



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

ALINE SILVA FERREIRA

PROSPECÇÃO DE FONTES AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN e *Cryptococcus gattii* (VANBREUS. & TAKASHIO) KWON-CHUNG & BOEKHOUT EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARÁ.

Belém-Pará

2017

ALINE SILVA FERREIRA

PROSPECÇÃO DE FONTES AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN e *Cryptococcus gattii* (VANBREUS. & TAKASHIO) KWON-CHUNG & BOEKHOUT EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Solange do Perpétuo Socorro Evangelista Costa

Belém-Pará

2017

ALINE SILVA FERREIRA

RPOSPECÇÃO DE FONTES AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN e *Cryptococcus gattii* (VANBREUS. & TAKASHIO) KWON-CHUNG & BOEKHOUT EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. SOLANGE DO PERPÉTUO SOCORRO EVANGELISTA COSTA -ICB – UFPA (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. KARLA TEREZA SILVA RIBEIRO- ICB-UFPA

Prof. Dr. ANTONIO HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ - ICB-UFPA

Belém-Pará

2017

*"Nada existe tão alto que o homem, com
força de vontade, não possa apoiar a sua
escada."* Friedrich Schiller

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me guiar em todas as minhas decisões. O trabalho também é dedicado aos meus pais e em memória ao meu avô Raimundo Edmir (pai Camurin), que onde quer que esteja, deve estar muito feliz e orgulhoso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado forças e sabedoria durante toda esta caminhada.

À minha mãe Ligia Silva e ao meu pai Ronaldo Ferreira por todo apoio e dedicação. Obrigada por tudo que fizeram por mim, mesmo diante das dificuldades. Vocês são os alicerces da minha vida. Amo vocês mais do que tudo.

À minha tia Odaleia Costa, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pelos conselhos e pelo apoio incondicional. A senhora me ensinou que a família é o bem mais precioso que temos. Obrigada minha tia, te amo.

Aos meus avós, Maria Olinda e meu eterno pai Camurin (Raimundo Edmir), por nunca terem me abandonado nos piores momentos que passei, pela preocupação e orgulho que sempre demonstraram sentir por mim. Do meu avô/pai tenho as melhores lembranças.

Aos meus irmãos Amanda Mascarenhas e Ronaldo Filho. Amo vocês! Obrigada pelo apoio, companheirismo e amizade incondicional, e por terem me dado sobrinhos lindos e maravilhosos, Cesar Augusto e Cristiano Ronaldo, os príncipes da titia.

Aos meus cunhados Neto Mascarenhas e Renata Santos. Juntamente com meus irmãos, vocês foram muito importantes para mim nessa caminhada. Obrigada por todo carinho e toda ajuda que sempre me deram. Sou muito feliz por tê-los em minha família.

Tia Lidiane Silva, tio Ronilson Costa, primos e primas. Amo cada um de um modo especial. Obrigada por tudo!

À minha amiga Yasmin Moraes, umas das pessoas mais importantes na minha decisão de mudar de curso, trocar de cidade. Seus conselhos, amiga, hoje geraram frutos. Gratidão por tudo. Te amo, e amo a sua família que sempre me receberam de portas abertas, mesmo levando um monte de coisas para fazer coletas. Muito obrigada!

Aos meus amigos que conquistei ao logo da graduação, Higo Andrade, Vanessa Brito, Ana Carolina Serra, Camily Erica e Jackson Rodrigues, as “gordianes”, por terem tornado esses quatro anos inesquecíveis. Pessoas que quero levar pra vida toda!

Aos meus amigos de Marabá, Leticia Miranda, lasminne Lemos, Leonnam Massias, Carlos Telles e Gustavo Sales, que me apoiaram, ajudaram, me aconselharam, estiveram ao meu lado em todos os momentos.

À Prof.^a Dr.^a Solange do Perpétuo Socorro Evangelista Costa, agradeço pela orientação, confiança, incentivo e oportunidade de realizar este trabalho. Nestes dois anos que me deste a oportunidade de estagiar no Laboratório de Micologia, o aprendizado foi grande, refletiu no profissional e pessoal. Muito obrigada por tudo!

Amigos do LAMIC, em especial a Od Lucia Rodrigues e Seu Domingos, pela paciência, principalmente no final deste trabalho, além disso, obrigada pelos ensinamentos e conhecimentos que me passaram no decorrer desses dois anos. Caio Gustavo, Rafael Chaves, Juliana Gomes e a Luana Souza. Obrigada a todos pelas risadas e amizade.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) que foram minha segunda casa durante esses quatro anos.

Ao PROINT, pelo incentivo financeiro proporcionando o início deste trabalho.

A todos os professores do curso, que foram muito importantes na minha vida acadêmica.

E a todos aqueles que por ventura não foram citados aqui, mas que contribuíram para este sonho.

Muito Obrigada!!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HISTÓRICO	1
1.2. OS AGENTES: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E TAXONOMIA	3
1.3. EPIDEMIOLOGIA E ECOLOGIA DOS AGENTES	4
1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA	7
1.4.1. Cápsula	8
1.4.2. Melanina	8
1.4.3. Capacidade de crescimento a 37°C (Termotolerância)	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. GERAL	11
2.2. ESPECÍFICOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. ÁREAS DE ESTUDO	12
3.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	13
3.4. ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS	15
3.5. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	16
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÕES	25
7. REFERÊNCIAS:	26

RESUMO

O complexo *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans*, inclui os principais agentes da criptococose. Estas espécies são leveduras capsuladas com marcado neurotropismo, sendo os principais responsáveis por meningoencefalite fúngica. *Cryptococcus neoformans* é predominantemente oportunista e tem seu habitat relacionado com excretas de aves, enquanto *C. gattii* se comporta predominantemente como patógeno primário e associado a ocos vegetais. A infecção ocorre por inalação de leveduras ressecadas e/ou basidiosporos, presentes no ambiente. Objetivando investigar possíveis fontes ambientais destes agentes, foram realizadas coletas de material de origem vegetal e excretas nos municípios de Marabá, Cametá, Igarapé-Açu e os distritos de Outeiro (Belém) e Beja (Abaetetuba), localizados no estado do Pará, Brasil. Em laboratório as amostras foram processadas e semeadas em meio indicativo, Ágar níger. As colônias fenoxidase positivas foram subcultivadas em ágar Sabouraud com antibiótico para estudo micromorfológico e diferenciação das espécies através do teste de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Das 57 amostras analisadas uma amostra de oco vegetal foi positiva para *C. neoformans* e *C. gattii*. Estes achados representam o primeiro registro ambiental dos agentes da criptococose para a cidade de Marabá, sugerindo-se que novas investigações devem ser realizadas buscando-se ampliar o conhecimento das fontes naturais destes importantes patógenos na região Amazônica.

Palavras chaves: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, fontes sapróbias, Pará

1. INTRODUÇÃO

Fungos são organismos eucariontes, unicelulares e multicelulares, com nutrição absorptiva e capacidade enzimática que lhes permite colonizar os mais diferentes tipos de substratos. Estão amplamente distribuídos na natureza, vivendo como sapróbios, parasitas, predadores ou em associação com outros seres vivos. Como sapróbios têm grande importância como os principais decompositores e recicladores da matéria orgânica, incluindo a degradação da celulose e madeira através de um sistema especializado único dos fungos (Deacon, 2006). Como parasitas causam danos em animais, vegetais, protozoários, fitoplâncton entre outros.

Estima-se que exista aproximadamente 1,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos (Hawksworth, 1991; O'Brien, 2005) das quais cerca de 100.000 espécies estão descritas (Hawksworth, 2004). Destas, aproximadamente 270 espécies têm sido reportadas como patógenos para humanos (Perfect, 2006), apresentando-se como **agentes primários** (capazes de causar infecções em indivíduos aparentemente saudáveis) ou **oportunistas**, que acometem hospedeiros imunocomprometidos.

1.1. HISTÓRICO

O gênero *Cryptococcus* tem sua origem na palavra grega *kryptos*, que significa “escondido”, “secreto”, “misterioso”, “obscuro”, e foi criado em 1833 por Kutzing (Heitman et al., 2011).

O primeiro isolamento de *Cryptococcus* ocorreu em 1894, na Itália, pelo médico e cientista Francesco Sanfelice, que estudou as leveduras que cresciam em variedade de sucos de frutas, onde a partir do isolamento em suco fermentado de pêssago, foi possível isolar uma levedura denominada então de *Saccharomyces neoformans*, e posteriormente foi demonstrada sua patogenicidade experimentalmente em cães pelo próprio Sanfelice (Correa & Correa, 1992).

No mesmo ano da descoberta de Sanfelice, Otto Busse e Abraham Buschke descreveram, separadamente, um patógeno removido de uma lesão de sarcoma na tíbia de uma paciente. Busse observou formas parasitárias arredondadas, das quais

obteve um cultivo, identificando o agente como Blastomiceto. Por considerarem o patógeno parecido com o gênero *Saccharomyces*, o organismo foi denominado de *Saccharomyces hominis* (Correa; Correa, 1992).

Em 1884, o micologista francês Jean Paul Vuillemin, por considerar mais adequado, transferiu esta levedura do gênero *Saccharomyces* para o gênero *Cryptococcus*, com a denominação *C. neoformans* (Lacaz, 2002; Lazéra et al., 2000).

Em 1905, Hansemann descreveu o primeiro caso de meningoencefalite, na qual era visualizada a levedura nas lesões císticas gelatinosas presente na doença. Em 1916, após vários casos semelhantes, Stoddard e Cutler denominaram o agente de *Torula histolytica*, o que gerou uma grande confusão taxonômica. Com isso, em 1934 Rhoda Benham e Jacomina Lodder apontaram que muitas dessas leveduras que receberam nomes diferentes (*Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Torula*, *Debaryomyces*), pertenciam à mesma espécie, e em 1950 Behnham recomendou "*Cryptococcus neoformans*" como nome autêntico para os isolados, e criptococose para a micose ocasionada por este agente (Kwon-Chung et al., 1982a; Barnett, 2010).

Entre os anos de 1949 e 1960, houve uma série de artigos publicados que ampliaram os estudos antigênicos realizados inicialmente por Benham. Nesse período três sorotipos foram descritos (A, B e C) com base nas diferenças antigênicas de polissacarídeos capsulares, e 20 anos depois, um quarto sorotipo (D) foi descoberto, evidenciando claramente que *C. neoformans* é taxonomicamente heterogêneo, que até então era considerado uma espécie anamorfa homogênea (Barnett, 2010).

Em 1970, Gattii e Eeckels isolaram uma cepa de *Cryptococcus* proveniente de uma criança de sete anos, com sintomas de meningoencefalite, e a descreveram como sendo uma nova variedade, denominando-a de *C. neoformans* var. *gattii* (Heitman et al., 2011).

1.2. OS AGENTES: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E TAXONOMIA

O gênero *Cryptococcus* inclui cerca de 100 espécies e variedades, das quais *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os principais agentes da criptococose (Mitchell *et al.*, 2011). Em sua forma anamórfica (assexuada) apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, com 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo, com cápsula de mucopolissacarídeos característica, de crescimento colonial de textura mucoide, coloração branca a creme brilhante e margem lisa (Kwon-Chung & Bennett, 1984; Lin & Heitman, 2006).

Em 1975, experimentos de reprodução conduzidos por Kwon-Chung revelaram a fase sexuada ou teleomórfica do fungo (Kwon-Chung, 1975). Através de conjugação de células haploides compatíveis em meios específicos tinha sido observada a formação de basidiosporos que até o momento foi observado apenas *in vivo*. A maioria dos isolados clínicos ou ambientais são haploides ou heterotáticos e poucos são autoférteis. Os *mating types* dos isolados haploides pode ser α ou *a* (**MAT α** e **MATa**) (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Os basidiosporos medem aproximadamente 1,8 a 3 x 2 a 5 µm de diâmetro, são uninucleados, ovalados, elípticos, cilíndricos, piriformes a globosos, com uma parede levemente rugosa. Os basidiosporos são secos e sem cápsula, mas quando são liberados no meio aumentam de tamanho e se multiplicam por brotamento apresentando-se como leveduras capsuladas em poucas horas (Kwon-Chung & Bennett, 1992). A espécie heterotática foi denominada *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung, 1976a). Com base na morfologia dos basidiosporos, foi descrita a espécie *F. bacillispora* (Kwon-Chung, 1976b).

Na forma de levedura ou anamórfica, as espécies são morfologicamente semelhantes, porém na forma sexuada exibem diferenças: os basidiosporos de *F. neoformans* são esféricos, oblongos a elípticos ou cilíndricos, com parede finamente rugosa, enquanto que em *F. bacillispora* são baciliformes e de parede lisa (Casadevall & Perfect, 1998).

Atualmente são reconhecidas duas espécies: *Cryptococcus neoformans* com duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) (Franzot *et al.*, 1999), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D e AD) e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C). *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, referem-se aos seus respectivos

teleomorfos. No entanto, com o avanço dos estudos moleculares, nova proposta está em discussão entre os pesquisadores da área. Em recente estudo detalhado sobre a taxonomia destes fungos, Hagen e colaboradores sustentam que diferentes métodos de genotipagem suportam o novo conceito de pelo menos sete espécies para o complexo *Cryptococcus gattii*/ *C. neoformans*, as quais são descritas no artigo (Hagen et al., 2015).

O desenvolvimento e utilização de numerosas técnicas de genotipagem, resultaram no uso de várias nomenclaturas para diferenciação dos genótipos. De acordo com Meyer & Trilles (2010) a nomenclatura recomendada pelo grupo de estudo “Genotyping of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*” inclui oito tipos moleculares: VNI-VNIV para *C. neoformans* e VGI-VGIV para *C. gattii*.

Considerando a complexidade que envolve a taxonomia destes agentes, neste trabalho será adotada a taxonomia proposta por Kwon-Chung et al., (2002), ou seja, *C. neoformans* com seu teleomorfo *Filobasidiella neoformans* e *C. gattii* com seu teleomorfo *Filobasidiella bacillispora*. Assim, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipos A e D respectivamente, serão referidos como *C. neoformans*, e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C), serão referidos como *C. gattii*. Com base nas características fenotípicas e genotípicas estas espécies estão classificadas no reino Fungi, filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Tremellomycetes, ordem Tremellales e família Tremellaceae (*Index Fungorum*).

1.3. EPIDEMIOLOGIA E ECOLOGIA DOS AGENTES.

A criptococose está entre as mais prevalentes micoses com risco de morte para humanos de ocorrência mundial. Trata-se de uma infecção sistêmica, adquirida por inalação de leveduras desidratadas de tamanho reduzido 2 a 3 µm de diâmetro e possivelmente basidiosporos (2 a 4 µm) considerados resistentes às condições ambientais (Lazéra et al, 2005). Após o evento pulmonar a infecção pode evoluir como quadro com formação de focos extrapulmonares, de estrutura tecidual granulomatosa nos hospedeiros normais que raramente calcificam (Consenso, 2008). O fungo pode espalhar-se através da corrente sanguínea ou linfática (Figura

1), tendo marcado tropismo pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (Cichon et al., 2011; Takahara et al., 2011).



Figura 1 - Desenho esquemático evidenciando o ciclo de infecção por *Cryptococcus* spp.
 Fonte: Lin & Heitman (2006) Annual Rev Microbiol

Do ponto de vista clínico e epidemiológico a micose distingue-se em duas entidades clínicas: **criptococose oportunista**, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, causada predominantemente por *C. neoformans* e, **criptococose primária**, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, ocorre em hospedeiros aparentemente hígidos, imunocompetentes, causada predominantemente por *C. gattii* (Consenso, 2008). Segundo Lazéra et al. (2005) ambas as espécies causam meningoencefalite, de evolução grave e fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários na pele, ossos, rins, glândulas supra-renais, entre outros.

Nos países desenvolvidos, a mortalidade por criptococose é estimada em 10% chegando a 43% nos países em desenvolvimento (Consenso, 2008). No Brasil, (Darzé et al. 2000) reportaram a incidência de 30% em 104 casos analisados menores de 15 anos. No estado do Pará, Corrêa et al. (1999), analisaram as características clínicas de 78 pacientes diagnosticados com criptococose no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) no período de 1992 a 1998, com

ênfase em 19 casos (24,3%) que ocorreram em crianças menores de 13 anos de idade. Santos et al. (2008) em estudo de 56 isolados provenientes de 43 pacientes diagnosticados no HUIBB, no estado do Pará, evidenciaram *C. gattii* VGII como o principal agente de meningite em pacientes HIV negativos, sendo 17% em crianças e destas 11% eram causadas pelo genótipo VGII. A infecção é endêmica, especialmente no norte e nordeste do país, onde estudo com 467 isolados demonstrou que o sorotipo A é prevalente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste enquanto que o sorotipo B predominou no Norte e Nordeste. (Nishikawa et al., 2003).

Aspectos clínicos e eco-epidemiológicos estão relacionados a sua etiologia e diferenças comportamentais de seus principais agentes. *Cryptococcus neoformans*, como agente predominantemente oportunista tem sido associado a AIDS, sendo o sorotipo A (VNI) o principal agente nestes pacientes (Hagen et al., 2015). Estima-se a prevalência da criptococose associada a AIDS entre 8 a 12 % (Lazéra et al., 2005). Dados do Sistema Único de SAÚDE – SUS indicam que a criptococose tem sido relatada como a mais prevalente em termos de internação no Brasil no período de 2000 a 2007, totalizando 4.558 (Brasil, 2012). Entre os fatores de risco incluem-se o uso de drogas imunossupressoras, sobretudo corticosteroides, presença de tumores de linhagem linforreticular, sarcoidose, doença do colágeno e indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Passoni et al., 1998).

Em relação à ecologia, *C. gattii* tem distribuição endêmica nas regiões tropicais e subtropicais, no entanto, em 1999 foi detectado um surto em áreas de clima temperado (Vancouver, Canadá) atingindo humanos e vários animais silvestres e domésticos, tendo se expandido para o oeste dos Estados Unidos. (Kidd et al., 2004; Dixit et al., 2009), o que demonstra que o fungo pode se adaptar a novos ambientes.

O primeiro isolamento ambiental ocorreu na Austrália, onde tem sido associado a árvores de *Eucalyptus*. No Brasil o agente foi registrado em diversas espécies vegetais incluindo *Cássia grandis*, *Sena multijuga*, *Ficus microcarpa*, *Moquilea tomentosa*, *Guettarda acreana*, *Senna* sp. e *Senna siamea*, *Ficus soatensis*, *Croton bogotanus*, *Croton funckianus*, *Coussapoa* sp., *Pinus radiata*, *Eucalyptus globulus*, *Cupressus lusitanica*, *Acacia decurrens* (Lazéra, 1993; 1996;

Fortes et. al, 2001; Granados et al, 2005 & Costa et al, 2009), sendo seu habitat considerado fortemente relacionado a ocos vegetais e madeira em decomposição.

Cryptococcus neoformans é cosmopolita, com ampla disseminação em ambientes urbanos relacionados a habitats de aves, principalmente pombos (*Columbia livia*), e psitacídeos (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Passoni et al., 1998; Filiú et al., 2002). As excretas funcionam como uma fonte nutritiva para *Cryptococcus*, ideia justificada pelo alto conteúdo de substancias nitrogenadas de baixo peso molecular, como a creatinina, utilizadas por *Cryptococcus*, que também assimila ou hidroliza outros constituintes nitrogenados como ácido úrico, alantoína, amônia, ureia, xantina e guanina (Staib, 1963). Também já foram descritas outras fontes, como madeira em decomposição e poeira domiciliar (Lazéra et al., 1996; Passoni, 1999).

Abegg (2006) em seu estudo demonstrou que *C. gatti* é raramente encontrado em excretas de aves, tendo sido registrado em Psittaciformes por este autor. Passoni (1999) sugere que o habitat primário para o *Cryptococcus gattii* pode ser espécies de plantas e madeira envelhecida, locais onde a levedura possivelmente desenvolve o estado sexuado.

No ano 2000, Lazéra et al., estudaram troncos de arvores de uma região endêmica para criptococose no Brasil, em seus resultados, 18,5 % desses troncos foram positivos para *Cryptococcus neoformans*. Em um desses troncos, encontraram *C. gattii* e *C. neoformans* compartilhando o mesmo habitat. Esse fato é favorecido pela capacidade de *C. gattii* e *C. neoformans* produzirem lacase (fenoloxidase), que possivelmente permite a colonização da madeira, principalmente em estado avançado de decomposição (Araújo et al.; 2015).

1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA

Vários fatores de virulência são descritos para os agentes da criptococose dentre os quais se destacam a cápsula, a produção de pigmentos de melanina, e a capacidade de crescer a 37°C (Casadevall, 1998; Perfect, 2005; Maziarz & Perfect, 2016).

1.4.1. Cápsula

A cápsula é uma estrutura complexa que se estende a partir da parede celular, podendo atingir várias vezes o diâmetro da célula fúngica (Coelho et al., 2014). É o fator de virulência mais estudado de *C. neoformans* (Poeta, 2004), está associada com a parede celular da levedura e é composta predominantemente de glucuronoxilomanana (GXM). É considerada um fator de virulência essencial que tem múltiplos efeitos na imunidade do hospedeiro e pode aumentar de tamanho com a exposição aos tecidos do corpo e fluidos (Zaragoza et al., 2010). Dentre os efeitos imunológicos, são citados: indução a apoptose, inibição de proteção a anticorpos, interferência na fagocitose entre outros mecanismos que contribuem para a virulência. Além disso, a cápsula protege a célula fúngica, no ambiente, da desidratação e de predadores ambientais (Steenbergen et al., 2001.)

1.4.2. Melanina

A capacidade de produção de melanina com formação de colônias marrons em meios de cultura como extrato de sementes de *Guizotia abyssinica* (*niger*) e de *Helianthus annuus* (girassol), e em meios com ácido cafeico ou L-dopa, é característica de *C. neoformans* e *C. gattii*, não ocorrendo em outras espécies do gênero *Cryptococcus*. A melanina produzida por essas espécies é consequência da ação da enzima fenol-oxidase sobre os compostos fenólicos ou difenólicos presentes nesses meios, e é um importante fator de virulência para essas espécies, pois colabora para a proteção do fungo contra danos oxidativos causados por fagócitos e radiações ionizantes, e ainda, pode proteger o fungo contra a ação de agentes antifúngicos (Pedroso et al.; 2007).

1.4.3. Capacidade de crescimento a 37°C (Termotolerância)

Em condições fisiológicas, *C. neoformans* mantém sua curva de crescimento a 38- 39°C e perde a viabilidade a 40°C, após 24h e *C. gattii*, possui um limite de

35°C e perde a viabilidade a 37°C (MENDES, 2009). Estudos moleculares associam o crescimento em altas temperaturas a múltiplas vias de sinalização e enzimas que esta levedura adquiriu ou adaptou ao longo do tempo para reter ou aumentar a sua patogenicidade em mamíferos. É uma característica básica de virulência para os fungos causadores de infecções sistêmicas e em consequência, responsáveis por formas mais graves da micose. Além deste, outros fatores de virulência incluem a produção de fosfolipase, urease e várias enzimas associadas com a proteção contra o estresse oxidativo, conferindo sobrevivência dentro do fagolisossomo (Coelho et al., 2014).

A criptococose é uma infecção grave, responsável por elevada mortalidade, notadamente em pacientes HIV+ ou associada a outros fatores de risco. A forma de infecção está diretamente relacionada ao ambiente, onde seus agentes são frequentemente registrados a partir de substratos associados predominantemente a excretas de aves (*C. neoformans*) e ocos vegetais (*C. gattii*).

O estado do Pará, com uma área aproximada de 1.247.689 km² é o segundo maior estado do Brasil localizado na região Norte, com clima tropical e elevada umidade, condições propícias ao desenvolvimento de fungos. O conhecimento sobre criptococose e seus agentes nesta região ainda é pouco registrada. Entre os estudos clínicos destacam-se o relato de 19 casos de criptococose em crianças, das quais 9 foram causadas por *C. gattii*, sugerindo-se que o estado do Pará constitui uma região de alta endemicidade da criptococose por esta espécie (Corrêa et al., 1999). Em 2008, Santos et al., detectaram *C. gattii* como o principal agente de meningite em pacientes HIV negativos, destas 17% em crianças com 11% causadas pelo genótipo VGII. Isolamentos de *C. neoformans* (VNI) e *C. gattii* (VGII) foram registrados na Região Metropolitana de Belém (RMB) (Costa et al., 2008) e no interior do estado do Amazonas, também se registrou a ocorrência de *C. gattii* tipo molecular VGII (Brito-Santos et al., 2015). Estes achados representam possíveis focos de infecção humana pelo tipo molecular VGII na região, ressaltando ainda que este mesmo genótipo foi responsável por surtos epidêmicos em Vancouver, Canadá e atualmente Estados Unidos (Kidd et al., 2004; Dixit et al., 2009).

Neste contexto novas investigações sobre o habitat destas espécies são de grande relevância para ampliação do conhecimento sobre novos nichos ecológicos

dos agentes e subsidiar estudos para o conhecimento do perfil eco-epidemiológico do *Cryptococcus* spp. em nossa região.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Investigar fontes ambientais de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* em diferentes regiões do estado do Pará, Brasil.

2.2. ESPEFÍFICOS

- Coletar amostras de origem vegetal e/ou de excretas de aves em áreas públicas de municípios paraenses.
- Processar as amostras e isolar colônias suspeitas de *Cryptococcus* patogênicos para o homem e outros animais.
- Estimar a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Cryptococcus* patogênicos presentes nas amostras analisadas.
- Diferenciar fenotipicamente *Cryptococcus neoformans* de *C. gattii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREAS DE ESTUDO

O estado do Pará é dividido em 144 municípios, abrangendo uma área média de 1.247.955,381 km² (IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). O clima do estado é equatorial com médias térmicas anuais entre 24 e 26°C, além de alto índice pluviométrico, que chega a alcançar 2.000 mm nas proximidades do rio Amazonas. O território paraense apresenta basicamente mangues, campos, cerrados e floresta amazônica, esta última predomina no estado. Para amostragem foram selecionadas três cidades e dois distritos localizados em Belém e Abaetetuba, conforme a Figura 2.



Figura 2 - Mapa do estado do Pará, destacando os locais de coleta, representados pelos municípios de Abaetetuba, Cametá, Igarapé-Açu, Marabá e Belém. Fonte: <http://www.baixarmapas.com.br/mapa-do-para/>

O Quadro 1 relaciona as cidades e seus dados atuais, caracterizando área, localização e população, de acordo com o IBGE.

Quadro 1 - Dados gerais e demográficos dos locais de coleta

Local de coleta	Área (Km²)	Localização	População (2016)
Abaetetuba (Beja)	1.610,408	01°43' 05" S e 48°52' 57" W	141.100
Belém (Outeiro)	1.059,458	01° 16' 01.65" S a 048° 25' 47.67"	1.393.399
Cametá	3.081,367	02° 14' 40" S a 049° 29' 45" W	132.515
Igarapé Açu	785, 983	01° 07' 44" S a 047° 37' 12" W	37.547
Marabá	15.128,058	05°22' 07" S e 49° 07' 04" W	266.932

3.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas de forma aleatória e de acordo com a disponibilidade do material, em praças públicas e áreas de praias, no período de novembro/2016 a fevereiro de 2017, totalizando 57 amostras. As amostras foram coletadas com o auxílio de espátulas estéreis e EPIs necessários (máscaras e luvas), sendo acondicionados em frascos coletores estéreis, os quais foram mantidos sob refrigeração e transportados até o Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas (UFPA). Conforme a figura 3 as amostras consistiram de material oriundos de ocos, cascas, detritos em decomposição de diferentes árvores, especificadas na tabela 1, e material contendo excretas de aves. Algumas amostras apresentavam líquens, formigas, cupins entre outros organismos.



Figura 3 – Material vegetal em vias, praças públicas e áreas de praias. A) Cametá; B) Abaetetuba (Beja); C) Belém (Outeiro); D) Marabá. Fonte: Costa S, S. P. S. E. & Ferreira, A. S.

Tabela 1 - Denominação e número de amostras coletadas.

NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR DO VEGETAL	Nº DE AMOSTRAS COLETADAS
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Cajueiro	1
<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn	Samaúameira	1
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Jambeiro	3
<i>Ficus benjamina</i> L.	Benjamin	2
<i>Psidium guajava</i> L.	Goiabeira	1
<i>Ínga edulis</i> Mart	Ingazeira	1
<i>Licania tomentosa</i> (Bent.) Fritsch	Oiti	6
<i>Mangifera indica</i> L.	Mangueira	4
<i>Spondias mombin</i> L.	Taperebazeiro	1
<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Ameixeira	6

NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR DO VEGETAL	Nº DE AMOSTRAS COLETADAS
<i>Handroanthus serratifolius</i> L.	Ipê	1
Não identificadas	-	24
Amostras de excretas de pombos	-	6
Total		57

No âmbito laboratorial as amostras foram maceradas e homogeneizadas em gral e pistilo de porcelana. Um grama do material foi suspenso em 50 ml de solução salina estéril contendo cloranfenicol. Após agitação vigorosa durante 5 minutos, a suspensão foi mantida em repouso por 30 minutos, seguindo a metodologia descrita por Lazéra et al., (1996).

3.4. ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS

Para o isolamento das colônias, 1 mL do sobrenadante foi distribuído em placas de Petri descartáveis contendo meio de cultura com sementes de níger (Niger Seed Agar-NSA), num total de 10 (dez) placas por amostra ambiental. As placas foram incubadas à temperatura ambiente $\pm 27^\circ$ e observadas em até sete dias. As colônias leveduriformes de coloração marrom (fenoloxidade positiva), sugestiva do complexo *Cryptococcus neoformans* foram isoladas em Ágar Sabouraud com cloranfenicol (figura 4). Quando necessário, sucessivos repiques foram realizados em NSA até a obtenção de colônias puras e posteriormente isoladas em ágar Sabouraud com cloranfenicol.

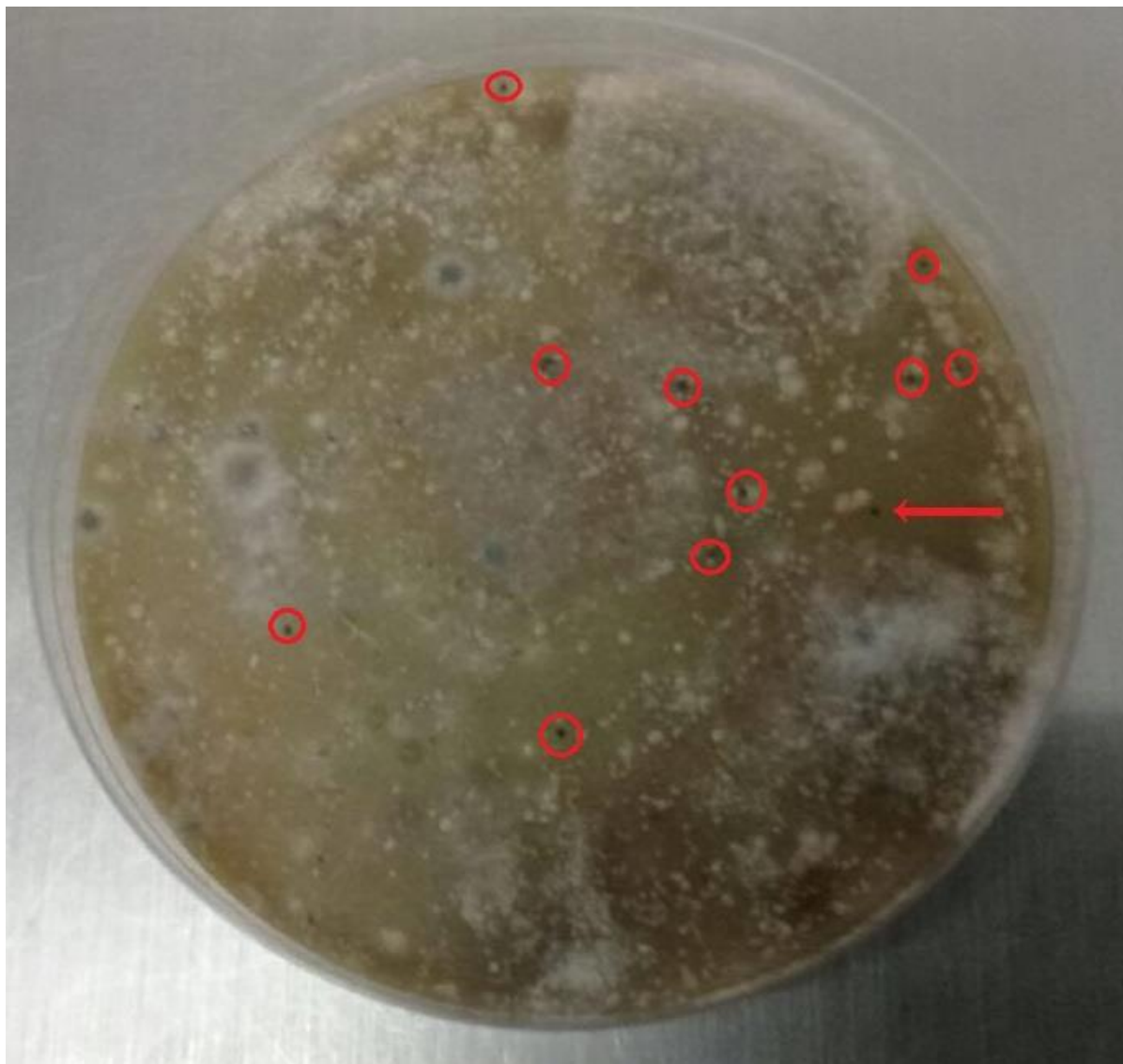


Figura 4 - Colônias leveduriformes de coloração marrom (fenoloxidade positivas), sugestivas do complexo *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans*. Fonte: Costa S, S. P. S. E. & Ferreira, A. S.

3.5. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

As colônias isoladas em meio Ágar Sabouraud foram identificadas com base na produção de melanina em Ágar Níger (colônias fenoloxidases positivas), observação de cápsula em preparações com tinta da China e teste CGB.

O meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) proposto por Kwon-chung & Rhodes (1986) permite a diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii*. Os isolados foram semeados em CGB e incubados à temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) durante 5 dias. *Cryptococcus gattii* cresce na presença de L-canavanina e utiliza

glicina como única fonte de Nitrogênio e em consequência ocorre aumento do pH (inicialmente 5,8), o que é revelado pelo azul de bromotimol que altera a coloração do meio de amarelo esverdeado para azul cobalto. *Cryptococcus neoformans* não cresce na presença de canavanina e não utiliza glicina, não ocorrendo alteração na coloração do meio (Klein et al., 2009).

Os resultados da reação foram obtidos segundo os parâmetros sugeridos por Melo *et al.* (1993), discriminados a seguir: 0 = nenhuma variação; 1+=leve variação na cor; 2+ = meio azul esverdeado; 3+ = azul cobalto e fundo azul-esverdeado; 4+ = azul cobalto até o fundo do tubo. Resultados variando 0 a 2+ = *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A-D), 2+ = indeterminado e igual ou acima de 3+ = *Cryptococcus gattii*. O teste é positivo quando o meio de cultura de cor verde amarelado altera para a cor azul = *C. gattii*.

4. RESULTADOS

A partir de 57 amostras ambientais processadas, foi possível detectar a presença de colônias fenoloxidasas positivas, sugestivas de *Cryptococcus* spp. em apenas uma amostra proveniente de um oco de árvore não identificada e coletada no município de Marabá-PA, representando 1,54% do total (Tabela 2).

Tabela 2 – Procedência, número e positividade das amostras processadas em ágar níger.

LOCALIDADE	Nº DE AMOSTRAS COLETADAS (N)	AMOSTRAS POSITIVAS
Abaetetuba (Beja)	5	0
Belém (Outeiro)	10	0
Cametá	20	0
Igarapé-Açu	10	0
Marabá	12	1
TOTAL	57	1

Na Tabela 3 evidencia-se o substrato e densidade de UFCs estimadas na amostra positiva. A densidade foi estimada através da quantificação do número de unidades formadoras de colônias em 1:50 (P/V) da suspensão inoculada em meio NSA e expressa em UFC/g.

Tabela 3 - Distribuição de *Cryptococcus* spp de acordo com o substrato e densidade.

AMOSTRA	Nº DE ISOLADOS	DENSIDADE (UFC/G)
Oco vegetal	21	$4,3 \times 10^3$

Embora tenham sido observadas 87 colônias fenoloxidasas positivas, em virtude do crescimento competitivo de fungos filamentosos, apenas 21 (24.1 %) foram repicadas em novas placas contendo ágar níger para obtenção de colônias puras, observadas na figura 5.



Figura 5 - Colônias purificadas em meio com semente de níger. Fonte: Costa S, S. P. S. E. & Ferreira, A. S

Após o isolamento das colônias em Ágar Sabouraud, as colônias foram submetidas à análise microscópica utilizando tinta da China, para a revelação da espessa cápsula mucopolissacarídica, característica destes patógenos. Os resultados das amostras isoladas e submetidas ao teste CGB (Figura 6), são apresentados na Tabela 4, onde se observa que das 21 cepas isoladas, 8 (38,1 %) foram identificadas como *C. neoformans* e 13 (61,9 %) como *C. gattii*. Os resultados da análise fenotípica obtidos neste estudo estão demonstrados na Tabela 5.

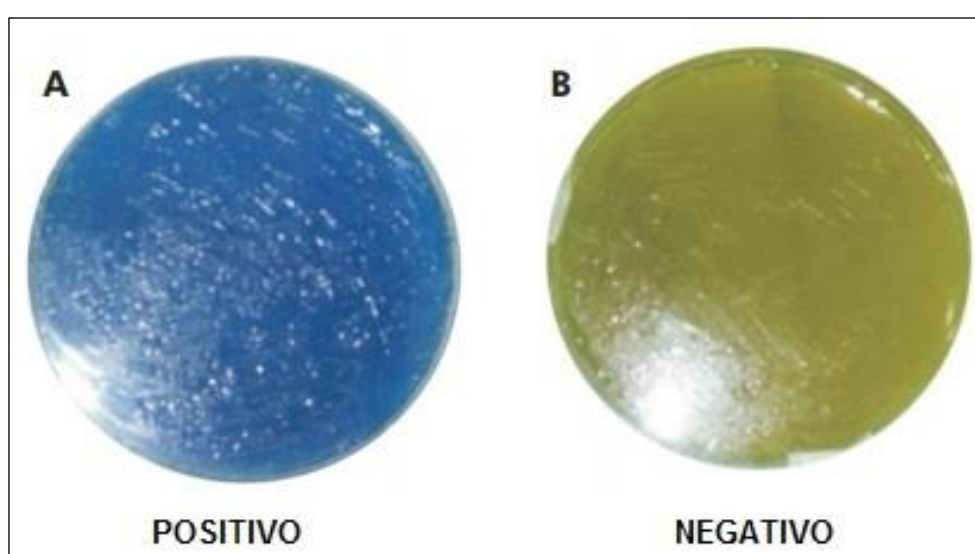


Figura 6 - Teste em meio CGB. Resultado positivo= *C. gattii* e resultado negativo= *C. neoformans*. Fonte: Adaptado de Gomes *et al.* (2010).

Tabela 4 – Diferenciação das espécies de *Cryptococcus* spp. em meio CGB.

Espécies	Nº de Isolados	%
	Ambientais	
<i>C. neoformans</i>	8	38,1
<i>C. gattii</i>	13	61,9
Total	21	100 %

Tabela 5 - Caracterização fenotípica dos isolados de *Cryptococcus* spp.

Cepa	Aspectos Fenotípicos		Identificação (CGB)
	Melanina	Cápsula	
MA 1.1	+	+	<i>C. neoformans</i>
MA 1.2	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 2.2	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 2.4	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 2.5	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 3.2	+	+	<i>C. neoformans</i>
MA 3.3	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 3.4	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 3.7	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 3.9	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 6.3	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 7.7	+	+	<i>C. neoformans</i>
MA 7.8	+	+	<i>C. neoformans</i>
MA 8.3	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 8.4	+	+	<i>C. neoformans</i>
MA 8.11	+	+	<i>C. gattii</i>
MA 9.2	+	+	<i>C. neoformans</i>
MA 9.3	+	+	<i>C. neoformans</i>
MA 9.4	+	+	<i>C. neoformans</i>
MA 9.8	+	+	<i>C. neoformans</i>

5. DISCUSSÃO

O gênero *Cryptococcus* caracteriza-se por leveduras encapsuladas que podem estar dispersas no ambiente, podendo causar infecção grave no homem e outros animais, dependendo das complexas relações que envolvem parasitas e hospedeiros (Passoni, 1994). Não se sabe ao certo a totalidade desta infecção no mundo, visto que em geral a micose não é de notificação compulsória o que dificulta informações precisas sobre sua incidência. No entanto, esquemas profiláticos com antifúngicos (Casadeval & Perfect 1998), ajudaram na redução significativa da doença em portadores HIV, tendo em conta que *Cryptococcus neoformans* é considerado o agente predominantemente oportunista nestes pacientes (Hagen et al., 2015).

A estimativa de prevalência da criptococose associada à AIDS é entre 8 e 12% em centros de referência das Regiões Sul e Sudeste e no Brasil a criptococose tem sido relatada com maior prevalência em relação à internação no período de 2000 a 2007, totalizando 4.558 casos (Brasil, 2012). Diferentemente, *Cryptococcus gattii* se comporta como patógeno primário atingindo predominantemente hospedeiros imunocompetentes. Muito se tem reportado sobre o comportamento eco-epidemiológico destas espécies, no entanto muitos aspectos de sua ecologia, virulência, ciclo biológico e origem ainda permanecem desconhecidos.

Neste estudo obteve-se o isolamento de *C. gattii* (n=13) e *C. neoformans* (n=8) a partir de uma amostra cujas espécies foram isoladas do mesmo substrato, ou seja, oco vegetal, constituído de material em decomposição em uma árvore viva não identificada, localizada em uma praça pública com muito trânsito de pessoas bem como foi registrada a presença de aves e outros animais no local. A literatura mundial tem evidenciado a ocorrência de *C. gattii* neste nicho ecológico, sendo esta espécie fortemente associada a este habitat (Hagen & Boekhout, 2010; Hagen et al, 2015).

O predomínio de *C. gattii* sobre *C. neoformans* registrado aqui está em consonância com a literatura. Sobre este assunto, Lazéra et al. (2000) ponderam que estas espécies e seus teleomorfos possivelmente estejam associados à madeira em decomposição atuando numa sucessão ecológica como decompositores de substratos lignificados. O compartilhamento destas espécies em um mesmo oco

também foi reportado por Lazéra et al., (1999) em *Syzygium jambolana* (RJ) e Costa et al., (2008) em *Cassia siamea* (PA). De fato, esta relação ainda não está totalmente esclarecida, necessitando de estudos mais aprofundados.

Vários estudos associam *C. neoformans* à excretas de aves notadamente pombos, em ambientes urbanos, locais em geral com grande fluxo de pessoas suscetíveis ou não à patogenia (Emmons, 1951; Lazéra et al., 1993; Kobayashi, 2005). Faria et al., (2010), em um estudo realizado na Cidade de Pelotas – RS, isolaram 26,9% de *C. neoformans*, a partir de excretas coletadas em prédios históricos, igrejas, engenhos e armazéns. Staib (1963) enfatiza que as excretas funcionam como fonte nutritiva para *Cryptococcus* que assimila a creatinina, ácido úrico, purinas e xantinas presentes nas excretas. Contrastando com este cenário, em nosso estudo não foi identificada a presença dos agentes da criptococose nas amostras de excretas. No entanto ressaltamos que poucas amostras desta natureza (n=6) foram analisadas. Estas foram coletadas em praças públicas onde se registrou a presença de aves, incluindo pombos, porém todas negativas. Ao invés, observou-se maciço crescimento de colônias leveduriformes fenoloxidasas negativas.

Em estudo conduzido em Votuporanga (SP), Rezende et al. (2008) analisaram 30 amostras de excretas de pombos, não obtendo êxito no isolamento de *Cryptococcus*, enquanto que na Jordânia Hamasha et al. (2004) analisaram 509 amostras de excretas de pombos resultando em 100% de negatividade para *Cryptococcus*, constatando a raridade de *C. neoformans* neste habitat na referida região.

Outro fator a discutir refere-se à colonização dos substratos analisados por diferentes espécies de fungos e possivelmente bactérias, que podem interferir no crescimento dos agentes pesquisados e/ou dificultar o isolamento e mesmo a visualização das colônias.

Por outro lado, o isolamento de *C. neoformans* a partir de substratos vegetais também tem sido notificado em diferentes regiões do Brasil (Consenso, 2008), incluindo a região do Norte (Costa et al., 2008; Nishikawa, 2003). Neste estudo *C. neoformans*, foi isolado de oco vegetal, representados por 21 colônias totalizamos 38,1 % para *C. neoformans*.

O encontro de *C. gattii* e *C. neoformans* no sudeste do Pará traz novas evidências sobre a ocorrência do fungo neste ambiente e de certa forma condizente com a expectativa destes achados visto que a criptococose tem sido considerada endêmica na região amazônica (Correa et al., 1999; Santos et al., 2008).

No levantamento epidemiológico realizado no período de 1992 a 1998, realizado por Correa et al. (1999), os autores detectaram 78 casos de criptococose diagnosticados no Hospital Universitário João Barros Barreto (HUJBB), dos quais dezenove eram crianças, procedentes de várias localidades do estado do Pará. O estudo demonstrou elevado número de casos de criptococose em crianças entre dois e 13 anos onde *C. gattii* foi responsável por metade dos óbitos ocorridos. Destaca-se que destes casos 2 procederam da região sudeste do Pará, sendo 1 de Marabá. Mais recentemente Santos et al., (2008), analisando amostras clínicas de pacientes diagnosticados no HUJBB no período de maio de 2003 a abril de 2007 obteve os seguintes resultados: *C. gattii* frequente em pacientes HIV negativos (19/29, 65,5%), e *C. neoformans* predominante em pacientes HIV positivos (12/14, 85,7%), com registro do tipo molecular VGII na região sudeste do Pará. Cabe destacar que este genótipo foi o principal responsável pelo surto ocorrido no Canadá e Estados Unidos (Kidd et al., 2004; Dixit et al., 2009).

No período de março de 2004 e abril de 2005, em Belém, Costa et al., (2008) realizaram visitas nos domicílios de 8 pacientes com diagnóstico comprovado de criptococose. Foram coletadas 186 amostras de diversos ambientes, destas, 10 amostras de poeira foram positivas para *C. neoformans* e/ou *C. gattii* (em poeira de cinco residências foram encontradas as duas espécies simultaneamente) dos tipos moleculares VNI e VGII. O estudo registrou pela primeira vez o isolamento de *C. neoformans* e *C. gatti* de fontes ambientais na cidade de Belém (Costa et al., 2008). Mais recentemente, Brito-Santos et al. (2015) investigando amostras de poeira em habitações do interior do estado do Amazonas, associaram as variáveis árvore-espécies e local-espécie do complexo de *Cryptococcus* e concluíram que tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* podem ser encontrados em diferentes locais, espécies de árvores e período do ano.

Estudos conduzidos por Beheregaray et al. (2005), indicam que temperaturas superiores a 30°C, diminuiria a viabilidade da levedura no ambiente. Levando em

consideração que a temperatura média no estado se situa entre 24 a 26 °C, é importante avaliar esta variável em futuras investigações. No presente trabalho, as coletas foram realizadas em dezembro e janeiro 2016, na região de Marabá, quando a temperatura média oscila entre 22 °C a 30 °C (Instituto Nacional de Meteorologia), fator importante para o crescimento da levedura.

Estes resultados configuram-se no primeiro registro de *C. neoformans* e *C. gattii* isolados de fontes sapróbias na região sudeste do Pará, levantando a hipótese de que estes vegetais possam representar reservatórios do fungo e possível risco de contaminação à população local.

Considerando que a Amazônia paraense apresenta condições climáticas favoráveis à biodiversidade fúngica, bem como os resultados desta pesquisa, sugere-se que o estudo deva ser ampliado e conduzido de forma a abranger períodos chuvosos e de estiagem, e outros diferentes substratos para uma avaliação mais abrangente dos agentes e aspectos ambientais relacionados, uma vez que se trata de espécies de importância médica que têm como principal forma de infecção a inalação.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. Em 57 amostras analisadas, uma apresentou positividade para os agentes da criptococose, embora com registro de $4,3 \times 10^3$ UFC/g, constatando-se a ocorrência dos agentes em uma das cidades pesquisadas.
2. Quanto aos substratos analisados, detectou-se positividade apenas em oco vegetal, evidenciando-se predomínio de *C. gattii* em relação a *C. neoformans*.
3. Amostras de excretas, normalmente relacionadas ao habitat de *C. neoformans*, não apresentaram positividade, embora representem neste estudo menor número de amostras em relação ao substrato vegetal.
4. Registra-se a primeira ocorrência de *C. neoformans* e *C. gattii*, a partir de fontes sapróbias, para a cidade de Marabá, Pará, Brasil.
5. Estes achados iniciais indicam a necessidade de realização de estudos mais abrangentes no estado, onde a criptococose gattii tem sido considerada endêmica.

7. REFERÊNCIAS:

ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, p.83-91, 2006.

ARAÚJO JUNIOR, E.C.; TAPARO, C.V.; UCHIDA, C.Y. *et al.* *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. Arq. Bras. **Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.4, p.1003-1008, 2015.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v.27, n.11, p.875-904, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância Epidemiológica da Criptococose**. Brasília, DF: MS, 2012.

BRITO-SANTOS, F.; BARBORA, G. G.; TRILLES, L. NISHIKAWA, M. M; WANKE, B. MAYER, W. CARVALHO-COSTA, F. A. & LAZÉRA, M. S. Environmental Isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin.

CASADEVALL, A. & PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington, DC: American society for Microbiology Press, 1998. p. 541.

CICHON, M.; VICENTE, V. A.; MURO, M. D.; BORDIGNON, G. P. F. & QUEIROZ-TELLES, F. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, p.176-179, 2011.

COELHO C.; BOCCA A. & CASADEVALL A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p. 1-41, 2014.

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

CORRÊA, W. M. & CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: MEDSI, 1992.

CORRÊA, M. P. C. S.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R. B. S.; PARDAL, P. P. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 505-508, 1999.

COSTA, S. P. S. E. **Isolamento e caracterização molecular de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de fontes ambientais na região metropolitana de Belém, Pará**. 2008. 161f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

COSTA, S. P. S. E. *et al.* First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VG II and *Cryptococcus neoformans* molecular type VN I from environmental sources in the city of Belem, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p.662-664, jul. 2009.

DARZE C.; LUCENA R.; GOMES I. & MELO A. **Características clínicas e laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33: 21-26, 2000.

DEACON, J.W. **Fungal Biology**. Blackwell Publishing, 4 ed., 2006.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F. & QURESHI, S. T. ***Cryptococcus gattii*: Na Emerging Cause of Fungal Disease in North America**. Hindawi Publishing Corporation Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. v. 2009, Article ID 840452, p.13.

EMMONS, C.W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **Journal of Bacteriology**, v.62(1): 685-690. 1951.

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

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZÉRA, M. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 591-595, 2002.

FORTES, S. T.; LAZÉRA, M. S.; NISHIKAWA, M. M.; MACEDO, R. C. L. & WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **MYCOSES** **44**, 137±140 (2001).

GRANADOS D. P. & CASTAÑEDA E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology**, v.49, p. 282-290, 2005.

HAGEN, F.; Khayhan, K.; Theelen, B.; Kolecka, A.; Polacheck, I.; Sionov, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; LUMBSCH, H. T. & BOEKHOUT, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet. Biol.** 78, 16–48. doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.009.

HAGEN, F. BOEKHOUT, T. The Search for the Natural Habitat of *Cryptococcus gattii*. **Mycopathologia** (2010) 170:209–211 DOI 10.1007/s11046-010-9313-6.

HAMASHA, A.M.S.; YILDIRAN, S.T.; GONLUM, A.; SARACLI, M.A. & DOGANCI, L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. **Mycopathologia**, v.158:195-199. 2004.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, v.50: 9-18. 2004.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycologica Research**, v. 95: 641-655. 1991.

HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. ***Cryptococcus* human pathogen to model yeast**. 2nd ed. Woshigton: ASM Press, 2011. 602 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <
<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?coduf=15>> Acesso em: 28 de fev. 2017.

<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> Acesso em: 27 de fev. 2017.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARLETT, K. H.; FYFE, M.; MCDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n 49, p. 7258-17263, Dec. 2004.

KLEIN, K. R.; HALL, L.; DEML, S. M.; RYSAVY, J. M.; WOHLFIELD, S. L.; WENGENACK, N. L. Identification of *Cryptococcus gattii* by Use of L Canavanine Glycine Bromothymol Blue Medium and DNA Sequencing. **Journl of Clin. Microbil.**, v. 47, n11, p 26669-3672, 2009.

KOBAYASHI, C.C.B.A.; SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O.F.L.; BRITO, S.C.A.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D. & SILVA, M.R.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 47(4): 203-207. 2005.

KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia** v.67, p. 1197–1200, 1975.

KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E.; Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v. 120, n. 1, p. 123-130, 1984.

KWON-CHUNG, K. J & BENNETT, J. E. Cryptococcosis. In: **Medical Mycology**, p.397-446, 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; RHODES, J. C. Taxonomic studies on *Filobasidiella neoformans* and their anamorphs. **Antonie van Leeuwenhoek**, 48:25-38.1982.a.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. 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, p. 535-537, 1982b.

KWON-CHUNG, K. J. & RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 51, p. 218-223, 1986.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M. *ET AL.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the *cryptococcosis* outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.**101,17258–17263.doi:10.1073/pnas.0402981101, 2004.

LACAZ C S, *et al.* **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9a ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. S.; LONDERO, A. T. *et al.* Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycology**, v.38, n.5, p.379-383, 2000.

LAZÉRA, M. S. *et al.* Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.

LAZÉRA, M. S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; CAVALCANTI, M.A.S.; WANKE, B. Criptococose. In: COURA J. R. **Dinâmica das Doenças Infeciosas e Parasitárias**. Vol II. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p.1223-1235, 2005.

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WAKKE, B. Criptococose Em: SIDRIN, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Cap.24, 252-264, Guanabara Koogan, 2004.

LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.31, p.449-454, 1993.

LIN, X. & HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 69-105, 2006

MAZIARZ K. E. & PERFECT J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin N Am** v.30, p.179-206, 2016.

MELO, N. T.; LACAS, C. S.; CHARBEL, C. E.; PEREIRA, A. D.; HEINS-VACCARI, E. M.; FRANÇA-NETO, A. S.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A. quimiotipagem do *Cryptococcus neoformans*. Revisão da literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio de C.G.B no estudo daquela levedura. **Ver. Inst. Med. Trop**, 35 (5):469-478,1993.

MEYER, W. & TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. **Australian Biochemist**, v. 41, n. 1, p. 11-15, 2010.

MITCHELL, T. G.; CASTANEDA, E.; NIELSEN, N.; WANKE, B. & LAZERA, M. S. **Environmental Niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii***. In: "Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast"; Edited by J. Heitman et al.; 2011 ASM Press, Washington, DC. 237-258p.

NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. L; BEZERRA, C. C. F; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P. & WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, 41, p.73-74, 2003.

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J. M. & VILGALYS, R. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. **Applied And Environmental Microbiology**, Vol. 71, No. 9. Sept. 2005, p. 5544–5550.

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

PASSONI L. F. et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med Vet Mycol**, v.36, p.305-311, 1998.

PEDROSO, R. S.; COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C. CANDIDO, R. C. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40(5):566-568, set-out, 2007.

PERFECT J. R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.45, n.3, p.395-404, 2005.

PERFECT J. R. ***Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot.** Duke University Medical Center Durham, NC, USA doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00051.x , 2006.

POETA, D. M. Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**. 2004;3(5):1067-75.

REZENDE, C.; SILVA. E. R.; GOME, A. H. F.; SILVA. J. E. & MIZZIARA, R. C. *Cryptococcus neoformans*: primeiro caso relatado de isolamento em fezes de pombos no município de Votuporanga-São Paulo. **Revista uniara**, v. 12, n.2, dez. 2009

SANTOS, W. R. et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 8138, Dec 2008. ISSN 1678-8060.

STAIB, F. New concepts in the occurrence and identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol. Mycol. App.**, v. 19, n. 1-2, p. 143-145, 1963

STEENBERGEN JN, SHUMAN HA, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 98(26):15245-50, 2001.

TAKAHARA, D. T. **Isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de Cuiabá e Várzea Grande - MT.** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Faculdade De Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

ZARAGOZA, O.; GARCÍA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J. D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; AND CASADEVALL, A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathog.** **6:** e1000945. doi: 10.1371/journal.ppat.1000945, 2010.