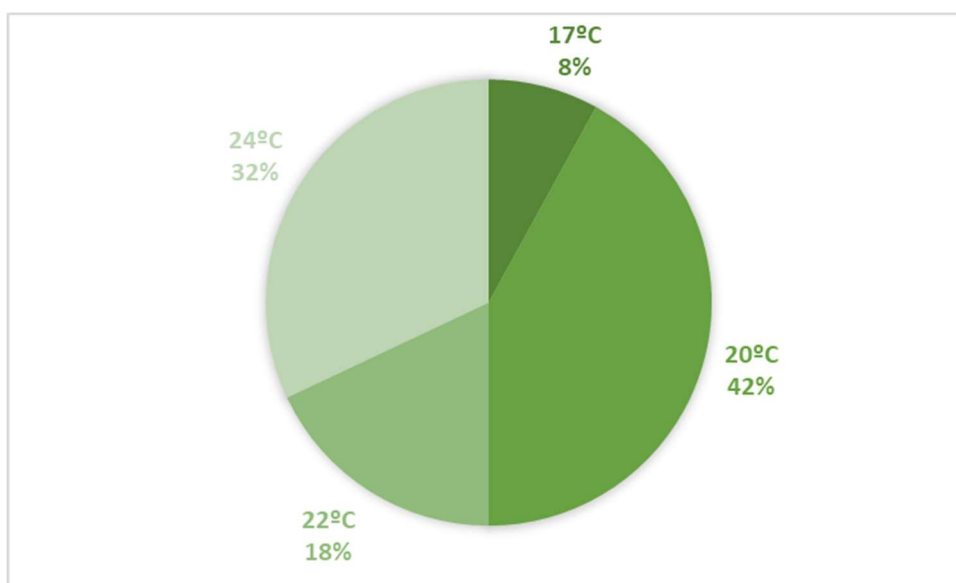


Figura 10. Relação percentual entre os isolados positivos para as leveduras de interesse e a temperatura em graus Celsius (°C) aferida no momento da coleta do material em campo.

Fonte: Elaborado pela autora

Quanto aos pontos de coleta, os hospitais Evangélico e Paulo de Tarso apresentaram maior percentual de amostras positivas com 34,04% (16/47) e 25,53% (12/47) respectivamente (figura 11).

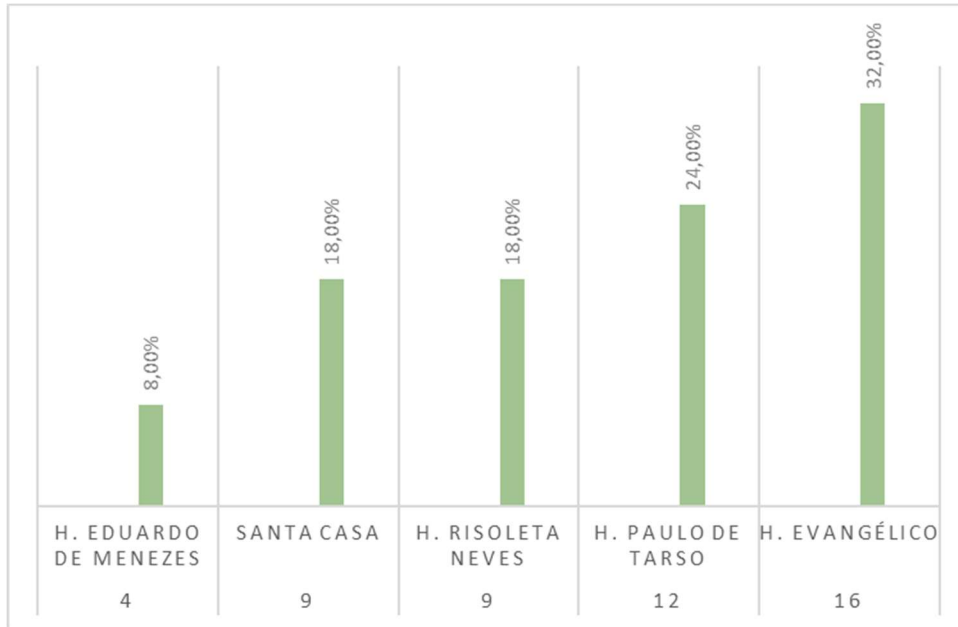


Figura 11. Relação percentual entre os pontos de coleta e os isolados de interesse positivos.

Fonte: Elaborado pela autora

Foram coletados materiais de quatro gêneros, antes integrantes do gênero *Cryptococcus* spp., dos quais *Hannaella* sp. representa 2% (1/50) *Kwoniella* spp. representa 14% (7/50) dos isolados, *Naganishia* spp. representa 18% (9/50) e *Papiliotrema* spp. 66% dos isolados (33/50) conforme tabela 15. Foram isoladas e identificadas, ainda, 37 leveduras adicionais que, por não pertencerem ao gênero e devido a pouca disponibilidade de tempo, não seguiram para os demais testes. Entretanto, a lista destes isolados e seu detalhamento se encontra nos apêndices 1 e 2.

Tabela 15. Percentuais de isolamento por material coletado em relação ao gênero e espécie de estudo.

Espécie	Material de Coleta			Total de isolados	Frequência relativa (%)	Frequência por gênero (%)
	Cascas / raspados de árvores (n=105)	Solo / detritos (n=75)	Excretas (n=105)			
<i>Hannaella luteola</i>	0	1	0	1	2,0%	2,0%
<i>Kwoniella heveanensis</i>	3	2	2	7	14,0%	14,0%
<i>Naganishia</i> sp.	1	0	1	2	4,0%	18,0%
<i>Naganishia albida</i>	0	1	3	4	8,0%	
<i>Naganishia cerealis</i>	0	0	1	1	2,0%	
<i>Naganishia diffluens</i>	1	1	0	2	4,0%	
<i>Papiliotrema</i> sp	1	1	1	3	6,0%	
<i>Papiliotrema flavescens</i>	0	2	0	2	4,0%	66,0%
<i>Papiliotrema laurentii</i>	5	5	7	17	34,0%	
<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	0	1	0	1	2,0%	
<i>Papiliotrema terrestris</i>	2	7	1	10	20,0%	
Totais	13	18	16	13	100%	

Fonte: Elaborado pela autora

6.5. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA

Após seleção apresentada no item 6.2.1, o grupo de interesse foi submetido a testes bioquímicos para verificação de aspectos relativos à sua virulência como termotolerância, melanização e produção de enzimas como protease, fosfolipase, urease e catalase. Os resultados dos referidos testes são detalhados a seguir e seus percentuais se baseiam em um grupo de 49 leveduras uma vez que, ao descongelar os isolados para os testes bioquímicos, um destes (isolado 265 – *Hannaella luteolla*) não se mostrou mais viável.

A avaliação de termotolerância foi testada mediante três temperaturas tendo um percentual de crescimento de 77,552% (38/49) dos fungos a 37°C, 42,86% (21/49) dos fungos a 40°C e apenas um isolado fúngico cresceu a 50°C. No entanto, nos ensaios de repetição do experimento este isolado, que havia crescido a 50°C, não cresceu novamente, sendo assim o resultado desconsiderado conforme detalhado na tabela 16.

Tabela 16. Resultados dos testes de termotolerância nas temperaturas de 37, 40 e 50°C em meio ágar SDA.

Código do Isolado	Espécies	Termo. 37°C	Termo. 40°C	Termo. 50°C
3	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+	-	-
91	<i>Kwoniella heveanensis</i>	++++	++++	-
113	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-	-	-
188	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-	-	-
204	<i>Kwoniella heveanensis</i>	S/C	S/C	S/C
253	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+	+	-
286	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+	-	-
41	<i>Naganishia</i> sp.	+	+	-
199	<i>Naganishia</i> sp.	S/C	S/C	S/C
162	<i>Naganishia albida</i>	+	-	-
163	<i>Naganishia albida</i>	+	-	-
201	<i>Naganishia albida</i>	S/C	S/C	S/C
356	<i>Naganishia albida</i>	-	-	-
111	<i>Naganishia cerealis</i>	+	+	-
9	<i>Naganishia diffluens</i>	+++	++	-
45	<i>Naganishia diffluens</i>	+	-	-
65	<i>Papiliotrema</i> sp.	++++	++++	-
144	<i>Papiliotrema</i> sp.	+	-	-
203	<i>Papiliotrema</i> sp.	+	-	-
351	<i>Papiliotrema flavescens</i>	-	-	-
359	<i>Papiliotrema flavescens</i>	-	-	-
1	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	++	-
2	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+++	++	-
12	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	++	-

Continua

Continuação

19	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	++	-
21	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	++	-
25	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	++	-
52	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-
131	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	+	-
135	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	+	-
148	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	+	-
167	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	-	-
187	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	-	-
236	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	+	-
267	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-	-	-
355	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-	+	-
357	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	-	-
360	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++	+	-
142	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	+	-	-
6	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++	++++	-
15	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-
42	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-
43	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-
64	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-
139	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	+	-
145	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-
182	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-
216	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-
354	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-	-	-
Totais (+)	-	38	21	0

Intensidade do crescimento variando de + (menos intenso) a ++++ (mais intenso); Colônias sem crescimento (-); Leveduras que não apresentaram viabilidade após descongelamento. (S/C)

Fonte: Elaborado pela autora

Dentre os fungos de maior crescimento, podemos observar o gênero *Papiliotrema* sp. (2 isolados, sendo 1 *Papiliotrema terrestris*) e *Kwoniella* sp. (1 isolado da espécie *K. heveanensis*) com crescimento robusto (++++) em ambas (37 e 40°C) temperaturas. As espécies *Papiliotrema laurentii* (1 isolado) e *Naganishia diffluens* (1 isolado), também apresentaram crescimento acentuado (+++) a 37°C e menor desenvolvimento das colônias (++) a 40°C conforme apresentado a seguir.

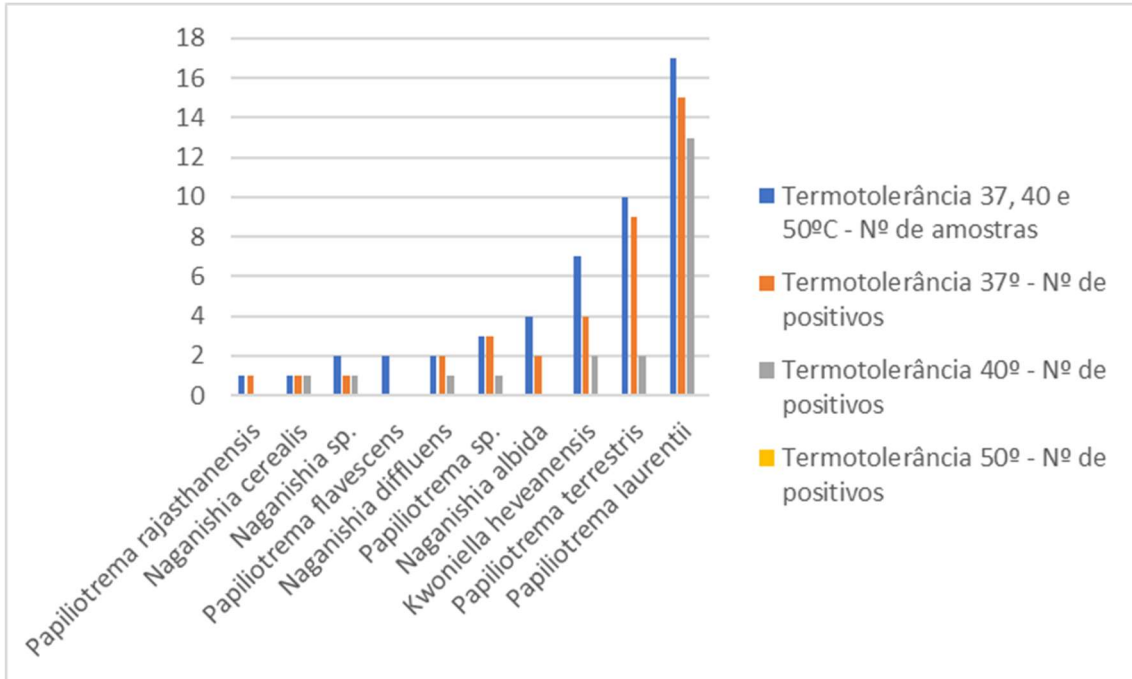


Figura 12. Crescimento das leveduras de interesse nas temperaturas de 37, 40 e 50°C em meio SDA.
Fonte: Elaborado pela autora

O potencial de melanização das colônias foi testado mediante duas temperaturas por um período de dez dias para verificação de influência destas variáveis. Embora as leveduras avaliadas não produzissem altos índices de melanização, foi possível perceber maior percentual de aparecimento deste fator em temperaturas mais elevadas (40°C) em detrimento das temperaturas mais baixas (37°C), conforme observado na figura 13.

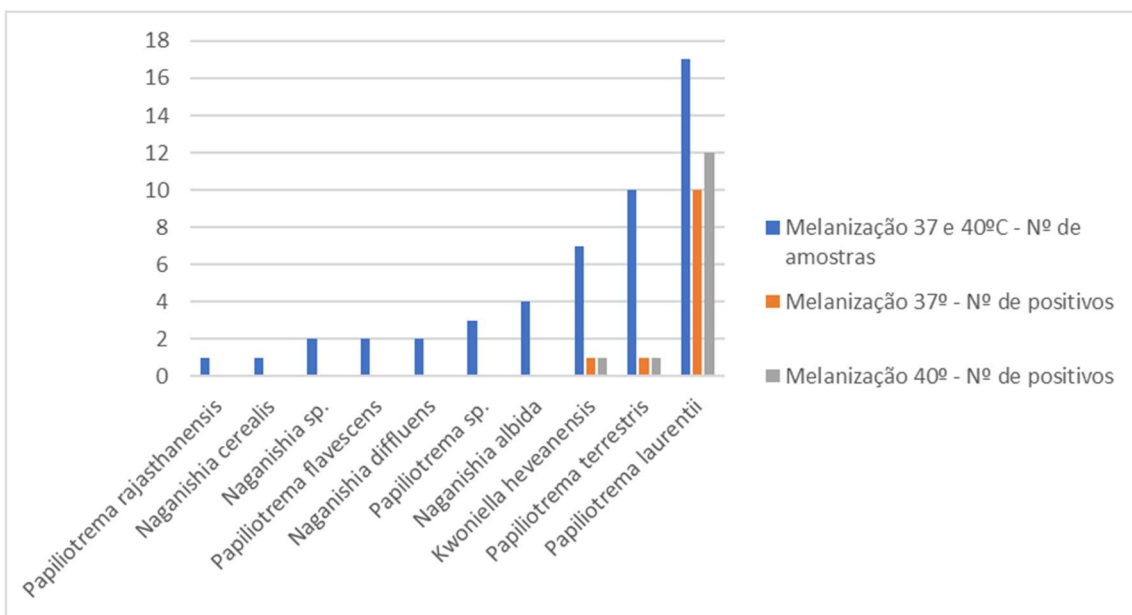


Figura 13. Potencial de melanização das leveduras de interesse em meio ágar semente de níger a 37 e 40°C.
Fonte: Elaborado pela autora

A intensidade da pigmentação das colônias observadas não diferiu significativamente entre as temperaturas (37 e 40°C) sendo observado a pigmentação de 24,49% (12/49) das leveduras na temperatura de 37°C enquanto 28,57% (14/49) melanizaram a 40°C. Grande parte das leveduras, 55,10% (27/49), não apresentaram crescimento no meio utilizado em nenhum dos testes desenvolvidos, conforme detalhamento do quadro 17.

Tabela 17. Resultados dos testes de melanização nas temperaturas de 37 e 40°C em meio ágar semente de níger.

Código do Isolado	Espécies	Melanização 37°C	Melanização 40°C
3	<i>Kwoniella heveanensis</i>	@	@
91	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+	+
113	<i>Kwoniella heveanensis</i>	@	@
188	<i>Kwoniella heveanensis</i>	@	@
204	<i>Kwoniella heveanensis</i>	S/C	S/C
253	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-	-
286	<i>Kwoniella heveanensis</i>	@	@
41	<i>Naganishia</i> sp.	-	-
199	<i>Naganishia</i> sp.	S/C	S/C
162	<i>Naganishia albida</i>	@	@
163	<i>Naganishia albida</i>	@	@
201	<i>Naganishia albida</i>	S/C	S/C
356	<i>Naganishia albida</i>	@	@
111	<i>Naganishia cerealis</i>	@	@
9	<i>Naganishia diffluens</i>	-	-
45	<i>Naganishia diffluens</i>	@	@
65	<i>Papiliotrema</i> sp.	-	-
144	<i>Papiliotrema</i> sp.	@	@
203	<i>Papiliotrema</i> sp.	@	@
351	<i>Papiliotrema flavescens</i>	@	@
359	<i>Papiliotrema flavescens</i>	@	@
1	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
2	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-	+
12	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
19	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
21	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
25	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
52	<i>Papiliotrema laurentii</i>	@	+
131	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
135	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
148	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
167	<i>Papiliotrema laurentii</i>	@	@
187	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-	@
236	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
267	<i>Papiliotrema laurentii</i>	@	@

Continua

Continuação

355	<i>Papiliotrema laurentii</i>	@	@
357	<i>Papiliotrema laurentii</i>	@	@
360	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+
142	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	@	@
6	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-	-
15	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	+
42	<i>Papiliotrema terrestris</i>	@	@
43	<i>Papiliotrema terrestris</i>	@	@
64	<i>Papiliotrema terrestris</i>	@	@
139	<i>Papiliotrema terrestris</i>	@	@
145	<i>Papiliotrema terrestris</i>	@	@
182	<i>Papiliotrema terrestris</i>	@	@
216	<i>Papiliotrema terrestris</i>	@	@
354	<i>Papiliotrema terrestris</i>	@	@
Totais (+)	-	12	14

Presença de pigmento +; Ausência (-); Leveduras que não apresentaram crescimento no meio utilizado e, portando, não puderam ser avaliadas (@); Leveduras que não apresentaram viabilidade após descongelamento. (S/C)

Fonte: Elaborado pela autora

É importante ressaltar que as colônias apresentavam significativa mudança de coloração e textura entre os meios SDA e níger (figura 14), fator que também colaborou para a definição do grupo de estudos inicial.

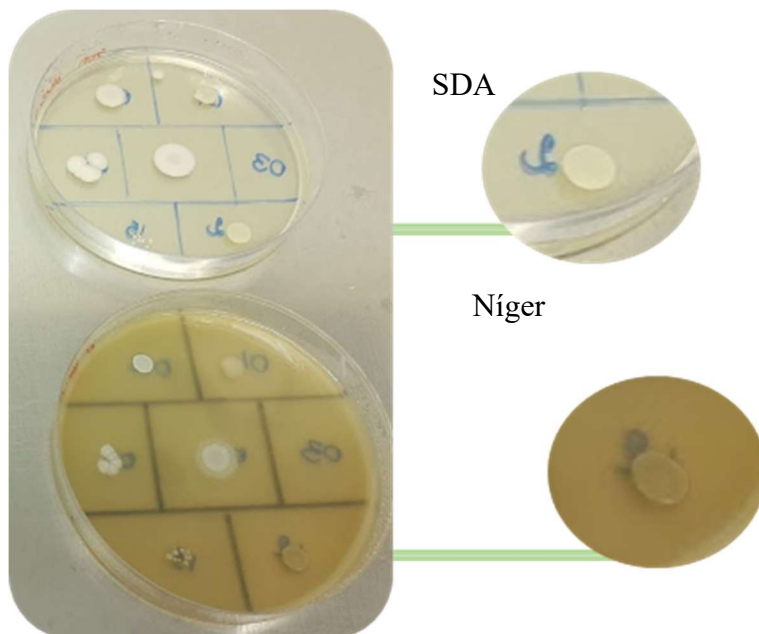


Figura 14. Melanização – Imagem comparativa de *P. laurentii* entre os meios SDA e semente de níger. No primeiro a levedura apresenta textura mais seca e coloração em tons de branco-bege. No segundo, ao contrário, passa a ser viscosa e apresenta coloração marrom.

Fonte: Registros fotográficos da autora

A produção da enzima proteinase foi avaliada através da proteólise da albumina de soro bovino visualizada após a incorporação da coloração com negro de amido conforme figura 15.

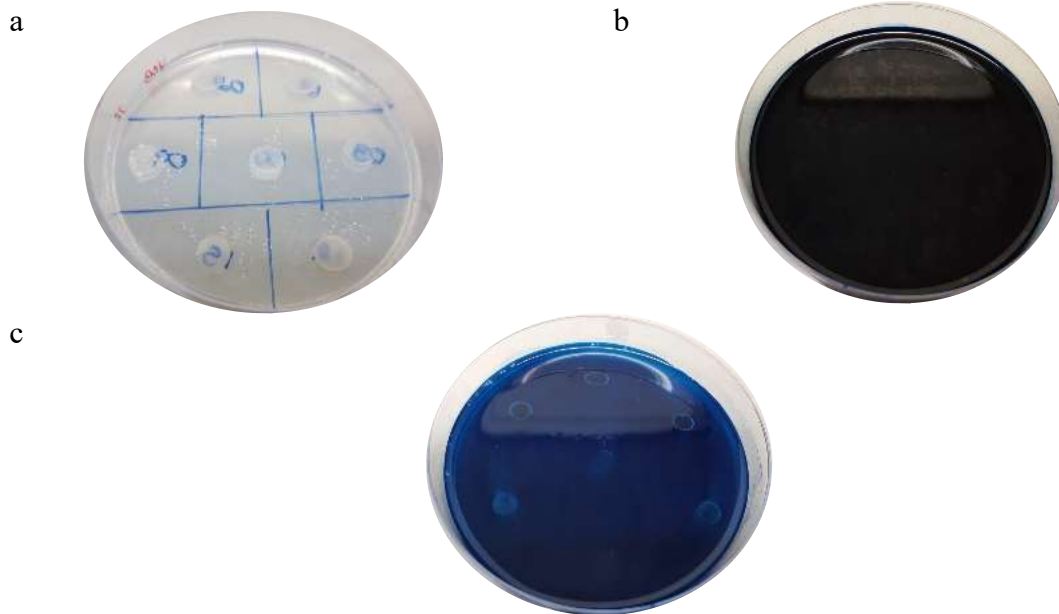


Figura 15. a- Placa apresentando crescimento das colônias em meio *Yeast Carbon Base* (YCB). b- Adição da coloração negro de amido. c- Ação da enzima proteinase evidenciada com a coloração negro de amido.
Fonte: Registros fotográficos da autora

A atividade de proteinase foi classificada como negativa (não houve formação de halo) para 55,10% (27/49) das colônias estudadas, enquanto 34,69% (17/49) apresentaram halo ao seu redor de tamanho entre 1 e 2mm e 4,08% (2/49) com descoloração do ágar superior a 2mm (ambos *P. laurentii*) conforme tabela a seguir.

Tabela 18. Resultados dos testes da ação da enzima proteinase na temperatura de 28°C em meio YPD.

Código do Isolado	Espécies	Proteinase 28°C
3	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-
91	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-
113	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-
188	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-
204	<i>Kwoniella heveanensis</i>	S/C
253	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-

Continua

Continuação

286	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-
41	<i>Naganishia</i> sp.	-
199	<i>Naganishia</i> sp.	S/C
162	<i>Naganishia albida</i>	-
163	<i>Naganishia albida</i>	-
201	<i>Naganishia albida</i>	S/C
356	<i>Naganishia albida</i>	-
111	<i>Naganishia cerealis</i>	-
9	<i>Naganishia diffluens</i>	-
45	<i>Naganishia diffluens</i>	-
65	<i>Papiliotrema</i> sp.	-
144	<i>Papiliotrema</i> sp.	-
203	<i>Papiliotrema</i> sp.	-
351	<i>Papiliotrema flavescens</i>	-
359	<i>Papiliotrema flavescens</i>	-
1	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
2	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-
12	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
19	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
21	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
25	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
52	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++
131	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
135	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++
148	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
167	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
187	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
236	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
267	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-
355	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
357	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
360	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+
142	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	-
6	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-
15	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-
42	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-
43	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-
64	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+
139	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-
145	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+
182	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+
216	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-
354	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+
Totais (+)	-	19

Presença de halo entre 1 e 2mm (+); Halo acima de 2mm (++); Ausência de halo (-); Leveduras que não apresentaram viabilidade após descongelamento. (S/C)

Fonte: Elaborado pela autora

Para atividade de fosfolipase, a avaliação das placas foi feita após o período de 10 dias e a formação de zonas de precipitação (Pz) ao redor das colônias seriam consideradas como indicativo da produção da enzima. Entretanto, apenas o controle apresentou início de formação de precipitação, sendo este teste considerado negativo para todas as amostras.

A avaliação da atividade da enzima urease foi realizada através da leitura visual, de modo a observar a alteração de coloração dos tubos de ensaio em que as leveduras foram estriadas. Após o período de 3 dias de incubação, 83,67% (41/49) dos tubos apresentava alteração completa da coloração original para o tom vermelho-arroxeadado, demonstrando atividade intensa da enzima urease, 2,04% (1/49) permaneceram apenas com o fundo na coloração original e 8,16% (4/49) fizeram com que o meio se tornasse mais amarelado, demonstrando acidificação do mesmo. O detalhamento dos resultados pode ser observado no quadro 19.

Tabela 19. Resultados dos testes da ação da enzima urease na temperatura de 31°C em meio ágar ureia.

Código do Isolado	Espécies	Urease 31°C
3	<i>Kwoniella heveanensis</i>	++++
91	<i>Kwoniella heveanensis</i>	**
113	<i>Kwoniella heveanensis</i>	++++
188	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+++
204	<i>Kwoniella heveanensis</i>	S/C
253	<i>Kwoniella heveanensis</i>	++++
286	<i>Kwoniella heveanensis</i>	++++
41	<i>Naganishia</i> sp.	++++
199	<i>Naganishia</i> sp.	S/C
162	<i>Naganishia albida</i>	++++
163	<i>Naganishia albida</i>	++++
201	<i>Naganishia albida</i>	S/C
356	<i>Naganishia albida</i>	++++
111	<i>Naganishia cerealis</i>	++++
9	<i>Naganishia diffluens</i>	++++
45	<i>Naganishia diffluens</i>	++++
65	<i>Papiliotrema</i> sp.	**
144	<i>Papiliotrema</i> sp.	++++
203	<i>Papiliotrema</i> sp.	++++
351	<i>Papiliotrema flavescens</i>	++++
359	<i>Papiliotrema flavescens</i>	++++
1	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
2	<i>Papiliotrema laurentii</i>	**
12	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
19	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++

Continua

Continuação

21	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
25	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
52	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
131	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
135	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
148	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
167	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
187	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
236	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
267	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
355	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
357	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
360	<i>Papiliotrema laurentii</i>	++++
142	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	++++
6	<i>Papiliotrema terrestris</i>	**
15	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
42	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
43	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
64	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
139	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
145	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
182	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
216	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
354	<i>Papiliotrema terrestris</i>	++++
Totais (+)	-	42

Ação da enzima urease com viragem total do meio de laranja para rosa/roxo (++++); Viragem parcial do meio mantendo o fundo do tudo a cor original (+++); Acidificação do meio com viragem de laranja para amarelo (**); Leveduras que não apresentaram viabilidade após descongelamento. (S/C)

Fonte: Elaborado pela autora

A ação da enzima catalase foi medida através da produção de bolhas após adição de peróxido de hidrogênio 10 volumes sobre as colônias. A intensidade da produção não foi considerada, apenas sendo relatada presença ou ausência deste fator. 100% (49/49) das leveduras apresentaram produção de gás em algum nível.

O quadro resumo com a comparação entre os resultados dos testes realizados e o total de testes positivos entre as amostras pode ser observado a seguir através do mapa de calor (figura 16) e com seu detalhamento demonstrado no apêndice 3.

Espécies por hospital de coleta	Nº de Isolados	Termotolerância			Melanização		Ure.	Cata.	Prot.	Fosf.	Contagem Total
		37°C	40°C	50°C	37°C	40°C	31°C	31°C	28°C	37°C	
<i>Kwoniella heveanensis</i>											
H. Eduardo de Menezes											
H. Evangélico											
H. Paulo de Tarso											
H. Risoleta Neves											
Santa Casa											
<i>Naganishia albida</i>											
H. Paulo de Tarso											
Santa Casa											
<i>Naganishia cerealis</i>											
H. Evangélico											
<i>Naganishia diffluens</i>											
H. Evangélico											
<i>Naganishia sp.</i>											
H. Evangélico											
H. Paulo de Tarso											
<i>Papiliotrema flavescens</i>											
H. Eduardo de Menezes											
H. Paulo de Tarso											
<i>Papiliotrema laurentii</i>											
H. Eduardo de Menezes											
H. Evangélico											
H. Paulo de Tarso											
H. Risoleta Neves											
Santa Casa											

Continua

Continuação

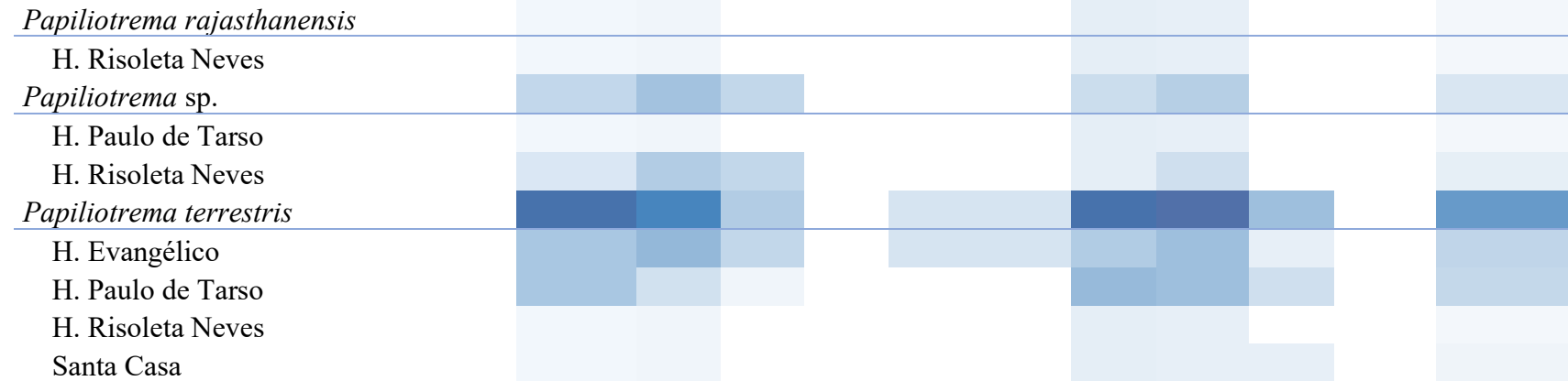


Figura 16. Mapa de calor - amostras de interesse com seus resultados individuais e somatório dos testes positivos.

Ure. – Urease; Cata. – Catalase; Prot. – Proteinase; Fosf. – Fosfolipase.

Fonte: Elaborado pela autora

As pontuações são representadas em cores distintas conforme figura a seguir:



Figura 17. Escala de cor do mapa de calor

Variação ocorre do branco (0) ao vermelho (valor máximo apresentado na categoria avaliada) conforme demonstrado na escala.

Fonte: Elaborado pela autora

6.5.1. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Após identificação molecular, que gerou o agrupamento de 50 amostras de interesse, 49 destas seguiram para caracterização bioquímica, podendo os resultados obtidos serem relacionados e apresentados conforme se segue:

As coletas foram realizadas entre os meses de junho e julho de 2021 sendo três no primeiro (171 amostras) e duas no segundo (114 amostras). Com relação a data de coleta podemos observar que 74% (37/50) das amostras positivas foram obtidas no primeiro mês e, proporcionalmente, os meses apresentaram 21,64% (37/171) e 11,40% (13/114) de positivos em relação ao total coletado no respectivo período.

Ainda é possível observar que houve certa variação de positivos em relação a temperatura e umidade dos dias de coleta sendo 58% (29/50) das amostras obtidas em dias de umidade próxima a 40%. Já para a temperatura foram observados dois pontos de maior impacto, sendo os valores próximos de 20°C e 24°C responsáveis, respectivamente, por 42% (21/50) e 32% (16/50) das amostras positivas (figuras 18 e 19).

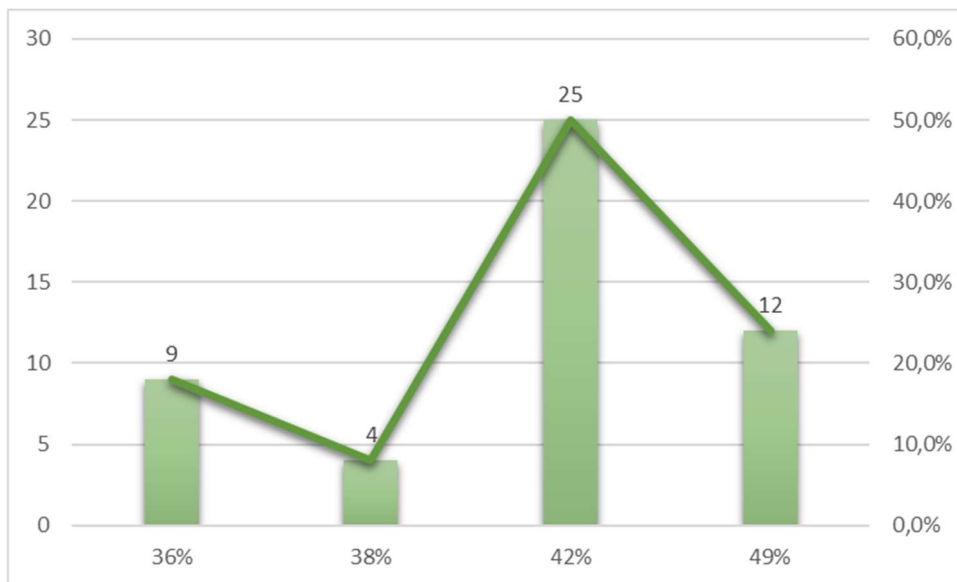


Figura 18. Percentual dos isolados recuperados em relação à umidade relativa do ar registrada no dia de coleta do substrato de isolamento – Percentuais de Umidade do ar registrados: 36, 38, 42 e 49%.

Fonte: Elaborado pela autora.

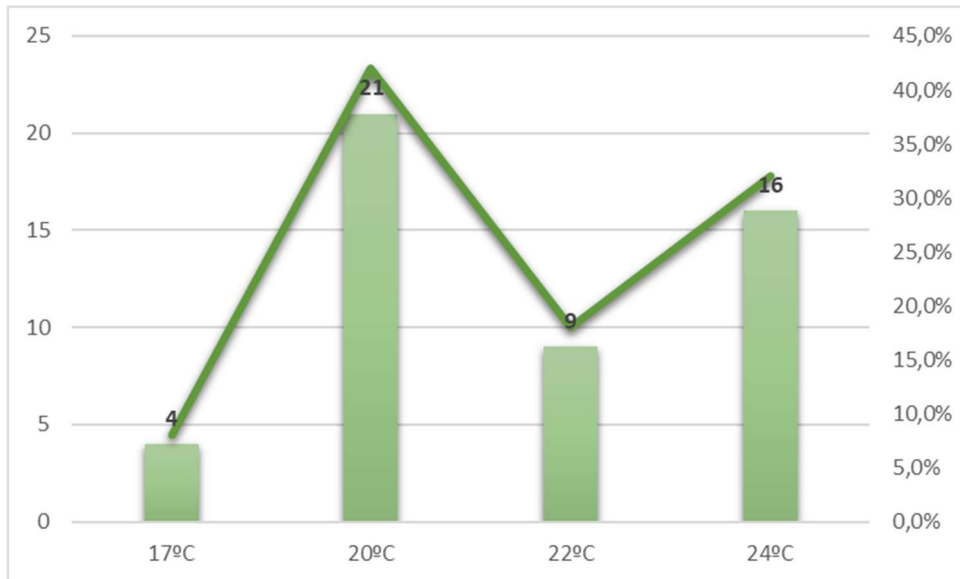


Figura 19. Percentual dos isolados recuperados em relação à temperatura registrada no dia de coleta do substrato de isolamento – Temperaturas registradas: 17, 20, 22 e 24°C.

Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação aos hospitais e seu entorno, o Centro Nefrológico do Hospital Evangélico de Venda Nova apresentou maior percentual com 32% (16/50) de positivos entre as amostras coletadas em seu entorno e também com relação ao total de amostras coletado gerando o percentual de 5,61% (16/285) conforme apresentado abaixo.

Tabela 20. Relação de isolados por ponto de coleta

	HEM	HEV	HPT	HRN	HSC	TOTAL
Nº absoluto	4	16	12	9	9	50
Por coleta*	7,02%	28,07%	21,05%	15,79%	15,79%	-
Pelo total coletado	1,40%	5,61%	4,21%	3,16%	3,16%	17,54%

*% avaliado entre o número de amostras coletado no hospital e/ou seu entorno totalizando 57 amostras.

Hospital Eduardo de Menezes (HEM); Hospital Evangélico (HEV); Hospital Paulo e Tarso (HPT); Hospital Risoleta Neves (HRN); Hospital Santa Casa (HSC).

Fonte: Elaborado pela autora

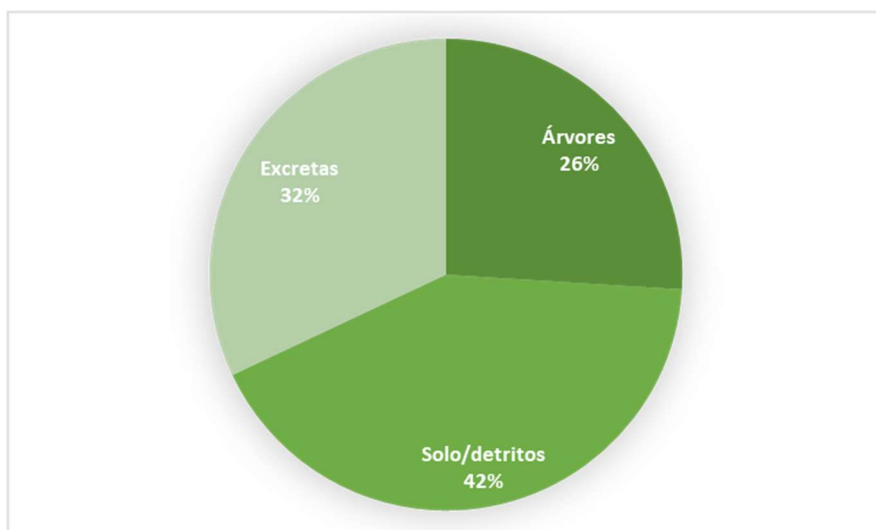
Além disso, o Hospital Evangélico foi também o responsável pelo percentual mais expressivo de leveduras com alto índice de testes bioquímicos positivos conforme tabela 21.

Tabela 21. Relação de isolados com alto índice de testes positivos por ponto de coleta

Isolado	Espécie	Hospital	n° de positivos	Total
360	<i>Papiliotrema laurentii</i>	H. Eduardo de Menezes	7	1
1	<i>Papiliotrema laurentii</i>	H. Evangélico	7	5
19	<i>Papiliotrema laurentii</i>	H. Evangélico	7	
25	<i>Papiliotrema laurentii</i>	H. Evangélico	7	
135	<i>Papiliotrema laurentii</i>	H. Evangélico	7	
148	<i>Papiliotrema laurentii</i>	H. Evangélico	7	
21	<i>Papiliotrema laurentii</i>	H. Paulo de Tarso	7	1
12	<i>Papiliotrema laurentii</i>	H. Risoleta Neves	7	1
131	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Santa Casa	7	2
236	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Santa Casa	7	
52	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Santa Casa	6	1

Fonte: Elaborado pela autora

Das leveduras selecionadas, 42% (21/50) foram obtidas de amostras provenientes de solo/detritos, 32% (16/50) de excretas de aves (*Columba livia*) e 26% (13/50) de cascas ou raspados de árvores (*Dyopsis lutescens*, *Caesalpinia Peltophoroides*, *Tabebuia ochracea*, *Terminalia catappa*, *Jacaranda cuspidifolia*) (Fig. 20). Esses valores ainda podem ser relacionados quanto ao percentual coletado por categoria e quanto ao total coletado, como apresentado na tabela 22 que demonstra a maior representatividade de positivos obtidos de “solos/detritos” em ambas categorias o que contraria a expectativa de maior probabilidade de encontrar tais leveduras em excretas de aves.

**Figura 20.** Proporção de positivos por grupo amostral

Fonte: Elaborado pela autora

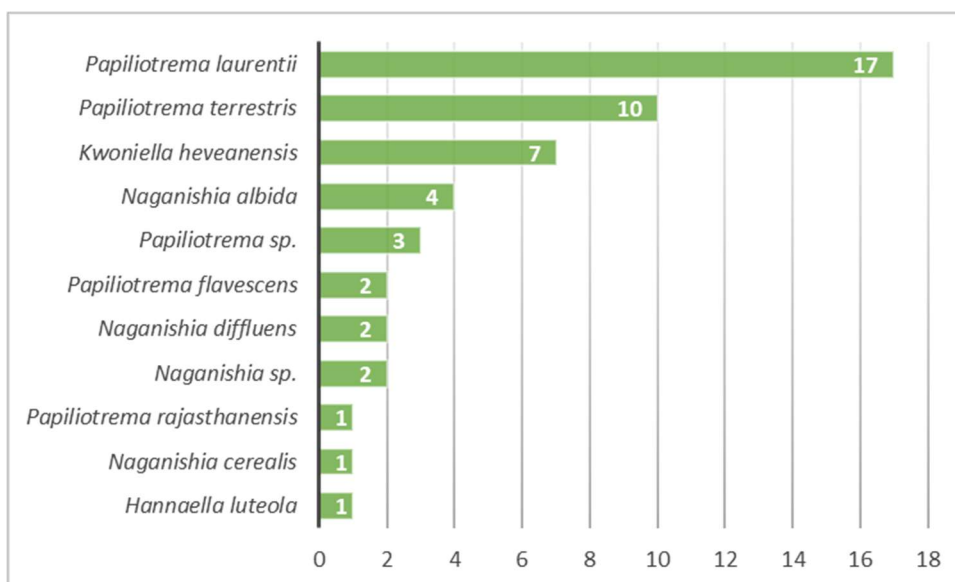
Tabela 22. Relação percentual quanto à categoria e quanto ao total coletado

	Solo/detritos	Excretas	Árvore	Total
Nº absoluto	21	16	13	50
Por categoria*	28,00%	15,24%	12,38%	-
Pelo total coletado	7,37%	5,61%	4,56%	17,54%

*% avaliado entre o número de amostras da categoria sendo 75 amostras de solo/detritos, 105 de excretas e 105 de cascas/raspados de árvores, totalizando 285 amostras.

Fonte: Elaborado pela autora

Dentre os isolados, o representante mais significativo foi *Papiliotrema laurentii* (figura 21), responsável por 34% (17/50) das amostras, seguido de *Papiliotrema terrestris* com 20% (10/50). A participação destes exemplares por hospital e/ou entorno pode ser observada na tabela 23, na qual é possível verificar que *P. laurentii* e *K. heveanensis* estiveram presentes em todos os pontos de coleta e que *P. terrestris* esteve presente em quatro dos cinco pontos coletados. *P. laurentii* também foi responsável pelas leveduras com maior número de testes bioquímicos positivos e a relação dos isolados mais virulentos com seus substratos de origem está representada na tabela 24.

**Figura 21.** Distribuição das espécies identificadas

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 23. Distribuição das espécies identificadas em relação aos pontos de origem.

Espécie	HEM	HEV	HPT	HRN	HSC	TOTAL
<i>Hannaella luteola</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Kwoniella heveanensis</i>	1	1	1	2	2	7
<i>Naganishia</i> sp.	0	1	1	0	0	2
<i>Naganishia albida</i>	0	0	3	0	1	4
<i>Naganishia cerealis</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Naganishia diffluens</i>	0	2	0	0	0	2
<i>Papiliotrema</i> sp.	0	0	1	2	0	3
<i>Papiliotrema flavescens</i>	1	0	1	0	0	2
<i>Papiliotrema laurentii</i>	2	7	1	2	5	17
<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Papiliotrema terrestris</i>	0	4	4	1	1	10
Totais	4	16	12	9	9	50
% por hospital	7,02%	28,07%	21,05%	15,79%	15,79%	-
% pelo total	1,40%	5,61%	4,21%	3,16%	3,16%	17,54%

% por hospital – cálculo realizado entre as coletas realizadas naquele ponto (57);

% pelo total – cálculo avaliado pelo total de amostras coletadas (285)

Hospital Eduardo de Menezes (HEM); Hospital Evangélico (HEV); Hospital Paulo e Tarso (HPT); Hospital Risoleta Neves (HRN); Hospital Santa Casa (HSC).

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 24. Relação de isolados com alto índice de testes positivos por substrato coletado.

Código do Isolado	Espécie	Hospital	nº de positivos
131	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Árvores	7
236	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Árvores	7
360	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Excretas	7
19	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Excretas	7
25	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Excretas	7
135	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Excretas	7
21	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Excretas	7
12	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Excretas	7
1	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Solo / detritos	7
148	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Solo / detritos	7
52	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Árvores	6

Fonte: Elaborado pela autora

7. DISCUSSÃO

Devido a sua distribuição global estima-se que, anualmente, ocorram 223.100 novos casos e mais de 181.000 mortes em decorrência de doenças causadas por esse microrganismo – principalmente em pacientes infectados pelo HIV – dentre os quais cerca de dois quartos destes valores (162.500 novos casos e 135.900 mortes) estejam concentrados na África subsaariana (CARLSON *et al.*, 2021; EDWARDS *et al.*, 2021; HONG *et al.*, 2021; MORALES-LÓPEZ; GARCIA-EFFRON, 2021).

Leveduras como *Papiliotrema laurentii*, *P. flavescens*, *P. terrestris*, *Naganishia albida*, *N. diffluens*, *N. friedmannii*, *Kwoniella heveanensis* e *Hannaella luteola*, todas anteriormente classificadas e pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, podem ser considerados patógenos emergentes em pacientes com algum nível de imunossupressão podendo, algumas destas espécies, apresentar risco a saúde humana e animal em maior ou menor grau (FERNANDES *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Apesar de o complexo *gattii/neoformans* ser mais comumente associado aos relatos de doenças, *Papiliotrema laurentii* e *Naganishia albida*, juntos, são responsáveis por cerca de 80% dos casos clínicos reportados não pertencentes ao referido complexo, demonstrando a importância do estudo destas espécies (KHAWCHAROENPORN *et al.*, 2007).

Apesar de não terem sido encontrados representantes do complexo *gattii/neoformans*, houve um percentual considerável (17,54% - 50/285) de isolados não pertencentes ao complexo, porém, também de crescente relevância clínica (KHAWCHAROENPORN *et al.*, 2007). No entorno dos hospitais de Belo Horizonte foram encontradas as leveduras dos gêneros *Papiliotrema* (66% - 33/50), *Naganishia* (18% - 9/50), *Kwoniella* (14% - 7/50) e *Hannaella* (2% - 1/50) sendo estes divididos entre as espécies *Papiliotrema laurentii* (34% - 17/50), *Papiliotrema terrestris* (20% - 10/50), *Papiliotrema flavescens* (4% - 2/50), *Papiliotrema rajasthanensis* (2% - 1/50), *Naganishia albida* (8% - 4/50), *Naganishia diffluens* (4% - 2/50), *Naganishia cerealis* (2% - 1/50), *Kwoniella heveanensis* (14% - 7/50) e *Hannaella luteola* (2% - 1/50).

Os avanços da medicina e consequente evolução dos tratamentos médicos proporcionaram a melhora da qualidade de vida e o aumento da longevidade de populações de risco como pacientes imunossuprimidos (LIU *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2017). Entretanto, doenças oportunistas tornam-se mais frequentes em meio a tal cenário fazendo com que a ampliação do conhecimento em relação aos patógenos oportunistas, bem como seus locais de

incidência, fossem de suma importância para seu mapeamento e controle (LIU *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2017).

Dentre as doenças oportunistas, as micoses sistêmicas possuem diferentes características quanto a epidemiologia e distribuição geográfica, contudo, fatores de risco como transplante de órgãos, doenças autoimunes, uso de quimioterápicos, terapias com altas ou prolongadas doses de corticoides e, principalmente, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), podem aumentar ou agravar a incidência destas infecções no hospedeiro (LIU *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2017; MONTOYA, *et al.* 2021; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

Por isso, o estudo priorizou coletas em hospitais cujo fluxo de pacientes estivesse relacionado com os fatores de risco acima citados sendo selecionados o centro nefrológico do Hospital Evangélico (atendimento pós-transplante renal, diálise peritoneal e hemodiálise), o Hospital Risoleta Neves (atendimento geral, nefrológico e infectologia), o Hospital Eduardo de Menezes (assistência especializada em infectologia e dermatologia sanitária), o Hospital Paulo de Tarso (hospital de transição para pessoas com perda de autonomia e declínio funcional, que demandam cuidados continuados em reabilitação, cuidados crônicos e cuidados paliativos) e a Santa Casa (atendimento nefrológico, oncológico, transplantes, quimio e radioterapia).

Além disso, a criptococose está entre as micoses invasivas mais frequentemente diagnosticadas, sendo considerada a principal causa de meningoencefalite fúngica, afetando indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes com níveis de mortalidade acentuados em grupos de risco, principalmente em indivíduos portadores do vírus HIV. (MORETTI *et al.*, 2008; MONTOYA, *et al.* 2021; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

A infecção por essa levedura também pode apresentar outras formas clínicas de manifestação, acometendo órgãos como pulmões, lesões em ossos, pele e tecidos moles ou promovendo casos de fungemia, esta última bastante comum para *Papiliotrema laurentii* (MORETTI *et al.*, 2008; MONTOYA, *et al.* 2021; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

Os fatores de virulência estão intimamente relacionados a capacidade e aos danos causados pela doença. Desta forma, avaliando os fatores de virulência, 100% (10/10) das que apresentaram positividade em 7 dos 9 testes eram da mesma espécie - *Papiliotrema laurentii*. Da mesma forma, com 6 dos 9 testes positivos, o único representante pertencia a mesma espécie dos anteriores totalizando 22,45% (11/49) das leveduras avaliadas. Embora menos relevantes ao propósito do trabalho, 4,08% (2/49) apresentaram positividade em 5 dos testes realizados, 26,53% (13/49) em 4 testes, 28,57% (14/49) em 3 e 12,24% (6/49) em 2 testes de virulência.

A baixa pigmentação apresentada pode ser relacionada ao meio utilizado (ágar semente de níger – *Guizotia abyssinica*) uma vez que o processo de melanização destes fungos ocorre

através da presença das enzimas fenol-oxidase ou lacase que atuam sobre o substrato no qual as leveduras são inseridas. Desta forma, a quantificação dos compostos fenólicos ou difenólicos na composição do meio está intimamente relacionada aos processos metabólicos e a consequente retenção de melanina na parede celular do fungo (PEDROSO *et al.*, 2007). Tal quantificação é possível através de meios como *L-dopa*, uma vez que, apesar de pesadas e padronizadas, não se pode afirmar a presença e/ou quantidade exata dos compostos fenólicos nas sementes utilizadas.

Entretanto, apesar da baixa expressão de pigmentos, é possível observar a alteração de textura das colônias entre os meios ágar semente de níger (*Guizotia abyssinica*) e *Sabouraud dextrose* ágar (SDA). As leveduras apresentam aspecto mais brilhante e cremoso no primeiro enquanto, no segundo, se tornam opacas e de textura mais ressecada, conforme demonstrado nas imagens abaixo.

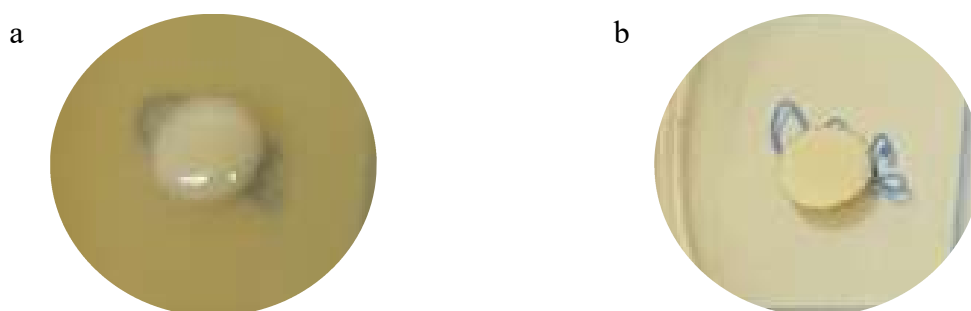


Figura 22. a- *Papiliotrema laurentii* cultivado em ágar semente de níger a 37°C. b- *Papiliotrema laurentii* cultivado em agar SDA a 37°C.

Fonte: Elaborado pela autora

Ainda é importante citar a alta incidência de positivos advindos de amostras de solo/detritos (28% - 2175), superior às de excretas (15,24% - 16/105), em contraponto ao normalmente esperado para isolamento de leveduras do gênero (TENCATE *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; MENDES, 2018). Além de mais significativo proporcionalmente, os isolados de amostras de solo/detritos também foram responsáveis pelo maior percentual em participação geral (7,37% - 21/285) mesmo com número inferior de amostras (75 amostras). A participação das amostras de excretas e cascas de árvores representaram um total de 5,61% e 4,56%, respectivamente, mesmo com maior amostragem (105 amostras cada).

Entre os hospitais podemos observar certa variação nos padrões de isolados sendo o Hospital Eduardo de Menezes o responsável pela menor proporção com 1,4% (4/285) enquanto o Hospital Evangélico apresenta um percentual de 5,61% (16/285). Dentre os Hospitais, o Hospital Evangélico também foi o que apresentou maior percentual de isolados de *P laurentii*

sendo 50% (5/10) dentre os mais virulentos, seguido da Santa Casa com 20% (2/10) entre os mais virulentos, os demais, com 10% (1/10) de isolados entre os mais virulentos cada.

Quanto às questões de temperatura e umidade, 74% dos positivos foram obtidos em dias com umidade relativa do ar entre 42 e 49%, enquanto as temperaturas de 20°C e 24°C corresponderam às maiores taxas de positividade com 42% e 32% respectivamente.

Em Uberlândia (MG), Brito e colaboradores (2019) também demonstraram considerável isolamento de leveduras no entorno de áreas hospitalares e acadêmicas com o total de 62,5% (20/40) em amostras de excretas de aves e 37,5% (12/41) em ocos de árvores. Também reafirmaram maior presença de *P. laurentii* sendo responsável por 12,5% (5/40) das amostras de excretas e 19,5% (8/41) das amostras de ocos de árvores. Foram relatadas, ainda, a presença de *Naganishia albida* (15%), *N. liquefaciens* (15%), *N. friedmannii* (10%) em excretas de aves e *Papiliotrema flavescens* (8%) ocos de árvores.

Embora menos conhecidos que o complexo *gattii neoformans*, *P. laurentii* e *N. albida* possuem casos de fungemia bem descritos na literatura (CHENG *et al*, 2001; FURMAN-KUKLINSKA *et al*, 2009; CHOE *et al*, 2019; FILHAO *et al*, 2022). *P. laurentii* ainda é relacionado a casos de meningite (CASTRO-LAINEZ *et al*, 2019) e criptococose cutânea primária (MOLINA-LEYVA *et al*, 2013) e *N. albida* a quadros de encefalite (LIU *et al*, 2013).

Aos quadros de fungemia, é atribuída a aquisição de forma nosocomial, na qual os fômites hospitalares teriam papel fundamental neste processo (JOHNSON *et al*, 1998; CHENG, *et al* 2001). Desta forma o trabalho apresenta a relação de isolados a partir de substratos coletados no entorno de hospitais com características de atendimento de pacientes de risco prévio associado à doença causada pelo fungo. Posto isso o estudo dos fatores de virulência destes microrganismos e a interação destes com o meio se faz necessário para antever o risco ao qual essa população possa estar exposta.

Em contrapartida, estudos demonstram que o mesmo microrganismo pode ser utilizado de forma benéfica ao homem e ao ambiente no qual está inserido. Vieira e colaboradores (2020), a partir de isolados de *P. laurentii* de solos de campos rupestres, sugerem a utilização destas leveduras como matéria-prima na produção de biodiesel.

Outra utilização da levedura é apresentada na agricultura, na qual é empregada como agente biológico de controle sendo pulverizada nas folhas de determinadas plantações para o manejo de pragas (EMBRAPA, 2009; SILVA, 2021).

Entretanto, a criptococose cutânea primária (CCP), entidade clínica distinta reconhecida desde 2003, é relacionada a infecção da pele sem que haja acometimento de órgãos internos. Essa enfermidade possui maior incidência em pacientes imunocomprometidos, mas seu

desenvolvimento em indivíduos hígidos também é bem documentado (SANCHES *et al.*, 2018). Apesar de pouco comum, são descritos casos de CCP causados por *C. neoformans*, *C. gatti* (MARQUES *et al.*, 2012; SANCHES *et al.*, 2018) e, até mesmo, por *P. laurentii* (MOLINA-LEYVA *et al.*, 2013).

Do mesmo modo que o rastreio e monitoramento do microrganismo na região hospitalar, estudos de virulência e patogenicidade destes microrganismos são de grande importância para verificar a viabilidade e o real impacto da utilização de *P. laurentii* nessas aplicações. É preciso avaliar o risco ao qual o trabalhador rural estará exposto durante aplicação, manuseio e coleta, uma vez que esse microrganismo possui características de infecção cutânea primária.

No presente trabalho foram isoladas muitas leveduras inicialmente, tornando-se um processo muito laborioso devido ao pouco tempo de trabalho e a indisponibilidade de auxílio nos processos de bancada. Desta forma, infelizmente, nem todas as leveduras puderam ser avaliadas.

8. CONCLUSÃO

Com base nesse estudo foi possível concluir que as leveduras dos gêneros *Papiliotrema*, *kwoniella* e *Naganishia* estão presentes no entorno dos hospitais de Belo Horizonte sendo os dois primeiros gêneros presentes em todos os pontos de coleta. Além disso, foi possível perceber maior dispersão de espécies como *P. laurentii* e *K. heveanensis*, que estiveram presentes em todos os pontos de coleta.

Outro ponto observado foi a potencial virulência dos isolados de *P. laurentii* sendo a única espécie com altos índices de testes positivos. Tal característica aliada ao grau de dispersão do microrganismo evidenciam a importância de estudos ecoepidemiológicos e a análise de riscos a ele associados.

9. PERSPECTIVAS

- Ampliar o estudo de modo a abranger todas as regionais da cidade de Belo Horizonte, realizando coletas ambientais e demais procedimentos.
- Retomar o projeto inicial de captura de pombos urbanos (*Columba livia*), realizando coleta e isolamento fúngico de seus órgãos.

- Correlacionar os achados ambientais com o encontrado nas aves de modo inferir o grau de correlação entre os isolados e a possibilidade de que as leveduras estejam sendo carreadas pela cidade através destas aves.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. A. D. F. de. *et al.* The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p. 13, 2017. DOI. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759013>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/7mPbFmVdpPByG4tXCrwZfHv/?lang=en>. Acesso em: 09 fev. 2022.
- ALEGRE-GONZÁLEZ, D. *et al.* Disseminated *Cryptococcus neoformans* infection associated to COVID-19. **Medical Mycology Case Reports**. Vol. 34, p. 35-37, Dec 2021. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2021.10.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221175392100052X>. Acesso em: 19 fev. 2022.
- ALVES, S. H. *et al.* Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 6, p. 359–361, Nov.1997. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000600010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/ddtQLMcs96f3VZWk3Q9v4Rv/abstract/?lang=en>. Acesso em: 09 fev. 2022.
- ARAÚJO, A. C. **Estudo da população de pombos da Escola de Veterinária da UFMG: avaliação ambiental e isolamento de *Cryptococcus* spp.** 46f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- ARAÚJO, E. C., Jr *et al.* *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 4, Jul. 2015. DOI. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7451>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/kfvnHV7zPgCzLgRcWmJVKRg/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 09 fev. 2022.
- BARBOSA, A. T. F. *et al.* Criptococose pulmonar isolada em paciente imunocompetente. **Jornal brasileiro de pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 476–480, Out. 2006. DOI. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000500016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/ngVVfNDQ5HRqWcFtSCsLgnB/?lang=pt>. Acesso em: 09 fev. 2022.
- BARONI, F. DE A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71–75, Apr. 2006. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000200003>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/tpJfCdtkYzktGBMLwRjRg3x/?lang=en>. Acesso em: 09 fev. 2022.
- BIANCHI, R. M. Pneumonia por *Cryptococcus neoformans* em um caprino na região Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 48, n. 10, p. 1678–4596, 2018. DOI. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180372>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cr/a/Lg3fZ7jvkYQGGBVT5RFdD6H/abstract/?format=html&lang=pt>
#. Acesso em: 09 fev. 2022.

BOVERS, M. *et al.* AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* hybrid. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, Jul. 2008. DOI. 10.3201/eid1407.080122. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2600336/>. Acesso em: 09 fev. 2022.

BOVERS, M.; *et al.* Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 1, p. S4-12, 2008. Disponível em: <http://www.reviberoammicol.com/2008-25/S04S12.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 5. ed., 1.126p. Brasília, 2021. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed.pdf
Acesso em: 08 mar. 2022.

CARLSON T. *et al.* Effects of environmental factors on sensitivity of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole and amphotericin B. **FEMS Microbiology Letters**. Vol. 368, n 7, Apr 2021. DOI. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab040>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/368/7/fnab040/6240154?login=false>. Acesso em: 19 fev. 2022.

CASTRO-LAINEZ, M. T. *et al.* *Cryptococcus laurentii* meningitis in a non-HIV patient. **IDCases**. Vol. 18, n. e00612, Jul2019. DOI. 10.1016/j.idcr.2019.e00612. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214250919300976?via%3Dihub>. Acesso em: 11 mar. 2022.

CHENG, M. F. *et al.* *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **Journal of Clinical Microbiol.** Vol.39, n.4, p.1608-1611, Apr 2001. DOI.10.1128/JCM.39.4.1608-1611.2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.39.4.1608-1611.2001>. Acesso em: 11 mar. 2022.

CHOE, Y. J. *et al.* *Cryptococcus albidus* Fungemia in an Immunosuppressed Child: Case Report and Systematic Literature Review. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**. Vol. 9, n. 1, p. 100-105, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/jpids/piz039>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jpids/article/9/1/100/5513660?login=false>. Acesso em: 10 mar. 2022.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**. vol. 2013, Article ID 675213, 23 p., 2013. DOI. <https://doi.org/10.1155/2013/675213>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2013/675213/>. Acesso em: 20 fev. 2022.

COLOMBO, G. *et al.* Caracterização bioquímica e molecular de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas ambientais de pombos (*Columba livia domestica*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 6, p. 1639–1645, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/168256>.

CONDE-PEREIRA, C. *et al.* Fatal Case of Polymicrobial Meningitis Caused by *Cryptococcus liquefaciens* and *Mycobacterium tuberculosis* Complex in a Human

Immunodeficiency Virus-Infected Patient. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 53, n. 8, p. 2753-2755, Aug 2015. DOI. 10.1128/JCM.00840-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00840-15>. Acesso em: 11 mar. 2022.

CONTIN, J. T. *et al.* Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG - Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**. Vol. 21, n.1, Apr. 2010. Disponível em: <http://rmmg.org/artigo/detalhes/286>. Acesso em: 09 fev. 2022.

CORREA, M. DO P. S. C. *et al.* The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 283–287, Oct. 2002. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000500010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/ts4W38FmHMZP8wHmSfVNqS/?lang=en>. Acesso em: 09 fev. 2022.

COUTINHO, R. L. *et al.* Infecção abdominal por *Cryptococcus sp* em paciente com imunodeficiência adquirida em uso de profilaxia secundária com fluconazol. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21, n. 4, p. 467–470. Disponível em: <http://www.rmmg.org/artigo/detalhes/157>. Acesso em: 09 fev. 2022.

CUELLAR, N. N. V. **CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, PROTEÓMICA Y DE LA VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: EFECTO DEL HIERRO Y EL COBRE**. 178f. Tese (Doutorado) FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, 2021.

DARZÉ, C. *et al.* Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 21–26, Fev. 2000. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822000000100003>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/PTLspPWtQFrgpd5sQc69pFC/?lang=pt>. Acesso em: 09 fev. 2022.

DERENGOWSKI, L. S. **Caracterização da resposta de fungos patogênicos a diferentes condições de interação intra e inter-reinos**. 176f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 2011.

DESJARDINS, C. A. *et al.* Population genomics and the evolution of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genome Research**. Vol. 27, n. 7, p. 1207-1219, Jul. 2017. DOI. 10.1101/gr.218727.116. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28611159/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

EDWARDS H. M. *et al.* The need for environmental surveillance to understand the ecology, epidemiology and impact of *Cryptococcus* infection in Africa. **Microbiology Ecology**. Vol. 97, n. 7, Jul 2021. DOI. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab093>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article/97/7/fiab093/6312494?login=false>. Acesso em: 19 fev. 2022

ESHER, S. K.; *et al.* Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 2018. DOI. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180057>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/pvFBp5Mv8QKrhqc7KTnL79j/abstract/?lang=en>. Acesso em: 09 fev. 2022.

FARRER, R. *et al.* A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambeian Miombo Woodlands. **American Society for Microbiology**. Vol. 10, n. 6, e02306-19, Nov 2019. DOI. <https://doi.org/10.1128/mBio.02306-19>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.02306-19>. Acesso em: 10 mar. 2022.

FARRER, R. *et al.* Genomic epidemiology of a *Cryptococcus neoformans* case cluster in Glasgow, Scotland, 2018. **Microbial Genomics**. Vol. 07, n. 3, mgen000537, Mar 2021. DOI. 10.1099/mgen.0.000537. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8190611/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

FERNANDES, F. G. *et al.* *Cryptococcus neoformans* em ninhos de pombos, poeira e secreção nasal de cães e gatos na cidade do Rio de Janeiro. In: II SEMINÁRIO CIENTÍFICO DA FACIG: SOCIEDADE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2, 2016, Minas Gerais; I JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACIG, 1, 2016, Manhuaçu, **Anais...** Minas Gerais: FACIG, 2016 p. 1-5. Disponível em: <http://pensaracademico.facig.edu.br/index.php/semiariocientifico/article/view/130/109>. Acesso em: 11 fev. 2022.

FERREIRA, R. R. Infecções fúngicas do trato respiratório de cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 285–288, 2007. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/13304>. Acesso em: 11 fev. 2022.

FERREIRO, L. *et al.* Principais micoses dos suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. S113–S120, 2007. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/13356/000601903.pdf?sequence=1>. Acesso em: 10 fev. 2022.

FERRER, C. *et al.* Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, Aug. 2001. DOI. 10.1128/JCM.39.8.2873-2879.2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88253/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

FILHAO, F. Q. T., *et al.* FUNGEMIA POR *PAPILIOTREMA (CRYPTOCOCCUS) LAURENTII* FUNGEMIA EM PACIENTE BRASILEIRO COM *SARS-COV-2*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. Vol.26, S. 1, p. 122-123, Jan. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.102222>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867021006917?via%3Dihub>. Acesso em: 02 mar. 2022.

FILIÚ, W. F. DE O. *et al.* Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 591–595, Dez. 2002. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000600008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/jMmLgdJrQYKBnWf7bvqJgyr/?lang=pt>. Acesso em: 10 fev. 2022.

FIRACATIVE, C. *et al.* The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 113, n. 7, p. e170554, 2018. DOI. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170554>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/mioc/a/DH4cpB7hxW7fMD6RwGPznPK/?lang=en#>. Acesso em: 19 fev. 2022.

FIRACATIVE, C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes in Latin America: A Map of Molecular Types, Genotypic Diversity, and Antifungal Susceptibility as Reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. **Journal of Fungi**. Vol. 7, n. 4, p. 282, Apr 2021. DOI. <https://doi.org/10.3390/jof7040282>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/4/282/htm>. Acesso em: 19 fev. 2022.

FISHER, J. F. *et al.* Pulmonary Cryptococcosis in the Immunocompetent Patient - Many Questions, Some Answers. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 167, Sep. 2016. DOI. 10.1093/ofid/ofw167. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27704021/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

FRANCISCO, E. C. *et al.* Cryptococcosis and *Cryptococcus*. **Mycopathologia**. N. 186, P. 729 - 731, Jul 2021. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11046-021-00577-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11046-021-00577-7>. Acesso em: 19 fev. 2022.

FURMAN-KUKLIŃSKA, K. *et al.* Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* as a complication of immunosuppressive therapy--a case report. **Advances in Medical Sciences**. Vol. 54, n.1, p. 116-119, 2009. DOI.10.2478/v10039-009-0014-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19482727/>. Acesso em: 11 mar. 2022.

GALIZA, G. J. N. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 267–276, Mar. 2010. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000300014>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/Sp7yJkQgTJ55XLpBqp7JdzH/?lang=pt#>. Acesso em: 10 fev. 2022.

GHANEM, H; SIVASUBRAMANIAN, G. *Cryptococcus neoformans* Meningoencephalitis in an Immunocompetent Patient after COVID-19 Infection. **Case Reports in Infectious Diseases**. vol. 2021, article ID 5597473, 3p., Jun 2021. DOI. <https://doi.org/10.1155/2021/5597473>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/criid/2021/5597473/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

GONÇALVES, E. H. **Comportamento de pombos ferais (*Columba livia*) criados em cativeiro e influências da rotina de manejo do pombal do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina**. 60f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/176814/TCC%20Eduardo%20Henrique%20Gon%3%a7alves%20-%20Vers%3%a3o%20final%20para%20envio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 11 fev. 2022.

GOUVEIA, V. A. *et al.* Características Clínicolaboratoriais da Criptococose em Pacientes Admitidos em Pronto Socorro Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Referência Terciária do Sistema Unico de Saúde: Análise Retrospectiva desde 2000 a 2013. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28 e-1932, 2000. DOI.

<http://www.dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20180073>. Disponível em:
<http://www.rmmg.org/artigo/detalhes/2396>. Acesso em: 10 fev. 2022.

GUERRERO, M. M. **Mira caça**. Lisboa :Edições Vieira da Silva, 2019.

HAAG-WACKERNAGEL, D. **Die Taube. Vom heiligen Vogel der Liebesgöttin zur Strassentaube**. Basileia: Schwabe & Co. AG, 1998.

HAAG-WACKERNAGEL, D.; *et al.* Protecting buildings against feral pigeons. **European journal of wildlife research**, v. 54, n. 4, p. 715–721, 2008. DOI.
<https://doi.org/10.1007/s10344-008-0201-z>. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10344-008-0201-z#citeas>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HAAG-WACKERNAGEL, D. *et al.* Human infestation by pigeon fleas (*Ceratophyllus columbae*) from feral pigeons. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, v. 11, n. 2, p. 343–346, 2004. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15627347/>. Acesso em: 10 fev 2022.

HAGEN, F. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 78, p. 16–48, May 2015. DOI. 10.1016/j.fgb.2015.02.009. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25721988/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HONG, N. *et al.* Cryptococcosis in HIV-negative patients with renal dialysis: A retrospective analysis of pooled cases. **Mycopathologia**, v. 182, n. 9, p. 887–896, Jun. 2017. DOI. 10.1007/s11046-017-0163-3. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587633/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HONG N. *et al.* Molecular Markers Reveal Epidemiological Patterns and Evolutionary Histories of the Human Pathogenic *Cryptococcus*. **Cellular and Infection Microbiology**. Vol. 11, article 683670, May 2021. DOI. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.683670>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.683670/full>. Acesso em: 19 fev. 2022.

HONSHO, C. S. *et al.* Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 155–159, Apr. 2003. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000200005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/nGS5GXQyXwxzbpXztVdzNPH/?lang=en>. Acesso em: 10 fev. 2022.

JOHNSON, L. B. *et al.* Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. **Mycoses**. Vol. 41, n. 7-8, p.277-280, Sep 1998. DOI. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00338.x>. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00338.x>. Acesso em: 11 mar. 2022.

KHAWCHAROENPORN, T. *et al.* Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v. 35, n. 2, p. 51–58, Jan. 2007. DOI. 10.1007/s15010-007-6142-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17401707/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

KOMMERS, G. D. Criptococose pulmonar granulomatosa em um equino. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 938–940, Aug. 2005. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000400032>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cr/a/by8m5CwDQXwCgkcCPcMpTKH/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 10 fev. 2022.

KROCKENBERGER, M. B. *et al.* *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by *C. n.* var. *gattii* and investigation of environmental sources. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 263–272, Jun. 2002. DOI.

10.1080/mmy.40.3.263.272. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12146756/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic. **Nature Reviews Microbiology**. Vol. 9, p. 193-203 FEB. 2011. DOI.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2522>. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/nrmicro2522>. Acesso em: 19 fev. 2022.

KONW-CHUNG, K. J. *et al.* Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, n.3, p. 535–537, Mar 1982. DOI.

10.1128/jcm.15.3.535-537.1982. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7042750/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**. v. 2, n. 1, e00357-16, Jan. 2017. DOI.

10.1128/mSphere.00357-16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28101535/>.

Acesso em: 10 fev. 2022.

LARSSON, C. E. *et al.* Canine ocular cryptococcosis: a case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 533–538, Oct. 2003. DOI.

<https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000500004>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/SzkLKfrrtKpYwb4xYc44qbvd/?lang=pt>. Acesso em: 10 fev. 2022.

LAZERA, M. S. *et al.* Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, n. 6, p. 449–454, Nov. 1993. DOI.

<https://doi.org/10.1080/02681219380000581>, Disponível em:

<https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/31/6/449/988679>. Acesso em: 10 fev. 2022.

LEE, S. C. *et al.* Pseudohyphal growth of *Cryptococcus neoformans* is a reversible dimorphic transition in response to ammonium that requires Amt1 and Amt2 ammonium permeases. **American Society for Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 1391–1398, Nov. 2012.

DOI. 10.1128/EC.00242-12, Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23002105/>.

Acesso em: 25 abr. 2022.

LIU, Y. *et al.* *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. **Medical mycology case reports**, v. 3, p. 8–10, Jan 2014. DOI.

10.1016/j.mmcr.2013.11.002. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3930956/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

- LIU, X.-Z. *et al.* Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in mycology**, v. 81, n. 1, p. 85–147, Jun. 2015. DOI. 10.1016/j.simyco.2015.12.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26955199/>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- MALIK, R. *et al.* Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 35, n. 1, p. 27–31, Jan. 1997. DOI. <https://doi.org/10.1080/02681219780000831>. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/35/1/27/948531>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- MALIK, R. *et al.* Avian cryptococcosis. **Medical mycology**, v. 41, n. 2, p. 115–124, Apr. 2003. DOI. 10.1080/mmy.41.2.115.124. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12964843/>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- MARCASSO, R. A. *et al.* Criptococose no sistema nervoso de cães - relato de três casos. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 229 - 238, Abr. 2005. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744076014>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- MARQUES, S. A. *et al.* Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients. **International Journal of Dermatology**, Vol. 51, n. 7, p. 780-784, Jul 2012. DOI. 10.1111/J.1365-4632.2011.05298.X. Disponível em: <https://oce-ovid.ez27.periodicos.capes.gov.br/article/00004342-201207000-00004/HTML>. Acesso em: 02 mar. 2022.
- MARTINS, F. B. *et al.* Classificação climática de köppen e de Thornthwaite para minas gerais: cenário atual e projeções futuras. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 1, p. 129 – 156, Nov. 2018. DOI. <http://dx.doi.org/10.5380/abclima.v1i0.60896>. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/revistaabclima/article/view/60896>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- MARTINS, L. M. S. *et al.* Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725–730, Sep. 2011. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600012>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/bYXt6NFVCKfrJrcSV6NQzXh/?lang=en>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- MENDES, L. L. **Isolamento e identificação de fungos a partir de amostras biológicas de morcegos da cidade de SINOP-MT**. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, 2018. Disponível em: <https://ri.ufmt.br/handle/1/3053>. Acesso em: 11 fev. 2022
- MEYER, W. *et al.* Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2274–2280, Sep.1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265746/>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- MEYER, W. *et al.* Consensus multi locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 6, p. 561–570, 2009. DOI.

10.1080/13693780902953886. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19462334/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

MEZZARI, A. *et al.* Presença do *Cryptococcus* spp. nas excretas de pombos nos arredores de Hospitais de Porto Alegre. **Revista Panamericana de Infectologia**. Vol. 16, n. 3, p. 153-160, Aug. 2014. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/15494/5/Artigo%20-%20Adelina%20Mezzari%20-%202014.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2022.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *Jornal Vascular Brasileiro*. Vol 10, n. 4, p. 275-278, Dez. 2011. DOI. <https://doi.org/10.1590/S1677-54492011000400001>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvb/a/Dxg84WBMPnNrVcpKMXyVfHd/?lang=pt#>. Acesso em: 10 mar. 2022

MOLINA-LEYVA, *et al.* Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. **International Journal of Infectious Diseases**. Vol. 17, n. 12, e1232-3, Dec. 2013. DOI. 10.1016/j.ijid.2013.04.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23791224/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

MONTOYA, M.C. *et al.* Associations between *Cryptococcus* Genotypes, Phenotypes, and Clinical Parameters of Human Disease: A Review. **Journal of Fungi**. Vol. 7, n. 4, p. 260. Mar 2021. DOI. <https://doi.org/10.3390/jof7040260>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article/97/7/fiab093/6312494?login=false>. Acesso em: 19 fev 2022

MORALES-LÓPEZ, S. E.; GARCIA-EFFRON, G. Infections due to rare *Cryptococcus* Species. A Literature Review. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 4, p. 279, Apr. 2021. DOI. 10.3390/jof7040279. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8067992/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

MORETTI, M. L. *et al.* Consenso em Criptococose – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524 – 544, Sep. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/K7mvNM3kj3Mnymt5FTqBkRp/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 fev. 2022.

NCCLS/CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada - 2ªed. Tradução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2.pdf. Acesso em: 08 mar. 2022.

NUNES, S. G. **Saleiros automáticos para bovinos**. 2ª Ed. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998.

NUNES, V.; DE, F. P. Pombos urbanos: o desafio de controle. In: *Palestra*, 2003, São Paulo. **Anais e palestras...** São Paulo: Instituto Biológico, 2003. v.65, n.1/2, p.89-92. Disponível

em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v65_1_2/nunes.pdf. Acesso em: 11 fev. 2022.

OLIVEIRA, E. P. **Criptococose : determinação do perfil clínico-demográfico de pacientes com AIDS atendidos em unidades de saúde pública de Pernambuco**. 120f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/42007/1/TESE%20Ert%c3%aania%20Paiva%20Oliveira.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2022.

OLIVEIRA, A. S. DE. **Criptococose: padrões de mortalidade no Brasil e morbimortalidade em hospital de referência do Ceará**. 78f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Departamento de saúde comunitária, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/35195/2/2018_dis_asoliveira.pdf. Acesso em: 11 fev. 2022.

OLIVEIRA, L. S. DE S. *et al.* Comparison of *Cryptococcus gattii/neoformans* species complex to related genera (*Papiliotrema* and *Naganishia*) reveal variances in virulence associated factors and antifungal susceptibility. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 642658, 2021. DOI. 10.3389/fcimb.2021.642658. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34277464/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

PADILLA, A. A. A. **Impacto da deleção de *GPP2* sobre o processo de autofagia em *Cryptococcus neoformans***. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/62115/DISSERTA%c3%87AO%20V.F%20P%c3%93S-DEFESA%2023-10-21%20PDF-A.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 25 abr. 2022.

PASSONI, L. F. *et al.* *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Medical mycology**, v. 36, n. 5, p. 305–311, Oct. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10075500/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

PEDROSO, R. DOS S. *et al.* Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 566–568, Oct. 2007. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000500014>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/dspBQPQVkdHp76bSpGZPwhH/?lang=pt>. Acesso em: 10 fev. 2022.

PEDROSO, R. D. S. **Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de *Cryptococcus*, antes e após inoculação em modelo murinho**. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-18082008-133009/publico/Tese.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2022.

PEREIRA, J. R. *et al.* *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* isolados de excretas de aves comercializadas em lojas de animais no município do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 1, p. 90–94, Jan. 2014. Disponível em: <https://docplayer.com.br/50733021-Cryptococcus-neoformans-e-c-gattii-isolados-de-excretas-de-aves-comercializadas-em-lojas-de-animais-do-municipio-do-rio-de-janeiro-rj.html>. Acesso em: 11 fev. 2022.

PERFECT, J. R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, Feb. 2010. DOI. 10.1086/649858. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20047480/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

POSTERARO, B. *et al.* Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. **Molecular microbiology**, v. 47, n. 2, p. 357–371, Jan. 2003. DOI. 10.1046/j.1365-2958.2003.03281.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12519188/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

QUEIROZ, J. P. A. F. *et al.* CRIPTOCOCOSE - uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 32–38, Mar. 2008. DOI. <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.2.699>. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/699>. Acesso em: 10 fev. 2022.

RASO, T. F. *et al.* Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Medical mycology**, v. 42, n. 4, p. 355–362, Aug. 2004. DOI. <https://doi.org/10.1080/13693780410001712061>. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/42/4/355/1053107>. Acesso em: 10 fev. 2022.

REOLON, A. *et al.* Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 293–298, Out. 2004. DOI. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442004000500003>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/t7qgxQJcvpSxtpxtRdCvhTH/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 10 fev. 2022.

ROCHA, D. F. S.; FREIRE, A. K. L. Caracterização dos grupos moleculares de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus spp.* e a correlação na resistência ao fluconazol. In: III Congresso de Iniciação Científica do INPA – CONIC, 3., 2014, Manaus. **Anais...** Manaus: Fundação e Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas FAPEAM, 2014. p. 392–395. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/4822/1/pibic_inpa.pdf. Acesso em: 11 fev. 2022.

SANCHES, C. E. M. *et al.* Um Caso de Criptococose Cutânea Primária. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 76, n. 2, p. 181–184, Apr. 2018. DOI. <https://dx.doi.org/10.29021/spdv.76.2.849>. Disponível em: <https://revista.spdv.com.pt/index.php/spdv/article/view/849>. Acesso em: 10 fev. 2022.

SANTOS, M. S. *et al.* Ocorrência de *cryptococcus neoformans* em excretas dos pombos da cidade de Guaraí/TO. **Health of Humans**, v. 1, n. 2, p. 1–7, May 2020. DOI. <https://doi.org/10.6008/CBPC2674-6506.2019.002.0001>. Disponível em:

<https://www.sapientiae.com.br/index.php/healthofhumans/article/view/CBPC2674-6506.2019.002.0001>. Acesso em: 10 fev. 2022.

SEVERO, C. *et al.* *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. v. 35, n. 11. Brasília: Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2009. Curso de Atualização – Micoses 12, Cap 3. DOI. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001100012>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/sg46wsJ4G8wvBHZQf7rR5td/abstract/?lang=pt#>. Acesso em 10 fev 2022.

SILVA, F. A. DA. **Genética populacional e epidemiologia molecular de isolados brasileiros clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans***. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/49274/2/000247675.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2022.

SILVA, L. C. S. DA. **Anatomia das aves silvestres e selvagens**. São Paulo (apostila) Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/download/ANATOMIA/Apostila.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2022.

SILVA, P. R. DA *et al.* Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 158–162, Mar. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/FvmxrWdBtmd9GZxSG9GbZMQ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 10 fev. 2022

SILVA, J. O.; DIVANI, M.C. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nas excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. RIALA6/1166. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 137–141, 2008. Disponível em: [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-do-instituto-adolfo-lutz/67-\(2008\)-2/ocorrencia-de-cryptococcus-spp-e-de-parasitas-de-interesse-em-saude-pu/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-do-instituto-adolfo-lutz/67-(2008)-2/ocorrencia-de-cryptococcus-spp-e-de-parasitas-de-interesse-em-saude-pu/). Acesso em: 10 fev. 2022.

SILVA, S. *et al.* Criptococose em Ovino - Relato de Caso. In: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 8., 2009, Goiás; Ciência animal brasileira, 1., 2009, Goiás. **Anais...** Goiás: UFG, 2009. v. 1, p. 707–713. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/7888/5727>. Acesso em: 10 fev. 2022

SIMÕES, V. C. R. **Infecções pós transplantes: fúngicas, virais, bacterianas**. 19f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2017. Disponível em: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/235/11722/1/21486785.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2022.

SOUZA, N. P. DE *et al.* Avaliação de *Cryptococcus Neoformans* em excretas de pombos (*Columba livia*) no perímetro urbano do município de Ji-Paraná, Rondônia, Brasil. **Revista Saúde (Santa Maria)**, v. 44, n. 3, Set. 2019. DOI. <https://doi.org/10.5902/2236583431790>. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/revistasaude/article/view/31790>. Acesso em: 10 fev. 2022.

SOUZA, J. A. M. DE O. **Variabilidade genética de *Cryptococcus* ambientais na cidade do Salvador – BA**. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade federal da Bahia, Salvador, 2013. Disponível em: https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/15136/1/Disserta%c3%a7%c3%a3o_ICS_%20Jo%c3%a3o%20Ant%c3%b4nio%20Miranda%20%20Souza.pdf. Acesso em: 11 fev. 2022.

SOUZA, R. G.; SOUSA, C. M. Incidência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos (*Columba livia*) na área central da cidade de Porto Velho, RO. **Revista Saber Científico**, v. 7, n. 1, p. 13–22, 2018. DOI. <http://dx.doi.org/10.22614/resc-v7-n1-794>. Disponível em: <http://revista.saolucas.edu.br/index.php/resc/article/view/794>. Acesso em: 10 fev. 2022

SYAKALIMA, M. *et al.* Opportunistic pathogenic fungi isolated from feces of feral pigeons in Mafikeng, North West Province of South Africa. **Veterinary world**, v. 12, n. 7, p. 1066–1069, Jul. 2019. DOI. 10.14202/vetworld.2019.1066-1069. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6702576/>. Acesso em: fev. 2022.

TENCATE, L. N. *et al.* Study of gastrointestinal fungal flora of bats (Mammalia, Chiroptera) of the northwest region of São Paulo state: zoonotic potential. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 2, p. 146–152, 2012. DOI. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v49i2p146-152>. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/40271>. Acesso em: 10 fev. 2022.

THYAGARAJAN, R. V. *et al.* *Cryptococcus neoformans* blood stream infection in severe COVID-19 pneumonia. **IDCases**. Vol. 26, n. e01274, 2021. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01274>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214250921002304>. Acesso em: 19 fev. 2022.

TREVIJANO-CONTADOR, N. *et al.* *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. **Plos pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007007, May 2018. DOI. 10.1371/journal.ppat.1007007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5959073/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

TRILLES, L. *et al.* Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical mycology**, v. 41, n. 5, p. 383–390, Oct. 2003. DOI. 10.1080/1369378031000137206. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14653514/>. Acesso em: 2022

TRILLES, L. *et al.* Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, Aug. 2008. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000500008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/jbLf3CgBd4bv6ngvMQHksHQ/?lang=en>. Acesso em: 10 fev. 2022.

YU, C. *et al.* Gene Expression of Diverse *Cryptococcus* Isolates during Infection of the Human Central Nervous System. **American Society for Microbiology**. Vol. 12, n. 6, e02313-21, Nov 2021. DOI. <https://doi.org/10.1128/mBio.02313-21>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.02313-21>. Acesso em: 19 fev. 2020.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**. Vol. 10, n. 1, p. 490-501, May 2019. DOI. 10.1080/21505594.2019.1614383. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6550552/>. Acesso em: 25 abr. 2022.

ZAVALA, S; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. Vol. 41, n. 1, p. 69-79, Feb 2020. DOI. 10.1055/s-0039-3400280. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32000285/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Tabela de leveduras identificadas não pertencentes aos gêneros de interesse.

Código do Isolado	ID Coleção	Fonte de isolamento	Identidade	Gaps	Genbank match	Espécies
99	ARH75	Árvores	477/483(99%)	0/483(0%)	KY106274.1	<i>Candida akabanensis</i>
14	SDH21	Solo/detritos	477/477(100%)	0/477(0%)	CP025182.1	<i>Candida albicans</i>
88	SDH40	Solo/detritos	462/462(100%)	0/462(0%)	KY106531.1	<i>Candida jaroonii</i>
294	ARH77	Árvores	189/193(98%)	4/193(2%)	MK394126.1	<i>Candida orthopsilosis</i>
277	EXH23	Excretas	442/442(100%)	0/442(0%)	MH545914.1	<i>Candida parapsilosis</i>
349	SDH61	Solo/detritos	389/389(100%)	0/389(0%)	OL514170.1	<i>Candida parapsilosis</i>
125	ARH14	Árvores	481/481(100%)	0/481(0%)	MT543182.1	<i>Candida tropicalis</i>
231	EXH28	Excretas	480/480(100%)	0/480(0%)	MH545915.1	<i>Candida tropicalis</i>
243	EXH93	Excretas	317/317(100%)	0/317(0%)	KY106936.1	<i>Clavispora lusitaniae</i>
297	EXH35	Excretas	169/170(99%)	0/170(0%)	MH545926.1	<i>Clavispora lusitaniae</i>
350	EXH91	Excretas	401/401(100%)	0/401(0%)	KY106934.1	<i>Clavispora lusitaniae</i>
278	ARH70	Árvores	512/512(100%)	0/512(0%)	KY107321.1	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
175	SDH6	Solo/detritos	446/446(100%)	0/446(0%)	LC496533.1	<i>Cystobasidium</i> sp.
95	SDH5	Solo/detritos	484/484(100%)	0/484(0%)	KJ705003.1	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
130	SDH74	Solo/detritos	349/349(100%)	0/349(0%)	MK394156.1	<i>Diutina catenulata</i>
285	SDH69	Solo/detritos	259/259(100%)	0/259(0%)	MK394156.1	<i>Diutina catenulata</i>
66	EXH89	Excretas	460/460(100%)	0/460(0%)	MH878059.1	<i>Exophiala dermatitidis</i>
132	EXH27	Excretas	515/516(99%)	1/516(0%)	FJ873559.1	<i>Hanseniaspora</i> sp.
60	ARH60	Árvores	372/372(100%)	0/372(0%)	MN371991.1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
120	ARH27	Árvores	435/435(100%)	0/435(0%)	KY106503.1	<i>Hyphopichia homilentoma</i>

Continua

Continuação

127	EXH32	Excretas	444/444(100%)	0/444(0%)	KY107906.1	<i>Kazachstania bovina</i>
116	EXH7	Excretas	483/485(99%)	0/485(0%)	MH545919.1	<i>Meyerozyma caribbica</i>
200	EXH11	Excretas	485/485(100%)	0/485(0%)	MH545919.1	<i>Meyerozyma caribbica</i>
101	SDH47	Solo/detritos	419/419(100%)	0/419(0%)	NG_069408.1	<i>Meyerozyma carpophila</i>
119	EXH2	Excretas	436/436(100%)	0/436(0%)	NG_069408.1	<i>Meyerozyma carpophila</i>
92	SDH39	Solo/detritos	355/355(100%)	0/355(0%)	MK110232.1	<i>Meyerozyma sp.</i>
140	EXH74	Excretas	551/551(100%)	0/551(0%)	MK110232.1	<i>Meyerozyma sp.</i>
300	SDH52	Solo/detritos	306/307(99%)	1/307(0%)	MK394165.1	<i>Pichia kluyveri</i>
161	EXH37	Excretas	440/440(100%)	0/440(0%)	MH545928.1	<i>Pichia kudriavzevii</i>
168	SDH5	Solo/detritos	436/436(100%)	0/436(0%)	MH545928.1	<i>Pichia kudriavzevii</i>
156	SDH5	Solo/detritos	475/479(99%)	0/479(0%)	NG_067794.1	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
157	SDH5	Solo/detritos	454/454(100%)	0/454(0%)	MN901718.1	<i>Symptodiomyces sp.</i>
108	SDH66	Solo/detritos	485/486(99%)	0/486(0%)	KY109860.1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
301	SDH67	Solo/detritos	423/423(100%)	0/423(0%)	MK394138.1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
59	ARH15	Árvores	481/484(99%)	0/484(0%)	NG_055057.1	<i>Torulaspora pretoriensis</i>
122	EXH14	Excretas	485/485(100%)	0/485(0%)	MN371940.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
229	EXH43	Excretas	480/480(100%)	0/480(0%)	MH545921.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>

As leveduras serão trabalhadas posteriormente, não puderam ser incluídas em decorrência do pouco tempo de projeto.

Fonte: Elaborado pela autora

APÊNDICE 2

Origem das leveduras identificadas não pertencentes aos gêneros de interesse.

Código do Isolado	ID Coleção	Fonte de isolamento	Espécies	Local de Coleta
99	ARH75	Árvores	<i>Candida akabanensis</i>	H. Eduardo de Menezes
14	SDH21	Solo/detritos	<i>Candida albicans</i>	H. Evangélico
88	SDH40	Solo/detritos	<i>Candida jaroonii</i>	H. Paulo de Tarso
294	ARH77	Árvores	<i>Candida orthopsilosis</i>	H. Eduardo de Menezes
277	EXH23	Excretas	<i>Candida parapsilosis</i>	H. Evangélico
349	SDH61	Solo/detritos	<i>Candida parapsilosis</i>	Santa Casa
125	ARH14	Árvores	<i>Candida tropicalis</i>	H. Risoleta Neves
231	EXH28	Excretas	<i>Candida tropicalis</i>	H. Evangélico
243	EXH93	Excretas	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Santa Casa
297	EXH35	Excretas	<i>Clavispora lusitaniae</i>	H. Evangélico
350	EXH91	Excretas	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Santa Casa
278	ARH70	Árvores	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>	H. Eduardo de Menezes
175	SDH6	Solo/detritos	<i>Cystobasidium</i> sp.	H. Risoleta Neves
95	SDH5	Solo/detritos	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	H. Risoleta Neves
130	SDH74	Solo/detritos	<i>Diutina catenulata</i>	Santa Casa
285	SDH69	Solo/detritos	<i>Diutina catenulata</i>	Santa Casa
66	EXH89	Excretas	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Santa Casa
132	EXH27	Excretas	<i>Hanseniaspora</i> sp.	H. Evangélico
60	ARH60	Árvores	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	H. Paulo de Tarso
120	ARH27	Árvores	<i>Hyphopichia homilentoma</i>	H. Evangélico
127	EXH32	Excretas	<i>Kazachstania bovina</i>	H. Evangélico
116	EXH7	Excretas	<i>Meyerozyma caribbica</i>	H. Risoleta Neves
200	EXH11	Excretas	<i>Meyerozyma caribbica</i>	H. Risoleta Neves

Continua

Continuação

101	SDH47	Solo/detritos	<i>Meyerozyma carpophila</i>	H. Eduardo de Menezes
119	EXH2	Excretas	<i>Meyerozyma carpophila</i>	H. Risoleta Neves
92	SDH39	Solo/detritos	<i>Meyerozyma sp.</i>	H. Paulo de Tarso
140	EXH74	Excretas	<i>Meyerozyma sp.</i>	H. Eduardo de Menezes
300	SDH52	Solo/detritos	<i>Pichia kluyveri</i>	H. Eduardo de Menezes
161	EXH37	Excretas	<i>Pichia kudriavzevii</i>	H. Evangélico
168	SDH5	Solo/detritos	<i>Pichia kudriavzevii</i>	H. Risoleta Neves
156	SDH5	Solo/detritos	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	H. Risoleta Neves
157	SDH5	Solo/detritos	<i>Sympodiomyces sp.</i>	H. Risoleta Neves
108	SDH66	Solo/detritos	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Santa Casa
301	SDH67	Solo/detritos	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Santa Casa
59	ARH15	Árvores	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	H. Risoleta Neves
122	EXH14	Excretas	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	H. Risoleta Neves
229	EXH43	Excretas	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	H. Paulo de Tarso

Fonte: Elaborado pela autora

APÊNDICE 3

Detalhamento das amostras de interesse com seus resultados individuais e somatório dos testes positivos

Código do Isolado	Espécies	Termotolerância			Melanização		Urease 31°C	Catalase 31°C	Prot. 28°C	Fosf. 37°C	Total de (+)
		37°C	40°C	50°C	37°C	40°C					
3	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
91	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+	+	-	+	+	**	+	-	-	5
113	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-	-	-	*	*	+	+	-	-	2
188	<i>Kwoniella heveanensis</i>	-	-	-	*	*	+	+	-	-	2
204	<i>Kwoniella heveanensis</i>	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
253	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	4
286	<i>Kwoniella heveanensis</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
41	<i>Naganishia</i> sp.	+	+	-	-	-	+	+	-	-	4
199	<i>Naganishia</i> sp.	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
162	<i>Naganishia albida</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
163	<i>Naganishia albida</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
201	<i>Naganishia albida</i>	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
356	<i>Naganishia albida</i>	-	-	-	*	*	+	+	-	-	2
111	<i>Naganishia cerealis</i>	+	+	-	*	*	+	+	-	-	4
9	<i>Naganishia diffluens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	4
45	<i>Naganishia diffluens</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
65	<i>Papiliotrema</i> sp.	+	+	-	-	-	**	+	-	-	3
144	<i>Papiliotrema</i> sp.	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
203	<i>Papiliotrema</i> sp.	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
351	<i>Papiliotrema flavescens</i>	-	-	-	*	*	+	+	-	-	2
359	<i>Papiliotrema flavescens</i>	-	-	-	*	*	+	+	-	-	2
1	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7

Continua

Continuação

2	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	-	+	**	+	-	-	4
2	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
19	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
21	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
25	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
2	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	*	+	+	+	+	-	6
131	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
135	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
148	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
167	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	-	-	*	*	+	+	+	-	4
187	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	-	-	-	*	+	+	+	-	4
236	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
267	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-	-	-	*	*	+	+	-	-	2
355	<i>Papiliotrema laurentii</i>	-	+	-	*	*	+	+	+	-	4
357	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	-	-	*	*	+	+	+	-	4
360	<i>Papiliotrema laurentii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	7
142	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
6	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	+	-	-	-	**	+	-	-	3
15	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	5
42	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
43	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
64	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-	*	*	+	+	+	-	4
139	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	+	-	*	*	+	+	-	-	4
145	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-	*	*	+	+	+	-	4
182	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-	*	*	+	+	+	-	4
216	<i>Papiliotrema terrestris</i>	+	-	-	*	*	+	+	-	-	3
354	<i>Papiliotrema terrestris</i>	-	-	-	*	*	+	+	+	-	3
Totais (+)	-	38	21	0	12	14	42	46	19	0	192

Testes positivos (+); Testes negativos (-); Meio sem crescimento durante o teste (*); Resultado oposto ao esperado no teste {acidificação do meio em ágar ureia} (**); Leveduras que não apresentaram viabilidade após descongelamento. (S/C)

Fonte: Elaborado pela autora

ANEXOS

ANEXO 1

Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais da UFMG - CEUA/UFMG (Projeto piloto)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 361/2018
Título do projeto: Estudo da população de pombos (Columba livia) da Escola de Veterinária da UFMG com foco na avaliação de riscos ambientais e sanitários
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Graciela Kunrath Lima
Unidade: Escola de Veterinária
Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 03/12/2018. Validade: 03/12/2018 à 02/12/2023

Belo Horizonte, 03/12/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2

Aprovação pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (Projeto piloto)



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 66535-2	Data da Emissão: 07/02/2019 10:13:07	Data da Revalidação*: 07/02/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Graciela Kunrath Lima	CPF: 064.674.226-43
Nome da Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais	CNPJ: 17.217.985/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Teste dos métodos de manejo e controle de pombos	02/2019	07/2019
2	Análise dos dados e elaboração de relatório, artigo e/ou TCC	08/2019	03/2020
3	Processamento e análise do material coletado	01/2019	07/2019
4	Captura, anilhamento e coleta de materiais das aves	01/2019	03/2019
5	Obtenção de autorização da CEUA e SISBIO	11/2018	01/2019

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Alexandra Tiso Cumerlato	Veterinária - Captura e coleta de material das aves	010.102.480-06	Brasileira
2	Amanda Cristina Araújo	Estudante de Biologia - Captura e coleta de material das aves	103.934.686-31	Brasileira


Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0665350220190207

Página 1/4

ANEXO 3

Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais da UFMG - CEUA/UFMG (Projeto de mestrado inicial)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 27/2021
Título do projeto: Isolamento e identificação de *Cryptococcus* spp. a partir de amostras ambientais e biológicas de pombos (*Columba livia*) da cidade de Belo Horizonte.
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Susana Johann
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado com Recomendação na reunião extraordinária emergencial on-line do dia 26/04/2021. Validade: 26/04/2021 à 25/04/2026
RECOMENDAÇÃO: De acordo com as diretrizes práticas do CONCEA, na impossibilidade de uso de sobredose anestésica para eutanásia, recomenda-se como métodos alternativos o uso de anestésicos inalatórios seguidos, quando necessário, de outros métodos que assegure a morte do animal como a exsanguinação. A câmara de CO2 é aceita com restrição e, quando utilizada, deve ser seguida de exsanguinação ou outro método que assegure a morte do animal.
Belo Horizonte, 26/04/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 4

Aprovação da Secretaria Municipal de Meio Ambiente - SMMA (Projeto de mestrado inicial)

 **PREFEITURA
BELO HORIZONTE**
GAB-SMMA/EXTER/N°0616/2021

Secretaria Municipal de Meio Ambiente

Belo Horizonte, 31 de março de 2021.

Assunto: Solicitação de autorização para coleta de material biológico em projeto de pesquisa

Prezada Senhora,

Considerando a análise do projeto: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptococcus* spp. A PARTIR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS DE POMBOS (*Columba livia*) DA CIDADE DE BELOHORIZONTE, e sua relevância para a saúde pública,

Considerando a aprovação do mesmo pelo Comitê de Ética em Experimentação da Universidade Federal de Minas Gerais,

Considerando a regularidade do projeto junto ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como comprometimento de executar as atividades autorizadas ou licenciadas em estrita observância à legislação vigente, sobretudo à Instrução Normativa ICMBio no 03/2014, publicada no D.O.U. de 02/09/2014,

Considera-se autorizada, por 24 meses a partir desta data, a coleta de material biológico de acordo com as determinações do projeto.

Leonardo Maciel - BM: 115.193-C
Coordenador de Defesa dos Animais
COAN / SMMA


Gerência de Defesa dos Animais
Secretaria Municipal de Meio Ambiente
Leonardo Maciel Andrade

ANEXO 5

Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SISGEN (Projeto atual)



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A4A790E

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A4A790E**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Cryptococcus neoformans

Título da Atividade: **ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE Cryptococcus spp. A PARTIR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS DE POMBOS (Columba livia) DA CIDADE DE BELO HORIZONTE E REGIÃO METROPOLITANA**

Equipe

Susana Johann **Universidade Federal de Minas Gerais**
Amanda Cristina Araujo **Universidade Federal de Minas Gerais**

Data do Cadastro: **09/12/2020 17:14:50**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:15 de 09/12/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - SISGEN