

ISOLAMENTO DE PROVÁVEIS FUNGOS DA CLASSE TREMELLOMYCETES DE ÓRGÃOS E FEZES DE *Columba livia* – RESULTADOS PARCIAIS

ALINE MACIEL DOS SANTOS¹; CASSIANE BORGES DE SOUZA²; NILSÉIA FEIJÓ DA SILVA³; CAROLINA CAETANO DOS SANTOS⁴; CAROLINA DOS SANTOS BERMANN⁵; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – *liny.maciel.17@gmail.com*

²Universidade Federal de Pelotas – *casborges96@gmail.com*

³Universidade Federal de Pelotas – *nilseiafeijo@hotmail.com*

⁴Universidade Federal de Pelotas – *carol_csantos@hotmail.com*

⁵Universidade Federal de Pelotas – *carolbermann@hotmail.com*

⁶Universidade Federal de Pelotas – *danielabrayer@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Tremellomycetes é uma classe de fungos adaptados a diferentes ambientes que fazem parte do subfilo Agaricomycotina. Alguns gêneros dessa classe são patógenos emergentes e causam infecções oportunistas em seres humanos e animais, sendo também considerados agentes causadores de criptococose (CAVALCANTE e FERREIRA, 2022). A fonte primária de contaminação com esses micro-organismos inclui o contato com excretas de aves ou alimentos contaminados (AKAPO et al., 2019; MENEZES et al., 2014).

Estudos demonstram que o pombo doméstico (*Columba livia*) é uma ave sinantrópica, encontrada em grande quantidade em ambientes urbanos, principalmente pela oferta de alimento, arquitetura das cidades que propiciam abrigo e a falta de um programa de controle populacional eficaz (LABANHARE e PERRELLI, 2007). Esta espécie apresenta um importante papel na disseminação de fungos patógenos, incluindo *Cryptococcus* do complexo *neoformans* e outras espécies emergentes de *Cryptococcus* reclassificadas por Liu et al (2015) nos gêneros *Papiliotrema*, *Naganishia* e *Filobasidium* (BRITO et al, 2019, OLIVEIRA et al., 2021). Recentemente, Bermann et al (2022) relataram o isolamento de *Papiliotrema flavescens*, *Naganishia diffluens*, *Filobasidium magnum* e *Naganishia randhawae* de cérebro, pulmão e intestino de *C. livia* hígidos e identificaram que esses fungos expressavam importantes fatores de virulência como cápsula e termotolerância, indicando seu potencial patogênico. Adicionalmente, esses autores destacaram a importância do pombo doméstico como possível disseminador de patógenos fúngicos oportunistas e emergentes.

Embora a etiologia da criptococose em humanos e animais seja comumente causada por espécies dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, é crescente o número de relatos de infecções por espécies oportunistas incluindo *Papiliotrema laurentii* (anteriormente *Cryptococcus laurentii*), *Naganishia albida* (anteriormente *Cryptococcus albidus*), *N. diffluens* (anteriormente *Cryptococcus diffluens*) e *F. magnum* (anteriormente *Cryptococcus magnum*) (MORALES-LÓPEZ e GARCIA-EFFRON, 2021),

Este trabalho é uma continuidade de estudos anteriores e tem por objetivo verificar a presença de espécies de *Cryptococcus* e outras espécies de fungos da classe Tremellomycetes em órgãos e fezes de pombos capturados na zona urbana dos municípios de Pelotas e Rio Grande, Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Columba livia jovens e adultos (n=71) foram capturados na área urbana dos municípios de Pelotas e Rio Grande utilizando rede de neblina. Este projeto foi realizado em parceria com o projeto Fauna parasitária de *Columba livia* (Aves: Columbidae) e todos os procedimentos com os animais foram submetidos à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEUA, processo nº12860-2018) e autorização de SISBIO (processo nº 612352).

Após eutanásia, os animais foram submetidos a necropsia e os órgãos (cérebro e pulmão) foram coletados e armazenados individualmente em freezer a -20°C até o processamento micológico para isolamento fúngico.

Para a pesquisa de *Cryptococcus* e outras espécies de Tremellomycetes em fezes de pombos domésticos, realizou-se a coleta de 30 amostras de fezes, acumuladas em prédios de armazenamento de grãos no porto do município de Pelotas. Aproximadamente 10 gramas de fezes foram armazenadas em frascos estéreis devidamente identificados e imediatamente encaminhadas ao laboratório de micologia (LAbMico/IB/UFPel), para o devido processamento e análise.

Posteriormente, as amostras de órgãos e fezes foram processadas, para se ter o isolamento fúngico. Os fragmentos dos órgãos (cérebro e pulmão) foram macerados e transferidos para tubos tipo falcon contendo 9mL de solução salina, a 0,9% em uma proporção aproximada de 1:9. Os tubos foram agitados por 10 segundos em vórtex e incubados a 37°C em estufa em agitação constante (150 rpm) durante 60 minutos. Após as amostras ficaram em repouso por 15 minutos e uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi semeada em placas de petri contendo ágar niger, em duplicatas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica 25°C durante 10 dias. Para o processamento das amostras de vezes, as excretas foram pesadas (aproximadamente 2 gramas) maceradas e posteriormente transferidas para tubos tipo falcon contendo 18mL de solução salina a 0,18%. Após, a solução foi homogeneizada por agitação em vórtex durante 10 minutos. Posteriormente, as amostras ficaram em repouso por 15 minutos e uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi semeada em placas de petri contendo ágar niger. As placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica, a 25°C, por um período de 3 a 5 dias.

As colônias com características similares às de *Cryptococcus* spp. foram submetidas ao exame direto com tinta da China e analisadas por microscopia óptica. Quando confirmada a presença de células leveduriformes envolvidas por cápsula, as colônias foram repicadas para obtenção de culturas puras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 71 amostras de cérebro e pulmão e de fezes (30) até o momento analisadas, 12 isolados dos órgãos e 8 isolados das fezes apresentaram colônias de coloração amarronzada ou creme em ágar niger com aspecto brilhante e mucóide, sugestivos de colônias de *Cryptococcus* spp.. A análise micromorfológica dessas colônias com tinta da China evidenciou células leveduriformes de morfologia globosa e ovalada, rodeadas por uma cápsula que variou em espessura. Ressalta-se que a identificação em nível de gênero e espécie será realizada por técnicas moleculares, conforme descrito por Bermann et al. (2022). Posteriormente, também serão avaliados os fatores de virulência desses isolados, incluindo produção de melanina, termotolerância, produção de urease e fosfolipase

Previamente, em seu estudo, Bermann et al. (2022) ao analisarem 112 pombos domésticos, obtiveram o isolamento de fungos com características macro e micromorfológicas, similares as descritas no presente estudo, em 11,60% (13/112). Os isolados de Bermann et al. (2022) foram identificados molecularmente como *P. flavescens*, *N. diffluens*, *F. magnum* e *N. randhawae* e expressaram importantes fatores de virulência, incluindo a produção de cápsula e termotolerância.

Adicionalmente, estudos realizados durante a última década têm demonstrado que ambientes ricos em excrementos de pássaros tem um papel relevante na disseminação de *Cryptococcus* do complexo *neoformans* (FARIA et al, 2010; BRITO et al., 2019), bem como de outros fungos patógenos emergentes, incluindo *P. laurentii*, *N. albida* e *P. flavescens* (BRITO et al, 2019, OLIVEIRA et al., 2021), destacando a importância desses animais no contexto da saúde única.

4. CONCLUSÕES

Os resultados parciais deste estudo demonstram que pombos domésticos podem albergar fungos, provavelmente da classe Tremellomycetes, com possível potencial patogênico. Contudo, análises moleculares necessitam ser realizadas para a identificação dos isolados obtidos em nível de gênero e espécie, bem como também será avaliada a expressão de fatores de virulência. Aqui, destaca-se também a importância do pombo doméstico como possível disseminador de patógenos fúngicos oportunistas e emergentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAPO, O. O.; PADAYACHEE, T.; CHEN, W.; KAPPO, A.P.; YU, J.; NELSON, D.R.; SYED, K. Distribution and diversity of cytochrome P450 monooxygenases in the fungal class Tremellomycetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 1-14, 2019.

BERMANN, C. S.; BRAGA, C.Q.; SILVEIRA, J.S.; MILECH, A.; DOS SANTOS, C.C.; IANISKI, L.B.; MACIEL, A.F.; BROD, A.D.; WEIBLEN, C.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B. Tremellomycetes isolated from organs of *Columba livia*. **Medical Mycology**, v. 60, n. 12, 2022.

BRITO, M. O.; BESSA, M.A.S.; MENEZES, R.P.; RÖDER, D.V.D.B.; PENATTI, M.P.A.; PIMENTA, J.P.; DE AGUIAR, P.A.D.F.; PEDROSO, R.S. Isolation of *Cryptococcus* species from the external environments of hospital and academic areas. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, n. 06, p. 545-553, 2019.

CAVALCANTE, F.B.L.; FERREIRA, T.C. Mecanismos de virulência do *Cryptococcus* spp e os desafios no tratamento da criptococose. **Anais do 24º Simpósio de TCC do Centro Universitário ICESP**, v.24, p.645-656, 2022.

FARIA, R.O.; NASCENTE, P.S.; MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; ANTUNES, T.A.; SILVEIRA, E.S.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na Cidade de Pelotas, Estado do Rio Grandedo Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 198-200, 2010.

LABANHARE, L.L.; PERRELLI, M.A.S. Maria Aparecida. Pombos urbanos: Biologia, Ecologia e métodos de controle populacional. **Multitemas**, n.35, p. 225-235, 2007.

LIU, X.Z.; WANG Q.M.; GÖKER M.; GROENEWALD, M.; KACHALKIN, A. V.; LUMBSCH, H.T.; MILLANES, A.M.; WEDIN, M.; YURKOV, A.M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F.Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in mycology**, v. 81, n. 1, p. 85-147, 2015.

MENEZES, T.; SCAIN, G.; DE QUADROS, R.M.; MILETTI, L.C.; SOUZA, A.L.; MIGUEL, R.L.; MARQUES, S.M.T. *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos (*Columba livia*) de áreas públicas de Lages, Santa Catarina. **Science and Animal Health**, v. 2, n. 2, p. 102-14, 2014.

MORALES-LÓPEZ, S.; GARCIA-EFFRON, G. Infections due to rare *Cryptococcus* species. A literature review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 279, 2021.

OLIVEIRA, L. S. S.; PINTO, L.M.; DE MEDEIROS, M.A.P.; TOFFALETTI, D.L.; TENOR, J.L.; BARROS, T.F.; NEVES, R.P.; LIMA NETO, R.G.; MILAN, E.P. PADOVAN, A.C.B.; ROCHA, W.P.S.; PERFECT, J.R.; CHAVES, G.M. 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**, p. 1-17, 2021.