



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
CAMPUS DE BOTUCATU



## DETECÇÃO MOLECULAR DE *Cryptococcus* spp. EM AMOSTRAS DE FEZES DE POMBOS COLETADAS EM BOTUCATU

**PABLO HENRIQUE SCHERRER**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração BPM – *Biologia de Parasitas e Micro-organismos*, Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP.

***Orientadora:*** Profa. Dra. Sandra de Moraes  
*Gimenes Bosco*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
CAMPUS DE BOTUCATU



DETECÇÃO MOLECULAR DE *Cryptococcus* spp. EM AMOSTRAS DE  
FEZES DE POMBOS COLETADAS EM BOTUCATU

**PABLO HENRIQUE SCHERRER**

**SANDRA DE MORAES GIMENES BOSCO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração BPM – *Biologia de Parasitas e Micro-organismos*, Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP.

**BOTUCATU-SP  
2022**

S326d	Scherrer, Pablo Henrique Detecção molecular de <i>Cryptococcus</i> spp. em amostras de fezes de pombos coletadas em Botucatu / Pablo Henrique Scherrer. -- Botucatu, 2022 98 f.  Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu Orientadora: Sandra de Moraes Gimenes Bosco  1. Criptococose. 2. <i>Cryptococcus</i> spp.. 3. <i>Cryptococcus neoformans</i> . 4. Epidemiologia. 5. Pombos. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nome do autor: Pablo Henrique Scherrer

Título: DETECÇÃO MOLECULAR DE *Cryptococcus* spp. EM AMOSTRAS DE FEZES DE POMBOS COLETADAS EM BOTUCATU

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr<sup>a</sup> Sandra Moraes de Gimenes Bosco

Presidente e Orientadora

Membro Departamento de Microbiologia e Imunologia

IBB – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Helio Langoni

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr<sup>a</sup> Giselle Souza da Paz

Programa de Treinamento em Epidemiologia Aplicada aos Serviços do Sistema Único de Saúde (EpiSUS - Avançado)

Ministério da Saúde

Data da Defesa: 29 de julho de 2022.

## **DEDICATÓRIA**

Dedicado a todos os familiares e vítimas da criptococose no Brasil, aos agentes de endemias e aos defensores da ciência, da democracia e do SUS.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento nº 001.

“Não sou nada. Nunca serei nada. Não posso querer ser nada.  
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

*(Trecho de "Tabacaria", Álvaro de Campos, heterônimo de Fernando Pessoa)*

Meu pai, enquanto vagava neste mundo, me ensinou, através de gestos, que a gratidão é uma das maiores virtudes de um homem. E, hoje, estou repleto dela.

Obrigado “profa” Sandra, professor Eduardo (Bagagli), amigos e colegas de pós-graduação Hans, Alana, Carol, Daniele, Gabriel e Arthur. Ao meu programa de pós-graduação, na figura da atual coordenação (professores Maeli e Justulin), à psicóloga Juliana Hoffmann e seu papel fundamental para a saúde mental da comunidade universitária, sobretudo no período pandêmico. Aos servidores técnico-administrativos, da limpeza e manutenção do Departamento de Microbiologia e Imunologia, e do Instituto de Biociências de Botucatu. Aos professores das disciplinas que cursei e às “profas” Simone e Luciana da minha banca examinadora. À minha família, minha melhor amiga, Nayara e minha companheira, Stefanie. Graças à vocês todos, sou mais um trabalhador, filho de carcereiro e técnica de enfermagem, que consegue cursar e concluir sua pós-graduação. Todos, em algum momento, ora não mediram esforços, ora foram pacientes, ora tiveram compreensão, ora agiram com justiça e bom senso, ora deram apoio incondicional e, assim como eu, o melhor de si pelo meu propósito, fazendo dele um propósito comum. Por isso, foram fundamentais (são parte) desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	16
<b>ABSTRACT</b>	17
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
1.1 Revisão bibliográfica	18
1.1.1 Aspecto histórico da criptococose e seu agente etiológico	18
1.1.2 Taxonomia e filogenia de <i>Cryptococcus</i> spp.	20
1.1.3 Aspectos epidemiológicos da doença	20
1.1.4 Biologia molecular no estudo de <i>Cryptococcus</i> spp. e criptococose	24
1.1.5 Pombos urbanos Vs. <i>Cryptococcus</i>	28
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	31
<b>3 OBJETIVOS</b>	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
4.1 Locais de coletas ( <i>hotspots</i> )	33
4.2 Coletas	35
4.3 Exames moleculares	37
4.3.1 Extração de DNA	37
4.3.1.1 Protocolo de extração	37
4.3.2 Reações de PCR, <i>nested</i> PCR e eletroforese	42
4.4 Questionário para pesquisa e análise do conhecimento sobre a criptococose	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	47
5.1 Resultados dos exames moleculares	47
5.2 Aspectos da amplificação total das amostras coletadas no <i>hotspot</i> HCFMB	56

5.3 Análise da influência da pandemia de COVID-19 em casos e notificações de criptococose	58
5.4 Análise dos resultados do questionário sobre o conhecimento popular no âmbito da criptococose	60
5.4.1 Perfil dos entrevistados	60
5.4.2 Interpretação dos dados obtidos	62
5.5 Perspectivas e desafios	72
<b>6. CONCLUSÕES</b>	74
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	75
<b>8. APÊNDICES</b>	82
APÊNDICE A: Modelo do requerimento elaborado para solicitação de autorização (anuência) para coleta de amostras de fezes de pombos	82
APÊNDICE B: Etiqueta de identificação de caixa exclusiva para transporte de amostras	83
APÊNDICE C: Protocolo de Extração do kit comercial <i>EasyPure<sup>®</sup> Stool Genomic DNA (TransGen Biotech Co., LTD)</i>	84
APÊNDICE D: Resumo apresentado à XI Semana da Biologia da UFABC, conforme orientações da banca do evento	86
APÊNDICE E: Certificado de premiação da XI Semana da Biologia UFABC	96
APÊNDICE F: Certificado da XI Semana da Biologia UFABC	97
APÊNDICE G: Certificado do CONBIO (Congresso de Biologia da UNESP/Bauru)	98

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Cryptococcus neoformans*
- Figura 2: Pombos disputam alimentos lançados por usuários de unidade hospitalar bastante frequentada em Botucatu
- Figura 3: Fezes de pombos em placa informativa no Boulevard, um dos principais acessos ao interior do HCFMB/UNESP
- Figura 4: Imagem do principal ponto de aninhamento de pombos no HCFMB atualmente, localizado sobre as obras da UTI Neonatal
- Figura 5: Registro do pesquisador durante procedimento de coletas de amostras ambientais de fezes em unidade hospitalar no município de Botucatu
- Figura 6: Tubos Falcon contendo amostras de fezes ambientas de dois dos seis hotspots: Hospital Estadual (HE) e Demétria (DE/Rural)
- Figura 7: Imagem do Precellys utilizado no protocolo de extração, que possibilita uma mistura efetiva da amostra de fezes ao glass Beads e ao LB21
- Figura 8: Centrífuga recebe amostras em microtubos de 2 mL durante etapa do protocolo de extração
- Figura 9: Pesquisador em laboratório durante procedimento de quantificação de DNA genômico de cada uma das amostras
- Figura 10: Adolescente participa da pesquisa respondendo ao questionário elaborado através de computador de unidade escolar (foto: arquivo pessoal)
- Figura 11: Eletroforese das 30 amostras coletadas em Botucatu: na parte superior, as cinco amostras do *hotspot* HCFMB

(colunas 1-5), HE (colunas 6-10) e PSI (colunas 11-15). Na parte inferior, as amostras coletadas em EECA (colunas 1-5), PIA (colunas 6-10) e DE (colunas 11-15). M: Marcador de peso molecular 100pb (100bp *Ladder Plus* Sinapse Biotecnologia), controle positivo (colunas 16 sup. e inf.) utilizando DNA de cepas de *C. neoformans* - FIOCRUZ e controles negativos (colunas 17 e 18 sup. e inf.) utilizando água nuclease-free da primeira e da segunda reação (nested) PCR, respectivamente.

Figura 12: Alguns dos pontos de coletas de fezes de pombos no *hotspot* PSI

Figura 13: Imagens de alguns dos pontos de coletas de fezes de pombos no *hotspot* EECA, onde crianças dividem espaço com pombos cotidianamente e praticam esportes descalças e em quadra com acúmulo de fezes (foto: arquivo pessoal)

Figura 14: *Boulevard* do *hotspot* HCFMB onde usuários adquirem e consomem alimentos cercados por pombos, fornecendo alimentos direta e indiretamente pra essas aves

Figura 15: Gráfico do percentual de pessoas do sexo feminino e masculino que responderam ao questionário sobre criptococose

Figura 16: Gráfico do percentual de pessoas por faixa etária que responderam ao questionário sobre criptococose

Figura 17: Gráfico do percentual de pessoas por faixa etária que responderam ao questionário sobre criptococose

Figura 18: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre criptococose a partir do termo “criptococose” para identificação da doença

- Figura 19: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre criptococose a partir do seu nome popular
- Figura 20: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar os principais meios de obtenção de informação sobre a criptococose
- Figura 21: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão sobre casos de criptococose próximos ao entrevistado
- Figura 22: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre como a criptococose é contraída, mostrando que mais da metade dos entrevistados desconhece como a doença é causada em seres humanos
- Figura 23: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre a prevenção da doença
- Figura 24: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre a gravidade da criptococose
- Figura 25: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre a principal forma de infecção por *Cryptococcus* spp. e o risco que as fezes de pombos contaminadas representam
- Figura 26: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão sobre o hábito de alimentar pombos em locais públicos como praças e outros<sup>3</sup>
- Figura 27: Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão sobre o hábito de alimentar pombos em locais públicos

como praças e outros

Figura 28: Gráfico do percentual de respostas assinaladas para medidas que, na opinião do entrevistado, contribuem para a redução da infestação de pombos nos centros urbanos

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Tipos moleculares e sorotipos (resposta antigênica) de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	24
Tabela 2:	Relação de hotspots elencados e visitados no período de março a maio de 2022	34
Tabela 3:	Relação de <i>hotspots</i> selecionados para a pesquisa, de acordo com o critério estabelecido, e suas respectivas coordenadas geográficas	34
Tabela 4:	Relação dos componentes do kit comercial de extração <i>EasyPure</i> <sup>®</sup> <i>Stool Genomic DNA</i> ( <i>TransGen Biotech Co., LTD</i> )	38
Tabela 5:	Quantidades de etanol 100% adicionadas aos frascos de CB21 e WB21, respectivamente, por recomendação do fabricante do kit utilizado	38
Tabela 6:	<i>Primers</i> utilizados para a identificação molecular de <i>C. neoformans</i>	42
Tabela 7:	Relação das perguntas contidas no questionário sobre criptococose	44
Tabela 8:	Relação das concentrações de DNA Genômico obtidas através do kit comercial <i>EasyPure</i> <sup>®</sup> <i>Stool Genomic DNA</i> ( <i>TransGen Biotech Co., LTD</i> ) após o protocolo de extração	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BPM	Biologia de Micro-organismos
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. Neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CN4	Primer específico para <i>Cryptococcus neoformans</i>
CN5	Primer específico para <i>Cryptococcus neoformans</i>
CN5	Primer específico para <i>Cryptococcus neoformans</i>
DCQB	Departamento de Ciências Químicas e Biológicas
DE	Estância Demétria (Zona Rural)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EE	Escarro Espontâneo
EECA	Escola Estadual “Cardoso de Almeida”
EI	Escarro Induzido
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GPS	Global Positioning System
HCFMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
HE	Hospital Estadual de Botucatu
IBB	Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP
IBTEC	Instituto de Biotecnologia/UNESP
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Região do DNAr)

LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MLST	Tipagem multi loci por sequenciamento ( <i>Multilocus sequence typing</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PPF	Peça Facial Filtrante
PIA	Praça “Isabel Arruda”
PLB1	Gene
PSA	Pronto Socorro Adulto
PSI	Pronto Socorro Infantil
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> )
SG	Sangue
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TBE	Tris Borato EDTA
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
URA5	Gene
var.	Variedade
VE	Vigilância Epidemiológica
VE(s)	Vigilância(s) Epidemiológica(s)
Vs.	Versus (contra)

SCHERRER, P. H. **Detecção molecular de *Cryptococcus* spp. em amostras de fezes de pombos coletadas em Botucatu.** 2022. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biologia). Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2022.

## RESUMO

A alta concentração de pombos (*Columba livia*) é um problema comum em metrópoles. No entanto, mesmo em cidades interioranas e relativamente pequenas, a presença dessas aves em praças, edificações e outros locais cuja estrutura oferece condições para abrigo, reprodução e alimentação, preocupa. A escassez de programas voltados para o controle, bem como a ausência de trabalhos de educação ambiental favorece a proliferação de pombos na área urbana, já que o ser humano potencializa a disponibilidade de alimento a esses animais. A criptococose ou popularmente doença do pombo, contraída principalmente por meio da inalação de poeira contendo células fúngicas associada às fezes secas, constitui uma ameaça à saúde pública. Seu agente etiológico, leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus* spp., possui relevância na quantidade de mortes de pessoas imunodeprimidas no mundo todo. Nosso objetivo foi investigar a ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em amostras de fezes de pombos, no município de Botucatu, Estado de São Paulo, coletadas em hospitais, praças ou escolas e seus arredores, onde a presença, concentração e aninhamento de pombos é facilmente verificada e o acúmulo de fezes notório. Para tanto, foram coletadas 5 amostras de fezes em 6 *hotspots* distintos na zona urbana e rural do município. Após extração de DNA realizou-se PCR com *primers* universais para fungos ITS-4 e ITS-5 e, a seguir, *nested* PCR com os *primers* CN4 e CN5, específicos para *C. neoformans*. Dos 06 *hotspots* avaliados, 5 foram positivos, sendo o único resultado negativo pertencente à zona rural do município de Botucatu. Dessa forma, podemos afirmar que 100% dos pontos urbanos analisados foram positivos para a presença de *C. neoformans*, o que é um dado preocupante, pois são áreas de grande circulação de pessoas que possam ser vulneráveis a infecções. Este achado deve trazer à tona a necessidade urgente da implementação de políticas coordenadas de monitoramento, de controle da proliferação de pombos e de educação ambiental e em saúde para difusão do conhecimento sobre a criptococose e como evitá-la.

**Palavras Chave:** *Cryptococcus neoformans*, Criptococose, diagnóstico, pombos, saúde pública, vigilância epidemiológica.

SCHERRER, P. H. **Molecular detection of *Cryptococcus* spp. in a data sample of pigeons collected in Botucatu.** 2022. 98 f. Dissertation (Master in Biology). Botucatu Institute of Biosciences. Paulista State University (UNESP), Botucatu, 2022.

## ABSTRACT

The high concentration of pigeons (*Columba livia*) is a common problem in metropolises. However, even in relatively small inland cities, the presence of these birds in squares, buildings and other places whose structure offers conditions for shelter, reproduction and food, worries. The scarcity of programs aimed at control, as well as the absence of environmental education work favors the proliferation of pigeons in the urban area, since human being enhances the availability of food to these animals. Cryptococcosis, or popularly pigeon disease, contracted mainly by inhaling dust containing fungal cells associated with dry feces, constitutes a threat to public health. Its etiological agent, encapsulated yeasts of the genus *Cryptococcus* spp., has relevance in the number of deaths of immunocompromised people worldwide. Our objective was to investigate the occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon feces samples in Botucatu, State of Sao Paulo, collected in hospitals, squares or schools and their surroundings, where the presence, concentration and nesting of pigeons is easily verified and the accumulation of feces was notorious. For this, it was collected 5 samples in each of the 6 distinct hotspots from urban and rural areas of the municipality. After DNA extraction, PCR was performed using the universal fungal primers ITS-4 and ITS-5 and then nested PCR with the specific primers, CN4 and CN5, for *C. neoformans*. Among the hotspots, 5 from urban area were positive while the one from rural was negative. Thus, we can affirm that 100% of the urban points analyzed were positive for the presence of *C. neoformans*, which is a worrying fact, as they are areas of great circulation of people who may be vulnerable to infections. This finding should bring to the fore the urgent need for the implementation of coordinated policies for monitoring, proliferation control of pigeons and environmental and health education for dissemination of knowledge about cryptococcosis and how to avoid it.

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*, Cryptococcosis, diagnosis, pigeons, public health, epidemiological surveillance.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Revisão de literatura

### 1.1.1 Aspecto histórico da criptococose e seu agente etiológico

A história da criptococose é marcada por uma grande confusão taxônomica que teve início com o primeiro isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* na Alemanha em 1894.

De acordo com o delineamento histórico da doença descrito por Lazera et al. (2004), sua descoberta teve início a partir da observação feita por Busse em 1895, um patologista, que descreveu formas parasitárias arredondadas em uma lesão de tibia, na qual foi possível o cultivo , microbiológico e posterior identificação como *Saccharomyces hominis*. Simultaneamente, um clínico conhecido por Buschke descrevia caso semelhante, porém atribuiu o agente a uma espécie de coccídio (LAZERA et al., 2004).

Na mesma época, na Itália, houve o isolamento de uma levedura por Sanfelice a partir de suco de pêsego que, uma vez inoculada em animais, apresentou alta patogenicidade e foi denominada de *Saccharomyces neoformans*. Quando esse mesmo autor identificou uma levedura semelhante em bois encontrou similaridade entre os isolados clínico e ambiental.

Lazera et al. (2004) refere que, conforme a identificação de casos em seres humanos crescia na Europa, a confusão taxonômica aumentava porque diferentes autores conferiam novas características e nomenclaturas ao mesmo agente etiológico. Porém, em 1901, com base na não formação de estruturas chamadas ascósporos, relacionadas à formação de novas hifas, e na não fermentação de açúcares nesses isolados, Vuillemin provou inadequada a utilização do termo *Saccharomyces* e foi então que se transferiu os achados para o gênero *Cryptococcus* que já havia sido cunhado desde 1833 por um cientista chamado Kutzing.

Do outro lado do atlântico, em meados de 1905, novas descobertas como o primeiro caso humano de uma meningoencefalite com lesões císticas gelatinosas abundantes levaram à novas descrições, como as de Stoddard e Cutler (EUA) que, por sua vez, deram o nome de *Torula histolytica* ao agente e de Torulose à doença, desconsiderando o que já havia sido descrito na literatura europeia sobre o tema e sugerindo uma atividade de lise celular que hoje se sabe tratar-se de áreas vazias e de retração da cápsula da levedura na lesão.

Tinta nanquim passa a ser referida para a visualização da cápsula em meios de cultivos na década de 1920 e a partir de 1935, com a revisão dos isolados referidos até aqui (*Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula*), Benham concluiu que todos pertenciam a um só gênero e espécie e propôs, em 1950, a denominação que se tornaria definitiva até hoje: *Cryptococcus neoformans* e, com isso, a doença denominada de criptococose (LAZERA et al., 2004).

Nos tempos atuais, verifica-se com frequência na literatura menções a sorotipos do agente, A, B, C, D e AD. Essas variações são baseadas em diferentes padrões de aglutinação frente a fatores séricos, relacionados à quantidade de anticorpos presentes em soros hiperimunes produzidos em coelhos e descritos a partir de 1949 por Evans.

A relação de *C. neoformans* com pombos teve início na década de 1950 e constitui um momento crucial para a história da criptococose. Primeiramente, foi nessa época que Emmons evidenciou que as excretas de aves, principalmente fezes secas de pombos, constituem um habitat natural para o agente etiológico da doença, isolando com facilidade a partir desse tipo de amostras ambientais, tornando evidente a distribuição cosmopolita e urbana para a levedura e a doença. Um número crescente de casos passa a ser diagnosticado nos EUA, evidenciando seu aspecto oportunista, primeiramente associado ao uso de corticosteróides, diabetes melito, transplantes e, posteriormente, à Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) a partir da década de 1980 (LAZERA et al., 2004).

As descobertas em torno da criptococose no mundo continuaram e, a partir daí, não demorou muito para que casos da doença em indivíduos aparentemente imunocompetentes fossem relatados. O primeiro que se tem notícia foi no continente africano e em um menino de 7 anos, em que o isolamento da levedura foi identificado como sendo do sorotipo B, que mais tarde considerou-se como a variedade *gattii* de *C. neoformans*. Foi a cientista Know-Chung (1975) ao obter o cruzamento sexuado entre isolados de *C. neoformans* e isolados de *C. gatti* com produção de *Filobasidiella* e progênie fértil que reduziu *C. neoformans* a uma só espécie e duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C), critério de variedade baseado no cruzamento sexuado, como diferenças metabólicas, em que o principal marcador tornou-se o meio canavinina-glicina-azul de bromotimol (meio CGB) que constitui critério taxônomico de variedade. Esses e outros achados contribuíram para a descoberta do ciclo sexuado na década de 1980 e posteriores estudos genéticos que possibilitaram maior conhecimento sobre a virulência, produção de cápsula, síntese de enzimas, potencializando estudos epidemiológicos e filogenéticos (LAZERA et al., 2004).

### 1.1.2 Taxonomia e filogenia de *Cryptococcus* spp.

A taxonomia da levedura é: domínio Eukaryota, reino Fungi; filo Basidiomycota; classe Tremellomycetes; ordem Tremelales; família Cryptococcaceae; gênero *Cryptococcus*; espécie *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. De acordo com Bahn et al., (2020), os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (coletivamente espécies patogênicas de *Cryptococcus*) englobam pelo menos sete espécies biológicas e filogenéticas distintas, com potencial de espécies crípticas adicionais a serem definidas (BAHN et al., 2020).

Quanto à filogenia do patógeno, análises de sequenciamento genético revelaram dois grandes grupos dentro do complexo de espécies de *Cryptococcus*, correspondente aos complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, que divergiram de um ancestral comum há mais de 40 milhões de anos atrás. Esses subcomplexos contêm ainda duas a cinco espécies patogênicas, respectivamente (HAGEN et al., 2015). Divergência significativa se acumulou entre essas sete espécies, incluindo polimorfismos de nucleotídeos, rearranjos cromossômicos, bem como translocações cromossômicas mediadas por *transposons* (genes “saltadores” ou seqüências de DNA móveis que podem se autoreplicar em um determinado genoma) localizados dentro dos centrômeros. Enquanto *C. neoformans* e suas variedades são distribuídos em todo o mundo e causam criptococose sistêmica na maioria dos pacientes imunocomprometidos, espécies do complexo *C. gattii* são frequentemente encontrados em regiões tropicais e subtropicais e afetam indivíduos imunocompetentes (SOUTO, 2014).

Apesar disso, em comparação com os clados irmãos não patogênicos intimamente relacionados, as espécies patogênicas de *Cryptococcus* formam um grupo de clado monofilético, sugerindo uma única origem do potencial de patogenicidade. As manifestações da doença podem diferir ligeiramente entre as espécies de *Cryptococcus*, mas o diagnóstico e o tratamento são praticamente os mesmos, independentemente da espécie envolvida (KWON-CHUNG et al., 2017).

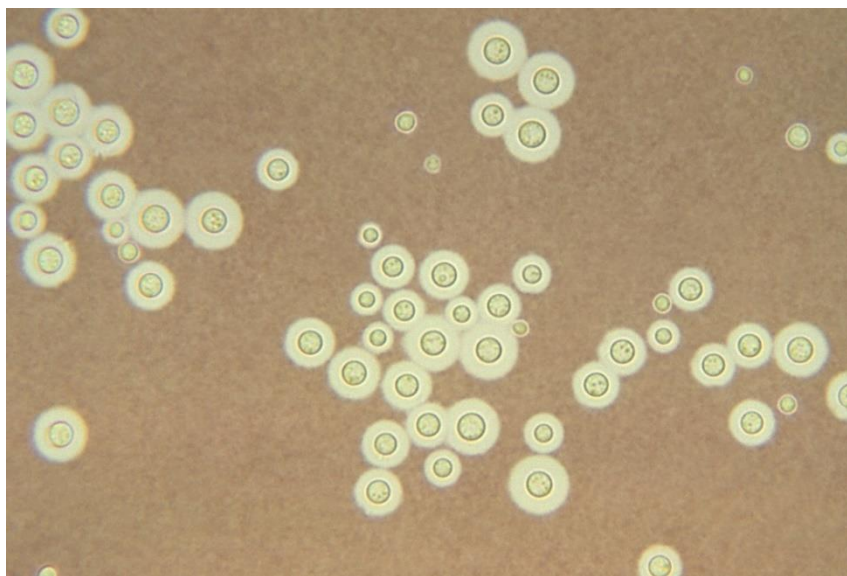
### 1.1.3 Aspectos epidemiológicos da criptococose

A criptococose, contraída principalmente através da inalação de poeira contendo partículas de fezes secas, constitui uma ameaça à saúde pública. Seu agente etiológico, as leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus* spp., possuem relevância na quantidade de mortes de pessoas imunodeprimidas no mundo todo. Ademais, ainda existem estudos que

descrevem casos da doença não associados a disfunções do sistema imune, isto é, em pessoas imunocompetentes, como referido por Ribeiro e Cerqueira (2019), Maranhão et al. (2020) e Xavier (2019), nas formas cutânea, pulmonar e também na mais grave: neurocriptococose.

Na literatura, também encontram-se referências da ocorrência de infecções por *Cryptococcus* spp. em animais, principalmente em felinos (RODRIGUES et al., 2020; LIMA, 2018), cães domésticos (GALIZA et al., 2014), eqüinos (KOMMERS et al., 2005), caprinos (BARÓ et al., 1998), coalas (SCHMERTMANN et al., 2018) e aves também são mencionadas (MALIK et al., 2003; RASO et al., 2004). A transmissão entre animais e humanos ainda não foi comprovada (PEREIRA & COUTINHO, 2003; NELSON & COUTO, 2001). Ferreira et al. (2020) relataram a transmissão da criptococose por meio de transplante de órgãos (fígado e rins), pois os pacientes que receberam esses órgãos do mesmo doador apresentaram criptococose disseminada.

Souto (2014) refere as duas espécies distintas, pertencentes à divisão de basidiomicetos, como principais agentes causadores da criptococose no mundo: *Cryptococcus neoformans* (figura 1) e *Cryptococcus gatti*, e aponta a já mencionada inalação de blastosporos presentes nas fezes secas e com forte tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) como sendo a forma mais comum de infecção em seres humanos.



**Figura 1.** *Cryptococcus neoformans* (foto: Dr. Leonor Haley/CDC)

A criptococose é, portanto, uma doença ou infecção fúngica que, por ser considerada uma micose sistêmica mais frequente em pacientes imunocomprometidos, como é o caso de pacientes com AIDS e também em imunossuprimidos, figura entre as principais doenças

classificadas como oportunistas e cosmopolita no mundo. Nesses casos de imunossupressão adquirida ou induzida, o agente mais comum, de acordo com Souto (2014), é predominantemente *C. neoformans*. Já quando a doença se apresenta como uma infecção endêmica que acomete indivíduos imunocompetentes, a etiologia geralmente é *C. gattii*. No entanto, no mesmo levantamento, a autora ressalta que outras formas clínicas diferentes das descritas podem ocorrer, com *C. neoformans* acometendo indivíduos imunocompetentes e causando óbitos.

Outro aspecto epidemiológico de relevância da criptococose está relacionado à capacidade que as leveduras que a causam possuem de sobreviver em excretas ressecadas por muitos meses. Portanto, o acúmulo de fezes atua como substrato e, uma vez contaminados, podem agir como fontes de infecção durante um tempo prolongado. Além disso, *Cryptococcus* spp. tem cápsula composta de polissacarídeos antigênicos. Essa característica garante às espécies patogênicas proteção contra a ação de células fagocitárias, tais como monócitos, macrófagos e neutrófilos, fator que contribui para a diminuição da resposta imunológica. (NUNES, 2003; MEZZARI, 2004).

Dentre os polissacarídeos antigênicos que constituem a cápsula de *Cryptococcus* está a glicuronoxilomana (GXM), galactoxilomana (Galxm) e manoproteína (MP). Contin (2011) refere o glicuronoxilomana como o principal e o responsável por potencializar a infecção, pois inibe a resposta inflamatória e a fagocitose, além de reprimir tanto a imunidade humoral quanto a celular. Acrescenta-se a isso, um outro fator importante e característico dessas leveduras: a sua capacidade de crescimento a 37°C (SEVERO, 1998; FRIES, 1999; LEAL, 2006).

Quanto à patogenicidade de *C. neoformans* (capacidade do agente causar a doença), que pode estar ligada à virulência (capacidade de se multiplicar dentro do organismo), também encontram-se os fatores produção de urease, que inativa o sistema do complemento e a fenol-oxidase, ambas como resultado de sua ação metabólica, além de outras características da levedura, como a secreção de proteinases, fosfolipases extracelulares e produção de manitol. É ao degradar proteínas dos tecidos do hospedeiro, como colágeno, elastina e fibrinogênio, e também ao destruir proteínas com funções imunológicas importantes, como imunoglobulinas e fatores do complemento já citados, as proteinases aumentam a virulência de *C. neoformans*. Essa levedura ainda pode produzir uma enzima fenol oxidase, identificada como uma lacase, que pode sintetizar melanina a partir de precursores com L- e D- Dopa, dopamina, epinefrina e norepinefrina (LEAL, 2008).

As duas espécies reconhecidas atualmente, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, são baseadas nas diferenças na distribuição geográfica, nos nichos ecológicos, na

epidemiologia, na patobiologia, na manifestação clínica e também por aspectos moleculares (KWON-CHUNG, 2006), observadas desde a informação do primeiro caso da doença em humanos por Busse, em 1894.

Atualmente, a escassez de programas voltados para o controle, bem como a ausência de trabalhos de educação ambiental, favorecem a proliferação de pombos domésticos na área urbana, já que, segundo Schuller (2005, apud MIRANDA, 2014, p.24) os seres humanos potencializam a disponibilidade de alimento (figura 2) que, por sua vez, é um fator limitante: quanto maior a disponibilidade, maior a capacidade reprodutiva da espécie. Nesse sentido, Botucatu, localizada a 22° 53' 09" de latitude sul e 48° 26' 42" de longitude oeste, cidade interiorana do Estado de São Paulo com aproximadamente 149.178 habitantes (IBGE, 2021) apresenta todos os fatores favoráveis mencionados para a proliferação exacerbada dessas aves.



**Figura 2.** Pombos disputam alimentos lançados por usuários de unidade hospitalar bastante frequentada em Botucatu (foto: arquivo pessoal)

Outro aspecto facilmente verificado é que, geralmente, esse tipo de estudo envolvendo detecção da levedura a partir de amostras ambientais, geralmente emprega apenas técnicas microbiológicas de cultivo, isolamento e identificação através da micromorfologia da colônia, prova de urease, dentre outras. Isto é, limitam-se à identificação fenotípica, como fez De Souza (2021) que investigou a presença de *C. neoformans* em fezes de pombos no centro de Porto Velho a partir de 10 amostras coletadas de praças, mercados e igrejas e encontrou uma incidência de 30% na ocasião.

O emprego das técnicas microbiológicas para o isolamento e identificação fenotípica

frente ao emprego de *kits* comerciais para extração de DNA genômico direto de amostras ambientais de fezes, sem dúvidas, se dá devido ao elevado custo que as técnicas moleculares para detecção e identificação genotípica ainda apresentam.

### 1.1.4 Biologia molecular no estudo de *Cryptococcus* spp. e criptococose

Trilles et al. (2008) refere que a sorotipagem (método através do qual se distinguem microorganismos por diferirem na resposta a diferentes anticorpos) foi amplamente utilizada para estudos epidemiológicos de *C. neoformans* e *C. gattii*, mas que a falta de *kits* comerciais disponíveis para esse tipo de teste fenotípico resultou na busca por uma técnica mais confiável e, com isso, contribuiu para um aumento significativo do uso de ferramentas moleculares. Ademais, a análise de genótipos dentro de uma espécie pode responder a várias questões, impactando no manejo, terapia, vigilância e ações profiláticas. Neste sentido, a autora e seus colaboradores mencionam uma tentativa de padronizar uma técnica para um levantamento epidemiológico molecular global dos agentes de criptococose.

Em 1999, Meyer et al. designaram oito tipos moleculares principais por meio de PCR e os agruparam conforme a **tabela 1**:

**Tabela 1.** Tipos moleculares e sorotipos (resposta antigênica) de *C. neoformans* e *C. gattii*

	<b>Espécie</b>	<b>Tipo Molecular</b>	<b>Sorotipo(s)</b>
<b>1</b>	<i>C. neoformans</i>	VNI/AFLP1	A
<b>2</b>		VNII/AFLP1A	A
<b>3</b>		VNIII/AFLP2	AD
<b>4</b>		VNIV/AFLP3	D
<b>5</b>	<i>C. gattii</i>	VGI/AFLP4	B e C
<b>6</b>		VGII/AFLP5	
<b>7</b>		VGIII/AFLP6	
<b>8</b>		VGIV/AFLP7	

O agrupamento acima foi confirmado por outros autores através de diferentes técnicas, como a AFLP, RFLP dos genes *URA5* e *PLB1* e tipagem de sequência multilocus (MLST) (MEYER et al. 2003). No entanto, pouco tempo depois, em 2006, Trilles et al. (2008) refere que, através de AFLP e MLST, também revelaram a existência de um novo tipo molecular

de *C. neoformans* (genótipo VNB) na África Subsaariana que, de acordo Litvintseva e seus colaboradores, parecia geograficamente restringido àquele país.

Em 2008, Trilles et al propôs então reanalisar a distribuição dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* no Brasil correlacionando genótipos e regiões, em virtude de observar que, apesar da existência de muitos estudos anteriores, os tipos moleculares de isolados brasileiros (de acordo com o sistema de tipagem descrito na tabela 1) tenham demonstrado apenas a presença de *C. neoformans* e *C. gattii* em algumas cidades ou estados (CASALI et al. 2003, IGREJA et al. 2004, ABEGG et al. 2006, MATSUMOTO et al. 2007 apud TRILLES, 2008), salientando que, mesmo quando mais de uma região foi analisada, o número de isolados foi limitado (TRILLES et al. 2003). E, nessa reanálise que contemplou um total de 443 isolados de *C. neoformans* (n = 320) e *C. gattii* (n = 123) de 11 estados e todas as regiões brasileiras, o único tipo molecular que não foi identificado entre os isolados brasileiros clínicos e ambientais estudados foi o tipo VGIV.

Os demais achados de Trilles (2008) e seus colaboradores reforçaram a ideia de que quanto mais estudos de polimorfismos moleculares em dos agentes etiológicos da criptococose, maior a compreensão da epidemiologia dos mesmos. De fato, isso contribui para a análise de intervenções e tratamentos da doença.

Nesse aspecto, Martins et al (2007) analisaram isolados de pacientes com HIV e seus achados sugeriram que os pacientes podem ser infectados por mais de um isolado. No mesmo ano, Almeida et al. observou uma alta correlação entre um perfil genético distinto e a tendência de se tornarem resistentes aos antifúngicos. Um dos resultados obtidos por Trilles et al (2008) com a análise de polimorfismo molecular mostrou uma taxa de similaridade menor (77%) entre os isolados VGII do que VNI (87%) que, segundo os autores, permite inferir que os isolados VGII podem ter uma taxa mais alta de mutação, o que poderia produzir uma resposta mais pobre à terapia antifúngica. Não se pode esquecer que, além do diagnóstico precoce, um suporte clínico eficiente com uma terapia antifúngica adequada são essenciais para reduzir o óbito e as sequelas causadas pela criptococose.

Nota-se, até aqui, a importância que a biologia molecular vem tendo para os estudos sobre *Cryptococcus* spp. e, conseqüentemente, para o diagnóstico e tratamento da criptococose no mundo, principalmente nas últimas duas décadas. Entretanto, quanto maior (ou melhor) o emprego das técnicas moleculares, maior a diversidade genética revelada, o que, por sua vez, implica numa certa “instabilidade nomenclatural” quase que contínua nesse período.

Em virtude das novas descobertas publicadas ao longo de pelo menos 20 anos, Kwon-Chung et al (2017) julgaram inapropriado designar sete clados (MLST) monofiléticos,

identificados entre 115 linhagens de *C. neoformans* e *C. gatti* em novas espécies, como demonstrado mais acima neste trabalho. Os autores justificam seu ponto de vista por considerarem prematuro basear uma nova classificação e nomenclatura para *Cryptococcus* spp. com base em apenas 5% (115) das cepas genotipadas (até a publicação de Kwon-Chung já eram mais de 2.600 cepas genotipadas). Isto é, certamente qualquer designação sofrerá alteração a curto prazo. Foram por essas e outras razões que os autores teceram a seguinte sugestão prática de adoção de nomenclatura que, desde então, vêm sendo empregada e referenciada por muitos autores no mundo todo:

In the absence of biological differences between clades and no consensus about how DNA sequence alone can delineate a species, we recommend using “*Cryptococcus neoformans* species complex” and “*C. gattii* species complex” as a practical intermediate step, rather than creating more species. This strategy recognizes genetic diversity without creating confusion. (KNOW-CHUNG et al., 2017, p. 1)

A proposta foi pertinente porque, tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* constituem um verdadeiro complexo de muitas espécies fenotipicamente crípticas que, por sua vez, é algo característico de uma população em plena evolução.

Os autores lembram que “complexo de espécies”, em biologia, geralmente implica que duas ou mais espécies crípticas estão escondidas sob o nome de uma espécie, o que torna tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* complexos de espécies típicos e que, ao contrário de uma espécie, um complexo não tem status nomenclatural e não requer mudança de nome. Os tipos moleculares dentro de cada complexo de espécies podem ser designados pelo seu tipo molecular (VNI/AFLP1, VGI/AFLP4, etc.) sempre que necessário.

Ademais, lembram ainda que os complexos de espécies são claramente definidos por métodos convencionais de diagnóstico que podem ser validados por dados moleculares e que o termo “complexo de espécies” também serviu para a estabilidade nomenclatural de outros táxons de fungos no passado.

Barião (2019) refere que espécies raras e/ou menos isoladas como as leveduras de *C. laurentii*, necessitam de uma identificação mais especializada. De acordo com o autor, em estudos baseados na análise da composição das bases de DNA nuclear e nos padrões de proteínas celulares, desse patógeno, foi revelado que *C. laurentii* também apresenta um grupo heterogêneo, sendo classificado como complexo *C. laurentii*.

Devido a esta heterogeneidade na espécie e ao aumento da incidência em infecções, este microrganismo vem sendo bastante estudado (PEDROSO et al., 2010; FARIA et al., 2014, apud BARIÃO 2019). Atualmente, os estudos filogenéticos das espécies *C. laurentii* e *C.*

*albidus* que foram relatadas como caso clínico não-*neoformans* e não-*gattii* estão levando estas espécies a uma nova reclassificação (LIU et al., 2015a; LIU et al., 2015b, apud BARIÃO, 2019).

O diagnóstico laboratorial clássico das espécies do gênero *Cryptococcus* é realizado por meio de exames direto, histológico, sorológico e cultura. O exame direto é realizado pela coloração da levedura com tinta nanquim para evidenciar a cápsula polissacarídica do fungo. O exame histopatológico é através da observação das características micromorfológicas das leveduras em amostras obtidas de biopsia. O isolamento do fungo é realizado em cultura e pode ser feito através de diferentes materiais biológicos, como líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue (SG), escarro induzido (EI) ou escarro espontâneo (EE), urina, entre outras (PEDROSO; CANDIDO, 2006; GAZZONI et al., 2009).

Devido às limitações no diagnóstico laboratorial clássico as quais dificultam a identificação final da espécie, novas abordagens estão sendo adotadas, como os métodos moleculares que vêm mostrando ser uma ferramenta excelente na identificação dessas espécies, além de confiável. Os métodos moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade, disponibilizando um diagnóstico precoce e rápido das suspeitas de criptococose (SAHA et al., 2009). Além de contribuírem na identificação da espécie, os métodos moleculares também possibilitam a identificação da variedade, tipo molecular e conseqüentemente o sorotipo do gênero *Cryptococcus*, sendo este essencial para estudos epidemiológicos. Desta maneira, as metodologias moleculares são essenciais para a identificação e a compreensão da virulência, patogênese e perfil de suscetibilidade de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos (SIDRIM et al., 2010; PASA, 2011).

Entre as principais técnicas moleculares que são utilizadas na diferenciação das espécies de *Cryptococcus*, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é a mais empregada.

Para a determinação dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* é utilizada a *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) que mostra ser uma ferramenta importante em estudo de epidemiologia molecular, onde são observadas variações entre espécies e intra-espécies (MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2008). Na PCR-RFLP, um determinado fragmento de DNA é amplificado com *primers* específicos e submetido às enzimas/endonucleases de restrição, gerando fragmentos com seqüências e tamanhos específicos (ABREU, 2008). Para *Cryptococcus* spp, os genes de polimorfismo amplificados para realizar a RFLP podem ser *MAT*, *URA5* e/ou *CAP59* (CHATURVEDI et al., 2000; ENACHE-ANGOULVANT et al., 2007; MATOS et al., 2012) que detectam as seqüências do DNA minissatélites e microssatélites em cada espécie

(MEYER et al., 2003; MORA et al., 2010). O gene *URA5* é o mais utilizado na PCR-RFLP o qual possui tamanho de fragmento correspondente a 850 pb (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000; SORRELL, 2001), apresentando uma cópia única com sequência conhecida, sendo polimórfica e com uma conservação primária na estrutura da enzima (CASADEVALL et al., 1992b). Este gene codifica a enzima orotidina monofosfato pirofosforilase que apresenta 98% de similaridade entre os tipos moleculares VNI, VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII e VGIV. Este valor de similaridade é determinante na diferenciação dos tipos moleculares do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* (CASADEVALL; FAN, 1992a).

A identificação molecular baseada na amplificação da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal (DNAr), considerada região com sequência de DNA conservada, possibilita uma classificação criteriosa sobre a identificação de gênero e espécies de fungos em geral, sendo considerado um “código de barras” universal para identificação do reino *Fungi* (WHITE et al., 1990). Esta técnica também vem sendo muito utilizada para a identificação das espécies do gênero *Cryptococcus* (WENGENACK; BINNICKER, 2009; FERREIRA-PAIM, et al., 2011; SCHOCH, et al., 2012; KÖLJALG et al., 2013). Entretanto, a diferenciação entre as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* não é eficientemente realizada pelo sequenciamento da região ITS (VU et al., 2016). A análise da composição do DNA com amplificação da região D1/D2 do ITS, possibilitou a divisão do complexo *C. laurentii* em dois grupos filogenéticos, onde são separados por características bioquímicas e fisiológicas, através de assimilação de carboidrato, fontes de nitrogênio e até mesmo por requerimentos vitamínicos. Com isto, diferentes espécies foram reclassificadas, onde algumas espécies foram transferidas para outros gêneros e outras foram incluídas neste complexo (SUGITA et al., 2000; TAKASHIMA et al., 2003).

### **1.1.5 Pombos urbanos Vs. *C. neoformans***

De acordo com Bellenzier (2014) são poucas as cidades que não comportam uma significativa população de pombos urbanos, aves geralmente onipresentes em metrópoles do mundo todo. Para a autora, trata-se de um animal global e cosmopolita – adjetivos que geralmente não são empregados para descrever animais, mas que são precisos para descrever o pombo urbano.

Coincidentemente, cosmopolita e global também são adjetivos que se encaixam perfeitamente ao *C. neoformans*. Nesse sentido, não é exagero afirmar que, assim como o

pombo urbano fez da cidade o seu habitat naturalizado, as leveduras do gênero *Cryptococcus* spp., em especial a espécie *C. neoformans*, os acompanharam nessa jornada, pois possuem uma relação saprobiótica com matéria orgânica rica em excretas de aves, particularmente as fezes ressecadas de pombos, conforme descrito nos estudos de Emmons desde a década de 1950 e citado por Lazera et al. (2004).

Um agravante dessa realação íntima e mútua entre pombo e *Cryptococcus* encontra-se, principalmente, na característica dessas aves descrita por Bellenzier (2014):

(...) o pombo vive nas mesmas construções habitadas pelo homem, alimenta-se nas ruas e calçadas e não em árvores, e, apesar de poder voar, é um animal que vive entre os pedestres das cidades: seu plano de atuação se dá no mesmo plano que o dos habitantes humanos das cidades, de forma que é um dos animais mais visíveis e presentes no cotidiano das grandes cidades. (BELLENZIER, 2014, p. 7).

Segundo Nunes (2003) pode-se considerar ainda outro agravante que envolve a problemática da urbanização desordenada das cidades associada à falta de políticas de controle ambiental urbano, rural e silvestre eficientes. De acordo com a autora, são três as razões básicas para a sobrevivência ou sucesso reprodutivo dessas aves nos centros urbanos:

1) Oferta abundante de abrigo: a arquitetura urbana de edifícios, monumentos e obras de engenharia e arquitetura, oferecem uma quantidade enorme de vãos, frestas e espaços que servem adequadamente para o pouso, abrigo e formação de ninhos, protegendo os pombos das intempéries, mesmo em locais onde a falta de verde é significativa; 2) Ausência de predadores: a ausência ou pequena existência de aves de rapina, predador natural das pombas em ambientes naturais, para o controle de aves doentes e fracas; e: 3) Grande quantidade de alimentos disponíveis: estas aves são pouco seletivas em sua alimentação e em meios urbanos as fontes de alimentação artificial são muito amplas e diversificadas, quer seja pela desordenação na destinação de resíduos provenientes de atividades humanas em todos os níveis, individuais ou coletivos, quer pela alimentação oferecida por pessoas na comunidade de forma eventual ou permanente. (NUNES, 2003, p. 9).

Convém lembrar que a criptococose, no entanto, não se trata da única zoonose transmitida por essas aves. Psitacose, salmonelose, toxoplasmose, além de shigelose, listeriose, aspergilose, processos dermatológicos e respiratórios diversos são citados por autores como relacionados com pombos, além de parasitas artóprodes como piolho, ácaros, percevejos e carrapatos (NUNES, 2003). Com excessão desses últimos parasitas, as doenças mencionadas anteriormente também possuem como a principal forma de infecção a inalação de partículas em aerossóis.

Diante de tantas características que representam risco à saúde pública, é natural que o pombo urbano seja classificado por muitos como uma praga urbana e equiparada aos ratos, outros animais detentores da transmissão de várias zoonoses, ou, nesse caso, como o grande

vilão da criptococose. No entanto, vale destacar a assertiva de Bellenzier (2014) de que talvez a presença constante do pombo na cidade seja tão incômoda por nos recordar do fato de que, assim como eles, não passamos de animais adaptados a uma certa realidade.

## 2 JUSTIFICATIVA

A concentração de pombos denominados urbanos, um problema comum em metrópoles do mundo todo, tornou-se um problema mesmo em cidades interioranas e relativamente pequenas, onde a presença dessas aves em praças, edificações e outros locais cuja estrutura oferece condições para a sua adaptação, reprodução e alimentação é cada vez mais notável e preocupante, sobretudo nos últimos anos, como se pode observar em Botucatu, região central do Estado de São Paulo.

Estudos que envolvem a detecção ou isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de fezes de pombos no Brasil e no mundo são comuns, mas nota-se que ainda ocorrem em menor número aos estudos que envolvendo isolamentos clínicos quando pesquisados para um levantamento bibliográfico nas principais ferramentas de busca de publicações científicas.

Considerando-se que a criptococose é facilmente adquirida pela inalação de aerossóis junto às fezes dos pombos, é uma doença grave, negligenciada e, em muitos casos de difícil diagnóstico e tratamento, foi que decidiu-se investigar a presença de *C. neoformans* em amostras ressecadas de fezes em Botucatu, bem como relevante e oportuno avaliar o conhecimento popular no âmbito da doença nesta pesquisa, frente ao já mencionado e visível crescimento populacional de pombos urbanos, inclusive em regiões interioranas.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Pesquisar a presença de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos, na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo;

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Pesquisar *Cryptococcus neoformans* em excretas ambientais de pombos provenientes de hospitais, praças e/ou escolas na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, através de técnicas da biologia molecular, em locais onde se verifica a combinação entre fluxo intenso de pessoas e presença significativa de pombos (*hotspots*), nas áreas urbanas e rurais do município;

- Analisar o conhecimento popular no âmbito da criptococose através da aplicação de questionário sobre o tema, e;

- Contribuir com a implementação de políticas públicas e campanhas educativas para a prevenção da criptococose e o controle de pombos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Locais de coleta (*hotspots*)

Para a definição dos *hotspots*, isto é, locais com fluxo de pessoas e infestação por pombos, levou-se em consideração a opinião de personagens da comunidade local, como autoridades em saúde e vigilância sanitária, gestores educacionais e outros cidadãos botucatuenses. Deste modo, definiram-se como prioridades, na ordem em que aparecem, os seguintes pontos: hospitais ou unidades de saúde; escolas ou unidades de ensino, e; praças públicas.



**Figura 3.** Fezes de pombos em placa informativa no *Boulevard*, um dos principais acessos ao interior do HCFMB/UNESP (foto: arquivo pessoal).

Uma vez definidos os *hotspots*, o critério adotado para a inclusão do local e a realização da coleta de amostras de fezes foi a presença significativa de pombos e, conseqüentemente, o acúmulo de fezes.

A ausência desses dois fatores (ou de pombos e suas excretas) resultou na exclusão do local na ocasião da visita para a realização das coletas, ocorrida entre os meses de março à maio de 2022. Nesse sentido, foram visitados ao menos 13 locais diferentes na área urbana e rural de Botucatu, conforme **tabela 2**.

**Tabela 2.** Relação de *hotspots* elencados e visitados no período de março a maio de 2022

	<b>Identificação dos <i>hotspots</i></b>	<b>Presença de pombos com acúmulo de fezes</b>
1	Hospital das Clínicas da FMB (Rubião Jr.)	SIM
2	Hospital Estadual de Botucatu (Jardim Aeroporto)	SIM
3	Pronto Socorro Infantil (Jardim Paraíso)	SIM
4	Pronto Socorro Adulto (Jardim Assumpção)	Ausentes
5	Largo São José (Centro)	Ausentes
6	E. E. Cardoso de Almeida (Centro)	SIM
7	E. E. Álvaro José de Souza (Jardim Peabiru)	Ausentes
8	Praça do Paratodos (Jardim Central)	Ausentes
9	Ginásio Municipal/Apape (Vila Eny)	Ausentes
10	Estância Demétria (Zona Rural)	SIM
11	Hospital Unimed I (Centro)	Ausentes
12	Hospital Unimed II (Jardim Assumpção)	Ausentes
13	Praça Isabel Arruda (Centro)	SIM

Deste modo, considera-se, neste trabalho de pesquisa, apenas os *hotspots* em que a coleta foi realizada. No total, pelo menos seis deles foram incluídos na pesquisa, sendo cinco distribuídos na área urbana (*hotspots* n<sup>os</sup> 1, 2, 3, 6, 10 e 13) e um situado na zona rural de Botucatu (Estância Demétria, *hotspot* n<sup>o</sup> 10).

Os *hotspots* que tiveram amostras coletadas e submetidas à extração de DNA para detecção molecular de *Cryptococcus neoformans*, bem como suas respectivas abreviações e localização geográficas (GPS), estão relacionadas na **tabela 3**.

**Tabela 3.** Relação de *hotspots* selecionados para a pesquisa, de acordo com o critério estabelecido, e suas respectivas coordenadas geográficas.

<b>BOTUCATU-SP</b> (Latitude 22° 53' 09" S e Longitude 48° 26' 42" O)	
<b>Identificação dos locais ou regiões de coletas</b>	<b>Localização Geográfica (GPS)</b>
<b>1.</b> HCFMB - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Rubião Jr.)	-22.890765677749613, -48.4956154449762
<b>2.</b> HE - Hospital Estadual de Botucatu (Jardim	S 22° 55' 45.0768"

	Aeroporto)	W 48° 27'43.8048"
3.	PSI - Pronto Socorro Infantil (Jardim Paraíso)	-22.86884541894623, -48.44454806817283
4.	EECA - E. E. Cardoso de Almeida (Centro)	S 22° 53'04.4016" W 48° 26'42.6372"
5.	PIA - Praça Isabel Arruda (Centro)	S 22° 53'15.3744" W 48° 26'44.1096"
6.	DE - Estância Demétria (Zona Rural)	-22.964063365298376, -48.417919310054046

### 3.3 Coletas

Apesar de não se tratar de espaços ou instituições privadas, as visitas e/ou coletas foram realizadas sempre mediante contato prévio e a anuência de gestores locais como da superintendência do HCFMB (modelo anexado/Apêndice A), exceto quando praça pública. Para cada um dos seis locais onde se verificou o acúmulo de fezes de pombos, foram obtidas sempre amostras em quintuplicata, cada uma delas contendo aproximadamente 1,5g de fezes.



**Figura 4.** Imagem do principal ponto de aninhamento de pombos no HCFMB atualmente, localizado sobre as obras da UTI Neonatal (foto: arquivo pessoal).

As coletas e o processamento das amostras foram realizados observando-se os riscos de contaminação, tanto individual quanto coletivo. Equipamentos e bancadas foram esterelizados

ou limpos com álcool 70% antes e após o processo. Os principais EPIs empregados no processo foram luvas descartáveis, pinças e outros instrumentos de metal (esterilizáveis), máscaras PFF2 sem filtro e óculos de proteção (figura 5).



**Figura 5.** Registro do pesquisador durante procedimento de coletas de amostras ambientais de fezes em unidade hospitalar no município de Botucatu (foto: arquivo pessoal).

As amostras foram acondicionadas em tubos, tipo *Falcon*, estéreis, à temperatura ambiente (figura 6) e colocadas em caixa de isopor destinada e devidamente identificada para transporte das mesmas. O processamento das amostras em laboratório se deu sempre em até 24 horas após suas respectivas coletas. O excedente de cada amostra foi devidamente lacrado, identificado e armazenado sob refrigeração em laboratório a 4° C, em caso de necessidade de repetição do experimento.



**Figura 6.** Tubos *Falcon* contendo amostras de fezes ambientais coletadas para o estudo (foto: arquivo pessoal)

### 4.3 Exames moleculares

#### 4.3.1 Extração de DNA

Em cada um dos seis *hotspots*, coletou-se pelo menos cinco amostras, totalizando 30 amostras processadas. Essas foram maceradas e pesadas para a obtenção de porções contendo entre 0,18g e 0,22g de fezes para o processo de extração de DNA, empregando-se o kit comercial *EasyPure® Stool Genomic DNA* (TransGen Biotech Co., LTD) e seguindo o protocolo do fabricante (Apêndice B).

##### 4.3.1.1 Protocolo de extração de DNA

O kit comercial *EasyPure® Stool Genomic DNA* (TransGen Biotech Co., LTD) é composto pelos itens e suas respectivas quantidades descritas na **tabela 4**.

**Tabela 4.** Relação dos componentes do kit comercial de extração *EasyPure® Stool Genomic DNA* (TransGen Biotech Co., LTD)

Componentes do kit EE301-01	Quantidades
Tampão de Lise/ <i>Lysis Buffer</i> 21 (LB21)	60 mL
Tampão de Precipitação/ <i>Precipitation Buffer</i> 21 (PB21)	15 mL
Tampão de Ligação/ <i>Binding Buffer</i> 21 (BB21)	35 mL
Tampão de Limpeza/ <i>Clean Buffer</i> 21 (CB21)	6 mL
Tampão de Lavagem/ <i>Wash Buffer</i> 21 (WB21)	12 mL
Tampão de Eluição/ <i>Elution Buffer</i> (EB)	10 mL
<i>Glass Beads</i>	12.5 g
Colunas de Rotação (ou Centrifugação) Genômica com Tubos de Coleta/ <i>Genomic Spin Columns with Collection Tubes</i>	50 unidades
Tubo sem Nuclease/ <i>Nuclease-free Tube</i> (2 mL)	100 unidades
Tubos de Coleta/ <i>Collection Tubes</i>	150 unidades

Antes de iniciar o processo, seguindo às orientações do fabricante, acrescentou-se etanol 100% aos concentrados CB21 e WB21 nas proporções descritas na **tabela 5**.

**Tabela 5.** Quantidades de etanol 100% adicionadas aos frascos de CB21 e WB21, respectivamente, por recomendação do fabricante do kit utilizado.

Component	Quantidade de etanol 100% adicionada
Clean Buffer 21 (CB21)	24 mL
Wash Buffer 21 (WB21)	48 mL

Baseado no protocolo do fabricante, na etapa um (*Step 01*) do protocolo de extração, em cada um dos microtubos de 2 mL contendo 0,18g de cada amostra de fezes maceradas, foram adicionados 0,25 g de *glass beads* e 1 mL de LB21. Os microtubos utilizados eram resistentes, o que permitiu a agitação das amostras com *glass Beds* em aparelho agitador *Precellys* (*Bertin Technologies*). Ainda nesta etapa, as amostras foram incubadas a 70°C em banho-maria por 10 minutos.



**Figura 7.** Imagem do *Precellys* utilizado no protocolo de extração, que possibilita uma mistura efetiva da amostra de fezes às *glass beads* e ao tampão LB21 (foto: arquivo pessoal).

Na sequência (*Step 2*), os microtubos foram centrifugados a 15.000 g por 2 minutos e o sobrenadante de cada um deles transferido para um novo microtubo de 2 mL previamente identificado. O passo seguinte (*Step 3*) foi adicionar 250  $\mu$ L de PB21, agitar em *vórtex* por 3 minutos e incubar os microtubos contendo as amostras no gelo por 5 minutos.

Na quarta etapa (*Step 4*) centrifugou-se, novamente, a 15.000 g por 2 minutos, e transferiu-se para um novo microtubo de 2 mL o sobrenadante sem, no entanto, exceder a quantidade de 600  $\mu$ L, conforme recomendação do fabricante. Adicionaram-se, então, na etapa cinco (*Step 5*), etanol e BB21 no mesmo volume que o sobrenadante de cada amostra foi obtido na etapa anterior e agitados em *vórtex* por 1 minuto.

Na etapa seis (*Step 6*), 650  $\mu$ L da solução obtida na etapa anterior foi transferida para uma coluna de centrifugação com tubo de coleta e centrifugada a 12.000 g por 30 segundos. Essa etapa foi repetida, conforme protocolo, até que toda a solução passou pela coluna de centrifugação e se depositou no tubo de coleta. Na mesma coluna, porém já na etapa sete (*Step*

7), foram adicionados 500  $\mu$ L de CB21 e centrifugado outra vez, a 12000 g por 30 segundos, descartando-se o sedimento na sequencia.

Na oitava etapa (*Step 8*) foram adicionados 500  $\mu$ L de WB21 e novamente os tubos contendo as respectivas amostras foram centrifugados a 12.000 g por 30 segundos com descarte do volume sedimentado.

A nona etapa (*Step 9*) consistiu na repetição da etapa oito e na décima etapa (*Step 10*), a coluna de centrifugação foi submetida a centrifugação, desta vez a 15.000 g por 2 minutos, para a remoção de qualquer WB21 residual.



**Figura 8.** Microtubos colocados de forma equilibrada em centrífuga refrigerada *Eppendorf* 5804 para os procedimentos de extração e precipitação de DNA das amostras de fezes de pombas coletadas em Botucatu/SP (foto: arquivo pessoal).

Na décima primeira (*Step 11*) e última etapa do protocolo, as colunas de centrifugação de cada uma das amostras foram colocadas em um novo microtubo do tipo *Eppendorf*<sup>®</sup>, desta vez de 1,5 mL e adicionou-se ao centro de cada coluna 50  $\mu$ L do tampão de eluição (EB). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 1 minuto e posteriormente centrifugadas a 12.000 g por 1 minuto para a eluição de DNA genômico.



**Figura 9.** Pesquisador em laboratório durante procedimento de quantificação de DNA genômico de cada uma das amostras (foto: arquivo pessoal).

Após o processo de extração de DNA das amostras realizou-se a quantificação de DNA em espectrofotômetro no Laboratório de Biologia de Fungos (*GE NanoVue Plus® Spectrophotometer*), em comprimentos de onda 260 e 280nm.

Para comprovar a qualidade do DNA extraído a partir das amostras, foram comparadas com extrações feitas a partir de cepas de *C. neoformans* extraídas de amostras gentilmente cedidas pela Dra. Luciana Trilles (FIOCRUZ/RJ) e utilizadas como controles positivos para as reações de PCR.

#### 4.4 Reações de PCR, *nested* PCR e eletroforese

Os *primers* utilizados na reação de PCR foram os *primers* fúngicos universais ITS-4 e ITS-5 (WHITE et al., 1990). Já na *nested* PCR, utilizou-se os *primers* específicos CN4 e CN5 para *C. neoformans*, desenhados por Mitchell (1994) a partir do sequenciamento das regiões ITS e do gene 5.8S, conforme **tabela 6**.

Todos os *primers* também foram previamente testados e padronizados com cepas de *C. neoformans* da FIOCRUZ para a garantia de resultados precisos nas análises das amostras ambientais.

**Tabela 6.** *Primers* utilizados para a identificação molecular de *C. neoformans*

<i>Primers</i>	Referências
ITS-4 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'	WHITE et al., 1990
ITS-5 5' - GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG - 3'	
CN4 5' - ATCACCTTCCCACTAACACATT - 3'	MITCHELL et al., 1994
CN5 5' - GAAGGGCATGCCTGTTTGAG - 3'	

O perfil de ciclagem aplicado para a PCR seguiu o descrito por Mitchel et al. (1994) que consistiu em: 95° C/1 minuto (primeiro estágio, 1x); 95° C/40 segundos, 55° C/50 segundos, 72° C/1 minuto (ciclos, 35x), e; 72° C/5 minutos (extensão final).

O perfil de ciclagem aplicado para a *nested* PCR também utilizou o descrito por Mitchel et al. (1994): 94° C/2 minutos (primeiro estágio 1x); 94° C/30 segundos, 57° C/30 segundos, 72° C/30 segundos (ciclos 30x), e; 72° C/5 minutos (extensão final).

O material amplificado foi posteriormente visualizado através da eletroforese em gel de agarose 1,5%. O preparo do gel de agarose 1,5% para eletroforese, foi realizado com 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer e a adição de 1,5g de agarose e homogeneizada. Em seguida, levou-se ao microondas para aquecimento por aproximadamente 2 minutos, até que a solução ficasse completamente translúcida. Com o auxílio de uma micropipeta, foi adicionado 10 µL de brometo de etídeo ao gel e novamente homogeneizado.

Utilizou-se o marcador de peso molecular 100pb (100bp *Ladder Plus, Ready-To-Use*, 5×50 µg/Sinapse Biotecnologia).

Após a conclusão da etapa da *nested* PCR, considerou-se positivo o *hotspot* que tivesse

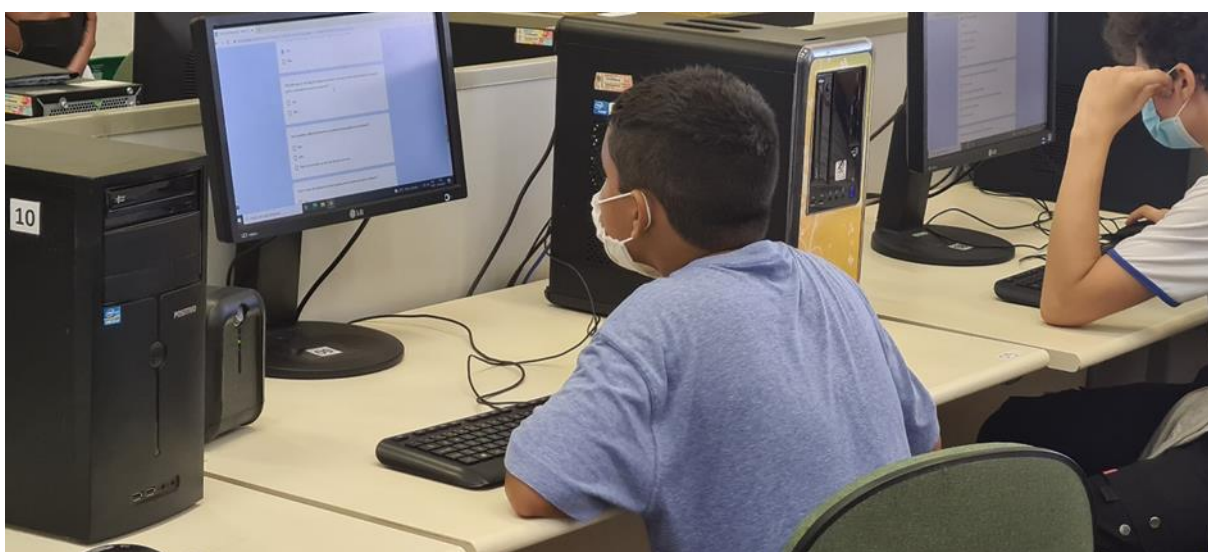
ao menos uma das cinco amostras amplificadas quando submetidas à eletroforese (90V/15min; 120V/20min).

#### 4.5 Questionário avaliativo do conhecimento sobre a criptococose e seus aspectos

Para avaliar o conhecimento no âmbito da criptococose, um questionário *online*, através da plataforma *Google Forms*, contendo 16 perguntas, sendo 10 diretamente relacionadas ao tema desta pesquisa foi elaborado e compartilhado nas redes sociais, visando mensurar, de modo não probabilístico, o conhecimento popular sobre a doença e os aspectos que a envolvem, como profilaxia, forma de contágio e sintomas.

Por se tratar de uma plataforma digital e *online*, a pesquisa não foi restrita ao município de Botucatu e dados como faixa etária, grau de escolaridade e profissão também foram coletados para posterior traçar um perfil dos entrevistados, bastante útil para discussão e extrapolação dos resultados.

O questionário *online* foi disponibilizado através do *link* encurtado <https://forms.gle/Yo1msoPLTuhCbnXs9>. Para coletas em vias públicas e outros espaços públicos, foi utilizado *tablet* ou computadores de laboratórios de informática com acesso à internet (quando em escola de educação básica, por exemplo) com o objetivo de estimular a participação e o interesse de jovens pelo tema (figura 12) que é de relevância sanitária, mas também educacional.



**Figura 10.** Adolescente participa da pesquisa respondendo ao questionário elaborado através de computador de unidade escolar (foto: arquivo pessoal).

A tabela abaixo apresenta as 16 perguntas contidas no questionário, com destaque em negrito para as dez sobre o tema em questão:

**Tabela 7.** Relação das perguntas contidas no questionário sobre criptococose

<b>Ordem no questionário</b>	<b>Descrição das perguntas</b>	<b>Opções de respostas</b>
1	Qual seu município?	-Assis;* -Botucatu;** -Outro.
2	Qual a sua idade?	-de 13 a 19 anos; -de 20 a 29 anos; -de 30 a 39 anos; -igual ou maior que 40 anos.
3	Sexo?	-Masculino; -Feminino.
4	Escolaridade?	- cursando o Ensino Fundamental; - Ensino Fundamental incompleto; - Ensino Fundamental completo; - cursando o Ensino Médio; - Ensino Médio incompleto; - Ensino Médio completo; - cursando a Graduação; - Graduação incompleta; - Graduação completo; - Pós-Graduação.
5	Profissão?	- Estudante de Educação Básica; - Estudante do Ensino Superior; - Profissional de saúde; - Educador ou professor; - Servidor em hospital ou unidade de saúde pública

		<p>ou privada;          -Servidor em escola pública ou privada;          -Outro.</p>
6	<p><b>Você conhece ou já ouviu falar no nome "doença do pombo"?</b></p>	<p>-Sim, mas não sei o que é;          -Sim e sei o que é;          -Não sei ou nunca ouvi falar;          -Apenas ouvi falar, não sei nada sobre;</p>
7	<p><b>De que forma você soube sobre essa doença?</b></p>	<p>-Sim, mas não sei o que é;          -Sim e sei o que é;          -Não sabe ou nunca ouviu falar;          -Apenas ouvi falar, não sei nada sobre.</p>
8	<p><b>Você já soube (ou sabe) de algum caso dessa doença próximo a você?</b></p>	<p>-Sim, de familiar;          -Sim, de amigo ou colega de trabalho;          -Sim, de pessoa desconhecida (através de noticiário, por exemplo);          -Não, nunca fiquei sabendo;          -Não sei responder.</p>
9	<p><b>Você sabe como a Criptococose/Doença do Pombo é contraída?</b></p>	<p>-Sim;          -Não.</p>
10	<p><b>Você tem conhecimento de como a transmissão dessa doença pode ser evitada?</b></p>	<p>-Sim;          -Não.</p>
11	<p><b>Você sabia que as fezes de pombos representam algum risco para a saúde?</b></p>	<p>-Sim;          -Não.</p>
12	<p><b>Você sabia que, se não diagnosticada precocemente, a doença do pombo pode resultar em sequelas graves ou</b></p>	<p>-Sim;          -Não.</p>

até mesmo na morte do paciente?

13	<b>Você considera o hábito de alimentar os pombos em locais públicos um problema?</b>	-Sim; -Não; -Não me incomodo ou não me importo com isso.
----	---	--

14	<b>Você é a favor de medidas de controle populacional de pombos nos centros urbanos?</b>	-Sim; -Não; -Não me incomodo ou não me importo com isso.
----	--	--

15	<b>Na sua opinião, quais dessas medidas poderiam contribuir para a redução da infestação de pombos em hospitais, escolas e praças, por exemplo?</b> <i>(Pode ser assinalado mais de uma alternativa)</i>	-Trabalhos de educação e difusão do conhecimento sobre a doença e suas causas; -Extermínio de pombos; -Punição ou multa para pessoas que alimentam pombos; -Projetos e pesquisas (científicas) que visem conhecimento, tratamento e cura da doença; -Não considero importante combater a doença; -Materiais didáticos e informativos para comunidade sobre a doença e como evitá-la; -Barreiras que impeçam o aninhamento dessas aves em prédios e instituições; -Outro.
----	---	---

16	Agradecemos sua participação e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos sobre a pesquisa e/ou sobre a doença pelos e-mails: Pablo ( <a href="mailto:ph.scherrer@unesp.br">ph.scherrer@unesp.br</a> ) e Sandra ( <a href="mailto:sandra.bosco@unesp.br">sandra.bosco@unesp.br</a> ).	<i>Participação facultativa</i>
----	---	---------------------------------

\*Cidade de origem do pesquisador.\*\*Cidade de desenvolvimento da pesquisa e do mestrado acadêmico.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados dos exames moleculares

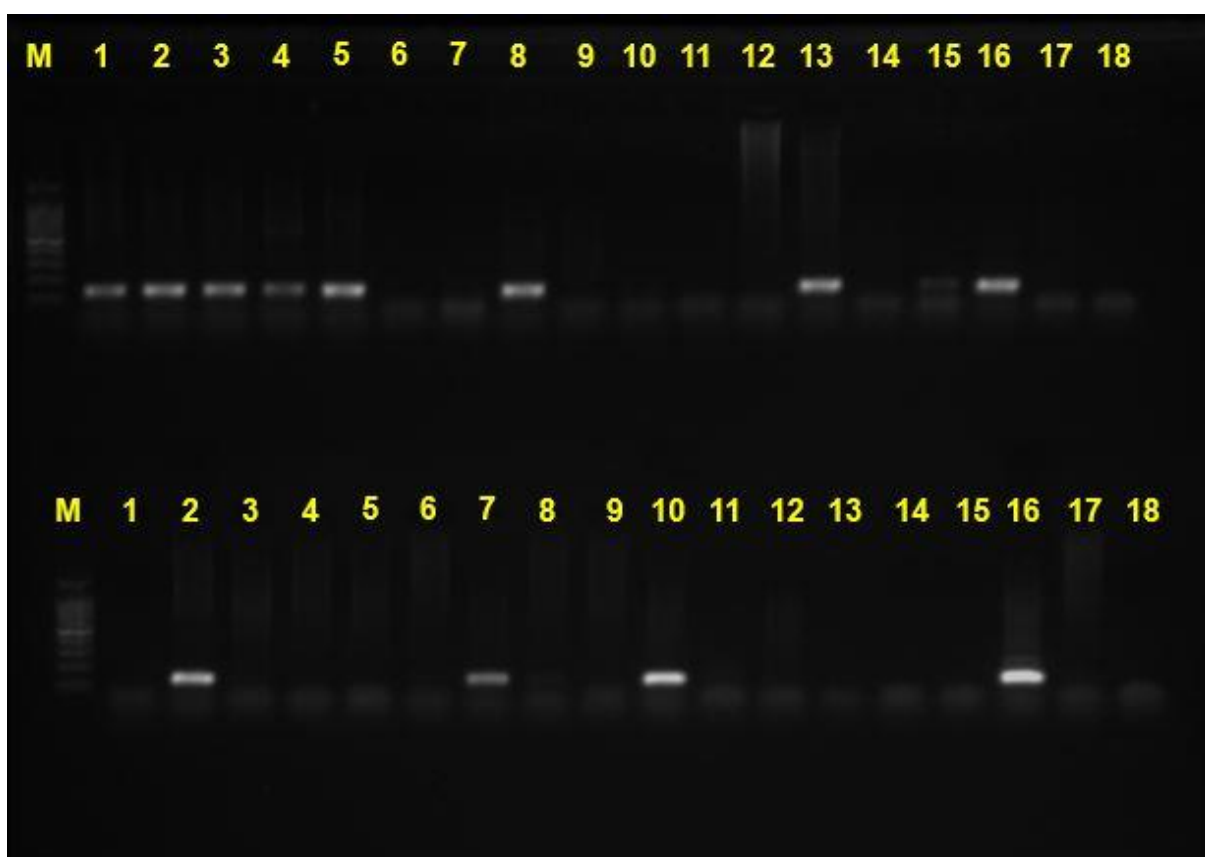
As concentrações de DNA obtidas, por amostra, estão dispostas na tabela a seguir:

**Tabela 8.** Relação das concentrações de DNA genômico obtidas após o protocolo de extração de DNA.

<b>Amostra</b>	<b>[de DNA]</b>
DE1	40.5 ng/uL
DE2	63.5 ng/uL
DE3	47.5 ng/uL
DE4	78.5 ng/uL
DE5	94.5 ng/uL
EECA1	100.5 ng/uL
EECA2	75 ng/uL
EECA3	50 ng/uL
EECA4	98.5 ng/uL
EECA5	71.5 ng/uL
HC1	127 ng/uL
HC2	46 ng/uL
HC3	75.5 ng/uL
HC4	85 ng/uL
HC5	77.5 ng/uL
HE1	90.5 ng/uL
HE2	54.5 ng/uL
HE3	58 ng/uL
HE4	80.5 ng/uL
HE5	137 ng/uL
PIA1	80 ng/uL
PIA2	74.5 ng/uL
PIA3	75.5 ng/uL
PIA4	39.5 ng/uL

PIA5	46.5 ng/uL
PSI1	66.5 ng/uL
PSI2	98 ng/uL
PSI3	103,5 ng/uL
PSI4	276 ng/uL
PSI5	219.5 ng/uL

Os resultados obtidos através de eletroforese em gel de agarose 1,5% detectaram a presença do *amplicon* de 136 pb de *C. neoformans* nos cinco *hotspots* urbanos pesquisados (figura 11). Nestes casos, observou-se a amplificação do DNA de *C. neoformans* em ao menos uma das cinco amostras coletadas, como pode ser observado nas imagens a seguir:

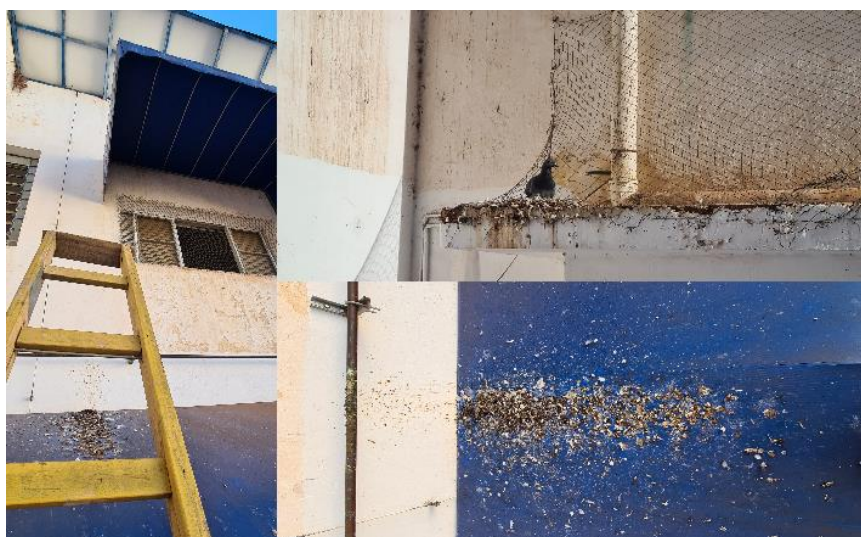


**Figura 11.** Eletroforese das 30 amostras coletadas em Botucatu: na parte superior, as cinco amostras do *hotspot* HCFMB (colunas 1-5), HE (colunas 6-10) e PSI (colunas 11-15). Na parte inferior, as amostras coletadas em EECA (colunas 1-5), PIA (colunas 6-10) e DE (colunas 11-

15). M: Marcador de peso molecular 100pb (100bp *Ladder Plus* Sinapse Biotecnologia), controle positivo (colunas 16 sup. e inf.) utilizando DNA de cepas de *C. neoformans* - FIOCRUZ e controles negativos (colunas 17 e 18 sup. e inf.) utilizando água *nuclease-free* da primeira e da segunda reação (*nested*) PCR, respectivamente.

O amplicon específico de *C. neoformans* gerado por CN4-CN5 (figuras 11) é de 136bp de comprimento (MITCHELL et al., 1994).

O resultado observado através da eletroforese das cinco amostras de fezes de pombos coletadas no Pronto Socorro Infantil (PSI) revela, através da amplificação da amostra 3 (coluna 13 da eletroforese superior, figura 11), que a unidade de saúde (figura 12) destinada ao atendimento exclusivo de crianças, localizada no Jardim Paraíso, positivou para *C. neoformans*.



**Figura 12.** Alguns dos pontos de coletas de fezes de pombos no *hotspot* PSI (foto: arquivo pessoal)

A eletroforese das cinco amostras coletadas no Hospital Estadual de Botucatu (HE), que correspondem às colunas 1 à 5, também revela resultado positivo para a unidade de saúde através da amplificação da amostra número 3 (coluna 8, eletroforese superior, figura 11). O HE está localizado no Jardim Aeroporto, pertence à área urbana e abriga a Oncologia no município.

Outra unidade de saúde em que foi verificada a presença de pombos e acúmulo de fezes, o HCFMB, é uma das maiores e mais importantes não só de Botucatu, mas de toda a região, já que recebe diariamente pacientes de várias cidades. Através de autorização expressa da superintendência do hospital (Apêndice A), foi possível a coleta de amostras no principal ponto

de aninhamento daquela unidade atualmente: as obras da UTI Neonatal. O resultado observado através de eletroforese (figura 11, colunas superiores 1 à 5 correspondentes às amostras 1 à 5, respectivamente) foi o mais alarmante dentre todos, com todas as cinco amostras amplificadas para *C. neoformans*. Tal resultado deve ser profundamente discutido neste trabalho.

Com os resultados analisados até aqui, pode-se inferir que 100% das unidades de saúde consideradas *hotspots* e que foram pesquisadas são positivas para a presença de *C. neoformans*.

Costa et al. (2014), refere a criptococose como sendo a terceira causa de doença oportunista do SNC causando meningite encefálica severa e geralmente fatal em pacientes com HIV/Aids. Embora o atendimento especializado a portadores de HIV/Aids no município tenha sido descentralizado do HCFMB desde 2004, para uma unidade próxima ao campus da Unesp e ao IBTEC no distrito de Rubião Júnior, os quadros graves, ou seja, complicações da doença que demandam de internação são encaminhados ao hospital das clínicas.

Um centro de transplantados é considerado um importante *hotspot* devido a suscetibilidade ou vulnerabilidade à criptococose desses pacientes transplantados que ali frequentam. Um aspecto preocupante relacionado à criptococose, a subnotificação de casos, é grave, pois, quando ocorre, por exemplo, em centros de transplantados, reduz a realização da sua profilaxia. Afinal, sabe-se que, para não haver a rejeição de órgãos transplantados, pacientes recebem altas doses de medicamentos que promovem sua imunossupressão (DE PAULI, 2020). Nestes casos em que a criptococose é subnotificada, a profilaxia acaba se concentrando para casos de infecções bacterianas ou virais.

A pesquisa pelo termo “criptococose” em notícias ou qualquer informação sobre a doença no portal do HCFMB (<https://hcfmb.unesp.br/?s=criptococose>) ou da FMB (<https://www.fmb.unesp.br/#!/noticias/busca/criptococose/pagina/1/>) encontrou um total de zero (0) resultados. No mesmo período e *sites*, a mesma busca pelo termo “transplante” traz mais de uma dezena de tópicos relacionados. Na ferramenta de pesquisa da *Google*, a busca por “hcfmb transplantes” indica que o hospital em questão realizou seis transplantes em uma semana em julho de 2020, dois transplantes de fígado em 24 horas em março de 2022 e que é destaque em transplante renal no interior de São Paulo, dentre outras informações.

Não há dúvidas de que a concentração ou fluxo de pessoas, ainda que saudáveis, isto é, imunocompetentes, em quaisquer locais onde facilmente se verifica a presença de pombos e, conseqüentemente, o acúmulo de suas fezes, representa um risco à saúde coletiva e também pode ser considerado, portanto, um *hotspot* para um surto da doença. É nesse sentido que devemos nos preocupar com as unidades básicas de saúde e seus arredores, onde se sabe que há pacientes imunodeprimidos e que esses locais geralmente são desprovidos de métodos

antipombos em suas estruturas, bem como em janelas, beirais e condensadores de ar-condicionado. Praças públicas onde há fluxo constante de pessoas não necessariamente imunodeprimidas e também escolas, sobretudo as de educação básica, frequentadas por centenas de crianças e adolescentes todos os dias, também necessitam ser incluídas neste tipo de levantamento, pesquisa e difusão científica de seus resultados, afim de se evitar que a doença ainda sem cura, faça vítimas fatais ou cause sequelas graves.

A eletroforese das amostras coletadas na Praça Isabel Arruda (PIA) na figura 11 (colunas inferiores 6-10) classifica como positiva para *C. neoformans* a praça localizada no centro da cidade e a apenas 30 metros de uma unidade hospitalar (o Hospital Unimed 1) em decorrência da amplificação das amostra 2 e 5 (colunas inferiores 7 e 10, respectivamente). A praça é bastante frequentada e, além do hospital citado, possui estacionamento ao seu redor, parada de ônibus, bancos para descanso e banca de jornal.

Também no centro de Botucatu, verificou-se a presença de *C. neoformans* em uma unidade escolar tradicional do município, a Escola Estadual Cardoso de Almeida (EECA). Os resultados de cada uma das amostras coletadas na EECA estão na eletroforese inferior da figura 11, que apresenta os resultados das cinco amostras coletadas (colunas inferiores 1-5, respectivamente). A amostra que classifica a escola positiva para a presença de *C. neoformans* é a amostra número 2 (coluna inferior 2 da figura 11).

Apesar de o ambiente escolar não ser um local cuja presença de pessoas imunodeprimidas seja uma característica marcante como nos hospitais, sabe-se que o uso de anti-inflamatórios na idade infanto-juvenil, por exemplo, é comum e pode afetar a imunidade. Ademais, nessa fase ainda pode haver imaturidade do sistema imune nessa fase (MEZZARI *et al.*, 2013 apud OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A criptococose em crianças ocorre mais frequentemente entre os 2 e 12 anos (CORRÊA *et al.*, 1999 apud OLIVEIRA *et al.*, 2017). Ademais, deve-se considerar ainda que, normalmente, não se dá a atenção devida ao controle da presença, abrigo e proliferação de pombos em suas estruturas, como forros, beirais, quadras de esportes, etc.



**Figura 13.** Imagens de alguns dos pontos de coletas de fezes de pombos no *hotspot* EECA, onde crianças dividem espaço com pombos cotidianamente e praticam esportes descalças e em quadra com acúmulo de fezes (foto: arquivo pessoal)

Os resultados observados e descritos permitem afirmar que todos os cinco *hotspots* urbanos pesquisados são positivos para a presença do principal agente etiológico da criptococose. Isto é, 100% dos pontos urbanos apresentaram uma ou mais amostras de fezes de pombos contendo *C. neoformans*.

Por sua vez, a Estância Demétria (DE), único *hotspot* rural pesquisado no município, cujo os resultados das cinco amostras coletadas estão contidos na eletroforese inferior da figura 11 (colunas inferiores 11 à 15, amostras de 1 à 5, respectivamente) não apresentou nenhuma amplificação e, portanto, foi o único ponto sem presença de *C. neoformans* detectada no período desta pesquisa.

Quanto aos demais locais visitados durante a pesquisa, porém não inclusos devido a ausência dos critérios pré-estabelecidos, Oliveira *et al.* (2017), que investigou a ocorrência de pombos e excretas em locais considerados potencialmente de risco para criptococose no município de Ituiutaba, Minas Gerais, refere que em alguns locais do seu estudo também não foram verificadas a presença de pombos e de excretas, em virtude da adoção de medidas que impediram o abrigo de pombos nas estalagens, como a instalação de telas entre o telhado e a laje, e que nem todos os locais com presença de pombos apresentou ocorrência de excretas, possivelmente pelo fato de ocorrer ações de limpeza diariamente (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A criptococose por *C. neoformans* (variedade *neoformans*) no Brasil, a primeira manifestação ocorre em cerca de 4,4% dos casos de AIDS e estima-se a prevalência da

criptococose associada à essa síndrome do sistema imune entre 8 e 12% em centros de referência da região sudeste do país (MS 2019 apud FROTA et al., 2020).

De acordo com Frota (2020), nas regiões norte e nordeste, há predominância de casos de criptococose em indivíduos sem evidência de imunodepressão, tanto no sexo masculino, quanto feminino, causados pela variedade *gattii*, com comportamento de micose como endemia regional. A meningoencefalite criptococócica ocorre em pessoas residentes destas regiões, com a inclusão de jovens e crianças, apresentando elevada morbidade e letalidade (37 a 49%), apresentando padrões regionais marcadamente distintos da criptococose por variedade *neoformans*, principalmente na região sudeste e sul do país. A taxa de mortalidade por criptococose é 10% nos países desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento a taxa é de 43% (MS 2019 apud FROTA et al., 2020).

Os resultados obtidos neste estudo em Botucatu, realizado a partir de excretas ambientais de pombos, corroboram o fato de que excrementos de pombos são comumente documentados como a principal fonte de *C. neoformans* na natureza. No entanto, há estudos que relatam que a levedura também foi isolada, em alta taxa, de excrementos de gaiolas de outras espécies de aves, inclusive pássaros domésticos. É o caso LUGARINI et al (2008) que obteve o isolamento de *Cryptococcus neoformans* de 34 (24,11%) amostras de passeriformes e duas (1,42%) amostras de psitacídeos, com ocorrência geral de 25,53% em seu estudo, e de ABBEG et al. (2006), que analisou amostras fecais de 59 espécies de aves em cativeiro mantidas em gaiolas em um Jardim Zoológico no Rio Grande do Sul, pertencentes a 12 ordens diferentes, das quais trinta e oito isolados ambientais de *C. neoformans* foram obtidos apenas de Psittaciformes (*Psittacidae*, *Cacatuidae* e *Psittacula*).

Outro aspecto importante na comparação com os resultados e considerações realizadas por Lugarini et al. (2008) diz respeito ao tipo de amostras estudadas no presente estudo no município de Botucatu, onde as amostras de fezes coletadas e estudadas foram as predominantemente ressecadas no ambiente. Lugarini relata que a maioria das amostras coletadas de psitacídeos foram do tipo molhada ou fresca no momento da coleta, e que isso pode ter contribuído para o fracasso do isolamento nesses casos. Os excrementos úmidos sofrem decomposição bacteriana, causando forte alcalinização do substrato e inibição do crescimento *C. neoformans*, enquanto o excremento seco é um substrato favorável porque tem menos bactérias viáveis e menos competição (GANADOS; CASTAÑEDA, 2005 apud LUGARINI et al., 2008), e, portanto, excretas dessecadas antigas são mais prováveis para abrigar um alto número de *C. neoformans* (MITCHELL, 1995 apud LUGARINI et al., 2008).

Durante a apresentação dos resultados preliminares deste estudo no CONBIO 2022

(Congresso de Biologia da UNESP/FC de Bauru) (Apêndice B), muito se perguntou sobre a possibilidade de isolamento de *C. neoformans* no trato digestório ou a partir da cloaca de aves e porquê elas demonstram ser imunes à infecção de uma levedura de alta patogenicidade. A baixa taxa de isolamento pode ser explicada através das condições impróprias de crescimento, incluindo a alta temperatura interna das aves, a alta concentração de amônia (ROSARIO et al., 2005, CAFARCHIA et al., 2006 apud LUGARINI et al., 2008) ou falta de glicose (NIELSEN et al., 2007 apud LUGARINI et al., 2008) em excrementos. As aves geralmente não manifestam uma verdadeira infecção provavelmente por causa da alta temperatura corporal e resistência à infecção (MITCHELL 1994 apud LUGARINI et al., 2008).

Na comparação entre o presente estudo realizado em Botucatu, onde 10 (33,3%) das 30 amostras coletadas de hospitais, praças e escolas foram positivas para a presença de *C. neoformans*, com outros estudos de isolados ambientais no Brasil e no mundo, temos o estudo realizado em 1994 na Cidade do México, onde 251 amostras de excremento de pombos foram analisadas e *C. neoformans* foi isolado em 52 (20,7%). A maior frequência do isolamento dessa levedura foi em amostras coletadas em prédios públicos (31,2%), seguido de igrejas (22%) e residências (13,3%) (CASTANÓN-OLIVARES et al., 1994 apud SOARES et al., 2005). Em outra avaliação, foram analisadas 522 amostras de excremento de pombos coletadas em 14 cidades de Porto Rico, das quais 129 (24,7%) foram positivas para *C. neoformans*, todos os isolados pertencentes à variedade neoformans (RUIZ et al., 1989 apud SOARES et al., 2005). Pesquisadores também realizaram um estudo em 634 amostras de excremento de pombo coletadas na Turquia e o resultado foi o isolamento de *C. neoformans* em 29 (4,6%) das amostras. No estudo em questão, a maioria desses isolados foi obtida de amostras coletadas em telhados e ninhos de pombos (YLDIRAN et al., 1998 apud SOARES et al., 2005).

Na cidade do Rio de Janeiro, foram estudadas 83 amostras do solo e 13,2% delas foram positivas para *C. neoformans* (LÁZERA et al., 1993 apud SOARES et al., 2005). Em estudo realizado na cidade de São Paulo, foi encontrada positividade para esse fungo em 21% dos locais amostrados em fezes de pombos (MONTENEGRO; PAULA, 2000 apud SOARES et al., 2005) enquanto na cidade do Rio de Janeiro foi encontrada positividade de 31% nas torres das igrejas com acúmulo de excremento de pombo (BARONI 2001 apud SOARES et al., 2005).

Os resultados obtidos por Randhawa et al. (2006) no noroeste da Índia chama a atenção com dados sobre a alta prevalência, densidade populacional de fungos, colonização e, principalmente, sobre isolamentos aéreos que indicam que a madeira em decomposição de *Syzygium cumini* representa risco à saúde pois ocorrem em cavidades de troncos de árvores nas proximidades de habitações humanas e animais. *S. cumini*, no Brasil, é conhecida como Jamelão

e é considerada como o principal nicho ambiental primário bem documentado de *C. gattii* e *C. neoformans* naquela região. Essa observação indicou que a dispersão de *C. gattii* e *C. neoformans* de uma árvore colonizada poderia ocorrer a outras árvores por seus aerossóis que podem ser gerados artificialmente ou por perturbações naturais de superfícies de madeira deterioradas devido a agentes como vento, insetos, pássaros, etc. Anteriormente, *C. gattii* já havia sido isolado do ar em amostragem realizada sob o dossel do eucalipto camaldulensis na Austrália e em amostras de ar coletadas perto das cavidades de duas Acácias-rosa (*Cassia grandis*) no Brasil (LAZERA et al. 2000; ELLIS et al., 1990 apud RANDHAWA et al., 2006).

Refojo *et al.* 2009 descreveu a distribuição de espécies de *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*) em cavidades de árvores de sete parques da cidade de Buenos Aires, para determinar os sorotipos e genótipos desses isolados ambientais e compará-los com os resultados de pesquisas anteriores. Das 489 amostras, coletadas limpando todas as árvores que apresentavam cavidades ou fissuras nos sete parques estudados, oito isolados de *C. neoformans* e 18 isolados de *C. gattii* foram recuperados de 15 das 489 amostras de árvores. Nesse estudo não houve tentativas de isolamento a partir do ar nas proximidades.

A quantidade de fezes depositadas no local de coleta do *hotspot* HCFMB, em que houve amplificação de *C. neoformans* nas cinco amostras coletadas, e o isolamento da levedura em amostras de ar atmosférico descrita por autores no Brasil e no mundo, sugere a necessidade da aplicação desse tipo de teste nas proximidades desses pontos. Nesse sentido, Soares *et al.* (2005) descreve que de 116 amostras analisadas na cidade de Santos, Estado de São Paulo, das quais 79 foram de fezes de pombos e 37 de ar atmosférico de regiões com acúmulo de fezes, *C. neoformans* (var. *neoformans*) foi isolado de 11 (13,9%) destas amostras. Outras espécies de *Cryptococcus* também foram isoladas destas amostras, tais como *C. laurentii* (8,9%) e *C. albidus* (12,6%), o qual também foi isolado de amostras do ar (5,4%). De acordo com o autor, a contaminação do ar foi verificada em 37 locais por meio de placas expostas por 15 minutos.

No levantamento bibliográfico do autor, o histórico da doença traz dados importantes sobre a presença de *C. neoformans* no ar. Soares et al. (2005) descrevem o relato de que uma taxa de isolamento de 54% já havia sido verificada no passado para *C. neoformans* a partir de poeira retirada de casas ocupadas por pacientes com AIDS (SWINNE et al., 1991 apud SOARES et al., 2005). Além disso, acrescenta que 154 residências humanas foram analisadas, coletando-se 824 amostras de poeira de dentro das casas, do solo e de excrementos de pássaros fora das casas. *C. neoformans* (var. *grubii*) foi isolado em 20 (13%) das residências; mais especificamente, de cinco das 32 residências de pacientes com AIDS associadas à criptococose, quatro (8,9%) das 45 residências de pacientes com AIDS não associadas à criptococose e 11

(14,3%) das 77 residências de indivíduos aparentemente saudáveis. Os autores verificaram que o principal fator associado à contaminação domiciliar por *C. neoformans* foi a presença de aves dentro da casa ou em seus ambientes (PASSONI et al., 1998 apud SOARES et al., 2005).

Dentre toda revisão bibliográfica levantada durante a pesquisa, o estudo realizado por Baroni *et al.* (2006) no Rio de Janeiro, RJ, Brasil, talvez seja o que mais se assemelha aos resultados obtidos em Botucatu. Afinal, Baroni *et al.* (2006) avaliaram a presença de *C. neoformans* a partir de excretas ambientais no Rio de Janeiro, RJ, Brasil, em dez igrejas e também descreve que *C. neoformans* estava presente em 100% desses *hotspots* urbanos (37,8% das 219 amostras das excretas das aves, bem próximo dos 33,3% das amostras de Botucatu). No entanto, além de fezes de pombo, também coletou amostras de ar das torres das igrejas e de áreas vizinhas: quinze (4,9%) do total das amostras de ar foram positivas (BARONI et al., 2006).

## **5.2 Aspectos da amplificação total das amostras coletadas no *hotspot* HCFMB**

De um modo geral, o resultado desta investigação da presença de *C. neoformans* tem sua relevância confirmada ao constatar que 100% da área urbana submetida aos exames moleculares são positivos para a levedura patogênica em estudo. No entanto, dentre os achados que são positivos, é o *hotspot* HCFMB o mais alarmante, não só pela amplificação total de suas amostras, mas pela referência em saúde pública que a unidade (que recebe milhares de pacientes anualmente) é em diversas áreas.

É importante salientar que já houve ou há uma preocupação com a proliferação de pombos no hospital, notada através da existência de sistemas antipombos como a rede que visa impedir o aninhamento dessas aves e se verifica instalada na área coberta do *Boulevard* (figura 18), um dos principais acessos ao interior da unidade. No entanto, embora este e outros tipos de tentativas de controle da infestação por essas aves seja visível, não existe absolutamente nada no *Boulevard*, que possui uma cantina para comércio de alimentos, ou em qualquer outro ponto do HCFMB, que forneça aos pacientes e demais usuários da unidade um alerta ou orientações sobre o consumo de alimentos no local, a criptococose e/ou as consequências que a alimentação direta ou indireta de pombos implicam.

De acordo com Schuller (2005 apud MIRANDA *et al.*, 2014) o alimento é um fator limitante para a espécie e o bando tende a ocupar locais onde há fartura. Entretanto, se o alimento é escasso, o bando se desloca diariamente até o alimento, qualquer que seja a

distância, podendo passar 85% do seu tempo diário percorrendo um raio de ação de até 600 metros do seu local de moradia. Quanto mais alimento disponível, maior será a capacidade reprodutiva, que varia de 10 a 14 ovos por ano/fêmea, num período médio de quatro a seis anos. Os ninhos podem ser reutilizados pelos animais após o abandono do primeiro casal, facilitando assim o aumento do número de indivíduos do bando.



**Figura 14.** *Boulevard* do hotspot HCFMB onde usuários adquirem e consomem alimentos cercados por pombos, fornecendo alimentos direta e indiretamente pra essas aves (foto: arquivo pessoal).

Distante apenas 100 metros, aproximadamente, da UTI Neotal (obras), encontra-se o local de coletas das amostras analisadas no *hostspot* HCFMB (figura 6). A quantidade de fezes depositadas no local sugere que, no período das coletas ou imediatamente anterior à realização das mesmas, o espaço tornou-se o principal ponto de aninhamento dessas aves na unidade hospitalar, provavelmente pela proximidade de uma das suas maiores fontes de alimento, o *Boulevard*, e por se tratar de um local coberto, protegido de vento forte e/ou chuva e, portanto, seguro e propício à instalação de ninhos e abrigo dos seus ovos.

### **5.3 Análise da influência da pandemia de COVID-19 em casos e notificações de criptococose**

O levantamento de dados para qualquer pesquisa quantitativa por meio de questionários requer cuidado especial. Deve-se considerar que não basta apenas coletar respostas sobre questões de interesse, mas sim saber como analisá-las (MANZATO & SANTOS, 2012).

Portanto, para a análise que se propôs, por simplicidade e impossibilidade de se obter amostras probabilísticas como seria desejável, empregou-se a amostra não probalística que, de acordo com Manzato & Santos (2012), muitas vezes têm os efeitos da sua utilização considerados equivalentes ao de uma amostragem probabilística, isto é, o método aplicado tem também sua importância.

Dentre os vários tipos descritos por autores dessa área de conhecimento, foi a amostragem a esmo ou sem norma, na qual o amostrador, para simplificar o processo, procura ser aleatório sem, no entanto, realizar propriamente um sorteio, o tipo de análise pretendida através da elaboração deste questionário, dentro da realidade e da viabilidade deste trabalho de pesquisa.

Durante a sua aplicação, no entanto, evitou-se o que Amaral-Bastos (2012) denomina de enviesamento da amostra não probabilística, que pode ter implicações nos resultados finais e, inclusive, comprometê-los, já que a seleção dos elementos da população para compor a amostra depende, ao menos em parte, do julgamento do pesquisador.

Em 2019, alguns meses antes da pandemia de COVID-19, ao menos três casos de óbitos por criptococose no interior de Estado São Paulo, ganharam notoriedade ao se tornarem destaques nos principais noticiários e na internet: dois deles em Santos, litoral paulista, e um em Taquaritinga, na região norte do Estado de SP. Nos casos de Santos, litoral de São Paulo, por exemplo, as vítimas foram um cinegrafista de 43 anos que morreu em 19 de julho de 2019, e um empresário de 56 anos que morreu quatro dias depois, em 23 de julho de 2019. De acordo com informações coletadas no portal de notícias G1, os familiares dos pacientes, que ficaram internados por aproximadamente quatro meses, relataram que ambos eram pessoas ativas e saudáveis.

No caso de Taquaritinga, a vítima, um homem de 38 anos, foi a óbito em 03 de setembro de 2019. Um mês antes, não apresentava nenhum problema de saúde antes de apresentar complicações por conta da doença do pombo. Portanto, em ambos os casos, nota-se que a criptococose comumente atribuída a pacientes imunodeprimidos, ou seja, classicamente uma doença oportunista, pode não estar restrita a esta condição, ao acometer indivíduos que sejam

passíveis de serem considerados saudáveis, ou seja, imunocompetentes à época da infecção, como refere Souto (2014).

Os casos descritos acima ocorreram imediatamente antes da pandemia de COVID-19 que também pode ter contribuído para um aumento da subnotificação de casos e mortes por criptococose e outras doenças desde a chegada do novo coronavírus ao Brasil em fevereiro de 2020.

Por outro lado, o uso compulsório de máscaras, inclusive em locais abertos como praças públicas e até mesmo nas áreas comuns ou ao ar-livre de condomínios residenciais, pode ter contribuído para a redução de casos, já que a principal forma de contaminação pelo *Cryptococcus* spp., assim como o coronavírus e suas variantes, é principalmente inalatória.

Concomitante ao início da pandemia de COVID-19 no Brasil, em 17 de fevereiro de 2020, através da portaria nº 264 de mesma data, foi incluída na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública, além da doença de Chagas crônica, a esporotricose humana, a paracoccidiodomicose e a criptococose. A verificação dos efeitos dessa portaria na realidade epidemiológica da doença deve levar ainda alguns anos e se dar, sobretudo, no período pós pandêmico.

A análise de óbitos que ganharam os noticiários em 2019 trouxe à tona um outro aspecto de relevância sanitária pode ser facilmente verificado em ambos os casos: a escassez ou total falta de conhecimento da população sobre a criptococose.

A esposa de uma das vítimas da criptococose em Santos, por exemplo, fez a seguinte declaração: “A gente correu, investigou e mesmo assim não teve sucesso em receber um diagnóstico completo. Eu sabia que o pombo trazia doença, mas eu não sabia que era uma doença tão grave como essa. É importante as pessoas ficarem em alerta.” (<https://g1.globo.com/sp/santos-regiao/noticia/2019/08/08/medicos-suspeitaram-que-empresario-morto-por-doenca-do-pombo-tinha-sindrome-do-panico.ghtml>).

Os familiares da vítima da criptococose em Taquaritinga, relataram que o rapaz de 38 anos era advogado em Ribeirão Preto (SP) e que suspeitam que ele tenha contraído a doença no escritório em que ele trabalhava pois, segundo os relatos, havia um aparelho de ar condicionado na sala dele, onde os pombos se aninhavam há algum tempo na parte externa do aparelho, denominada condensadora.

Tais informações disponíveis na mídia denotam o quão importante e necessário se faz a difusão da pesquisa e de conhecimento no âmbito da criptococose.

Em vista disso, são projetos de pesquisa como este e como, por exemplo, o de Corrêa Junior (2019) que, pela primeira vez, investigou e confirmou a presença de *C. neoformans* em

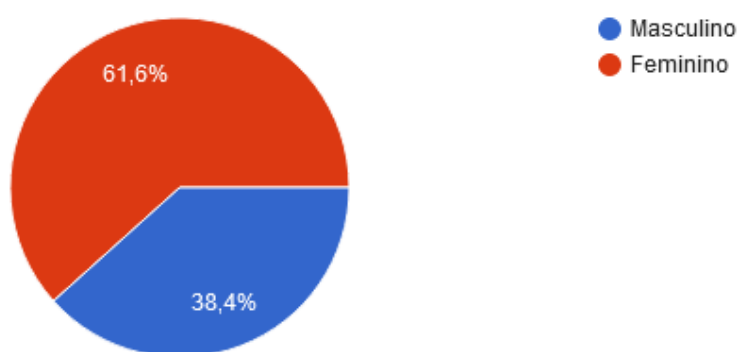
escolas municipais no Mato Grosso do Sul (PIMENTA, 2019), que fomentam as autoridades de Saúde Pública (VEs, SMS e outras) na implantação ou implementação de medidas de higienização, principalmente aquelas que permitam a redução das cargas ambientais destas leveduras nos substratos favoráveis ao seu desenvolvimento. Ademais, Corrêa Junior (2019) também produziu um material didático sobre criptococose que foi fornecido gratuitamente para gestores e estudantes da rede municipal de ensino de Campo Grande, para ampliar os conhecimentos sobre a doença, segundo ele, muitas vezes negligenciada no Estado de Mato Grosso do Sul.

## 5.4 Análise dos resultados do questionário sobre o conhecimento popular no âmbito da criptococose

### 5.4.1 Perfil dos entrevistados

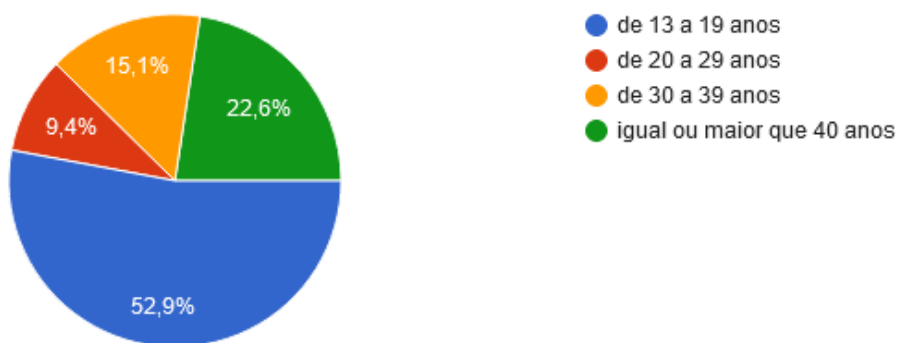
Através do questionário *online*, 425 pessoas foram entrevistadas, entre as quais se verifica a participação de 262 do sexo feminino (61,6%), e de 163 (38,4%) do sexo masculino (figura 19). Dessas, 225 são jovens de 13 a 19 anos de idade (52,9%); 40 possuem de 20 a 29 anos (9,4%), 64 têm de 30 a 39 anos (15,1%) e 96 com idade igual ou maior de 40 anos (22,6%) (figura 20).

Sexo



**Figura 15.** Gráfico do percentual de pessoas do sexo feminino e masculino que responderam ao questionário sobre criptococose

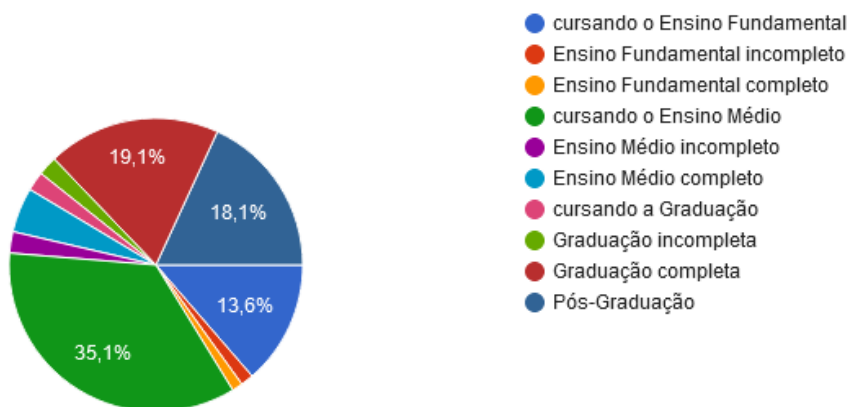
Qual a sua idade?



**Figura 16.** Gráfico do percentual de pessoas por faixa etária que responderam ao questionário sobre criptococose

O grau de instrução ou escolaridade do público atingido (figura 21), foram predominantemente: 149 estudantes cursando o ensino médio (35,1%); 81 com graduação completa (19,1%); 77 com Pós-Graduação (18,1%), e; 58 cursando o Ensino Fundamental.

Escolaridade



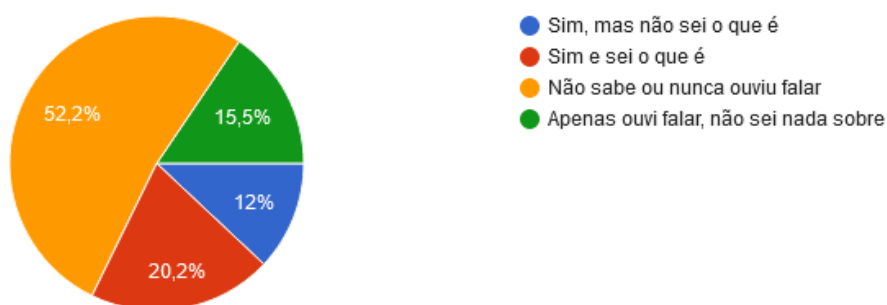
**Figura 17.** Gráfico do percentual de pessoas por faixa etária que responderam ao questionário sobre criptococose

As profissões mais indicadas ou declaradas foram: 1) Estudante de Educação Básica: (38,4%); 2) Educador ou professor (20,7%); 3) Estudante de graduação (7,8%), e; 4) Profissional de saúde (3,8%). E ao menos 25 cidades diferentes foram mencionadas como origem do entrevistado.

## 5.4.2 Interpretação dos dados obtidos

Conforme as perguntas elaboradas para o questionário sobre criptococose e na metodologia aplicada, obteve-se os seguintes resultados e as respectivas discussões da sua relevância:

Você conhece ou já ouviu falar no nome Criptococose?

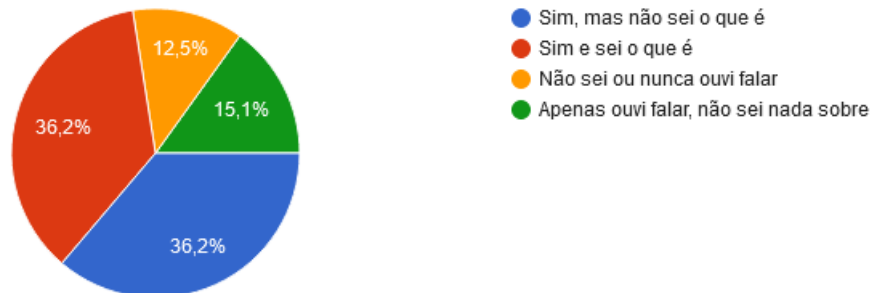


**Figura 18.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre criptococose a partir do termo “criptococose” para identificação da doença

Quando perguntado se o entrevistado tem conhecimento ou já ouviu falar em criptococose (figura 18), mais da metade deles, isto é, 52,2%, afirmaram que “não sabe ou nunca ouviu falar”; apenas 20,2% afirmaram que “sim e sabe o que é”, e; 27,5% (12% mais 15,5%) que apenas “ouviu falar”, percentual que também pode se somar aos que não sabem o que é (79,7%) e revelar um alto índice de desconhecimento geral da doença a partir do termo criptococose. Essa diferença entre o percentual dos que afirmam que “sabe o que é” e os que, definitivamente, não sabe ou nunca ouviu falar poder ser atribuída ao termo criptococose, (ainda) pouco difundido na sociedade.

Quando perguntado ao entrevistado se ele tem conhecimento ou já ouviu falar na mesma doença, desta vez, a partir do seu nome popular (doença do pombo), o percentual dos que afirmam que já ouviu falar foi de 87,5% (soma dos percentuais dos que ouviram falar no termo popular, ainda que não saibam o que é). Porém, o percentual daqueles que, além de conhecer o termo popular para a doença, declararam possuir algum conhecimento sobre ela (provavelmente despertado a partir do nome popular) foi maior: 36,2% frente aos 20,2% quando a partir do termo criptococose, conforme a figura 19 a seguir:

Você conhece ou já ouviu falar no nome "Doença do pombo"?



**Figura 19.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre criptococose a partir do seu nome popular

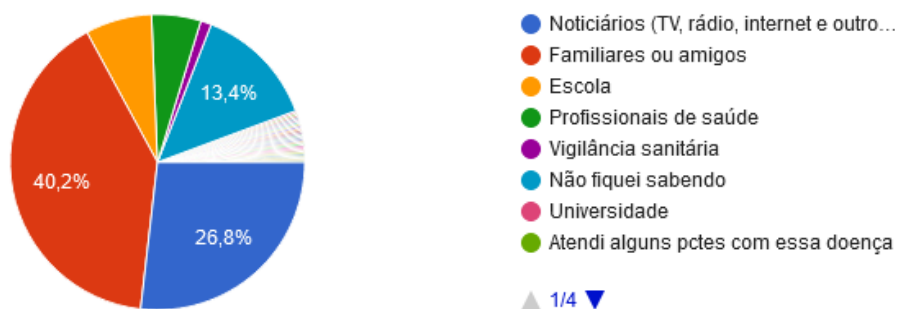
Esse percentual elevado de desinformação sobre a doença, independente do termo empregado para se referir a ela, pode ser comparado com resultados obtidos por Miranda et al. (2014), que aplicou questionário com objetivos análogos ao da presente pesquisa e refere que informações equivocadas têm implicado na associação da figura dos pombos com zoonoses não relacionadas a esta espécie, despertando, inclusive, manifestações de repulsa aos pombos por parte da população em áreas urbanas. Em seu estudo, apesar de 95,8% dos entrevistados apontar os pombos como agente transmissor de doenças, apenas 17,6% indicaram a criptococose como a zoonose em questão.

Miranda et al. (2014) também avaliaram a percepção da população sobre a participação dos pombos como fontes de infecção de zoonoses, através de questionários aplicados na orla da praia de Santos e em praças da cidade de São Paulo (em locais públicos com uma grande concentração de pessoas e de pombos). Em sua pesquisa, refere que 215 pessoas foram entrevistadas de maneira aleatória, ou seja, valendo-se também da amostragem não probabilística. A faixa etária pesquisada pelos autores variou entre 18 e 85 anos e diferentes graus de escolaridade, evitando-se assim preferências e preconceitos.

Quando investigada a forma através da qual as pessoas normalmente adquirem conhecimento acerca desse tema, o gráfico (figura 20) é bastante elucidativo. Os cinco principais meios citados são: 1) familiares ou amigos: 40,2%; 2) noticiários: 26,8% (independente do tipo); 3) na escola; 4) através de profissionais de saúde, ou; 5) por meio da vigilância de sanitária. É que, de fato, a primeira reação observada entre os entrevistados que desconheciam totalmente a criptococose até o recebimento do *link* do questionário, logo após a

conclusão do mesmo, era buscar por esclarecimentos sobre a doença e mencionar que falaria com seus entes queridos a respeito (transmissão de conhecimento) a fim de evitá-la.

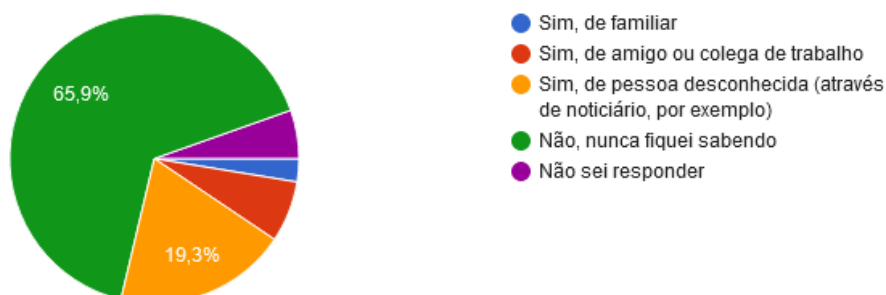
De que forma você soube sobre essa doença?



**Figura 20.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar os principais meios de obtenção de informação sobre a criptococose

A principal interpretação que se pode extrapolar a partir do gráfico com os resultados da questão sobre casos de criptococose próximos ao entrevistados (figura 25) é da relevância da doença mesmo em amostra relativamente pequena de entrevistados. Embora 65,9% refere que nunca ficaram sabendo de casos de criptococose e 19,3% de pessoa desconhecida, são os dados referentes a casos entre amigos ou colega de trabalho (6,8%) e de familiar (2,96%) que chamam a atenção. Afinal, os resultados preliminares aqui apresentados correspondem a um universo de 425 participantes. Nesse caso, o número de casos próximos, de amigo ou colega de trabalho, equivale a 29, ou seja, em média, aproximadamente seis a cada 100 pessoas conhece ao menos um amigo (ou colega de trabalho) que tem (ou teve) criptococose. Já no caso de familiar, o número de casos próximos referidos até aqui foi de 11, que corresponde a uma média de aproximadamente duas a cada 100 pessoas com pelo com caso de criptococose na família.

Você já soube (ou sabe) de algum caso dessa doença próximo a você?

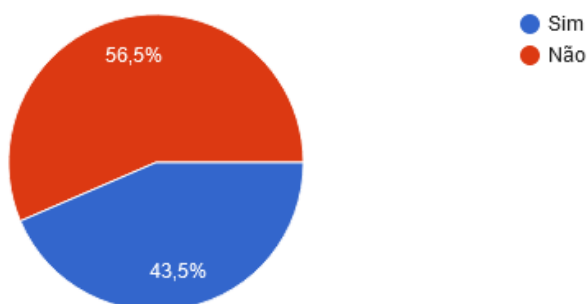


**Figura 21.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão sobre casos de criptococose próximos ao entrevistado

Outro ponto importante dessa pesquisa foi avaliar um aspecto que está diretamente relacionado com a prevenção da doença (figura 22). Afinal, só é possível combater e evitar uma doença sabendo como o seu agente etiológico pode infectar os seres humanos. Ao conhecer como se dá a infecção por *C. neoformans*, as pessoas podem adotar hábitos que permitem evitá-la de modo mais efetivo como, por exemplo, utilizar máscara para limpeza de área com acúmulo de fezes ressecadas, bem como utilizar água com um pouco de água sanitária diluída durante o processo. Essas são medidas simples mas que reconhecidamente reduzem o risco de contaminação pelo ar e infecção por *C. neoformans* a zero, haja vista que o principal meio de contaminação é por partículas sólidas de fezes (poeira) misturadas à levedura em suspensão Souto (2014).

Quando perguntado, no entanto, se o participante sabe ou não a forma como um indivíduo pode contrair criptococose, mais de metade dos entrevistados (56,5%) respondeu que não, conforme o gráfico da figura 22. Note-se que o nome popular da doença é citado na questão junto ao termo criptococose, de modo a se extrair do entrevistado uma resposta coerente com o seu conhecimento prévio da doença, isto é, independente do termo empregado e, ao mesmo tempo, evidenciar que se tratam da mesma doença e que se familiarizem seus nomes.

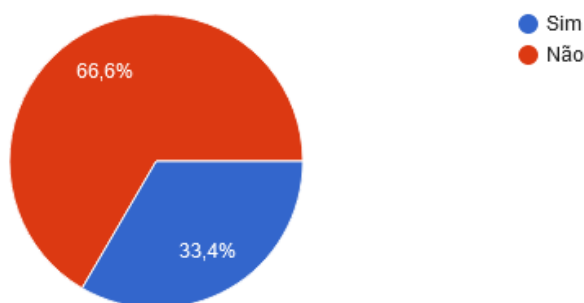
Você sabe como a Criptococose/Doença do Pombo é contraída?



**Figura 22.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre como a criptococose é contraída, mostrando que mais da metade dos entrevistados desconhece como a doença é causada em seres humanos

Essa relação sugerida entre conhecimento e prevenção pode ser comparada com o resultado observado quando, na sequência, se pergunta ao entrevistado se, de fato, ele sabe como a transmissão da criptococose pode ser evitada (figura 23). É evidente também que, como paulatinamente vem sendo enfatizado no desenvolvimento e na discussão desse trabalho, as ações de educação ambiental e conscientização em saúde são escassas e, quando ocorrem, não são de maneira coordenada, isto é, não envolvem escolas, vigilância sanitária, unidades hospitalares ou de saúde, universidades e outras instituições. O resultado é que dois terços (66,6%) dos participantes desconhecem medidas de como se evitar a doença:

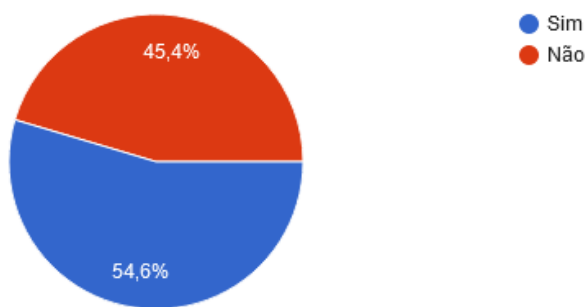
Você tem conhecimento de como a transmissão dessa doença pode ser evitada?



**Figura 23.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre a prevenção da doença

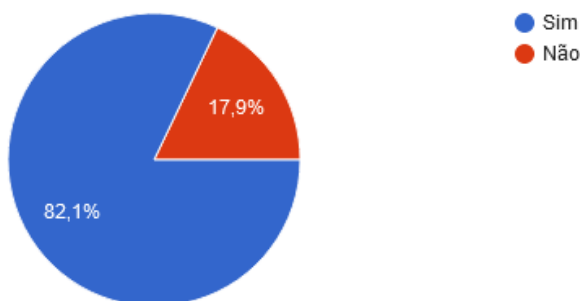
A análise dos resultados das questões das figuras 24 e 25 denotam que, embora a grande maioria dos entrevistados não detenham conhecimento sobre criptococose, existe uma espécie de percepção significativa de que os pombos são vetor de doenças de importância médica, como também verificado por Miranda *et al.* (2014). Quando perguntado ao entrevistado se o mesmo tem conhecimento da gravidade da criptococose, bem como da importância de um diagnóstico precoce (figura 24), mais da metade (54,6%) sugeriu que sim. Por sua vez, ao se questionar sobre a relação entre fezes de pombos e o risco à saúde (figura 25), 82,1% dos entrevistados sugeriram que sim, isto é, que sabem (ou supõe) que é das excretas dessas aves a origem de doenças.

Você sabia que, se não diagnosticada precocemente, a doença do pombo pode resultar em sequelas graves ou até mesmo na morte do paciente?



**Figura 24.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre a gravidade da criptococose

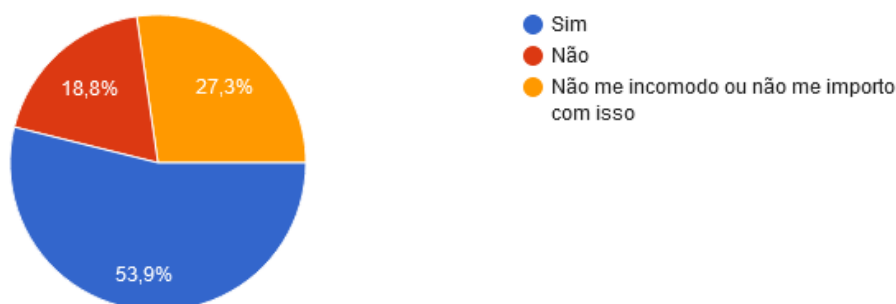
Você sabia que as fezes de pombos representam algum risco para a saúde?



**Figura 25.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que pretende avaliar o conhecimento sobre a principal forma de infecção por *Cryptococcus* spp. e o risco que as fezes de pombos contaminadas representam

Já em relação a um dos maiores desafios no controle da infestação por pombos nos centros urbanos - a disponibilização voluntária e involuntária de alimentos às aves, o gráfico a seguir (figura 26) demonstra haver uma pré-disposição da maioria das pessoas (53,9% dos entrevistados) em evitar a prática de alimentar pombos em espaços públicos como praças e hospitais, enquanto 18,8% não considera que isso represente um problema e 27,3% demonstre indiferença a essa questão:

Você considera o hábito de alimentar os pombos em locais públicos um problema?



**Figura 26.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão sobre o hábito de alimentar pombos em locais públicos como praças e outros

Ao se aprofundar na problemática da infestação por pombos, pode-se inferir, a partir do gráfico da questão que pretende verificar o quão favorável as pessoas são às medidas de controle populacional dessas aves (figura 27), que a grande maioria (72%) compreende a necessidade da implementação de medidas, provavelmente motivada pela percepção do aumento significativo dessas aves nos centros urbanos. Note-se que, em comparação ao resultado obtido no gráfico anterior, onde se verificou que 46,1% (soma de 18,8% e 27,3%) não consideram alimentar os pombos um problema ou não se importam com isso, apenas 8,7% não são favoráveis a medidas de controle dessas aves:

Você é a favor de medidas de controle populacional de pombos nos centros urbanos?



**Figura 27.** Gráfico do percentual de respostas obtidas para questão que verifica o quão favorável as pessoas são para medidas que visam controlar a proliferação de pombos nas cidades

Ainda sobre o resultado acima (figura 27), ao se evidenciar, portanto, que mesmo entre os entrevistados que tem o hábito de alimentar ou não consideram alimentar pombos em locais públicos um problema, existam pessoas favoráveis às medidas de controle populacional dessas aves (comparativo entre os resultados dos gráficos das figuras 26 e 27), fica claro um dos maiores gargalos existentes no controle dessas aves: o não coordenamento de medidas de controle com medidas educativas. Afinal, com os resultados obtidos, infere-se que, mesmo entre as pessoas que se mostram favoráveis a esse tipo de medidas, há pessoas que consideram que disponibilizar alimentos aos pombos não é um problema e, sem o conhecimento necessário, deverão seguir perpetuando esse hábito.

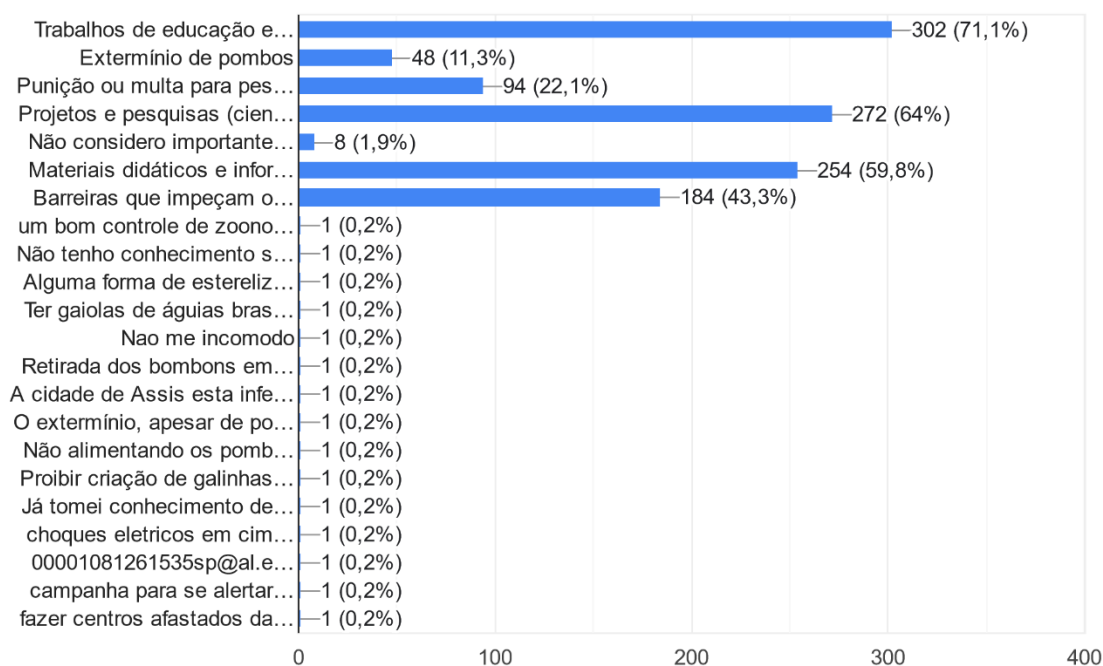
O maior exemplo disso no município de Botucatu, encontra-se no *hotspot* HCFMB. Conforme já referido e demonstrado ao longo desse trabalho, a unidade hospitalar em questão que apresentou um dos resultados mais alarmantes da detecção molecular de *C. neoformans* próximo à sua UTI Neonatal, possui instalada na área coberta conhecida como *Boulevard*, ou seja, acima da cabeça das pessoas que acessam o interior da unidade ou permanecem sentadas em um dos bancos existentes ali, redes que visam impedir o aninhamento de pombos no local, uma das principais medidas verificadas para o controle da infestação por essas aves não só em unidades de saúde, mas em escolas e quadras de esportes, por exemplo. No entanto, abaixo dessas redes, estão pessoas que continuam a alimentar e atrair pombos, direta e indiretamente, e absolutamente nenhuma placa ou medida educativa orientando os usuários do *Boulevard* a não alimentar essas aves ou evitar consumir alimentos no local, apenas orientando que, no

mesmo local, é proibido fumar. Sem medidas de controle coordenadas com medidas educativas, portanto, verifica-se a ineficácia da tentativa de controle empregada (redes antipombos) e, com isso, o desperdício de recursos públicos.

A última questão sobre o tema (figura 28), por sua vez, permite inferir que a saída para um problema que é acentuado pelo ser humano está no próprio ser humano.

As três respostas mais assinaladas pelos entrevistados dentre todas as medidas conhecidas que contribuem para a redução e/ou controle de infestações por essas aves foram, nessa ordem: 1) Trabalhos de educação e difusão do conhecimento sobre a doença e suas causas; 2) Projetos e pesquisas (científicas) que visem conhecimento, tratamento e cura da doença, e; 3) Materiais didáticos e informativos para comunidade sobre a doença e como evitá-la.

Na sua opinião, quais dessas medidas poderiam contribuir para a redução da infestação de pombos em hospitais, escolas e praças, por exemplo? (Pode ser assinalado mais de uma alternativa)  
425 respostas



**Figura 28.** Gráfico do percentual de respostas assinaladas para medidas que, na opinião do entrevistado, contribuem para a redução da infestação de pombos nos centros urbanos

Nota-se na figura 28 que apenas 11,3% assinalaram o extermínio de pombos como alternativa de controle populacional. Embora não se pode inferir repulsa à essas aves por parte

dos 72% de pessoas favoráveis à medidas de controle (figura 27), pode-se inferir repulsa dos 11,3% de pessoas, já que existem outros métodos de controle como alternativas ao extermínio dentre as opções que poderiam ser assinaladas pelo entrevistado.

Para fins de comparação entre os dados obtidos nesta pesquisa com os de outros autores, sobre essa relação entre seres humanos e pombos, os resultados dos estudos de Miranda et al. (2014) descrevem que 63,7% dos entrevistados, na ocasião, associaram a figura dos pombos com a dos roedores, que 25,5% das pessoas classificaram os pombos como animais nojentos, 44,6% afirmaram evitar o animal em função do medo de comprometer a saúde 14,8% afirmaram evitar os animais pelos dois motivos, risco de transmissão de doenças e nojo da ave, ou seja, manifestaram repulsa pela presença das aves. Por sua vez, quando avaliaram a percepção das pessoas nas praças do centro de Curitiba, Paraná, em relação à presença de pombos, Martins et al., (2015) descreve que 60,1% dos 887 entrevistados foram contra a presença dos pombos.

Outros dados importantes levantados por Martins *et al.* (2015) é que a maioria dos entrevistados considerou a quantidade de pombos exagerada (69,6%) e atribuíram como causa a disponibilidade de alimento (44,1%). Ademais, 93% afirmaram que pombos podem transmitir doenças e as mais citadas foram doenças respiratórias (35,3%) e doenças causadas por piolhos ou pulgas (22,8%). Já o principal problema relatado foi a sujeira (57,4%) e a ação mais aprovada para controle populacional também foi a educação da população, com 69,6%.

## 5.5 Perspectivas e desafios

A proliferação e a adaptação dos pombos em centros urbanos estão associadas principalmente à disponibilidade de alimentos nesses locais. Não existem estatísticas e levantamentos que indiquem a quantidade exata de pombos em centros urbanos mas, sob o ponto de vista sanitário, quanto maior o número de indivíduos, maior será o perigo de exposição aos agentes patogênicos, presentes nas fezes destas aves (KAHN *et al.*, 2012 apud MIRANDA *et al.*, 2014).

Ante o exposto, a necessidade da detecção de *Cryptococcus* spp. torna-se um fator de extrema relevância em áreas urbanas, pois, além de permitir um mapeamento e delineamento de áreas de risco de contaminação, endossa medidas de controle do seu principal vetor, os pombos que, apesar disso, não devem ser encarados como culpados e sujeitados à medidas extremas de controle populacional como o extermínio.

Pesquisas sobre a percepção da população em relação às pragas urbanas ou de avaliação de conhecimento sobre zoonoses como foi proposto e realizado nesta dissertação, contribuem para abordagens de temas relevantes como este da criptococose nas comunidades locais. A participação nesses tipos de pesquisa desperta a curiosidade dos entrevistados pelo tema, sobretudo dos mais jovens, que após a aplicação do questionário, tecem perguntas sobre o tema de maneira espontânea, um comportamento que é característico desse público e que geralmente os leva a compartilhar da experiência em suas casas, com seus pais e outros familiares.

Campanhas de esclarecimento e de difusão da ciência por trás de projetos de pesquisa como este são estratégias auxiliares de prevenção que, em parceria com autoridades sanitárias e instituições públicas, podem garantir excelentes resultados no sentido de minimizar os riscos existentes. Nesse âmbito, vale destacar o método inovador e contemporâneo através do qual a XI Semana da Biologia da UFABC (2022), um dos eventos em que os resultados dessa pesquisa foram publicados (Apêndice C), propôs para a apresentação de trabalhos: o resumo deveria ser no formato de postagem na rede social *Instagram*, contendo até 10 slides (ou páginas) com pouco texto (letras grandes) e figuras (livres de direitos autorais), sendo que o primeiro slide deveria conter o título do trabalho (de modo a instigar a curiosidade, sugeriu a organização) e no último slide o nome e o contato dos autores (*e-mail* ou perfil na rede social *Instagram*). Esse formato de divulgação rompe com o método convencional de exposição de resumos em eventos e mostra-se abrangente já que, de acordo com Volpato (2022), o *Instagram* está entre as redes sociais mais usadas no Brasil, atrás apenas do *YouTube* e do *WhatsApp*.

Por fim, a subnotificação de casos de criptococose verificada até a publicação da portaria

que tornou sua notificação compulsória em 2020, por muitos anos, se fez marcante na trajetória epidemiológica da doença, corroborando a assertiva de Megda e Bonafé (2013), de que a subnotificação de doenças infecciosas (ainda) é uma realidade do sistema de saúde brasileiro.

## 6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento da pesquisa possibilitou detectar *C. neoformans* em cinco dos seis *hotspots* avaliados, todos pertencentes à área urbana do município de Botucatu, Estado de São Paulo, e com grande circulação de pessoas.

Os resultados, ainda que preliminares, possibilitaram detectar a prevalência do principal agente etiológico da criptococose em imunodeprimidos (*C. neoformans*) em uma das maiores e mais importantes unidades hospitalares da região: o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB), localizado no campus da Unesp, em Rubião Júnior. Ademais, o Pronto Socorro Infantil, bem como o Hospital Estadual no município, que abriga a Oncologia e, portanto, realiza tratamentos imunossupressores como quimioterapia e radioterapia, também positivaram para *C. neoformans*.

As informações obtidas neste estudo no âmbito do conhecimento sobre a criptococose revelam que a maioria dos entrevistados reconhece os pombos e, principalmente suas fezes, como agentes transmissores de doenças. No entanto, desconhecem a zoonose transmitida e seus aspectos, refletindo um alto grau de desinformação da população.

Juntos, estes achados corroboram a necessidade urgente da implementação de políticas coordenadas de monitoramento, de controles mais eficazes da proliferação de pombos e, principalmente, de educação ambiental e em saúde para difusão do conhecimento sobre a doença e como evitá-la.

## 7 REFERÊNCIAS

ABEGG, M. A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 161, n. 2, p. 83-91, 2006.

ACONTECE BOTUCATU. **Em 24 horas HCFMB realiza dois transplantes de fígado.** Botucatu: Acontece Botucatu, 2022. Disponível em: <https://acontecebotucatu.com.br/saude/em-24-horas-hcfmb-realiza-dois-transplantes-de-figado/#:~:text=Programa%20de%20Transplantes%20do%20HCFMB&text=O%20Programa%20de%20Transplantes%20atua,f%C3%ADgado%2C%20c%C3%B3rneas%2C%20entre%20outros>. Acesso em: 7 abr. 2021.

AMARAL-BASTOS, M. Técnicas de amostragem quantitativa em saúde: revisão de conceitos e aplicação prática. *In: ENCONTRO LUSO-BRASILEIRO DE ENFERMAGEM*, 7., 2012, Porto. **Anais [...]**. Porto: Universidade Católica Portuguesa, 2012.

BAHN, Y. S. *et al.* Microbe profile: *Cryptococcus neoformans* species complex. **Microbiology**, Reading, v. 166, n. 9, p. 797-799, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000973>.

BARBOSA, A. F. *et al.* Criptococose pulmonar isolada em paciente imunocompetente. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 32, p. 476-480, 2006.

BARIÃO, P. H. G. **Caracterização molecular, susceptibilidade a antifúngicos e virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.** 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BARÓ, T.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; MENDOZA, M.H.; MORERA, Y.; ALÍA, C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36(2), p. 458-461, 1998.

BARONI, F. A. **Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro:** fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. 2001. 232 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BELLENZIER, A. P. **O Pombo urbano: paisagens do outro.** 2014. 143 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Terra, Programa de Pós-graduação em Geografia, Curitiba, 2014.

BORGES, A. S. *et al.* Histoplasmose em pacientes imunodeprimidos: estudo de 18 casos observados em Uberlândia, MG. **Revista de Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 30, p. 119-124, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 264, de 17 de Fevereiro de 2020.** Dispõe sobre a inclusão da doença de Chagas crônica, da criptococose, da esporotricose humana e da paracoccidiodomicose na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e

eventos de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264\\_19\\_02\\_2020.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html). Acesso em: 7 abr. 2021.

COLOMBO, G. *et al.* Caracterização bioquímica e molecular de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas ambientais de pombos (*Columbia livia domestica*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, p. 1639-1645, 2015.

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

CORRÊA JUNIOR, D. **Investigação de *Cryptococcus* spp. em excrementos de pombos no ambiente escolar em Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2019.

COSTA, A. K. F. **Leveduras associadas à cloaca e a excrementos de pombos (*Columbia livia*): um enfoque especial para os aspectos micológicos de *Cryptococcus* spp.** 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

COSTA, C. *et al.* Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, p. 505-508, 1999.

COSTA, C. R. *et al.* Infecções fúngicas em pacientes HIV positivos: revisão da literatura sobre criptococose e histoplasmoze. **Estudos**, Goiânia, v. 41, p. 843-854, 2014.

CONTIN, J. T. *et al.* Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG–Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21, n. 1, p. 19-24, 2011.

DO CARMO, F. N. *et al.* *Cryptococcus* spp. and cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-17, 2022.

ELIAS, M. S. **Avaliação da melanina como fator de proteção para preservação de *Cryptococcus neoformans* na Coleção de Fungos Patogênicos INI/Fiocruz**. 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2015.

FERREIRA, G. S. A. *et al.* “Transmission of cryptococcosis by liver transplantation: a case report and review of literature.” **World Journal of Hepatology**, Pleasanton, v. 12, n. 5, p. 253-261, 2020. DOI 10.4254/wjh.v12.i5.253.

GALIZA, G. J. N. *et al.* Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p. 261-269, 2014.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Portadores do vírus HIV dispõem de hospital especializado em Botucatu**. Botucatu: Secretaria de Estado da Saúde, 2004. Disponível em: <https://www.saopaulo.sp.gov.br/eventos/saude-portadores-do-virus-hiv-dispoem-de-hospital-especializado-em-botucatu/> Acesso em: 01 jul 2022 (*Conteúdo temporariamente indisponível*)

de 02 jul 2022 até o término do período eleitoral)

HAGEN, F. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16-48, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Botucatu: panorama**. Rio de Janeiro. IBGE, 2021. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/botucatu/panorama>. Acesso em: 7 abr. 2021.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Os conceitos de espécies principais suportam uma, duas ou mais espécies dentro de *Cryptococcus neoformans*?. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, pág. 574-587, 2006.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **MSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357-16, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Cidades e Estados: Botucatu**. Rio de Janeiro. IBGE, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/botucatu.html>. Acesso em: 7 abr. 2021.

KOMMERS, G. D. *et al.* Criptococose pulmonar granulomatosa em um equino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 938-940, 2005.

LAZERA, M.; IGREJA, R.P.; WANKE, B.; Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. p. 252-264. Guanabara Koogan, 2004.

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**, Oxfordshire, v. 34, p. 127-131, 1996.

LAZERA, M. S. *et al.* Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology**, v. 38, n. 5, p. 379-383, 2000.

LEAL, A. L. **Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LEAL, A. L. *et al.* *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. **Medical Mycology**, v. 46, n. 4, p. 377-383, 2008.

LIMA, P. Q.; OLIVEIRA, F. P.; MARCIANO, J. A. Criptococose em gato-relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 8, p. 1-10, 2018.

LUGARINI, C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 166, n. 2, p. 61-69, 2008.

LUNA FILHO, B. *et al.* Sequência básica na elaboração de protocolos de pesquisa. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 71, p. 735-740, 1998.

MALIK, R.; KROCKENBERGER, M. B.; CROSS, G.; DONELEY R.; MADILL, D. N.; BLACK, D.; MCWHIRTER, P.; ROZENWAX, A.; ROSE, K.; ALLEY, M.; FORSHAW, D.; RUSSELL-BROWN, I.; JOHNSTONE, A. C.; MARTIN, P.; O'BRIEN, C.R.; LOVE, D. N. Avian cryptococcosis. **Medical Mycology**, v. 41, p. 115–124, 2003.

MANZATO, A. J.; SANTOS, A. B. **A elaboração de questionários na pesquisa quantitativa**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

MARANHÃO, F. C. A. *et al.* Criptococose disseminada e cutânea por *C. neoformans* VNI em paciente imunocompetente. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 56, p. 1-4, 2020.

MARTINS, C. M. *et al.* Percepção de usuários de espaços públicos de Curitiba, Paraná, sobre a presença de pombos (*Columba livia*). **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 10-19, 2016.

MARTINS, M. A. *et al.* Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 777-784, 2007.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis: An International Journal**, v. 20, n. 8, p. 1790-1799, 1999.

MEZZARI, A.; REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 293-298, 2004.

MEGDA, J. D. L.; BONAFÉ, S. M. **Subnotificação de doenças infecciosas como realidade do sistema de saúde brasileiro**. Maringá: Cesumar, 2013.

MIRANDA, C.; LADENDORFF, N.; KNÖBL, T. Percepção da população sobre a participação dos pombos (*Columba livia domestica*) na transmissão de zoonoses. **Atas de Saúde Ambiental-ASA**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 23-28, 2014.

MITCHELL, T. G. *et al.* Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 1, p. 253-255, 1994.

NUNES, J. R. S.; MIRANDA, D. B. Aspectos biológicos de *Columba livia* doméstica (Columbiformes, Columbidae) no campus da Universidade de Cuiabá-Unic, Cuiabá–MT. **UNICIÊNCIAS**, Cuiabá, v. 14, n. 1, p. 113-133, 2010.

NUNES, V. F. P. Pombos urbanos: o desafio de controle. **Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 89-92, 2003.

OLIVEIRA, R. P. *et al.* Ocorrência de pombos (*Columba livia*) e excretas em locais considerados potencialmente de risco para criptococose. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 33-46, 2017.

PIMENTA, P. **Primeira investigação aponta existência de *Cryptococcus neoformans* em algumas escolas municipais de Campo Grande.** Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2019. Disponível em: <https://www.ufms.br/primeira-investigacao-aponta-existencia-de-cryptococcus-neoformans-em-algumas-escolas-municipais-de-campo-grande/>. Acesso em: 19 jul. 2019.

QUEIROZ, J. P. A. F. Criptococose-uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasileira**, Mossoró, v. 2, n. 2, p. 32-38, 2008.

RANDHAWA, H. S. *et al.* Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 7, p. 623-630, 2006.

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

REOLON, A. *et al.* Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 5, p. 293-298, 2004.

RIBEIRO, A. S.; CERQUEIRA, C. T. R. Criptococose disseminada em paciente imunocompetente: relato de Caso. **Revista Uningá**, Maringá, v. 56, n. 4, p. 164-170, 2019.

RODRIGUES, A. A. F. *et al.* Estudo clínico e epidemiológico de criptococose pulmonar diagnosticada em hospital universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. UFMS. In: CONGRESSO SUL-MATO-GROSSENSE DE PESQUISA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA. PERSPECTIVAS PARA ATENÇÃO HOSPITAL NO EIXO DO ENSINO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 1., 2015, Campo Grande, MS. **Anais [...]**. Campo Grande, 2015. p. EC-8.

RODRIGUES, T. O. *et al.* Criptococose em felino: relato de caso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 1-7, 2020.

SCHMERTMANN, L.J.; STALDER, K.; HUDSON, D.; MARTIN, P.; MAKARA, M.; MEYER, W.; MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.B. Cryptococcosis in the koala (*Phascolarctos cinereus*): pathogenesis and treatment in the context of two atypical cases. **Med. Mycol.**, v. 56(8), p. 926-936, 2018.

SCHULLER, M. **Pombos urbanos: um caso de saúde pública.** Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, v. 29, p. 32-37, 2005.

SCHULLER, M. Pombos urbanos: um caso de saúde pública. **Vetores e Pragas**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 15, p. 5-12, 2005.

SEVERO, C. B. *et al.* Capítulo 3: criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 1136-1144, 2009.

SILVA, D. Z. *et al.* Isolamento e Identificação de Fungos em Fezes de Pombos nas Dependências da Universidade de Gurupi (UNIRG). **Revista Amazônia: Science & Health**,

Gurupi, v. 7, n. 2, p. 79-86, 2019.

SOARES, E. A. **Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012)**. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

SOUTO, A. C. P. *et al.* **Análise da variabilidade do genótipo VGII de *Cryptococcus gattii* em isolados clínicos e ambientais do Brasil**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 2014.

SOUZA, L. **Médicos suspeitaram que empresário morto por 'doença do pombo' tinha síndrome do pânico**. Santos: Potal G1, 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/sp/santos-regiao/noticia/2019/08/08/medicos-suspeitaram-que-empresario-morto-por-doenca-do-pombo-tinha-sindrome-do-panico.ghtml>. Acesso em: 7 abr. 2021.

SOUZA, R. G.; SOUZA, C. M. Incidência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos (*Columba Livia*) na área central da cidade de Porto Velho, RO. **Saber Científico**, Porto Velho, v. 7, n. 1, p. 13-22, 2021.

TAKAHASHI, J. P. **Caracterização molecular e perfil de suscetibilidade de *Cryptococcus* e outras leveduras melanizadas de ambiente contaminado com fungicidas azólicos**. 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2016.

TRILLES, Luciana *et al.* Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical mycology**, v. 41, n. 5, p. 383-390, 2003.

TRILLES, L. *et al.* Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 455-462, 2008.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP. Faculdade de Medicina de Botucatu. **HCFMB realiza seis transplantes em uma semana**. Botucatu: Unesp, 2020. Disponível em: <https://www.fmb.unesp.br/#!/noticia/2700/hcfmb-realiza-seis-transplantes-em-uma-semana>. Acesso em: 7 abr. 2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP. Faculdade de Medicina de Botucatu. **SAE de Infectologia tem 600 pacientes com HIV em acompanhamento**. Botucatu: Unesp, 2012. Disponível em: <https://www.fmb.unesp.br/index.php#!/noticia/233/sae-de-infectologia-tem-600-pacientes-com-hiv-em-acompanhamento/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP. **Hospital dia, em Botucatu, tem recorde de atendimento**. Botucatu: Unesp, 2005. Disponível em: <https://www2.unesp.br/portal#!/noticia/549/hospital-dia-em-botucatu-tem-recorde-de-atendimento/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

XAVIER, L. S. M. *et al.* Criptococose pulmonar e neurocriptococose em paciente imunocompetente: relato de caso. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, São Paulo, n. 21, p. e613-e613, 2019.

## 8 APÊNDICES

**Apêndice A:** Modelo do requerimento elaborado para solicitação de autorização (anuência) para coleta de amostras de fezes de pombos



Ao  
Prof. Assoc. Dr. André Luís Balbi  
SUPERINTENDÊNCIA DO HCFMB/UNESP

Caríssimo Superintendente,

Vimos, por meio deste, requerer **autorização para a coleta de amostras de fezes de pombos** na área sob administração do HC no período de 04/02/2022 à 04/05/2022 (próximos 3 meses).

A coleta é rápida, deverá ser feita somente pelo pós-graduando Pablo Henrique Scherrer (ph.scherrer@unesp.br) e ocorrerá de forma esporádica (estima-se que apenas 3 vezes dentro do período já informado). Como os pombos costumam se aninhar em áreas externas à unidade hospitalar, **é a pontos externos e com o acúmulo de fezes dessas aves que essa autorização se limita**, tais como: estacionamento, obras, equipamentos de ar-condicionado, passeios e cobertura. Sempre que necessário e houver disponibilidade, podemos solicitar o acompanhamento do Núcleo de Segurança ou do Controle de Pragas para acesso a algum local específico ou orientações.

A coleta em questão faz parte de pesquisa sobre a *Criptococose* ou "Doença do Pombo", bastante comum em pessoas imunodeprimidas. Logo, este tipo de monitoramento em locais como os arredores do HCFMB e de outras unidades de saúde de Botucatu são importantes para prevenir e evitar a contaminação de pacientes, funcionários e visitantes. Em caso de dúvidas, nos colocamos à inteira disposição.

Atenciosamente,

*Assinado no original.*  
Pablo Henrique Scherer  
Mestrando

*Assinado no original.*  
Sandra de M. G. Bosco  
Orientadora

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Botucatu

Depto. de Ciências Químicas e Biológicas, Setor de Microbiologia e Imunologia  
Rua Dr. Plínio Pinto e Silva, S/N  
CEP: 18618-691- Botucatu/SP

(14) 3880-0434

sandra.bosco@unesp.br  
ibb.unesp.br


ID HC 1369095

Ao cuidados de Janaina Celestino

Núcleo Interno de Regulação

Peço ciência e autorização, com retorno a esta SHC.

Atenciosamente.

  
Prof. Assoc. Andre Balbi

Superintendente do HCFMB

08/02/2022

14102 Autorizado, equipe controle de Progas (Enfª Juliana) estará acompanhando a coleta

  
Enfiª Me. Janaina Cristina Celestino Santos  
Gerente de Regulação e Internação  
CREFEN-SP 228307

Retorne ao interessado sobre o requisição para análise at. te.

Prof. Assoc. Dr. André Luis Baião  
Superintendente do HCFMB

**Apêndice B:** Etiqueta de identificação de caixa exclusiva para transporte de amostras



# PROJETO CRIPTOCOCOSE

Conteúdo da caixa:

**TUBOS COLETORES COM  
AMOSTRAS DE FEZES DE POMBOS**

Não manusear sem máscara  
e luvas apropriadas.



**RISCO BIOLÓGICO**  
(Pode conter *Cryptococcus* sp.)

Pesquisador responsável:

**PABLO H. SCHERRER**  
(18) 99701-0861

## Apêndice C: Protocolo de Extração do kit comercial *EasyPure® Stool Genomic DNA* (TransGen Biotech Co., LTD)



The **BEST** for  
Life Science

### *EasyPure® Stool Genomic DNA Kit*

Cat. No. EE301

Storage: at room temperature (15-25°C) in dry for one year

#### Description

*EasyPure® Stool Genomic DNA Kit* provides a simple and convenient way to isolate high quality genomic DNA from 180-220 mg of fresh or frozen stool. Solid or liquid stool sample that is rich in contaminants and inhibitors is lysed by the unique lysis buffer. DNA is bound to silica-based column. The isolated DNA is suitable for PCR, qPCR and Next Generation Sequencing.

- Simple and fast.
- Complete removal of contaminants and inhibitors.
- Column based purification, no organic extraction or ethanol precipitation.

#### Starting material

Fresh or frozen solid or liquid stool, avoiding repeated freezing and thawing.

#### Kit Contents

Component	EE301-01 (50 rxns)
Lysis Buffer 21 (LB21)	60 ml
Precipitation Buffer 21 (PB21)	15 ml
Binding Buffer 21 (BB21)	35 ml
Clean Buffer 21 (CB21)	6 ml
Wash Buffer 21 (WB21)	12 ml
Elution Buffer (EB)	10 ml
Glass Beads	12.5 g
Genomic Spin Columns with Collection Tubes	50 each
Nuclease-free Tube (2 ml)	100 each
Collection Tubes	150 each

#### Procedures

Before starting, add the indicated volume of 100% ethanol into the concentrated CB21 and WB21.

Component	EE301-01 (50 rxns)
Clean Buffer 21 (CB21)	24 ml
Wash Buffer 21 (WB21)	48 ml

All centrifugation steps are carried out at room temperature.

1. Add the 180-220 mg of stool, 0.25 g glass Beads and 1 ml of LB21 into a centrifuge tube. Mix well by vortexing, and then incubate in 70°C for 10 minutes.  
Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 20 µl of RNase A for 3-minute incubation at room temperature before 70°C incubation.
2. Centrifuge the tube at 15,000×g for 2 minutes, transfer the supernatant to a new 1.5 ml or 2 ml centrifuge tube.
3. Add 250 µl of PB21 and mix by vortexing. Then incubate on ice for 5 minutes.

Website [www.transgenbiotech.com](http://www.transgenbiotech.com)

E-mail [info@transgenbiotech.com](mailto:info@transgenbiotech.com)

Customer Service +86-400-898-0321

Phone +86-10-57815027



The **BEST** for  
Life Science

4. Centrifuge at 15,000×g for 2 minutes. Transfer the supernatant not exceeding 600 µl to a new 2 ml centrifuge tube (A small amount of precipitation does not affect the next step of the experiment).
5. Add the ethanol and BB21 of the same volume as the supernatant obtained in step 5 (for example: supernatant 600 µl, add 600 µl BB21 and 600 µl ethanol). Mix by vortexing (There may be white flocculent precipitates here).
6. Add 650 µl solution to a spin column, and centrifuge at 12,000×g for 30 seconds. Repeat until all the solution is added to the spin column.
7. Add 500 µl CB21 (check to make sure ethanol has been added). Centrifuge at 12,000×g for 30 seconds. Discard the flow through.
8. Add 500 µl WB21 (check to make sure ethanol has been added). Centrifuge at 12,000×g for 30 seconds. Discard the flow through.
9. Repeat step 8 once.
10. Centrifuge at 15,000×g for 2 minute to remove any residual WB21.
11. Place the spin column to a new sterile 1.5 ml centrifuge tube. Add 50-200 µl of the Elution Buffer or deionized water (pH >7.0) to the center of column. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 12,000×g for 1 minute to elute the genomic DNA.

#### Notes

- The stool sample stored in ethanol is recommended to be centrifuged to remove ethanol and washed with sterilized water for 2-3 times before use.
- Use sterile tubes and pipette tips to avoid contamination from DNase.
- To obtain more DNA, it is recommended to preheat EB or deionized water at 65°C before elution.

FOR RESEARCH USE ONLY

Website [www.transgenbiotech.com](http://www.transgenbiotech.com)

E-mail [info@transgenbiotech.com](mailto:info@transgenbiotech.com)

Customer Service +86-400-898-0321

Phone +86-10-57815027


**Apêndice D:** Resumo apresentado à XI Semana da Biologia da UFABC, conforme orientações da banca do evento

IB Instituto de  
Biotecnologia  
Unesp Botucatu

unesp



CAPES

Você sabia que a

**Doença** 

**do pombo**

pode **matar?**



**Arraste e vamos, juntos,  
conhecer para prevenir!**

O nome da doença é

**CRIPTOCOCOSE,**

causada por uma levedura encontrada nas

**fezes de pombos.**



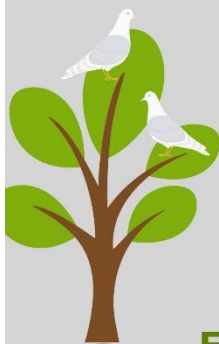
Contraí-se principalmente pela

**inalação de poeiras**

contendo partículas de

fezes secas

**contaminadas.**



**Evite fazer a limpeza das fezes a seco!  
Utilize água sanitária, luvas e máscara.**

A doença afeta o   
**Sistema Nervoso Central,**

causando sintomas e sequelas graves  
ou até mesmo **a morte** do paciente  
rapidamente.




**Controlar** a infestação por  
e **falar sobre** é **pombos**  
**o melhor que se pode fazer!**






**Não alimente direta ou indiretamente pombos.  
Não consuma alimentos em praças ou vias públicas.  
Jogue o lixo no lixo e mantenha-o devidamente fechado.**

Uma pesquisa realizada em



**Botucatu,** 

Estado de São Paulo  
detectou a presença de



**Cryptococcus** em fezes de   
**pombos**

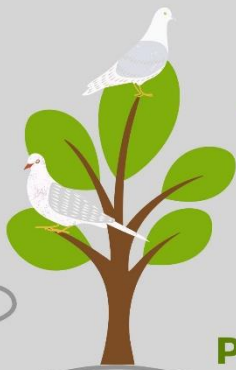
coletadas em **hospitais,**  
**praças &**  
**escolas**

**Fique ligado: o grande vilão dessa história  
não é o pombo!**



Para tal, os **pesquisadores** extraíram o **material genético** existente nas fezes, em busca de fragmentos de **DNA** que indicassem a presença de **Cryptococcus neoformans** nos locais estudados, através de técnicas da **biologia molecular.**



**As técnicas se chamam:  
PCR, nested PCR e eletroforese.**

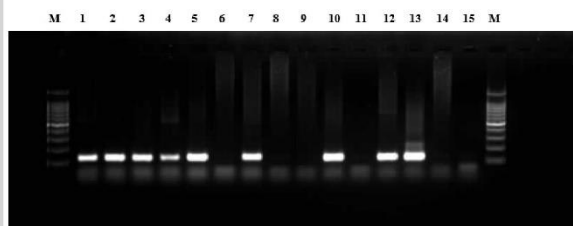
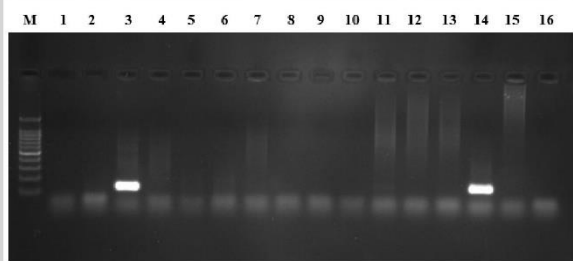
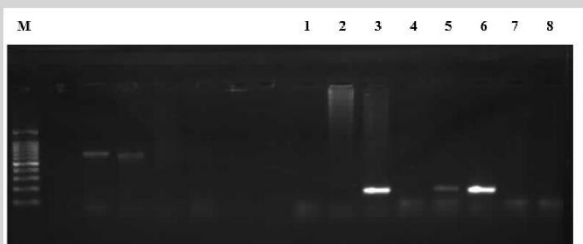


Os  
**resultados** revelaram que  
**100%** dos  
**pontos urbanos**  
pesquisados foram  
**positivos para a presença**  
do agente causador da  
**CRÍPTOCOCOSE**





# RESULTADOS



## LEGENDAS

M: Marcador molecular de 100pb;  
Coluna 3: Local 1 positivo;  
Colunas 6, 7 e 8: controles positivo e negativos, respectivamente.

M: Marcador molecular de 100pb;  
Coluna 3: Local 2 positivo;  
Colunas 14, 15 e 16: controles positivo e negativos, respectivamente.

M: Marcador molecular de 100pb;  
Colunas 1-5: Local 3 positivo;  
Colunas 7 e 10: Local 4 positivo;  
Coluna 12: Local 5 positivo;  
Colunas 14, 15 e 16: controles positivo e negativos, respectivamente.

## *Autores*

**Pablo Henrique Scherrer**

ph.scherrer@unesp.br

**Ana Carolina do Prado**

ana.prado@unesp.br

**Danielle Hamae Yamauchi**

danielle.yamauchi@unesp.br

**Gabriel Gasparini Camargo**

gabriel.gasparini@unesp.br

**Sandra de Moraes Gimenes Bosco**

sandra.bosco@unesp.br

## **Realização**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral & Aplicada do  
Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP.



**Apêndice E:** Certificado de premiação da XI Semana da Biologia UFABC

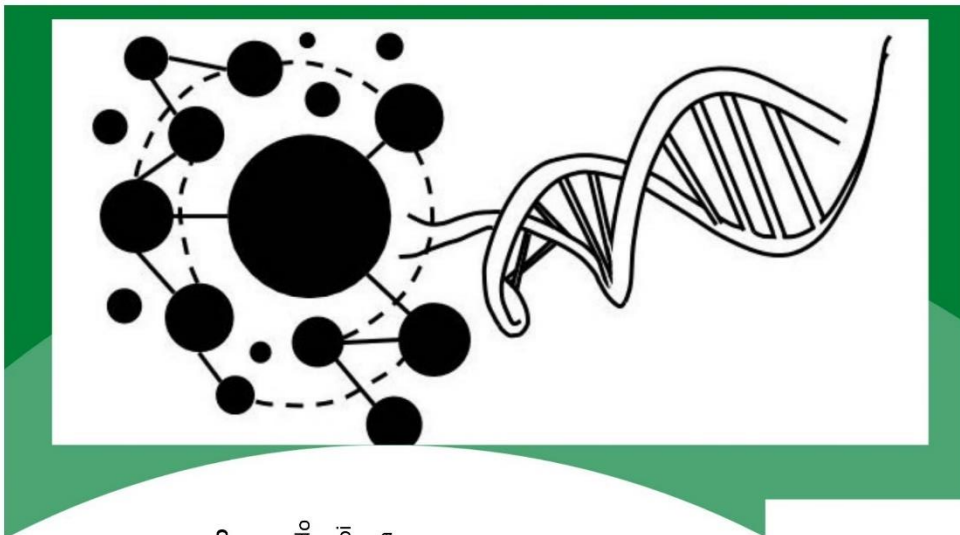
## CERTIFICADO

Certifico que **Pablo Henrique Scherrer** apresentou o trabalho “**Deteção molecular de *Cryptococcus spp.* em amostras de fezes de pombos coletadas na cidade de Botucatu, São Paulo**” de autoria de **Pablo Henrique Scherer, Ana Carolina do Prado, Danielle Hamae Yamauchi, Gabriel Gasparini Camargo e Sandra de Moraes Gimenes Bosco** na sessão oral do dia **11 de Julho**, gravada no YouTube no link: <https://youtu.be/hagZ75QeKl>. A sessão oral foi parte da programação da **XI Semana da Biologia UFABC**, realizada *online* e organizada pela **Universidade Federal do ABC (UFABC)**, de 9 a 17 de Julho de 2022. Os vídeos das mesas-redondas, apresentações de trabalhos e alguns minicursos realizados no evento, estão disponíveis no canal da Semana da Biologia UFABC no YouTube (<https://www.youtube.com/channel/UC7KNWHoxz9zFBZ7DrXxevBQ>).

19 de Julho de 2022



**Simone Rodrigues de Freitas**  
Docente da UFABC e membro da Comissão  
Organizadora do evento







A Comissão Organizadora certifica que

### **Pablo Henrique Scherer**

realizou a apresentação de painel do trabalho intitulado “**Deteção molecular de *Cryptococcus Spp. em amostras de fezes de pombos coletadas na cidade de Botucatu, São Paulo*” no IV Congresso de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/Bauru, promovido pela Comissão Organizadora do CONBIO, no dia 03 de junho de 2022.**

  
**Prof. Dr. Sergio Pereira**  
Coordenador Docente do  
Evento

  
**Camila Yuki Sano Santos**  
Presidente Discente da  
Comissão Organizadora do  
Congresso de Biologia

  
**Verônica Dall'Acqua Cruz**  
Presidente Discente da  
Comissão Organizadora do  
Congresso de Biologia

