

ISOLAMENTO DE *Cryptococcus* spp. EM CÉREBRO E PULMÃO DE POMBOS CAPTURADOS EM PELOTAS-RS

CAROLINA DOS SANTOS BERMANN¹; CAROLINE QUINTANA BRAGA²;
AUGUSTO DUARTE BROD²; CAROLINA CAETANO DOS SANTOS²; ANGELITA
MILECH²; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – carolbermann@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença fúngica endêmica, considerada a mais importante do Brasil (COSTA et al., 2019). É causada pelos complexos *neoformans* e *gattii* do gênero *Cryptococcus* spp., um basidiomiceto sapróbio e cosmopolita que causa infecção em humanos e animais (KWON-CHUNG et al., 2017).

A maior casuística em humanos é a criptococose causada pelo complexo *neoformans*, que acomete indivíduos imunocomprometidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), diabéticos e transplantados de órgãos (LI et al., 2017). A ocorrência da enfermidade está diretamente relacionada a superpopulação de pombos, que desempenham o papel de carreadores e disseminadores do fungo nos centros urbanos (BERMANN et al., 2019; ABULREESH et al., 2019). A micose em humanos e animais frequentemente apresenta-se nas formas clínicas de meningites e pneumonias, mas também pode cursar com lesões nasais, oculares, cutâneas, entre outras menos comuns (CHEN et al., 2014; RODRIGUES et al., 2020).

A forma de diagnóstico mais comum é a coleta de fluidos corporais para exame direto, podendo ainda ser realizada cultura, exame sorológico, análise histopatológica ou citológica de tecidos afetados. Em cultura em ágar Sabouraud as colônias são brancacentas a creme, homogêneas, de aspecto mucoide e brilhante, quando incubadas a 25-37°C/ 72 horas ou ainda apresentar produção de melanina em ágar niger, onde podem tornar-se de coloração amarronzada (MAZIARZ & PERFECT, 2016).

Micromorfológicamente, sua espessa cápsula de mucopolissacarídeo, característica do gênero e principal fator de virulência, envolve uma estrutura arredondada de até 6 µm, podendo apresentar brotamentos. Essas estruturas são visualizadas no exame direto com tinta da China, formando halos claros na região da cápsula em contraste ao fundo escuro, o que torna o método rápido e pouco oneroso para diagnóstico clínico (MORAES, 2018).

A maioria dos autores acredita que o fungo atravessa diretamente o trato digestório sendo eliminado juntamente com as fezes, sem relatos de infecção nas aves carreadoras (ABULREESH et al., 2019). Esse fato foi comprovado em vários estudos que avaliaram o isolamento de *Cryptococcus* spp. em dejetos de pombos (GHADERI et al., 2019). No entanto não foram encontrados na literatura estudos que comprovem que os Columbidae não possam ser acometidas pela enfermidade (MAIA, 2009). Um surto de criptococose clínica em psitacídeos criados em aviário foi relatado no Brasil (RASO et al., 2004). A enfermidade foi causada pela espécie *C. gattii* e a fonte de infecção foi relacionada à inalação do fungo presente em galhos de eucaliptos utilizados como poleiros.

Apesar de ser um fungo bastante estudado devido a sua importância na micologia médica, pouco se sabe sobre o seu comportamento no organismo dos pombos. O objetivo do presente trabalho é relatar o isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de cérebro e pulmão de pombos capturados em áreas urbanas da cidade de Pelotas/RS.

2. METODOLOGIA

Foram capturados 20 exemplares de pombo (*Columba livia*) por meio da utilização de rede de neblina e através da captura direta nos ninhos em um prédio na região do porto da cidade de Pelotas/RS (coordenadas: 31°46'56"S, 52°20'00"O) onde existe uma população considerável desses animais e intenso acúmulo de fezes. As aves foram submetidas a eutanásia induzida por isoflurano por via inalatória e após submetidos a necropsia, conforme aprovação do projeto pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEA), número 61235-2 e SISBIO 23110.012860/2018-81. Fragmentos de cérebro e pulmão foram coletados e macerados, transferidos para tubos tipo falcon contendo 9mL de solução salina a 0,9% em uma proporção aproximada de 1:9, agitados em vórtex e incubados a 37°C em estufa em agitação constante (150 rpm) durante 60 minutos. Após um descanso de 15 minutos, um volume de 100 µL do sobrenadante foi semeado em placas de ágar Niger, em duplicata e homogeneizados com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 25°C com acompanhamento diário durante 10 dias. As colônias com características macroscópicas similares as de *Cryptococcus* spp. foram submetidas ao exame direto com tinta da China e analisadas por microscopia óptica para confirmação da presença de células leveduriformes envoltas por ampla cápsula, característica do gênero.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a avaliação dos animais, nenhum apresentava sintomatologia clínica de enfermidades ou prostração e durante a necropsia não foram visualizadas lesões macroscópicas sugestivas da doença.

Dentre os 20 Columbidae avaliados, cinco (25%) apresentaram crescimento de colônias cor creme, homogêneas e mucóides em ágar niger, em pelo menos um órgão testado. O exame direto com tinta da China revelou células leveduriformes arredondadas em brotamento e circundadas por espessa cápsula, característica do gênero *Cryptococcus*. Desses, um (1/5;20%) apresentou crescimento em cérebro, três (3/5;60%) em pulmões e um (1/5;20%) em pulmões e cérebro. Segundo MAZIARZ & PERFECT (2016), as características das colônias e o exame direto são suficientes para determinar o gênero, todavia, é importante identificar a espécie e o complexo ao qual pertence.

Não há relatos na literatura sobre o isolamento de *Cryptococcus* spp. em órgãos de pombos. Alguns estudos apontam que o limitado crescimento intracelular do fungo no organismo das aves, combinado à elevada temperatura corporal desses animais, impedem a multiplicação do *Cryptococcus* spp. no organismo da ave (JOHNSTON et al., 2016). No entanto, criptococose em aves de aviário já foi relatada por RASO et al. (2004). No presente estudo os pombos avaliados eram sadios, uma vez que não apresentaram sintomas clínicos e/ou lesões macroscópicas durante a necropsia.



O isolamento de *Cryptococcus* spp. do pulmão pode ser explicado pelo fato de que a inalação de basidiósporos ou leveduras suspensas no ar é a principal via de infecção nos hospedeiros suscetíveis, ocasionando apenas uma pneumonia transitória ou subclínica (REGO et al., 2018). Interessantemente, em duas aves, o fungo foi isolado do cérebro, sugerindo que o micro-organismo pode ser multiplicar no organismo desse hospedeiro. No entanto, para melhor interpretar esse achado, outras análises, incluindo a histopatologia do órgão, são necessárias para avaliar a ocorrência de lesões teciduais e determinar se o fungo pode se estabelecer no sistema nervoso dessa espécie. É importante salientar que a criptococose em espécies silvestres de vida livre é raramente relatado. A doença foi observada em animais de cativeiro que tiveram contato com *C. gattii* proveniente de compostos orgânicos de árvores utilizadas na simulação do habitat natural (RASO et al., 2004). No presente estudo, ainda não foi possível realizar-se a identificação em nível de espécie dos isolados de *Cryptococcus* obtidos dos órgãos avaliados.

4. CONCLUSÕES

O isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de pulmão e cérebro de pombos, sugere que este fungo é capaz de resistir a elevada temperatura corporal e sistema imunológico desse hospedeiro, podendo se estabelecer em órgãos pelos quais o micro-organismo apresenta tropismo em mamíferos. No entanto, até o momento, não foi possível determinar-se a patogenicidade do fungo para esta espécie, uma vez que análises histopatológicas para avaliar lesões teciduais e, análises moleculares para identificação da espécie de *Cryptococcus*, são requeridas para melhor interpretar os resultados obtidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULREESH, H.H.; ORGANJI, S.R.; ELBANNA, K.; OSMAN, G.E.H.; ALMALKI, M.H.K.; ABDEL-MALEK, A.Y.; GHYATHUDDIN, A.A.K.; AHMAD, I. Diversity, Virulence Factors, and Antifungal Susceptibility Patterns of Pathogenic and Opportunistic Yeast Species in Rock Pigeon (*Columba livia*) Fecal Droppings in Western Saudi Arabia. **Polish Journal of Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 493–504, 2019.

BERMANN, C.S.; BRAGA, C.Q.; SANTOS, C.C.; MOTTA, S.P.; MILECH, A.; BRAYER, D.I.P. Isolamento e ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em intestino de pombos capturados na cidade de Pelotas – RS. In: **ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPEL**, 11., Pelotas, 2019, Anais 2019 Ciências Biológicas. Pelotas: Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2019, v. 1.

CHEN, S. C.A.; MEYER, W.; SORREL, T.C. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

COSTA, M.C. SÁ, N.P.; JOHANN, S.; SANTOS, D.A. Social, environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in Brazil. **New Microbes and New Infections**, v. 29, n. C, 2019.

GHADERI, Z.; EIDI, S.; RAZMYAR, J. High Prevalence of *Cryptococcus neoformans* and Isolation of Other Opportunistic Fungi From Pigeon (*Columba livia*) Droppings in Northeast Iran. **J. Avian Med. Surg**, v.33, n.4, p.335-339, 2019.

JOHNSTON, S.A.; VOELZ, K.; MAY, R.C. *Cryptococcus neoformans* Thermotolerance to Avian Body Temperature Is Sufficient For Extracellular Growth But Not Intracellular Survival In Macrophages. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

KWON-CHUNG, K.J.; FRASER, J.A.; DOERING, T.L.; WANG, Z.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN Y. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, 2014.

LI, Y.; FANG, W.; JIANG, W.; HAGEN, F.; LIU, J.; ZHANG, L.; HONG, N.; ZHU, Y.; XU, XIAOGUANG, X.; LEI, X.; DENG, D.; XU, J.; LIAO, W.; BOEKHOUT, T.; CHEN, M.; PAN, W. Cryptococcosis in patients with diabetes mellitus II in mainland China: 1993- 2015. **Mycoses**, v. 60, p. 706-713, 2017.

MAIA, D.C.B.S.C. **LEVEDURAS ISOLADAS DO TRATO GASTRINTESTINAL DE CALOPSITAS (*Nymphicus hollandicus*): DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA E ANÁLISE FENOTÍPICA**. 2009. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.

MAZIARZ, E.K.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 179-206, 2016.

MORAES, G.Y.B.; RODRIGUES, A.G.; MORAES, T.I. Fisiopatologia da criptococose em pacientes com HIV/AIDS e o papel do biomédico. **Revista Saúde em Foco**, v. 10, p. 308-318, 2018.

RASO, T.F.; WERTHER, K.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Medical Mycology**, v. 42, p. 355-362, 2004.

REGO, M.F.; FONTES, R.E.R.; NASCIMENTO, W.S.; SILVA, H.M. Análise Bibliográfica Dos Principais Aspectos Da Criptococose. **Anais dos Cursos de Pós-Graduação Lato Sensu UniEVANGÉLICA**, v.02, n.01, p. 23-33, 2018.

RODRIGUES, T.C.N.; STROOBANTS, L.R.; VANDENABEELE, S.I. Feline cutaneous nodular and ocular *Cryptococcus neoformans* in Belgium. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2020.