

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
Campus de Araçatuba

MATHEUS JANECK ARAUJO

**CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL DO COMPLEXO DE
ESPÉCIES *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii* NO
INTERIOR DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

Araçatuba
2020

MATHEUS JANECK ARAUJO

**CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL DO COMPLEXO DE ESPÉCIES
Cryptococcus neoformans E *C. gattii* NO INTERIOR DO ESTADO DE
SÃO PAULO, BRASIL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Prof.^a Ass. Dra. Márcia Marinho

**Araçatuba
2020**

J33c

Janeck-Araujo, Matheus

Caracterização ambiental do complexo de espécies
Cryptococcus neoformans e *C. gattii* no Interior do Estado de
São Paulo, Brasil / Matheus Janeck-Araujo. -- Araçatuba, 2020
37 f. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Márcia Marinho

1. *Cryptococcus gattii*. 2. *Cryptococcus neoformans*. 3.
Cryptococcus laurentii. 4. Brasil. 5. árvores. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Cryptococcus*
neoformans E *C. gattii* NO INTERIOR DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

AUTOR: MATHEUS JANECK ARAÚJO

ORIENTADORA: MÁRCIA MARINHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MÁRCIA MARINHO

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. MARIA MARGARETH THEODORO CAMINHAS

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. TATIANE FERREIRA PETRONI

Centro Universitário Toledo / UNITOLEDO - Araçatuba/SP

Araçatuba, 06 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda força e capacidade de entender a ciência dos seus mistérios, por me dar fé e me sustentar em momentos difíceis, principalmente quando as coisas fugiam do meu entendimento e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Agradeço aos meus pais por todo incentivo, apoio e amor.

Agradeço minha esposa pela compreensão, paciência, companheirismo e por ser minha confidente e amiga nos momentos difíceis.

Agradeço a Professora Adjunta Márcia Marinho pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e pela confiança depositada em mim.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-SP, pela estrutura física concedida, assim como apoio da Coordenação, da Biblioteca e da equipe de Pós-Graduação.

Agradeço à equipe do laboratório de Microbiologia e Raiva, a Cilene Vidovix Táparo, aos residentes do programa e ICs, pela paciência, ajuda e amizade, vocês foram essenciais para o andamento dessa pesquisa.

Agradeço ao Instituto Adolfo Lutz de Araçatuba e ao IAL Central pelo treinamento e capacitação para as técnicas que fugiam do meu domínio.

Agradeço ao Professor Adjunto Doutor Marcelo Vasconcelos Meireles pelas instruções e conselhos ao longo da pesquisa, e a sua orientanda Bruna Nicoletti Santana por todo apoio.

Agradeço à Professora Doutora Flávia Lombardi Lopes pela colaboração e apoio ao projeto.

Agradeço aos amigos Amanda Thais Pizani, Erivelto Corrêa de Araújo Junior, Lucas Xavier Bonfietti, Fumiko Miyashita Murai, Tatiane Ferreira Petroni e Felipe Eduardo Scardovelli da Silva por estarem disponíveis a me ajudarem com as dúvidas. E também aos amigos de caminhada, por não me deixar perder o ânimo e o bom humor.

Agradeço ao Centro Universitário Toledo de Araçatuba, por todo o apoio nessa jornada de aprimoramento acadêmico, e a reitora Silvia Cristina de Souza, por todo carinho.

Agradeço aos meus companheiros e amigos do LAC Unitoledo, Kátia Letícia Dias Ferreira, João Pedro Spironeli Santos e Maria Eduarda Basso, por sustentarem a rotina quando eu precisei estar ausente, e aos estagiários dos anos em que estive no programa de mestrado, por se comportarem e serem ótimos colaboradores.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente e que talvez eu tenha esquecido de nomear aqui, todos vocês são especiais.

“A sorte favorece a mente bem preparada.”

Louis Pasteur

JANECK-ARAUJO, M. **Caracterização ambiental do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* no Interior do Estado de São Paulo, Brasil.** 2020. 37 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

A criptococose é uma doença sistêmica causada pela inalação de basidiosporos desidratados de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* presentes no ambiente. Os complexos espécies mais associados à doença são os complexos de espécies *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. O complexo de espécies *C. neoformans* está associado a casos de criptococose em pacientes imunossuprimidos, sendo comumente isolados do solo e de fezes de aves. O complexo de espécies de *C. gattii*, por sua vez, afeta principalmente indivíduos imunocompetentes e geralmente é isolado em espécies de árvores nativas ou exóticas em estado de biodegradação. Este estudo teve como objetivo realizar o mapeamento ambiental de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* em amostras ambientais arbóreas em locais públicos da cidade de Birigui, São Paulo. Para a coleta das amostras, foram selecionadas regiões com maior trânsito neste município. Após processamento, foram realizados testes morfo-fisiológicos, bioquímicos, teste de assimilação de carbono e nitrogênio e PCR URA5 e RFLP com dupla digestão enzimática para caracterização do complexo de espécies/espécie de *Cryptococcus*. Entre fevereiro de 2018 e março de 2019, foram coletadas 100 amostras de diferentes árvores em locais arborizados públicos. A porcentagem de colonização das árvores por *C. gattii* VGII foi de 5%, por *C. neoformans* VNIV de 1% e foram encontrados 6% de *C. laurentii* e 3% de *C. albidus*. Estes resultados sugerem a existência de micro-focos e diversidade de espécies patogênicas de *Cryptococcus* em algumas árvores dos ambientes investigados neste estudo.

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus laurentii*. Brasil. árvores.

JANECK-ARAUJO, M. **Environmental Characterization of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complex in São Paulo state, Brazil.** 2020. 37 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic disease caused by the inhalation of dehydrated basidiospores of pathogenic species of *Cryptococcus* genus present in the environment. The two species complex associated with the disease are the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complex. *C. neoformans* species complex are associated with cases of cryptococcosis in immunosuppressed patients, being commonly isolated from the soil and birds feces. *C. gattii* species complex affects mainly immunocompetent individuals and are often isolated in native or exotic tree species in some state of biodegradation. This study aimed to perform the environmental mapping of pathogenic species of the genus *Cryptococcus* in tree samples of public places of the city of Birigui, São Paulo. For collection, the samples were collected from regions with greater traffic in this city. After processing, morphophysiological, biochemical, carbon and nitrogen assimilation and URA5 PCR and RFLP with double enzymatic digestion tests were performed to characterize the *Cryptococcus* species/species complex. Between february 2018 and march 2019 was collected a total of 100 samples from different trees in public arborized locations. The percentage of tree colonization by the *C. gattii* VGII was 5%, for *C. neoformans* VNIV was 1% and was found 6% of *C. laurentii* and 3% of *C. albidus* species. These results obtained suggests that there are a micro-foci and diversity of pathogenic *Cryptococcus* species in some arboreal environment locations investigated in this study.

Key words: *Cryptococcus gattii*. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus laurentii*. Brazil. trees.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição espacial dos locais das árvores colhidas (pontos azuis) e intensidade de tráfego (verde – leve, amarelo – moderado e vermelho – intenso) da cidade de Birigui – SP.....13
- Figura 2 - A – Associação entre os resultados do total de amostras colhidas pelo total de espécie de árvores; B – Associação entre o total de amostras colhidas e o total de isolados por família das árvores; C – Associação entre isolados do Complexo de espécies *C. gattii*, *C. neoformans* e espécies *C. laurentii* e *C. albidus* por espécie de árvore.....19
- Figura 3 - A – Associação entre o total de amostras colhidas e de isolamentos pela procedência do material; B – Associação entre isolamentos do Complexo de espécies *C. gattii*, *C. neoformans* e espécie *C. laurentii* e *C. albidus* por procedência do material; C – Associação entre o total de amostras colhidas e total de isolamentos por estação; D – Associação entre os isolamentos do Complexo de espécies *C. gattii*, *C. neoformans* e espécie *C. laurentii* e *C. albidus* por estação climática.....20
- Figura 4 - Distribuição espacial das amostras colhidas e espécie/complexo de espécie, identificadas segundo sua caracterização fenotípica.....21
- Figura suplementar 1 - Captura do gel de eletroforese relativo as amostras positivas para *C. gattii* VGII, *C. neoformans* VNIV e *C. laurentii*. Da esquerda para direita: M: Marcador Molecular 100 bp (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, BR), controles positivos VNIV (WM629), VGII (WM178) e VGIV (WM779), amostras A14.N1.2, A24.S2.2, A35.N1.1, A48.N3.4, A61.S3.1 e A83.S3.3; controle *C. laurentii* (LAU), amostras A33.N1.1, A42.N1.1, A50.N1.1, A54.N3.1, A61.N2.2 e A81.N2.1.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Complexo de espécie <i>C. neoformans</i> , <i>C. gattii</i> e espécies <i>C. laurentii</i> e <i>C. albidus</i> , espécie e família da árvore das amostras colhidas.....	18
Tabela suplementar 1 - Tabela adaptada (Sidrim, 2004; Fonseca; Boekhout; Fell, 2011) com perfis descritos na literatura para espécies de <i>Cryptococcus</i> de interesse clínico. +: Positivo, -: Negativo, V: Variável, F: Fraco, NA: Não Analisado, CAP: Cápsula, U: Urease, Termo: Termotolerância a 37°C, CGB: Meio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol.....	31
Tabela suplementar 2 - Amostras colhidas segundo sua localização (endereço), geolocalização, temperatura ambiente (T °C), espécie da árvore e procedência do material colhido.....	31
Tabela suplementar 3 - Tabela com resultados das análises bioquímicas realizadas por amostra.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 Coleta das Amostras.....	14
2.2 Processamento das Amostras.....	14
2.3 Cultivo das Amostras.....	14
2.4 Identificação Fenotípica.....	15
2.5 Caracterização molecular.....	16
2.6 Testes estatísticos.....	17
3 RESULTADOS.....	17
4 DISCUSSÃO.....	21
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica, que afeta humanos e animais, principalmente mamíferos, manifestando-se raramente em pássaros. No homem sua manifestação mais frequente é a meningoencefalite, enquanto nos animais pode apresentar quadros diversos, como infecção de cavidade nasal, pulmões, olhos, pele e sistema nervoso central.^{1,2}

A infecção ocorre pela inalação de basidiósporos de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*.³ Essas células podem se manter dormentes por muito tempo, e ativadas posteriormente, afetando tanto indivíduos imunocompetentes como imunossuprimidos.^{4,5} Estima-se que ocorra 223,100 casos humanos anualmente no mundo, com uma taxa de mortalidade de 81%.⁶

Os principais agentes infecciosos pertencem aos complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, podendo haver outras espécies do gênero capazes de causar criptococose, porém ainda carente de casos relatados até o presente momento.⁷

Apesar da revisão taxonômica atual, com base em análise filogenética de cepas isoladas de vários locais do mundo propor a separação da espécie *C. gattii* e *neoformans* em cinco e duas diferentes espécies, respectivamente,⁸ é reconhecido que essas “novas” espécies pertencem a dois complexos de espécies, cada qual composto por quatro tipos moleculares maiores, sendo VNI, VNII, VNIII e VNIV pertencente ao complexo de espécies *C. neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV ao complexo de espécies *C. gattii*.⁹

Os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* atuam em seus hospedeiros de formas distintas.⁵ As infecções causadas pelo complexo de espécies *C. neoformans* são oportunistas, urbanas e geralmente associadas a condições de imunossupressão,¹⁰ enquanto que, às relacionadas ao complexo *C. gattii* ocorrem com maior frequência em áreas tropicais e subtropicais, apresentando manifestações pulmonares, se comportando como agente infeccioso primário em hospedeiros imunocompetentes, ambas podendo se generalizar com curso fatal.³

Apesar de não haver a necessidade de um hospedeiro para sua sobrevivência¹¹ é necessário que se faça a consideração que não somente os isolados ambientais são importantes, mas também de animais. A criptococose acomete uma grande gama de seres vivos,^{1,12} e tanto animais silvestres como os de companhia são importantes sentinelas para indicadores de risco humano, por estarem sempre em contato com o

ambiente.¹³ Possivelmente animais e humanos são infectados pelos mesmos focos naturais, e apesar de não haver até o presente momento relato de transmissão mamífero-mamífero,¹² destaca-se a permanência e viabilidade do fungo no ambiente, como a sua disseminação pela ação do vento, carreando os propágulos para outras excretas adjacentes e presentes no solo, considerando-se assim fatores relevantes à formação de microfocos e à ampliação dos riscos de contaminação ambiental.¹⁴

Em seu *habitat* na natureza, as espécies do gênero *Cryptococcus* podem ser encontradas em diversos substratos orgânicos de forma saprofítica, estando frequentemente relacionado a ricas fontes de nitrogênio.¹⁵ As espécies do complexo *C. neoformans* estão mais associadas à excretas secas de aves e solo, também sendo relatada em guano de pombos de regiões urbanizadas, morcegos e em pássaros em cativeiros.^{16,17,18,19} Diferentemente do complexo de espécies *C. neoformans*, o complexo *C. gattii* é associado a materiais de origem vegetal em decomposição, cascas, flores e folhas de árvores, sendo isolado em diversas espécies arbóreas em diferentes países.^{15,6,20}

Estudos realizados após os surtos ocorridos em 2000, no Canadá, sugerem que as distribuições ambientais globais desses complexos de espécies estejam sofrendo alterações, porém a falta de isolados ambientais impossibilita que uma predição fidedigna seja realizada.¹³

A caracterização do complexo de espécies distribuídas no ambiente é importante para profilaxia e prevenção de surtos, visto que a infecção ocorre através da inalação do patógeno disposto no meio e cada complexo de espécies age de forma distinta em seu hospedeiro.^{6,11} A diferenciação dos tipos moleculares é necessária para verificação dos padrões complexos de espécies, assim possibilitando um maior entendimento de sua distribuição geográfica, acometimentos clínicos em humanos e animais, e posteriormente, possibilitando melhor entendimento dos possíveis genes de virulência e resistência a drogas.^{16,5} Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar o mapeamento ambiental de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* em amostras ambientais arbóreas de locais públicos com maior trânsito na cidade de Birigui, São Paulo.

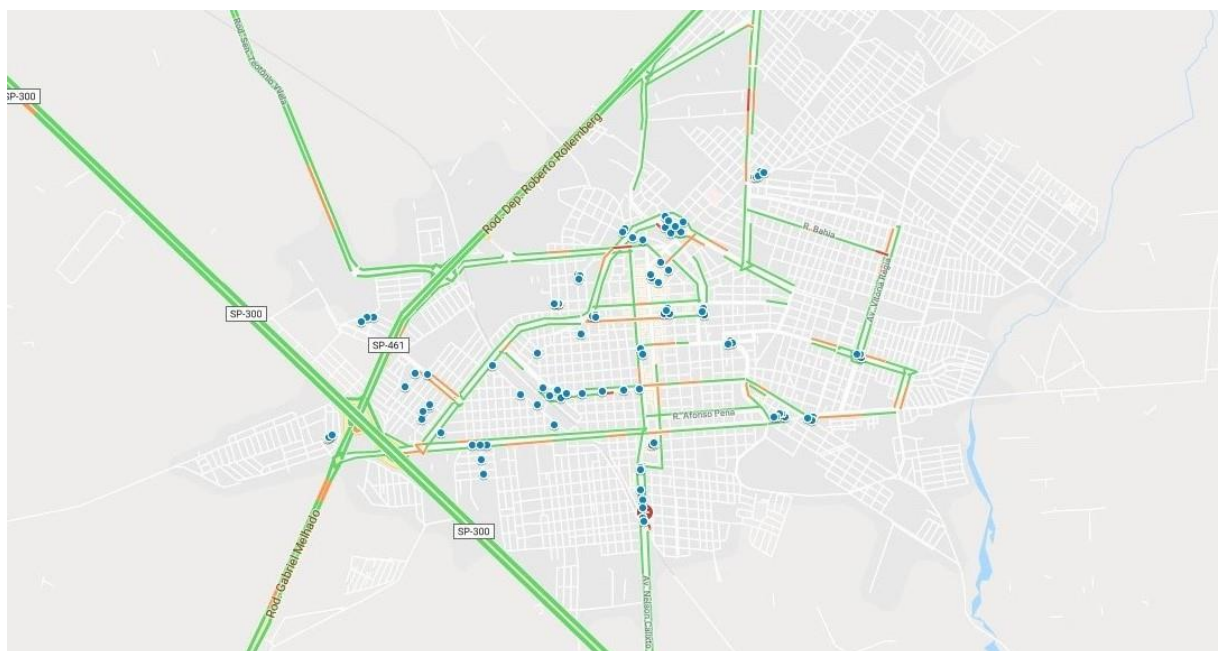
2 MATERIAL E MÉTODOS

Birigui é um município situado na região noroeste do estado de São Paulo. Está localizada geograficamente a uma latitude de 21° 16' 53" sul e longitude 50° 19' 35" oeste, estando a 11 quilômetros da cidade de Araçatuba e a 521 quilômetros da capital, encontrando-se a 400 metros acima do nível do mar, com uma população de 117.143 habitantes, de acordo com a estimativa do IBGE/2013-14.²¹ Seu clima é tropical, com eventuais secas no inverno, com média pluvial de 1229mm e média de temperatura anual de 23.6°C.²²

Para definição dos locais de coleta, foi utilizado o mapa geográfico do município, considerando seu perímetro urbano, em locais não protegidos, como praças, parques e canteiros de avenidas. Para determinação das áreas de fluxo expressivo de pessoas foi utilizado a ferramenta “trânsito” no Google Maps®.

Após a determinação de pontos de interesse, os locais foram analisados *in loco* quanto as árvores disponíveis no local, analisando a condição e conservação das mesmas. Árvores mais antigas, com ocos, material em decomposição e fissuras foram incluídas para amostragem.

Figura 1 - Distribuição espacial dos locais das árvores colhidas (pontos azuis) e intensidade de tráfego (verde – leve, amarelo – moderado e vermelho – intenso) da cidade de Birigui – SP.



Fonte: Mapa adaptado do Google Maps ®

2.1 Coleta das Amostras

Foram coletadas 100 amostras ambientais arbóreas procedentes de ocos, cascas, matéria em decomposição e fragmentos de troncos, utilizando curetas estéreis para a raspagem do material. As amostras foram armazenadas para transporte em frascos estéreis tipo coletor universal com tampa rosqueável, para posteriormente processamento.

A identificação de família, gênero e espécies das árvores incluídas na pesquisa foram realizadas previamente pelos aplicativos móveis *PictureThis* e *PlantNet*, e posteriormente na Secretaria Ambiental de Araçatuba.

2.2 Processamento das Amostras

As amostras foram processadas em capela de fluxo laminar, onde o material coletado foi homogeneizado e separado uma alíquota de 1g, que foi macerada utilizando gral e pistilo estéreis. Após este processo, o macerado foi transferido para um frasco *Erlenmeyer* com 50 mL de solução salina 0,9% estéril com cloranfenicol (400 µg/mL). O preparado foi vedado e agitado vigorosamente por meio de um vortex, por 5 minutos, sendo deixado posteriormente em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, 10 mL do sobrenadante foi transferido para tubos e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, foi desprezado 9 mL do sobrenadante, e o volume restante homogeneizado com o sedimento.

2.3 Cultivo de Amostras

Foram semeados *Drigalski*, 100µL do volume homogeneizado, em uma placa de Petri contendo meio ágar semente de Níger (NSA),²³ depois esgotando o conteúdo para mais duas placas com o mesmo meio. O mesmo procedimento foi realizado, com alça flambada, em tubos contendo ágar *Sabouraud* dextrose (SDA) com cloranfenicol. Todos os meios inoculados foram incubados por 5 dias a uma temperatura de 25°C (adaptado de Fiocruz²⁴).

As colônias de texturas cremosas, de pigmentação bege ou marrom foram repicadas em placas NSA, até a obtenção de colônias puras. Posteriormente, estas

foram repicadas em SDA para identificação e manutenção da amostra. Todas amostras foram coradas por tinta nanquim e lactofenol-azul-algodão para identificação presuntiva do gênero *Cryptococcus*.

2.4 Identificação fenotípica

As colônias características para *Cryptococcus* spp. foram semeadas em tubos contendo ureia-ágar-base,²⁵ incubadas a 25°C, sendo observadas diariamente por 5 dias.

Para prova de termotolerância, as amostras foram semeadas em tubos contendo SDA e incubadas a 37°C por 7 dias,^{26,27} analisando seu desenvolvimento diariamente.

As amostras positivas para as provas de urease e termotolerância foram semeadas em meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol),²⁸ para diferenciação presuntiva do complexo de espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Os isolados foram repicados e incubados a 25°C por até cinco dias, sendo observado diariamente a coloração do meio. Foram utilizadas as cepas WM148 (*C. neoformans* VNI) e WM178 (*C. gattii* VGII) como controles positivos do meio.

Também foram realizadas as provas de assimilação de carbono e nitrogênio, utilizando meios sólidos específicos²⁹. Para a prova de assimilação de carbono utilizou-se a glicose (controle positivo), sacarose, lactose, galactose, rafinose, inositol, xilose, celobiose, trealose, dulcitol, maltose e melibiose, e como fonte de nitrogênio, utilizou-se o nitrato de potássio e a peptona bacteriana (controle positivo). Foram utilizadas as tabelas de Sidrim³⁰ e Fonseca, Boekhout e Fell³¹ adaptadas ao estudo como padrão de comparação (Apêndice - Tabela Suplementar 1). As cepas WM148 (*C. neoformans* VNI), WM626 (*C. neoformans* VNII), WM178 (*C. gattii* VGII) e *C. laurentii* (C) foram utilizadas como controles.

Independentemente do resultado apresentado aos testes de assimilações, todas as amostras que apresentaram características morfo-fisiológicas e bioquímicas compatíveis aos complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* prosseguiram para caracterização molecular.

2.5 Caracterização molecular

As amostras foram repicadas em SDA por 48 horas a 25°C, e prosseguiram para extração de DNA e PCR-RFLP conforme descrito por Martins e colaboradores³² com algumas modificações. Após o crescimento, foi transferido uma porção das colônias para um microtubo contendo 1mL de EDTA 50mM, que foi centrifugado a 10.000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 200µL de EDTA 50mM pH 8,0 com 40µL de enzima lítica de *Trichoderma harzianum* (60mg/mL), sendo posteriormente homogeneizado por vortex e incubado em banho-maria por 30 minutos a 37°C. Após decorrido o tempo de incubação, a amostra foi centrifugada a 8 minutos por 10.000 rpm e desprezado o sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 300µL de solução tampão de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM, EDTA pH 8,0 10mM, SDS 0,5%, N-laurilsarcozyl 0,01% e proteinase K 110µg/mL), homogeneizado em vortex e incubado a 56°C por 30 minutos em banho-maria. Após decorrido o tempo, a amostra foi centrifugada por 8 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante transferido para outro microtubo. Foi adicionado 300µL de solução clorofórmio/isopropanol (24:1) ao sobrenadante, que foi agitado manualmente e centrifugado por 8 minutos a 10.000 rpm. Foi pipetado o sobrenadante aquoso em outro microtubo, adicionado 400µL de isopropanol e centrifugado por 8 minutos a 10.000 rpm. Após essa etapa, foi desprezado o sobrenadante, adicionado 300µL de etanol 70% e centrifugado por 8 minutos a 10.000 rpm. Por fim, foi desprezado o sobrenadante e o microtubo com DNA deixado na capela de fluxo “overnight” para total evaporação do etanol 70%. O DNA foi eluído em 20µL de H₂O para PCR.

Após a eluição, o DNA foi quantificado e analisado quanto sua pureza, e posteriormente a concentração das amostras foram ajustadas para 50 ng/µL.

Após a padronização das amostras, foram utilizados dois *primers* específicos para os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo as sequências utilizadas: URA5 (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC G 3') e SJ01 (5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3'). Foi adicionado a cada microtubo 1µL de amostra ou controle e 24µL do preparado *Mastermix* - GoTaq® Green Master Mix (Promega), *primers* (25 pM) URA5 e SJ101, água destilada estéril - que seguiram para a termocicladora. O perfil de termociclagem das amostras foi constituído de 37 ciclos, sendo um ciclo de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos composto por 3 etapas (94°C por 45 segundos, 63°C por 60 segundos e 72°C por 1 minuto) e uma extensão final de 72°C

por 10 minutos. Os fragmentos das amostras e controle foram analisados em gel de agarose 2%, visualizadas com a utilização de um transiluminador de luz ultravioleta.

Após a amplificação dos fragmentos, os produtos de PCR foram digeridos duplamente pelas enzimas de restrição *Sau96I* e *HhaI* a 37°C por 3 horas para determinação dos tipos moleculares, e uma nova visualização de bandas foi realizada em gel de agarose 2%. Os padrões de comparação foram as amostras controles WM148 (VNI/AFLP1), WM626 (VNII/AFLP1A), WM628 (VNIII/AFLP2), WM629 (VNIV/AFLP3), WM179 (VGI/AFLP4), WM178 (VGII/AFLP6), WM175 (VGIII/AFLP5) e WM779 (VGIV/AFLP7)³.

2.6 Testes estatísticos

As variáveis foram analisadas utilizando o teste Qui-quadrado e estatística descritiva para amostras coletadas e positivas para espécie e família da árvore, estações do ano e procedência do material coletado foi utilizado. Para a associação dos resultados referentes a ao complexo de espécies/espécies, árvores e procedência do material coletado utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Foi adotado em ambos os testes o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), os gráficos e cálculos foram realizados no programa *GraphPad Prism*® 8.

3 RESULTADOS

No período de sete de fevereiro de 2018 à nove de março do 2019 foram colhidas 100 amostras em diversos pontos da cidade de Birigui. Os resultados obtidos revelam que das amostras processadas foram obtidas 6 amostras *C. laurentii*, 5 amostras *C. gattii* VGII e 1 amostra *C. neoformans* VNIV identificadas por meio molecular (Apêndice – Figura suplementar 1), e 3 amostras *C. albidus* por meio de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio (Tabela 1). O teste de assimilação de carbono para as amostras *C. gattii* VGII e *C. neoformans* VNIV assimilaram diferentes fontes do que indicado na tabela de comparação. As amostras *C. laurentii* mantiveram o perfil descrito, com exceção das amostras A33.N3.1, A50.N1.1, A61.N2.2 e A81.N2.1 que demonstraram uma fraca assimilação de nitrato de potássio. As amostras A35.N1.1, A38.N1.7 e A91.N2.2 foram caracterizadas como *C. albidus*

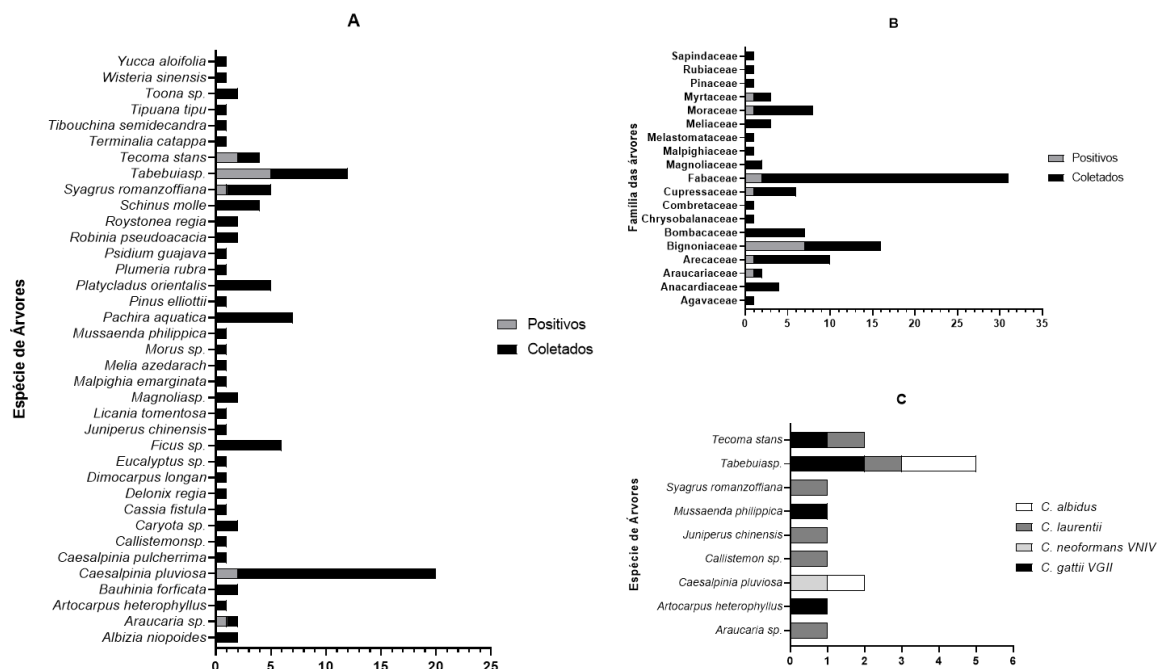
pelo perfil demonstrado no teste de assimilação de carbono e nitrato (Apêndice - Tabela suplementar 1 e 3).

Tabela 1 - Complexo de espécie *C. neoformans*, *C. gattii* e espécies *C. laurentii* e *C. albidus*, espécie e família da árvore das amostras colhidas.

Amostra	Espécie/ Tipo molecular	Estação	Árvore	Família da Árvore
A14.N1.2	<i>C. gattii</i> VGII	Outono	<i>Tecoma stans</i>	Bignoniaceae
A24.S2.2	<i>C. neoformans</i> VNIV	Outono	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Fabaceae
A33.N1.1	<i>C. laurentii</i>	Outono	<i>Tecoma stans</i>	Bignoniaceae
A35.N1.1	<i>C. albidus</i>	Outono	<i>Tabebuia</i> sp.	Bignoniaceae
A35.N1.2	<i>C. gattii</i> VGII	Outono	<i>Tabebuia</i> sp.	Bignoniaceae
A38.N1.7	<i>C. albidus</i>	Outono	<i>Tabebuia</i> sp.	Bignoniaceae
A42.N1.1	<i>C. laurentii</i>	Inverno	<i>Syagrus romanzoffiana</i>	Arecaceae
A48.N3.4	<i>C. gattii</i> VGII	Inverno	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Moraceae
A50.N1.1	<i>C. laurentii</i>	Inverno	<i>Callistemon</i> sp.	Myrtaceae
A54.N3.1	<i>C. laurentii</i>	Inverno	<i>Araucaria</i> sp.	Araucariaceae
A61.N2.2	<i>C. laurentii</i>	Inverno	<i>Tabebuia</i> sp.	Bignoniaceae
A61.S3.1	<i>C. gattii</i> VGII	Inverno	<i>Tabebuia</i> sp.	Bignoniaceae
A81.N2.1	<i>C. laurentii</i>	Verão	<i>Juniperus chinensis</i>	Cupressaceae
A83.S3.3	<i>C. gattii</i> VGII	Verão	<i>Mussaenda philippica</i>	Rubiaceae
A91.N2.2	<i>C. albidus</i>	Verão	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Fabaceae

Os dados completos das amostras, local da coleta, geolocalização, temperatura ambiente no dia da coleta (valor aproximado), espécie da árvore e a procedência do material encontram-se apresentados no Apêndice - Tabela Suplementar 2. A associação entre os resultados expressos para a espécie de *Cryptococcus* e o total de amostras coletadas por família das árvores não apresentou diferença significativa ($p=0,14$), porém, quando analisado somente entre as famílias das árvores com isolamentos positivos para espécies de *Cryptococcus* houve diferença significativa ($p=0,026$), tendo a família Bignoniaceae 46,6% do total de isolamentos positivos. Também não houve diferença estatística quando analisado o total de espécies de árvores coletadas pelo total de isolamentos, e somente entre as espécies de árvores com isolamentos positivos ($p=0,14$ e $p=0,065$ respectivamente), nem predileção entre as espécies analisadas por uma família ($p=0,26$) ou espécie ($p=0,12$) em específico (Figura 2).

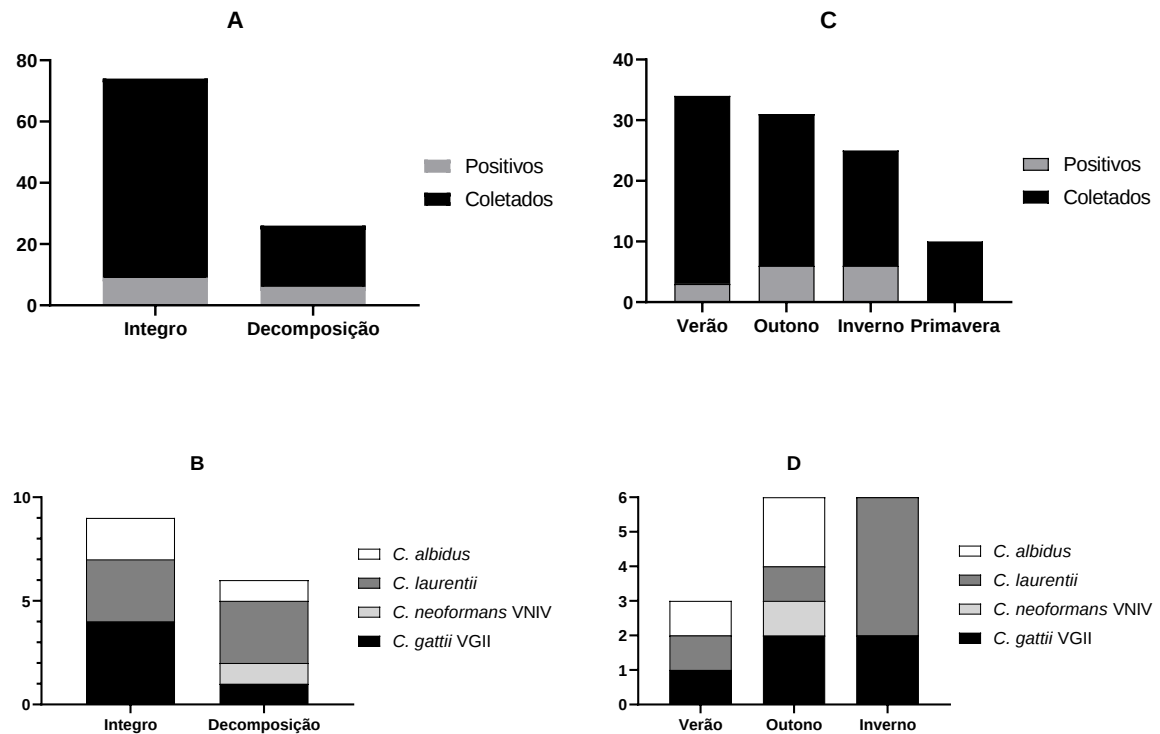
Figura 2 - A – Associação entre os resultados do total de amostras colhidas pelo total de espécie de árvores; B – Associação entre o total de amostras colhidas e o total de isolados por família das árvores; C – Associação entre isolados do Complexo de espécies *C. gattii*, *C. neoformans* e espécies *C. laurentii* e *C. albidus* por espécie de árvore.



Fonte: Elaborado pelo autor

Quanto as estações do ano, a comparação entre o total de isolados e a estação climática ($p=0,184$), verificou-se que a maioria das amostras positivas para espécies de *Cryptococcus* foram isoladas durante o inverno e outono (80% do total de positivos), com a temperatura inferior a 20°C. Com relação a associação entre a procedência do material coletado e quantidade total de isolados não houve diferença estatística entre os dados analisados ($p=0,30$), bem como a predileção por espécies de *Cryptococcus* por material ($p=0,31$) ou estação ($p=0,25$) em específico, como demonstrado na Figura 3.

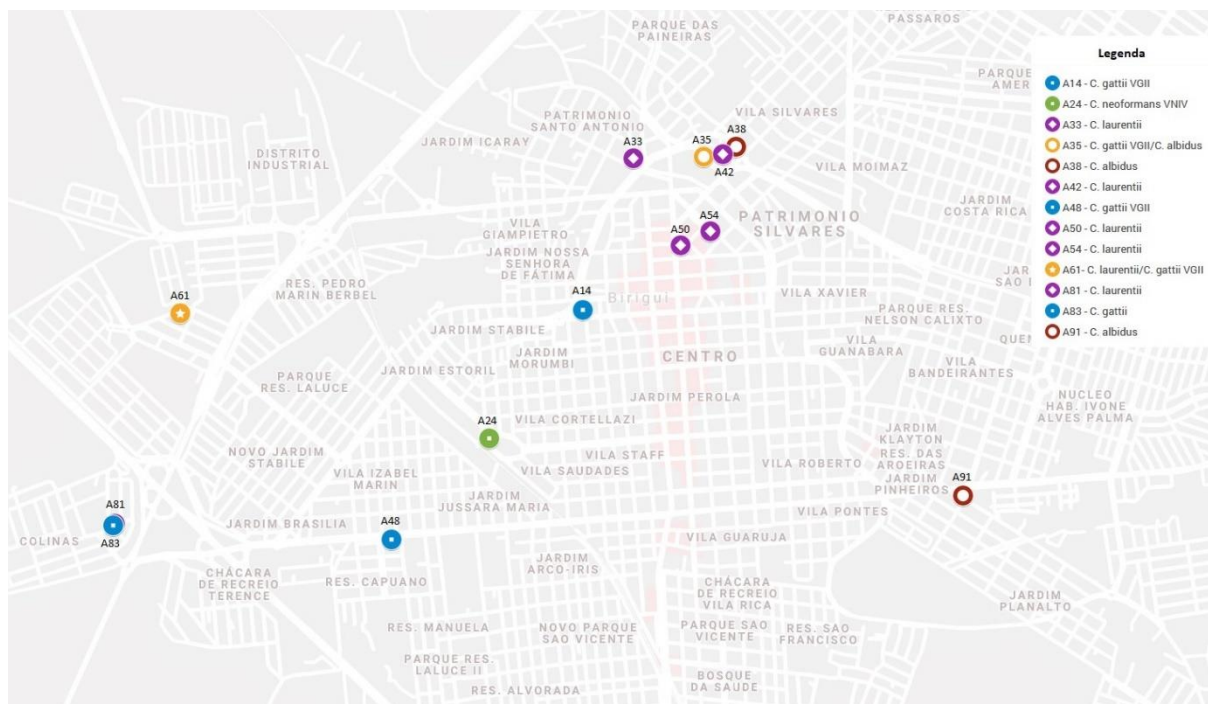
Figura 3 - A – Associação entre o total de amostras colhidas e de isolamentos pela procedência do material; B – Associação entre isolamentos do Complexo de espécies *C. gattii*, *C. neoformans* e espécie *C. laurentii* e *C. albidus* por procedência do material; C – Associação entre o total de amostras colhidas e total de isolamentos por estação; D – Associação entre os isolamentos do Complexo de espécies *C. gattii*, *C. neoformans* e espécie *C. laurentii* e *C. albidus* por estação climática.



Fonte: Elaborado pelo autor

A distribuição espacial dos isolamentos pode ser observada na Figura 4. Nota-se que 4 amostras positivas foram isoladas no Parque do Povo, sendo isolada da amostra A35 duas espécies distintas (*C. gattii* VGII e *C. albidus*), 2 na Capela São João Batista e 2 isolamentos provenientes da amostra A61 (*C. gattii* VGII e *C. laurentii*) da Praça Beatriz Calixto Sanches. As outras amostras positivas (n=7) foram amostras únicas para sua localização.

Figura 4 - Distribuição espacial das amostras colhidas e espécie/complexo de espécie, identificadas segundo sua caracterização fenotípica.



Fonte: Mapa adaptado do Google Maps®.

4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstrados neste trabalho obtiveram uma quantidade ligeiramente maior de isolados positivos para o número de amostras ambientais coletadas, geralmente em torno de 10%, conforme consta na literatura,^{11,33} mas assemelha-se aos dados expressos por Araújo-Júnior e pesquisadores em Araçatuba,³⁴ apesar de não serem cidades endêmicas para casos de criptococose, como observado no norte e nordeste do Brasil.³⁵

Vale salientar que o isolamento de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* do ambiente geralmente é custoso, visto a quantidade de micro-organismos que fazem parte do microbiota natural das árvores, principalmente fungos filamentosos de crescimento rápido, não favorecendo a visualização das colônias leveduriformes, podendo levar a resultados falso-negativo.^{36,37}

Em relação às espécies de árvores coletadas, os resultados apresentados corroboram com outros trabalhos, atestando que os complexos de espécies *C. gattii* e *C. neoformans* não associam-se diretamente a uma espécie específica de árvores,³⁸ mas sim a biodegradação natural de compostos orgânicos e madeira.³⁶ Porém, cada

complexo de espécies se comporta de forma diferente, como o complexo de espécies *C. neoformans* estando mais associado a excretas de aves, morcegos e solo,^{16,17} diferentemente do complexo de espécies de *C. gattii* que encontra-se presente na poeira, folhas, frutos, plantas e insetos,¹³ e a espécie *C. laurentii* em vegetais, leite e também em excretas de pássaros.³⁹

Outra consideração importante é que as localizações dos isolamentos configuram um micro-nicho, indicando que os isolados positivos tendem a aparecerem próximos uns dos outros. Sugere-se que as diferenças geográficas são relevantes quanto sua dispersão e manutenção no ambiente,⁴⁰ porém a baixa quantidade de isolamento ambiental em relação aos isolamentos clínicos e a subnotificação de casos atrapalham os estudos sobre a expansão e distribuição dessas espécies no ambiente.^{41,4}

O clima e a estação do ano também se mostraram fatores relevantes, apesar de haverem poucos estudos climatológicos junto ao estudo de isolamento de *Cryptococcus*.¹³ As espécies patogênicas possuem uma grande resistência a diferentes variâncias de temperaturas, como os 42°C da temperatura corpórea dos pássaros⁴² e as próximas a 0°C do inverno canadense.¹³ Porém é reconhecido que os diferentes tipos moleculares possuem diferentes requerimentos climáticos na natureza para o favorecimento de sua manutenção no ambiente,⁴³ essas variações podem interferir, inclusive, no seu isolamento ambiental.¹¹ Há também as alterações climáticas observadas nos últimos anos, como aquecimento global e *El Niño*, sendo fatores que podem estar diretamente ligados ao aparecimento de surtos em países onde a criptococose anteriormente era rara, como no Canadá.¹³

Algumas cepas catalogadas no Brasil são consideradas mais conservadas geneticamente, sugerindo que a Amazônia seja o berço das espécies patogênicas do gênero.⁴⁴ Outros autores encontraram grande diversidade genética em seus isolados em diversos estados do país. As distribuições dos tipos moleculares no Brasil são heterogênicas,⁴⁵ diferente dos perfis encontrados em outras partes do mundo, onde somente há menor diversidade de espécies,⁴⁶ possivelmente devido ao porte continental do país. No Brasil, os tipos moleculares mais prevalentes em criptococose são VNI para imunossuprimidos e VGII para imunocompetentes.³⁵ *C. gattii* VGII tem sido relacionado aos surtos ocorridos na ilha de Vancouver, considerado um dos tipos mais virulentos entre o complexo de espécie¹³, sendo esse o único tipo molecular de *C. gattii* encontrado neste trabalho, na cidade de Birigui. O tipo molecular VNIV é um

dos menos estudados, por haver poucos isolamentos ambientais e clínicos, sua prevalência está mais ligada ao continente europeu, tendo poucos isolados no Brasil¹⁰. Já os casos de criptococose por outras espécies, como *C. laurentii* e *C. albidus*, são pouco diagnosticados e a falta de padronização nos diagnósticos e tratamentos faz com que haja poucos relatos de casos na literatura.³⁹ Vale salientar que no passado, o complexo de espécies *C. gattii* também era subnotificado em relação ao *C. neoformans*, até ser considerado um patógeno importante mundialmente, havendo, recentemente, um aumento de relatos de casos de criptococoses relacionadas a outras espécies de *Cryptococcus* não *gattii-neoformans*, principalmente em pacientes imunossuprimidos.⁴⁷

Os resultados revelaram que cepas de *C. albidus* apresentam um perfil bioquímico similar ao *C. neoformans* e *C. laurentii* ao *C. gattii*, sendo somente identificados e caracterizados com a associação das provas de assimilação dos açúcares, nitrogênio e PCR. Recentemente vem sendo notificados casos de cepas híbridas, com mudanças nos padrões dos fragmentos do gene URA5 devido a mutações.⁴⁸ O padrão encontrado em nossas amostras de *C. laurentii* apresentaram perfil idêntico aos relatados por Andrade-Silva e colaboradores,^{49,50} sendo essas as únicas pesquisas encontradas que utilizaram a técnica de PCR-RFLP com o *primer* URA5 e dupla digestão de enzimas para essa espécie. Diferentemente do comportamento expresso pelo *C. albidus* o qual não apresentou resultado com o *primer* URA5, sendo identificado pelos testes tradicionais, como a assimilação de açúcares e nitrogênio. O uso de técnicas moleculares contribui sobremaneira para a identificação das cepas, para melhor compreensão da eco epidemiologia, da patogenicidade e da diversidade de espécies, bem como da variabilidade genética que compõem o gênero *Cryptococcus*. No entanto, devido à grande diversidade de espécies a associação entre técnicas moleculares com as tradicionais é de suma importância na identificação correta da espécie, principalmente quando se tratam de amostras clínicas⁵¹ Estudos futuros, serão necessários para melhor elucidação do perfil filogenético e patogenia, como o perfil de resistência à antifúngicos, MALDI-TOF e MLST.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi realizado o mapeamento de amostras ambientais arbóreas pertencentes ao complexo de espécies *C. gattii* e *C. neoformans*, bem como das espécies *C. laurentii* e *C. albidus*, provenientes da cidade de Birigui. As cepas de *C. laurentii* apresentaram características bioquímicas similares as cepas e padrões *C. gattii*, e as cepas *C. albidus* as de *C. neoformans*. Não houve associação entre os fatores espécie de árvore, estação do ano e procedência do material coletado a uma determinada espécie de *Cryptococcus*. Devido à complexidade e a diversidade das espécies que compõem o gênero, a associação entre técnicas tradicionais e moleculares é de vital importância para a identificação e caracterização das espécies.

REFERÊNCIAS

- 1 - Refai MK, El-Hariri M, Alarousy R. Cryptococcosis in Animals and Birds: A Review. *European Journal of Academic Essays*. 2017;4:202-223.

- 2 - Yan Z, Li X, Xu J. Geographic Distribution of Mating Type Alleles of *Cryptococcus neoformans* in Four Areas of the United States. *J Clin Microbiol*. 2002;40:965-972.

- 3 - Brito-Santos F, Barbosa GG, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B, Meyer W, et al. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. *PLoS ONE*. 2015;10:e0115866.

- 4 - Sun S, Priest SJ, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mating and genetic crosses. *Curr Protoc Microbiol*. 2019;e75.

- 5 - Maruyama FH, Jesus de Paula DA., Menezes IG, Favalessa OC, Hahn RC Ferreira de Almeida AB, et al. Genetic Diversity of the *Cryptococcus gattii* Species Complex in Mato Grosso State, Brazil. *Mycopathologia*. 2019;184: <https://doi.org/10.1007/s11046-018-0313-2>

- 6 - Bentes AS, Wanke B, Lazéra MS, Freire AK, Silva Júnior RM, Rocha DF, et al. *Cryptococcus gattii* VGII isolated from native forest and river in Northern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2019;50: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00066-6>

- 7 - Hagen F, Jensen RH, Meis JF, Arendrup MC. Molecular epidemiology and *in vitro* antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato* isolates from Denmark. *Mycoses*. 2016;59:576-584.

- 8 - Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolečka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015;78:16–48.

- 9 - Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere*. 2017;2:e00357-16.

- 10 - Andrade-Silva LE, Ferreira-Paim K, Ferreira TB, Vilas-Boas A, Mora DJ, Manzato VM, et al. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. *PLoS ONE*. 2018;13:e0193237.

- 11 - Gerstein AC, Nielsen K. It's not all about us: evolution and maintenance of *Cryptococcus* virulence requires selection outside the human host. *Yeast*. 2017;34:143–154.

- 12 - Singh K, Ilkit M, Shokohi T, Tolooe A, Malik R, Deyedmousavi. Cryptococcosis: Emergence of *Cryptococcus gattii* in Animals and Zoonotic Potential. In: Seyedmousavi S., de Hoog G., Guillot J., Verweij P. (eds) *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*. Springer; 2018.

- 13 - Acheson ES, Galanis E, Bartlett K, Mak S, Klinkenberg B. Searching for clues for eighteen years: Deciphering the ecological determinants of *Cryptococcus gattii* on Vancouver Island, British Columbia. *Med Mycol*. 2018;56:129–144.

- 14 - Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 1999;147:59-60.

- 15 - Watkins EA, King JS, Johnston SA. Nutritional Requirements and their importance for virulence of pathogenic *Cryptococcus* Species. *Microorganisms*. 2017;5(65): doi:10.3390/microorganisms5040065

- 16 - Vieille P, Cruz R, Léon P, Cáceres N, Giusiano G. Isolation of *Cryptococcus gattii* VGIII from feline nasal injury. *Med Mycol Case Reports*. 2018;22:55–57.

- 17 - Colombo G, Táparo CV, Araújo-Júnior EC, Makatu MY, Santos FS, Marinho M. Caracterização bioquímica e molecular de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas

ambientais de pombos (*Columba livia domestica*). Arq Bras Med Vet Zootec. 2015;67:1639-1645.

18 - Tencate LN, Táparo CV, Carvalho C, Bosco SM, Queiroz LH, Silva DC, et al. Estudo da microbiota fúngica gastrointestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da região noroeste do estado de São Paulo: potencial zoonótico. Braz J Vet Res Anim Sci. 2012;49:146-152.

19 - Filiú WF, Wanke B, Agüena SA. Cativieiros de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:591-595.

20 - Herkert PF, Hagen F, Pinheiro RL, Muro MD, Meis JF, Queiroz-Telles F. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries. J Fungi. 2017;3(62): doi:10.3390/jof3040062

21 - Portal do município de Birigui. Portal da prefeitura do município de Birigui. 25 ago. 2018: <http://www.birigui.sp.gov.br/birigui/cidade/dados.php>

22 - CEPAGRI. Centro de pesquisas meteorológicas e climáticas aplicadas a agricultura. 25 ago. 2016: http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_074.html

23 - Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. Med Mycol. 2005;43:67-71.

24 - Fiocruz. Metodologias padrão para a rede de criptococose Brasil – RCB. In: Third international course on molecular methodologies for epidemiology and diagnosis of systemic mycoses. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2015.

25 - Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J Bacteriol. 1946;52:461–466.

- 26 - Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 2003;5:667–675.
- 27 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013.
- 28 - Kwon-chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J Clin Microbiol.* 1982;15:535-537.
- 29 - Lacaz CS, Porto E, Martins JE, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia médica. 9rd ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- 30 - Milan EP, Zaror L. Leveduras: Identificação Laboratorial. In: Sidrim, JJ; Rocha, MF. Micologia médica à luz dos autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 93-96.
- 31 - Fonseca A, Boekhout T, Fell JW. *Cryptococcus Vuillemin* (1901) In: Kutzman C, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts, a Taxonomic study*. Elsevier; 2011. p. 1667-1668.
- 32 - Martins MA, Pappalardo MC, Mellhem MS, Pereira-Chiocola VL. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:777-784.
- 33 - Anzai MC, Lazéra MS, Wanke B, Trilles L, Dutra V, Jesus de Paula DA, et al. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathyenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *Mycoses.* 2014;57:414–418.
- 34 - Araújo-Júnior EC, Táparo CV, Uchida CY, Marinho M. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2015;67:1003-1008.

- 35 - Damasceno-Escoura A, Souza ML, Nunes F, Pardi TC, Gazotto FC, Florentino DH, et al. Epidemiological, Clinical and Outcome Aspects of Patients with Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* from a Non-endemic Area of Brazil. *Mycopathologia*. 2019;184:65.
- 36 - Fortes ST, Lazéra MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses*. 2001;44:137-140.
- 37 - Mak S, Vélez N, Castañeda E, Escandón P, et al. The Fungus among Us: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Ecological Modeling for Colombia. *J Fungi*. 2015;1:332-344.
- 38 - Hagen F, Boekhout T. The Search for the Natural Habitat of *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia*. 2010;170:209–211.
- 39 - Gupta M, Mishra AK, Singh SK. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a low birth weight pretermneonate: India. *J Inf Public Health*. 2018;11:896–897.
- 40 - Romeo O, Scordino F, Chillemi V, Criseo G. *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* Species Complex in Southern Italy: An Overview on the Environmental Diffusion of Serotypes, Genotypes and Mating-Types. *Mycopathologia*. 2012;174:283–291.
- 41 - Montagna MT, De Donno A, Caggiano G, Serio F, De Giglio O, Bagordo F, et al. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from environmental sources and genetic comparison with clinical isolates in Apulia, Italy. *Environ Res*. 2018;160:347–352.
- 42 - Johnston SA, Voelz K, May RC. *Cryptococcus neoformans* Thermotolerance to Avian BodyTemperature Is Sufficient For Extracellular Growth But Not Intracellular Survival In Macrophages. *Sci Rep*. 2016;6:20977.

- 43 - Granados DP, Casteñeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. FEMS Yeast Res. 2006;6:636–644.
- 44 - Hagen F, Ceresini PC, Polacheck I, Ma H, van Nieuwerburgh F, Gabaldón T, et al. Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. PLoS ONE. 2013;8:e71148.
- 45 - Trilles L, Lazéra MS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:455-462.
- 46 - Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. Aus Bioch. 2010;41:11-15.
- 47 - Smith N, Sehring M, Chambers J, Patel P. Perspectives on non-neoformans cryptococcal opportunistic infections. J Com Hosp Int Med Persp. 2017;7:214-217.
- 48 - Florek M, Król J, Woźniak-Biel A. Atypical URA5 gene restriction fragment length polymorphism banding profile in *Cryptococcus neoformans* strains. Folia Microbiol. 2019; <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00699-y>
- 49 - Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Silva-Vergara ML, Pedrosa AL. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. Fungal Biol. 2010;114:438–445.
- 50 - Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Mora DJ, Pedrosa AL, Rodrigues V, Silva-Vergara ML. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycoses. 2011;54:e294-300.
- 51 - Costa, SP. Isolamento e caracterização molecular de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de fontes ambientais na região metropolitana de Belém, Pará [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2008.

Tabela suplementar 1 - Tabela adaptada (Sidrim, 2004; Fonseca; Boekhout; Fell, 2011) com perfis descritos na literatura para espécies de *Cryptococcus* de interesse clínico. +: Positivo, -: Negativo, V: Variável, F: Fraco, NA: Não Analisado, CAP: Cápsula, U: Urease, Termo: Termotolerância a 37°C, CGB: Meio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol.

	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Rafinose	Inositol	Xilose	Celobiose	Trealose	Dulcitol	Maltose	Melibiose	Nitrato	CAP	U	Termo	CGB
<i>C. neoformans</i>	+	+	-	+	V	+	+	V	V	+	+	-	V	+	+	NA	NA
<i>C. albidus</i>	+	+	V	V	V	V	+	+	V	V	+	V	+	V	+	NA	NA
<i>C. gastricus</i>	+	V	V	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	NA	NA
<i>C. laurentii</i>	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	NA	NA
<i>C. terreus</i>	+	-	V	V	-	+	+	+	V	V	V	-	+	+	+	NA	NA
<i>C. luteolus</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	NA	NA
<i>C. uniguttulatus</i>	+	+	-	V	V	+	+	V	V	-	+	-	-	+	+	NA	NA

Tabela suplementar 2 - Amostras colhidas segundo sua localização (endereço), geolocalização, temperatura ambiente (T °C), espécie da árvore e procedência do material colhido

Amostra	Local	Geolocalização	T °C	Espécie de Árvore	Material
A1	Praça UNIMED (Américo Fioroto)	-21.28568, -50.34222	25	<i>Yucca aloifolia</i>	Árvore morta
A2	Praça UNIMED (Américo Fioroto)	-21.28553, -50.34311	25	<i>Ficus benjamina</i>	Oco em tronco
A3	Área Desprotegida Rua Profa Zulmira Gelis da Silva	-21.29988, -50.36165	25	<i>Ficus benjamina</i>	Oco em tronco
A4	Área Desprotegida Rua Profa Zulmira Gelis da Silva	-21.29971, -50.3616	25	<i>Cassia fistula</i>	Oco em tronco
A5	Av. Darcí Balabém	-21.29703, -50.36296	24	<i>Dimocarpus longan</i>	Material em decomposição em galho
A6	Av. Darcí Balabém	-21.29818, -50.36386	24	<i>Licania tomentosa</i>	Material em decomposição em galho
A7	Praça Antônio Luiz Picolo Primo	-21.3021, -50.36065	24	<i>Pachira aquatica</i>	Oco em tronco

Amostra	Local	Geolocalização	T °C	Espécie de Árvore	Material
A8	Av. Profa. Geracina de Menezes Sanches com a Rua João rodrigues Tortosa	-21.29717, -50.36188	24	<i>Pachira aquatica</i>	Material em decomposição em galho
A9	Praça N. S. Fátima	-21.29115, -50.34989	23	<i>Terminalia catappa</i>	Oco em tronco
A10	Praça N. S. Fátima	-21.29114, -50.34994	23	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Material em decomposição do tronco
A11	Praça N. S. Fátima	-21.29115, -50.35019	23	<i>Tecoma stans</i>	Galho em decomposição e casca
A12	Praça N. S. Fátima	-21.29115, -50.35033	23	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Oco em tronco
A13	Praça João Cernach	-21.29221, -50.34683	23	<i>Psidium guajava</i>	Oco em tronco
A14	Praça João Cernach	-21.2921, -50.3465	23	<i>Tecoma stans</i>	Galho em decomposição e casca
A15	Praça João Cernach	-21.2923, -50.34649	23	<i>Pachira aquatica</i>	Oco em tronco
A16	Rodoviária de Birigui	-21.29375, -50.34786	23	<i>Pachira aquatica</i>	Material em decomposição em galho
A17	Praça rua José Rodrigues Neri; rua Manoel de Carli e rua Afonso Pena	-21.30139, -50.35033	20	<i>Malpighia emarginata</i>	Material em decomposição em galho
A18	Rua José Rodrigues Neri	-21.29976, -50.35184	20	<i>Albizia niopoides</i>	Material queimado em decomposição
A19	Praça rua José Rodrigues Neri; rua José Antônio Marin; Av. São Francisco	-21.29883, -50.3534	20	<i>Tabebuia</i> sp.	Casca e oco em tronco
A20	Rua José Rodrigues Neri	-21.29642, -50.3559	20	<i>Ficus benjamina</i>	Oco em tronco
A21	Praça Raul Cardoso	-21.298428, -50.350053	20	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A22	Praça Raul Cardoso	-21.298977, -50.350723	20	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A23	Praça Raul Cardoso	-21.299097, -50.349663	30	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Casca e oco em tronco
A24	Praça Raul Cardoso	-21.298291, -50.351376	30	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Casca e oco em tronco
A25	Praça Lúcia Ullian Stábile	-21.29531, -50.3518	20	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A26	Av. São Francisco	-21.29837, -50.34259	20	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A27	Av. São Francisco	-21.29848, -50.34397	20	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A28	Av. São Francisco	-21.29871, -50.34774	20	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A29	Av. São Francisco	-21.29878, -50.3492	20	<i>Ficus elastica</i>	Árvore morta

Amostra	Local	Geolocalização	T °C	Espécie de Árvore	Material
A30	Praça Francisco Gardenal	-21.28872, -50.34818	19	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A31	Praça Francisco Gardenal	-21.28877, -50.34794	19	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A32	Praça Francisco Gardenal	-21.28903, -50.34804	19	<i>Pinus elliottii</i>	Casca de árvore
A33	Praça Santo Antônio	-21.28479, -50.34392	19	<i>Tecoma stans</i>	Galho em decomposição e casca
A34	Praça Santo Antônio	-21.28502, -50.34408	19	<i>Tabebuia</i> sp.	Casca de árvore
A35	Parque do Povo	-21.28468, -50.34024	19	<i>Tabebuia</i> sp.	Casca de árvore
A36	Parque do Povo	-21.28513, -50.33965	19	<i>Tabebuia</i> sp.	Casca de árvore
A37	Parque do Povo	-21.28505, -50.33877	19	<i>Tabebuia</i> sp.	Casca de árvore
A38	Parque do Povo	-21.28421, -50.33858	19	<i>Tabebuia</i> sp.	Casca de árvore
A39	Parque do Povo	-21.28373, -50.34016	19	<i>Tabebuia</i> sp.	Casca de árvore
A40	Av. São Francisco	-21.29855, -50.34591	19	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Tronco e casca
A41	Parque do Povo	-21.28411, -50.33989	19	<i>Syagrus romanzoffiana</i>	Oco em tronco
A42	Parque do Povo	-21.28458, -50.33926	19	<i>Syagrus romanzoffiana</i>	Oco em tronco
A43	Área Desprotegida Rua Profa Zulmira Gelis da Silva	-21.30094, -50.36238	19	<i>Eucalyptus</i> sp.	Tronco, casca e seiva
A44	Área Desprotegida Rua Profa Zulmira Gelis da Silva	-21.30031, -50.36228	19	<i>Tecoma stans</i>	Galho em decomposição e casca
A45	Av. Edilsinho Capuano	-21.30561, -50.35672	19	<i>Ficus benjamina</i>	Oco em tronco
A46	Av. Edilsinho Capuano	-21.30433, -50.3569	19	<i>Pachira aquatica</i>	Oco em tronco
A47	Av. Euclides Miragaia	-21.30317, -50.35775	19	<i>Schinus molle</i>	Tronco e casca
A48	Rua Valter Adas	-21.30317, -50.35642	19	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Oco em tronco
A49	Av. Euclides Miragaia	-21.30313, -50.35707	19	<i>Platycladus orientalis</i>	Tronco e casca
A50	Praça Dr. Gama	-21.28896, -50.34144	19	<i>Callistemon</i> sp.	Tronco e casca
A51	Praça Dr. Gama	-21.28866, -50.3415	19	<i>Tabebuia</i> sp.	Tronco e casca
A52	Praça Dr. Gama	-21.28933, -50.34083	19	<i>Tabebuia</i> sp.	Casca e oco em tronco

Amostra	Local	Geolocalização	T °C	Espécie de Árvore	Material
A53	Av. Governador Pedro de Toledo	-21.28761, -50.34064	19	<i>Platycladus orientalis</i>	Tronco e casca
A54	Av. Governador Pedro de Toledo	-21.28831, -50.33989	19	<i>Araucaria</i> sp.	Material em decomposição da casca
A55	Praça James Mellor	-21.29197, -50.3403	19	<i>Schinus molle</i>	Casca e oco em tronco
A56	Praça James Mellor	-21.29198, -50.33979	19	<i>Morus</i> sp.	Material em decomposição da casca
A57	Praça James Mellor	-21.29157, -50.34001	19	<i>Tipuana tipu</i>	Material em decomposição do tronco
A58	Praça James Mellor	-21.29176, -50.34011	19	<i>Roystonea regia</i>	Material em decomposição do tronco
A59	Praça João Arsênio Vieira	-21.29208, -50.33667	19	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Tronco e casca
A60	Praça Beatriz Calixto Sanches	-21.29225, -50.36677	20	<i>Tabebuia</i> sp.	Tronco e casca
A61	Praça Beatriz Calixto Sanches	-21.29225, -50.36738	20	<i>Tabebuia</i> sp.	Tronco e casca
A62	Praça Beatriz Calixto Sanches	-21.29266, -50.36787	20	<i>Tabebuia</i> sp.	Tronco e casca
A63	Praça João Arsênio Vieira	-21.2915, -50.33668	20	<i>Roystonea regia</i>	Material em decomposição do tronco
A64	Praça João Arsênio Vieira	-21.29177, -50.33678	20	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Material em decomposição do tronco
A65	Praça José Xavier Cervelati	-21.30313, -50.34147	24	<i>Plumeria rubra</i>	Casca e oco em tronco
A66	Praça José Xavier Cervelati	-21.30303, -50.34115	24	<i>Schinus molle</i>	Oco em tronco
A67	Praça José Xavier Cervelati	-21.30294, -50.34119	24	<i>Schinus molle</i>	Árvore morta
A68	Avenida Nelson Calixto	21.30502, -50.3425	24	<i>Magnolia</i> sp.	Oco em tronco
A69	Avenida Nelson Calixto	-21.30521, -50.34248	24	<i>Melia azedarach</i>	Oco em tronco
A70	Avenida Nelson Calixto	-21.30697, -50.3424	35	<i>Magnolia champaca</i>	Oco em tronco
A71	Avenida Nelson Calixto	-21.30779, -50.34227	35	<i>Toona</i> sp.	Tronco e casca
A72	Avenida Nelson Calixto	-21.30848, -50.34225	35	<i>Bauhinia forficata</i>	Oco em tronco
A73	Avenida Nelson Calixto	-21.30928, -50.3422	35	<i>Delonix regia</i>	Material em decomposição do tronco
A74	Avenida Nelson Calixto	-21.30963, -50.34216	35	<i>Toona</i> sp.	Oco em tronco
A75	Tv. Clélia com José Agostinho Rossi	-21.29425, -50.33427	30	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A76	Tv. Clélia com José Agostinho Rossi	-21.29445, -50.33411	30	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco

Amostra	Local	Geolocalização	T °C	Espécie de Árvore	Material
A77	Tv. Clélia com José Agostinho Rossi	-21.29454, -50.33445	30	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Oco em tronco
A78	Cemitério da Saudades	-21.29497, -50.34246	30	<i>Syagrus romanzoffiana</i>	Oco em tronco
A79	Cemitério da Saudades	-21.2954, -50.34224	30	<i>Araucaria sp.</i>	Material em decomposição do tronco
A80	Capela São João Batista	-21.30251, -50.37075	33	<i>Platycladus orientalis</i>	Material em decomposição do tronco
A81	Capela São João Batista	-21.30241, -50.37075	33	<i>Juniperus chinensis</i>	Material em decomposição do tronco
A82	Capela São João Batista	-21.30254, -50.37094	33	<i>Platycladus orientalis</i>	Material em decomposição do tronco
A83	Capela São João Batista	-21.30248, -50.37087	33	<i>Mussaenda philippica</i>	Tronco e casca
A84	Capela São João Batista	-21.3023, -50.37054	33	<i>Platycladus orientalis</i>	Tronco e casca
A85	Praça Av. Euclides Miragaia com Rua Paschoal Maraci	-21.30076, -50.32925	29	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Casca e oco em tronco
A86	Praça Av. Euclides Miragaia com Rua Paschoal Maraci	-21.30051, -50.32958	29	<i>Tibouchina semidecandra</i>	Casca e oco em tronco
A87	Praça Av. Euclides Miragaia com Rua Paschoal Maraci	-21.30046, -50.32976	29	<i>Syagrus romanzoffiana</i>	Casca e oco em tronco
A88	Praça Av. Euclides Miragaia com Rua Paschoal Maraci	-21.30079, -50.3301	29	<i>Wisteria sinensis</i>	Casca e oco em tronco
A89	Praça Av. Euclides Miragaia com Rua Paschoal Maraci	-21.30074, -50.33032	29	<i>Bauhinia forficata</i>	Casca e oco em tronco
A90	Praça Djalma Cheida Vicente	-21.3008, -50.32677	26	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Casca e oco em tronco
A91	Praça Djalma Cheida Vicente	-21.30106, -50.32683	26	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Casca e oco em tronco
A92	Praça Djalma Cheida Vicente	-21.30084, -50.32721	26	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	Casca e oco em tronco
A93	Praça das Camélias - Cidade Jardim	-21.29567, -50.32233	26	<i>Pachira aquatica</i>	Material em decomposição do tronco
A94	Praça das Camélias - Cidade Jardim	-21.29541, -50.32244	30	<i>Syagrus romanzoffiana</i>	Tronco e casca
A95	Praça das Camélias - Cidade Jardim	-21.29547, -50.32278	30	<i>Ficus sp.</i>	Casca e oco em tronco
A96	Praça Rafael Romera	-21.28043, -50.33211	29	<i>Albizia niopoides</i>	Tronco e casca
A97	Praça Rafael Romera	-21.28036, -50.3319	29	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Tronco e casca
A98	Praça Rafael Romera	-21.27996, -50.33155	29	<i>Caryota sp.</i>	Tronco e casca
A99	Praça Rafael Romera	-21.2803, -50.33178	29	<i>Caryota sp.</i>	Tronco e casca
A100	Praça Rafael Romera	-21.28001, -50.33118	29	<i>Pachira aquatica</i>	Casca e oco em tronco

	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Rafinose	Inositol	Xilose	Celobiose	Trealose	Dulcitol	Maltose	Melibiose	Nitrato	CAP	U	Termo	CGB
A42.N1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A48.N3.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
A50.N1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F	+	+	+	+
A54.N3.1	+	+	F	F	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
A61.N2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F	+	+	+	+
A61.S3.1	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F	+
A81.N2.1	+	+	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A83.S3.3	+	+	+	F	F	+	+	+	+	F	+	-	+	+	+	F	+
A91.N2.2	+	+	-	F	-	-	+	+	+	F	+	-	F	+	+	+	-