

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Eldon Carlos Queres Gomes

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO *IN VITRO*
E *IN VIVO* DE LINHAGENS DE *PSEUDOGYMNOASCUS*
SPP., *ASPERGILLUS THERMOMUTATUS* E
RHODOTORULA MUCILAGINOSA PRESENTES EM
ECOSSISTEMAS DA ANTÁRTICA**

Belo Horizonte

2022

Eldon Carlos Queres Gomes

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO *IN VITRO*
E *IN VIVO* DE LINHAGENS DE *PSEUDOGYMNOASCUS*
SPP., *ASPERGILLUS THERMOMUTATUS* E
RHODOTORULA MUCILAGINOSA PRESENTES EM
ECOSSISTEMAS DA ANTÁRTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas – Microbiologia.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa

Coorientadoras: Dra. Marliete Carvalho da Costa

Dra. Vívian Nicolau Gonçalves

Belo Horizonte

2022

043

Gomes, Eldon Carlos Queres.

Avaliação do potencial patogênico in vitro e in vivo de linhagens de *Pseudogymnoascus spp.*, *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa* presentes em ecossistemas da Antártica [manuscrito] / Eldon Carlos Queres Gomes. – 2022.

129 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa. Coorientadoras: Dra. Marliete Carvalho da Costa; Dra. Vivian Nicolau Gonçalves.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Regiões Antárticas. 3. Mudança Climática. 4. Extremófilos. 5. Fungos. 6. Virulência. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Costa, Marliete Carvalho da. III. Gonçalves, Vivian Nicolau. IV. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **ELDON CARLOS QUERES GOMES**

Nº REGISTRO: 2018705509

Relator e Suplente: Profa. Dra. Viviane de Souza Alves

Às 19:00 horas do dia **26 de abril de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Mariana de Lourdes Almeida Vieira (Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG), Rafael Wesley Bastos (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), Rachel Basques Caligiorne (Santa Casa de Belo Horizonte), Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa (Orientador), Dra. Vívian Nicolau Gonçalves (coorientadora) e Marliete Carvalho da Costa (coorientadora) para julgar o trabalho final "**Avaliação do potencial patogênico *in vitro* e *in vivo* de linhagens de *Pseudogymnoascus* spp., *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa* presentes em ecossistemas da Antártica**", do aluno **Eldon Carlos Queres Gomes**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de abril de 2022.

Membros da banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres
Profa. Dra. Mariana de Lourdes Almeida Vieira
Prof. Dr. Rafael Wesley Bastos
Dra. Rachel Basques Caligiorne

De acordo:

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa
(Orientador/ Presidente)
Dra. Vívian Nicolau Gonçalves
(coorientadora)
Dra. Marliete Carvalho da Costa
(coorientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Wesley Bastos, Usuário Externo**, em 28/04/2022, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 07:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 07:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marliete Carvalho da Costa, Usuário Externo**, em 29/04/2022, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vívian Nicolau Gonçalves, Usuário Externo**, em 02/05/2022, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana de Lourdes Almeida Vieira, Usuário Externo**, em 11/05/2022, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rachel Basques Caligiorne, Usuário Externo**, em 16/05/2022, às 23:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 30/05/2022, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1384108 e o código CRC DB625829.

Colaboradores

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Prof. Dra. Susana Johann

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Tatiana Alves da Paixão

Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Agradecimentos

Se tem uma coisa que aprendi nesses 6 últimos anos (mestrado e agora reforçou na conclusão do doutorado), é que não fazemos nada sozinhos, a ciência se complementa, muda e é feita de parcerias, de lutas, resiliências, fôlegos, esperanças, frustrações, desafios e principalmente erros, erros e claro, acertos! Essa tese é um mix de tudo disso, quando a esperança estava quase no fim, eis que as coisas aconteceram e apareceram resultados que nos surpreenderam, como disse, não fazemos nada sozinhos e por isso eu tenho uma lista e ela é enorme, vamos ela!

Deus é perfeito, nós que não somos e essa tese é o reflexo da imperfeição humana, mas com vontade de acertos e uma tentativa de desvendar o incrível mundo microbiológico com ajuda D'Ele, sempre será por Ele e para Ele.

A minha família que por vezes não entende muito essa loucura, mas que está sempre ao meu lado me apoiando e incentivando, agora com um Doutor na família Queres e Gomes.

Aos meus amigos que nem sempre estão perto fisicamente, mas certamente estão ao meu lado, não vou nominá-los, vocês estão em cada linha escrita e sei que vocês não esperavam, nem eu né?! Mas olha o que o Dinamus virou...

A minha igreja, Igreja Batista Nacional da Esperança que me sustentou em oração, em carinho e que compreendeu todo esse processo!

Ao Luiz, que no primeiro dia que o vi (ainda no J4 - saudades desse lugar) já me pediu pra ler **TODOS** os artigos do Lattes, e eu nem sabia como baixá-los... mas sempre foi me desafiando, dia após dia, aprendi muito, técnicas, viagens, discussão do projeto, desafios...obrigado pela oportunidade Luiz!

A Vivian e Marliete que me aguentaram todos esses anos, agradeço a paciência, os puxões de orelha, por me ouvir, os conselhos... sem vocês esse projeto não teria a forma que tem hoje, muito obrigado!

Aos colaboradores: Daniel, um professor/pesquisador excepcional, aprendi muito com você; ao Gustavo é toda equipe do Laboratório de Micologia que literalmente salvaram os experimentos *in vivo*, sem vocês eu nem sei o que faria; a Susana por abrir as portas do *Tenebrio* para esta tese e do MIC e por toda ajuda que tive; ao Carlos Rosa que sempre se colocou à disposição para a discussão do trabalho; a professora Tatiana que nos acolheu aos 45 minutos do segundo tempo; ao Jefferson que se dedicou em me ajudar na produção dos cassetes e nas leituras das lâminas de histologia, como eu já te falei, Jefferson você fez a diferença neste

trabalho, muito obrigado!

A **banca** que tirou um tempo para analisar e ajudar a melhorar este trabalho.

A **todos do LabFungos**, sem vocês os dias seriam longos e chatos, a Flávia com sua alegria de sempre; a Ana Raquel sempre com uma resposta afiada e pronta para ajudar; a Livia e o Mateus que viajaram, ouviram, trabalharam, dividiram, lamentaram junto comigo todos esses anos; a Graciê que me convidou para uma aventura na Diretoria da APECS-Brasil; a Aline e Blenda por ensinarem todo o trabalho com *Tenebrio* e MIC; começamos com o “pé esquerdo” no laboratório mas se tornou uma importante ajuda na Representação Discente do PPGM, obrigado Marina Bahia! A Beatriz Boreli, minha professora de micro na graduação e hoje colega de laboratório, o Laboratório da Cerveja contribui com este projeto, muito obrigado! A Thamar que esteve comigo nos momentos da gema do ovo, do sangue de carneiro, em tantos meios e em muitos outros, obrigado pela parceria no trabalho, eis aqui mais um fruto dele!

A **Betânia Paiva e o Flávio Guimarães** que entenderam nossa proposta como Representantes discentes: a academia precisa ouvir os discentes!

A **Secretaria do PPGM**, Débora e Tiago, pude conhecer vocês nos bastidores do PPGM, sei que vocês fazem sempre o melhor, continuem assim!

A **FUNED** que através da Michele, Fernanda, Bárbara, Fabiane, Marcela e Flávia proporcionaram a finalização da escrita desta tese com total compreensão!

Ao **SENAC** na figura da Thaís, minha supervisora pedagógica, obrigado por entender todo esse processo.

Em meio a pandemia da COVID-19

a ciência não parou, ela é feita por muitos,

as pessoas acima e as não citadas,

são integrantes desta tese,

o meu muito obrigado a todos!

Resumo

Considerado um ambiente extremo, a Antártica possui características limítrofes de sobrevivência para maioria dos seres vivos, porém alguns micro-organismos, entre os quais se destacam os fungos, conseguem colonizar e ocupar seus diferentes ecossistemas. Diante da diversidade da comunidade de fungos atualmente conhecida, apenas uma pequena parte é relatada como patogênica para humanos. Entretanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que nos diferentes ecossistemas extremos da Antártica, gêneros e espécies conhecidos como patogênicos para humanos e animais vêm sendo reportados, os quais demonstraram patogenicidade em ensaios *in vitro*. Dentre estes fungos, estão aqueles dos gêneros *Pseudogymnoascus*, *Aspergillus* e *Rhodotorula*. O gênero *Pseudogymnoascus* abriga entre suas espécies *Pseudogymnoascus destructans*, a qual é psicrófila, patogênica e responsável por reduzir a população de morcegos por meio da Síndrome do Nariz-branco nos Estados Unidos, na Europa e na Ásia Paleártica. Muitas linhagens de *Pseudogymnoascus* antárticos reportadas tem apresentado alta similaridade genética com *P. destructans*. O gênero *Aspergillus* é ubíquo e frequentemente encontrado nos mais variados substratos na Antártica, apresenta características que auxiliam sua sobrevivência em condições extremas. *Rhodotorula mucilaginosa* também é encontrada na Antártica, a qual vem sendo considerada um patógeno oportunista emergente de humanos e animais. Considerando alguns fatores como: (i) a ocorrência desses fungos oportunistas de humanos e animais nos ecossistemas antárticos, os quais em condições normais estariam aprisionados em seus diferentes substratos/habitats que colonizam devido ao frio/congelamento e (ii) o efeito das mudanças climáticas na região, principalmente o aumento gradual da temperatura nas últimas décadas, chama-se a atenção para a possibilidade desses substratos poderem se descongelar e liberar tais espécies com potencial patogênico para fora da Antártica. Desta forma, esta tese teve como objetivo avaliar o potencial patogênico de linhagens de *Pseudogymnoascus* spp., e das espécies *Aspergillus thermomutatus* e *R. mucilaginosa* obtidos de solo, talos de líquens e *permafrost* da Antártica por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Para isso, foram executados nove testes de fatores de virulência *in vitro* para determinar a patogenicidade dos fungos antárticos. Dos 11 isolados de *Pseudogymnoascus* spp. testados, *Pseudogymnoascus* sp. UFMG 8532 apresentou atividade hemolítica, crescimento em diferentes pH, produção enzimas hidrolíticas (fosfolipase e esterase) e esporos com capacidade de penetrar os alvéolos pulmonares. *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415 apresentou atividade hemolítica, crescimento em diferentes pH, crescimento a 45 °C e produção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase e proteinase) e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 atividade hemolítica, crescimento em diferentes pH,

crescimento a 50 °C e produção de enzimas hidrolíticas (esterase e fosfolipase). Devido ao amplo espectro de atividades *in vitro*, *Pseudogymnoascus* sp. UFMG 8532, *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 foram submetidos aos testes *in vivo* de patogenicidade utilizando os modelos *Tenebrio molitor* e camundongos BALB/c. O isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 matou 100% das larvas de *T. Molitor* em 1 dia; *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 provocou a morte de todas as larvas em seis dias, *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473 apresentou letalidade de aproximadamente 75% no primeiro dia, evoluindo para 100% no terceiro dia. Já o isolado *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 apresentou letalidade próxima de 40% no primeiro dia, evoluindo para 100% ao final de (4) quatro dias. No modelo utilizando camundongos BALB/c avaliou-se sobrevivência, comportamento e recuperação da carga fúngica inoculada nos animais. Para todos os isolados testados constatou-se a possibilidade de causar doença nos camundongos, provocar oscilações no peso, comportamento motor, função e reflexo sensorial e por fim alterações no estado psiquiátrico de todos os animais. Desta forma, os isolados de *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532, *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 estudados neste trabalho e obtidos de substratos/habitats que sofrem grandes impactos das mudanças climáticas na região, indica que a Antártica pode abrigar espécies/linhagens com diferentes fatores de virulência e patogenicidade para animais e humanos, em particular aqueles com algum grau de imunossupressão. Os resultados obtidos nesse estudo alerta que as mudanças climáticas na Antártica (principalmente o aumento da temperatura) podem liberar fungos e outros micro-organismos patogênicos de humanos e animais, os quais se encontram isolados geograficamente e aprisionados em seus substratos/habitats característicos da Antártica (como os talos de líquens endêmicos, solos únicos e *permafrost* de onde os fungos alvos desse estudo foram obtidos), os quais podem ser carregados da Antártica para as diferentes localidades do globo por meio de vetores biológicos e não biológicos. Por isso, mais estudos de levantamento da microbiota antártica e avaliação do seu potencial patogênico são de fundamental importância para monitoramento e controle de micro-organismos patogênicos emergentes oriundos de ecossistemas naturais extremos.

Palavras-chave: Antártica; mudanças climáticas; extremófilos; fungos; oportunistas; virulência.

Abstract

Considered an extreme environment, Antarctica has borderline survival characteristics for most living beings, but some microorganisms, among which fungi stand out, are able to colonize and occupy its different ecosystems. Given the diversity of the fungal community currently known, only a small part is reported to be pathogenic for humans. However, some studies have shown that in the different extreme ecosystems of Antarctica, genera and species known to be pathogenic for humans and animals have been reported, which have demonstrated pathogenicity in *in vitro* assays. Among these fungi are those of the genera *Pseudogymnoascus*, *Aspergillus* and *Rhodotorula*. The genus *Pseudogymnoascus* harbors among its species *Pseudogymnoascus destructans*, which is psychrophilic, pathogenic and responsible for reducing the population of bats through White-Nose Syndrome in the United States, Europe and Palearctic Asia. Many reported *Pseudogymnoascus* antarctic lineages have shown high genetic similarity to *P. destructans*. The genus *Aspergillus* is ubiquitous and often found in the most varied substrates in Antarctica, it has characteristics that help its survival in extreme conditions. *Rhodotorula mucilaginosa* is also found in Antarctica, which has been considered an opportunistic pathogen emerging from humans and animals. Considering some factors such as: (i) the occurrence of these opportunistic fungi of humans and animals in Antarctic ecosystems, which under normal conditions would be trapped in their different substrates/habitats that they colonize due to cold/freezing and (ii) the effect of climate change in the region, especially the gradual increase in temperature in recent decades, attention is drawn to the possibility of these substrates being able to thaw and release such species with pathogenic potential out of Antarctica. Thus, this thesis aimed to evaluate the pathogenic potential of strains of *Pseudogymnoascus* spp., and of the species *Aspergillus thermomutatus* and *R. mucilaginosa* obtained from soil, lichen stalks and permafrost from Antarctica through *in vitro* and *in vivo* experiments. For this, nine *in vitro* virulence factor tests were performed to determine the pathogenicity of Antarctic fungi. Of the 11 isolates of *Pseudogymnoascus* spp. tested, *Pseudogymnoascus* sp. UFMG 8532 showed hemolytic activity, growth at different pH, production of hydrolytic enzymes (phospholipase and esterase) and spores capable of penetrating pulmonary alveoli. *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415 showed hemolytic activity, growth at different pH, growth at 45 °C and production of hydrolytic enzymes (phospholipase and proteinase) and *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and 17473 hemolytic activity, growth at different pH, growth at 50 °C and production of hydrolytic enzymes (esterase and phospholipase). Due to the broad spectrum of *in vitro* activities, *Pseudogymnoascus* sp. UFMG 8532, *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 and *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and

17473 were submitted to *in vivo* pathogenicity tests using *Tenebrio molitor* models and BALB/c mice. The isolate *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 killed 100% of *T. molitor* larvae in 1 day; *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 caused the death of all larvae in six days, *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473 showed lethality of approximately 75% on the first day, evolving to 100% on the third day. The isolate *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 showed lethality close to 40% on the first day, evolving to 100% at the end of three days. In the model using BALB/c mice, survival, behavior and recovery of the fungal load inoculated in the animals were evaluated. For all tested isolates, it was found the possibility of causing disease in mice, causing fluctuations in weight, motor behavior, function and sensory reflex and finally changes in the psychiatric status of all animals. Thus, *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532, *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 and *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and 17473 studied in this work and obtained from substrates/habitats that suffer major impacts from climate change in the region, indicates that Antarctica may harbor species/lineages with different virulence factors and pathogenicity to animals and humans, in particular those with some degree of immunosuppression. The results obtained in this study warn that climate change in Antarctica (mainly the increase in temperature) can release fungi and other pathogenic microorganisms of humans and animals, which are geographically isolated and trapped in their substrates/habitats characteristic of Antarctica (such as the stems of endemic lichens, unique soils and permafrost from which the target fungi of this study were obtained), which can be transported from Antarctica to different locations around the globe through biological and non-biological vectors. Therefore, further studies of the Antarctic microbiota and assessment of its pathogenic potential are of fundamental importance for monitoring and controlling emerging pathogenic microorganisms from extreme natural ecosystems.

Keywords: Antarctica; climate changes; extremophiles; fungi; opportunists; virulence.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies do gênero <i>Pseudogymnoascus</i> spp. encontradas na Antártica	29
Tabela 2. Fungos da Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG selecionados para caracterização do potencial patogênico	41
Tabela 3. Classificação dos tipos de hemólise a partir da característica do halo hemolítico (LUO <i>et al.</i> , 2001)	50
Tabela 4. Classificação da atividade enzimática proteolítica e fosfolítica (AOKI <i>et al.</i> , 1990, com adaptações)	51
Tabela 5. Classificação das categorias funcionais do teste <i>SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/Phenotype Assessment</i> (SHIRPA) de acordo com os parâmetros avaliados (ROGERS <i>et al.</i> , 1997)	60
Tabela 6. Identificação pela região ITS e D1/D2 por meio da comparação de sequências obtidas, utilizando o programa BLASTn e o banco de dados do NCBI <i>GenBank</i>	64
Tabela 7. Velocidade em dias do crescimento micelial (mm) dos isolados de <i>Pseudogymnoascus</i> spp. provenientes da Antártica	65
Tabela 8. Caracterização dos fatores de virulência <i>in vitro</i> de <i>Pseudogymnoascus</i> spp. provenientes de diferentes substratos da Antártica	69
Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima de <i>Pseudogymnoascus</i> spp. provenientes de diferentes substratos da Antártica.....	70

Lista de Figuras

Figura 1. Fases da infecção em morcegos por <i>Pseudogymnoascus destructans</i> (DZAL & CRAIG <i>et al.</i> , 2020 – com modificações)	31
Figura 2. Morcego com crescimento fúngico visível no focinho devido a <i>White Nose Syndrome</i> (WNS) (Fonte: NWHC-USGS, 2018)	32
Figura 3. Fluxograma dos experimentos realizados.	43
Figura 4. Esquema da placa de 96 poços utilizada no ensaio de susceptibilidade aos antifúngicos e distribuição dos controles	54
Figura 5. Macromorfologia das colônias dos isolados de <i>Pseudogymnoascus</i> spp. provenientes da Antártica em ágar Sabouraud após 14 dias a 15 °C	63
Figura 6. Macromorfologia do isolado <i>Pseudogymnoascus</i> sp. UFMGCB 8532.....	66
Figura 7. Microestruturas do isolado <i>Pseudogymnoascus</i> sp. UFMGCB 8532 em microscopias óptica e eletrônica em varredura	67
Figura 8. Curva de sobrevivência expressa em percentagem (%) de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> submetidas à infecção por (a) diferentes isolados de <i>Pseudogymnoascus</i> spp. e (b) <i>Aspergillus thermomutatus</i> UFMGCB 17415.....	72
Figura 9. Curva de sobrevivência expressa em percentagem (%) de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> submetidas à infecção por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UFMGCB 17448 e 17473.....	73
Figura 10. Sobrevida, unidades formadoras de colônias (UFC) e comportamento dos camundongos BALB/c após infecção com <i>Pseudogymnoascus</i> sp. UFMGCB 8532 e <i>Aspergillus thermomutatus</i> UFMGCB 17415	75
Figura 11. Animais com barbeamento	76
Figura 12. Sobrevida, unidades formadoras de colônias (UFC) e comportamento dos camundongos BALB/c após infecção com os isolados de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UFMGCB 174473 e UFMGCB 17448	77
Figura 13. Perfil de bandeamento, utilizando o iniciador (GTG) ₅ , dos inóculos fúngicos recuperados	79

Figura 14. Perfil macromorfológico das colônias dos isolados <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UFMGCB 17448 e 17473 após recuperação da carga fúngica nos camundongos BALB/c.....	81
Figura 15. Pulmão de camundongos BALB/c com dois dias pós-infecção com <i>Pseudogymnoascus</i> sp. UFMGCB 8532, via intranasal.....	82
Figura 16. Pulmão de camundongos BALB/c com dois dias pós-infecção com <i>Aspergillus thermomutatus</i> UFMGCB 17415 via intranasal.....	84
Figura 17. Avaliação do escore histopatológico do pulmão de camundongos BALB/c	85

Lista de Abreviaturas

°C - Graus celsius

% - Por cento

AI - Aspergilose Invasiva

ATCC - American Type Culture Collection

BDA - Ágar Dextrose Batata

BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool

CABI - *Centre of Agriculture and Biosciences International*

CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMA - *Corn Meal Agar*

CTAB - Brometo de cetil trimetilamonio

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO - Densidade óptica

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO - Espécie reativa de oxigênio

EUA - Estados Unidos da América

g - Grama

HCl - Ácido Clorídrico

ITS - Região transcrita interna

M - Molar

MEGA - Mega Molecular Evolutionary Genetics Analysis

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

NaCl - Cloreto de Sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng/μL - Nanogramas por mililitro

°C - Graus Celsius

p/v - Peso por volume

pb - Pares de bases

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

RPB2 - RNA polimerase II

r.p.m. - Rotações por minuto

rDNA - DNA ribossomal

rRNA - RNA ribossomal

SDS - Sódio dodecil sulfato

TBE - Tris borato

UFC/mL - Unidades formadoras de colônia por mililitro

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UV - Ultra Violeta

V - Volt

WNS - *White Nose Syndrome*

µg/mL - Microgramas por mililitro

µL - Microlitro

µM - Micromolar

µmol - Micromol

Sumário

Introdução	21
1. Justificativa	24
2. Objetivos	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. Revisão Bibliográfica	27
3.1 Antártica	27
3.2 Diversidade de fungos na Antártica	27
3.3 Gênero <i>Pseudogymnoascus</i> (RAILLO, 1929) e a síndrome do Nariz-branco [<i>White Nose Syndrome</i> (WNS)]	28
3.4 Gênero <i>Aspergillus</i> (MICHELI, 1729)	34
3.5 Gênero <i>Rhodotorula</i> (HARRISON, 1928)	35
3.6 Patogenicidade dos fungos	36
4. Materiais e métodos	41
4.1 Origem dos fungos	41
4.2 Delineamento experimental	42
4.3 Confirmação da identificação dos isolados fúngicos	44
4.3.1 Identificação dos fungos filamentosos	44
4.3.1.1 Extração de DNA total	44
4.3.1.2 Amplificação da região ITS utilizando os iniciadores ITS-1 e ITS-4	45
4.3.2 Identificação das leveduras	46
4.3.2.1 Extração do DNA total	46
4.3.2.2 Amplificação do domínio D1/D2	46
4.3.3 Purificação dos produtos de PCR	47
4.3.4 Reação de sequenciamento e precipitação das amostras	47
4.3.5 Análise computacional das sequências	48
4.3.6 Identificação morfológica	48
4.4 Testes <i>in vitro</i> de patogenicidade	49
4.4.1 Determinação da termotolerância	49
4.4.2 Atividade hemolítica	49
4.4.3 Crescimento em diferentes faixas de pH	50
4.4.4 Determinação da produção de enzimas hidrolíticas	50
4.4.5 Determinação do diâmetro dos esporos	52
4.4.6 Suscetibilidade a antifúngicos: anfotericina B, itraconazol, fluconazol	52
4.4.7 Tolerância ao estresse oxidativo	54
4.4.8 Hipóxia	54

4.4.9 Ensaio de halotolerância.....	55
4.4.10 Testes com o invertebrado <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: <i>Tenebrionidae</i>).....	55
4.4.11 Avaliação da disseminação das linhagens em barreira hematoencefálica.....	56
4.4.11.1 Cultivo celular.....	56
4.4.11.2 Ensaios de transcitose.....	57
4.5 Testes <i>in vivo</i> com camundongos BALB/c.....	57
4.5.1 Isolados e animais experimentais utilizados.....	57
4.5.2 Preparo do inóculo fúngico.....	58
4.5.3 Análise de sobrevivência.....	59
4.5.4 Recuperação das cargas fúngicas	60
4.5.5 Avaliação histopatológica.....	61
4.5.6 Análise estatística dos dados	62
5. Resultados.....	62
5.1 Confirmação da identificação dos fungos	62
5.2 Caracterização fisio-morfológica <i>Pseudogymnoascus</i> spp.....	62
5.3 Testes de patogenicidade <i>in vitro</i> para <i>Pseudogymnoascus</i> spp.....	68
5.4 Testes de patogenicidade <i>in vitro</i> para <i>Aspergillus thermomutatus</i> e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	71
5.5 Testes de patogenicidade <i>in vivo</i> utilizando larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	71
5.5.1 Testes <i>in vivo</i> com camundongos BALB/c.....	74
5.5.1.1 Análise de sobrevivência.....	74
5.5.1.2 Análise comportamental (SHIRPA)	78
5.6 Recuperação das cargas fúngicas	78
5.6.1 Confirmação dos inóculos fúngicos recuperados por meio de técnicas de biologia molecular	79
5.6.2 Confirmação macromorfológica dos inóculos obtidos na quantificação da carga fúngica para <i>Rhodotorula</i>	80
5.7 Avaliação histopatológica de camundongos BALB/c infectados com <i>Pseudogymnoascus</i> sp. UFMGCB 8532 e <i>Aspergillus thermomutatus</i> UFMGCB 17415.....	81
6. Discussão dos resultados	86
6.1 Confirmação da identificação dos fungos	86
6.2 Caracterização fisio-morfológicas dos isolados de <i>Pseudogymnoascus</i> spp.....	86
6.3 Testes de patogenicidade <i>in vitro</i>	87
6.4 Testes de patogenicidade <i>in vivo</i> utilizando larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	91
6.5 Testes <i>in vivo</i> com camundongos BALB/c.....	93
6.5.1 Análise de sobrevivência, análise comportamental (SHIRPA) e recuperação e quantificação das cargas fúngicas.....	93
6.6 Avaliação histopatológica.....	95

7. Conclusões.....	95
8. Referências	98
9. Anexos.....	118
9.1 Anexo 1 – Protocolo 172/2020 - Aprovação CEUA/UFMG	118
9.2 Anexo 2 – Does Maritime Antarctic permafrost harbor environmental fungi with pathogenic potential?.....	119
9.3. Anexo 3 – Produção acadêmica.....	128
9.3.1 Artigos e capítulos publicados e submetidos.....	128
9.3.2 Resumos e participação em eventos de divulgação científica.....	129
9.3.3 Comissão avaliadora.....	129
9.3.4 Produção em eventos	129
9.3.5 Resumos apresentados em eventos.....	129

Introdução

A Antártica possui cerca 14 milhões de km², o que corresponde a aproximadamente 10% de toda a superfície terrestre (BRASIL, 2006). Seu território está envolto pelo Oceano Austral/Oceano Antártico com plataformas de gelo ao seu redor (BRASIL, 2013; GIBBENS, 2021). Devido ao seu isolamento geográfico e climático na maior parte do território da Antártica há pouca ou nenhuma influência antrópica (BRUNATI *et al.*, 2009). Por ser considerado um ambiente extremo, a Antártica possui características que limitam a sobrevivência de animais e plantas, no entanto os micro-organismos conseguem se destacar em seus diferentes ecossistemas (RUISI *et al.*, 2007).

As condições extremas que a Antártica possui são diferenciadas e incluem baixa precipitação anual, alta sublimação e evaporação, alta incidência de luz solar e radiação ultravioleta, baixas temperaturas, ciclos frequentes de congelamento e descongelamento, além de ventos fortes (RUISI *et al.*, 2007). Todos esses fatores associados tornam a Antártica um ambiente singular onde os micro-organismos residentes podem apresentar características únicas e por isso de grande relevância o catálogo dos diferentes fungos presentes neste ambiente (ROSA *et al.*, 2019).

Segundo ONOFRI (1999) e ARENZ *et al.* (2014), os micro-organismos representam uma das principais fontes de diversidade biológica da Antártica, distribuídos nos diferentes ecossistemas da região. Entre os micro-organismos antárticos, os fungos vêm sendo estudados quanto à diferentes aspectos que vão da sistemática até aplicações biotecnológicas (ROSA *et al.*, 2019). Entre os habitats já estudados quanto a presença de fungos na Antártica, as rochas, solos, neve, gelo, plantas, água e sedimento de lagos, macroalgas, sedimento marinho e invertebrados apresentaram diferentes índices de diversidade (PRICE, 2000; SELBMANN, *et al.*, 2005; ELSTER *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2009; LOQUE *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2010; ARENZ & BLANCHETTE, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2012; GODINHO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; HENRÍQUEZ *et al.*, 2014; FURBINO *et al.*, 2014; ALVES, 2017; GODINHO *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2019; da SILVA *et al.*, 2020; OGAKI *et al.*, 2021; de MENEZES *et al.*, 2021; COELHO *et al.*, 2021; de SOUZA *et al.*, 2021; de MENEZES *et al.*, 2022; ROSA *et al.*, 2022).

Diante da elevada diversidade da comunidade de fungos atualmente conhecida no mundo, apenas uma pequena parcela dos fungos é relatada como patogênica para humanos, representada por aproximadamente 400 espécies (PARRISH & RIEDEL, 2014). Os fatores que determinam a patogenicidade de um micro-organismo podem ser investigados por meio de diferentes análises e características, como a avaliação da atividade hemolítica, termotolerância,

produção de enzimas hidrolíticas, crescimento em diferentes pH, diâmetro dos esporos e sua capacidade de dimorfismo morfo-fisiológicos (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1984; WATANABE *et al.*, 1999; LATGE, 2001; KANAFANI & PERFECT, 2008; DAVIS, 2009; GOSTINCAR *et al.*, 2011; CASADEVALL, 2012).

Apesar de alguns estudos abordarem o isolamento de espécies fúngicas com potencial patogênico para humanos, animais e vegetais, a partir de substratos coletados na Antártica (GONÇALVES *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2019; FIGUEREDO *et al.*, 2019), pouco ainda se sabe sobre o tema. Dentre os diferentes fungos relatados na Antártica, podemos citar espécies endêmicas e cosmopolitas adaptadas ao frio como os pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus*. O gênero *Pseudogymnoascus* (anteriormente classificado como *Geomyces*) possui, atualmente, 19 espécies descritas, dentre as quais *Pseudogymnoascus destructans* é a mais conhecida, pois é psicrófila, patogênica e responsável por reduzir a população de morcegos por meio da Síndrome do Nariz-branco (LORCH *et al.*, 2011). Os morcegos infectados com *P. destructans* podem desenvolver, dentre outras manifestações, o crescimento fúngico visível no focinho e na membrana da cauda, despertar precoce da hibernação (BLEHERT, 2012; FISHER *et al.*, 2012) e esgotamento prematuro dos estoques de gordura, causando sua morte entre 70 a 120 dias após a infecção (HOYT *et al.*, 2015). Além disso, os morcegos presentes em cavernas da América do Norte e Europa, são frequentemente infectados por *P. destructans*, sendo passível a dispersão de conídios por meio de sua saída antecipada da hibernação (LORCH *et al.*, 2011). Desta forma, os esporos podem ficar disponíveis, infectar outros morcegos no ambiente (WILSON *et al.*, 2017) e colonizar diferentes substratos (RAUDABAUGH *et al.*, 2013).

Ubíquo, o gênero *Aspergillus*, frequentemente encontrado em diferentes substratos na Antártica (SOUSA *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2019; FIGUEREDO *et al.*, 2019), apresenta características que auxiliam sua sobrevivência em condições extremas, como aquelas de desertos e regiões polares (MESQUITA-ROCHA, 2019). Os conídios deste gênero possuem grande capacidade de dissipação pelo ar, o que amplia seu alcance em vários ambientes (MESQUITA-ROCHA, 2019). Já foram descritas cerca de 250 espécies do gênero *Aspergillus*, destas 16% são consideradas como oportunista em humanos. Sua forma invasiva é uma das principais causas de mortes em pacientes imunocomprometidos, sendo a via respiratória a principal porta de entrada nesses pacientes, pois o tamanho dos conídios propicia o acometimento da árvore broncopulmonar e dos seios nasais (MESQUITA-ROCHA, 2019).

Além dos fungos filamentosos, leveduras como a *Rhodotorula mucilaginosa* também são encontradas em diferentes substratos na Antártica (GONÇALVES *et al.*, 2017, SOUSA *et al.*, 2017, de MENEZES *et al.* 2020; da SILVA *et al.*, 2022). Apresentando colônias com pigmentos de cor laranja/vermelha, o gênero *Rhodotorula* pertence ao filo *Basidiomycota*, à família *Cryptococcaceae* e foi descrita em 1927 (KWON-CHUNG *et al.*, 1992). Das espécies pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, três se destacam em pacientes imunocomprometidos, a *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta* (THANOS *et al.*, 2006). A espécie *R. mucilaginosa* está distribuída em ambientes marinhos, aquáticos e terrestres com disseminação mundial, sendo possível a colonização de muitos substratos (FELL *et al.*, 1998). Dentre as possibilidades de colonização, no âmbito hospitalar, o mais comum é o acometimento de pacientes em uso de cateter venoso central, causando infecções na corrente sanguínea, além de relatos de infecções envolvendo a região ocular e cutânea (FERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2017; FRANCONIERI *et al.*, 2018).

Diante da aparente vulnerabilidade da Antártica em relação às mudanças climáticas que a região vem sofrendo, principalmente os efeitos do aumento da temperatura, diferentes espécies de micro-organismos, plantas, animais e até materiais inanimados como partículas de solos e água do degelo dos glaciais podem migrar para fora da Antártica (SOUSA *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2019; FIGUEREDO *et al.*, 2019; ROSA *et al.* 2019). Esse fenômeno pode contribuir para que propágulos de fungos potencialmente patogênicos possam ser dispersos por meio do ar, vetores animais, correntes marítimas e até os seres humanos, e assim percorrer grandes distâncias até chegar na América do Sul, Oceania ou adiante (SOUSA *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2019; FIGUEREDO *et al.*, 2019; ROSA *et al.* 2019). Considerando o potencial patogênico dos gêneros abordados, bem como o desconhecimento sobre a patogenicidade da comunidade fúngica Antártica, é de grande importância a avaliação da patogenicidade dos fungos antárticos pertencentes aos gêneros *Pseudogymnoascus*, *Aspergillus* e *Rhodotorula*, os quais são o alvo desse estudo.

1. Justificativa

Um dos gêneros comumente encontrado na Antártica é o *Pseudogymnoascus*, o qual vem sendo isolado a partir de substratos como solo (GONÇALVES *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2018), solo ornitogênico (SOUSA *et al.*, 2017), talo de líquens (SANTIAGO *et al.*, 2015), sedimento marinho (GONÇALVES *et al.*, 2015), macroalgas (FURBINO *et al.*, 2014) e rizosfera de *Deschampsia antarctica* (GONÇALVES *et al.*, 2015). Todos esses isolados encontram-se depositados na Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), identificados por meio de técnicas moleculares como *Pseudogymnoascus destructans* e *Pseudogymnoascus* sp.; contudo, estes fungos também podem representar potenciais espécies novas.

Pseudogymnoascus destructans é um fungo psicrófilo patogênico capaz de reduzir a população de morcegos por meio da Síndrome do Nariz-branco [*White Nose Syndrome* (WNS)] em regiões temperadas da América do Norte e Europa (LORCH *et al.*, 2011). De acordo com LANGWIG *et al.* (2015), durante a hibernação o sistema imunológico dos morcegos diminui tornando-os vulneráveis à infecção por *P. destructans*. No que se refere aos isolados antárticos de *P. destructans*, até o momento não há nenhuma informação sobre seu potencial virulento frente aos animais da região e outros mamíferos. Sua disseminação é crescente e têm se mostrado com alcance mundial em morcegos, sendo o monitoramento da dispersão deste fungo observado por meio do site (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/119002>) do *Centre of Agriculture and Biosciences International* (CABI).

Também encontrado na Antártica (SOUSA *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2019; FIGUEREDO *et al.*, 2019), o gênero *Aspergillus* representa um importante patógeno oportunista, uma vez que sua virulência está associada a pacientes em condições hospitalares (MESQUITA-ROCHA, 2019). Sua infectividade está correlacionada principalmente ao tamanho dos esporos, facilitando assim sua disseminação no trato respiratório e possivelmente na corrente sanguínea (BENNET, 2009; BAUMGARDNER, 2012; CALO *et al.*, 2013; MESQUITA-ROCHA, 2019).

O gênero *Rhodotorula* já foi isolado de solo, ar e plantas (SAMPAIO, 2011). Considerada como oportunista e um patógeno emergente, a espécie *R. mucilaginosa*, anteriormente descrita como *R. rubra*, pode causar infecções em pacientes imunocomprometidos, sendo encontrada na corrente sanguínea (GOLDANI e WIRTH, 2012). Nos últimos anos, houve um aumento expressivo das infecções fúngicas em humanos causadas por *Rhodotorula* spp. (ROSA *et al.*, 2018).

A partir de uma avaliação do potencial de virulência destes fungos, poderemos estabelecer parâmetros para avaliação da patogenicidade de fungos oriundos da Antártica e sua correlação com fungos considerados patogênicos em humanos e a possibilidade de disseminação. Dessa forma, trabalhos envolvendo a caracterização das linhagens antárticas de *Pseudogymnoascus* spp., *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa* depositados na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG e a realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* são de grande importância para a ampliação dos estudos sobre seu potencial de virulência em animais.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial patogênico de linhagens de *Pseudogymnoascus* spp., *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa*, obtidos de substratos/habitats da Antártica, por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial patogênico de diferentes linhagens de *Pseudogymnoascus* spp., *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa* por meio de diferentes testes *in vitro*;
- Avaliar o potencial patogênico de diferentes linhagens de *Pseudogymnoascus* spp., *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa* por meio de testes em modelo alternativo ao *in vivo* utilizando *Tenebrio molitor*;
- Avaliar o potencial patogênico *in vivo* de linhagens de *Pseudogymnoascus* spp., *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando camundongos BALB/c.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Antártica

Com uma extensão aproximada de 14 milhões de km², a Antártica corresponde a cerca de 10% de toda a superfície terrestre e possui características únicas para manutenção do sistema climático global (BRASIL, 2006). Seu território pode ser dividido em marítimo (compreende as ilhas Sandwich do Sul e Shetland do Sul) e continental (continente e a costa leste da Península) (TATUR, 1989). O interesse científico no continente Antártico surgiu no século XIX e se intensificou no século XX, período que foram instaladas cinco estações de pesquisas (BRASIL, 2017). Atualmente, 30 países mantêm mais de 70 estações científicas na Antártica (BISCHOFF, 1996), incluindo o Brasil com a Estação Comandante Ferraz, inaugurada em 1984 (BRASIL, 2008) e após um incêndio ocorrido em 2012, reinaugurada em 2020 (BRASIL, 2020).

A Antártica é conhecida pelas suas condições abióticas extremas, como ventos que podem atingir até 300 km/h, temperatura de -60 °C na região peninsular, oscilações de umidade, alta sublimação, evaporação e incidência de radiação solar, escassez de nutrientes e diferentes variações no pH (ONOFRI *et al.*, 2007; RUISI *et al.*, 2007; BRUNATI *et al.*, 2009; ARENZ & BLANCHETTE, 2011). É caracterizada ainda por ciclos de congelamento e degelo sucessivos, alta incidência de radiação ultravioleta, solos oligotróficos, baixa disponibilidade de água e precipitação anual (ONOFRI *et al.*, 2007; SHIVAJI & PRASAD, 2009). Mesmo com essas características, a Antártica abriga diversas formas de vida como mamíferos, aves, plantas, invertebrados e micro-organismos (RUISI *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2009).

3.2 Diversidade de fungos na Antártica

Diferentes micro-organismos estão presentes na Antártica, dentre eles, os fungos filamentosos e as leveduras que possuem capacidade de sobreviver ao ambiente extremo (FELL *et al.*, 2006). Segundo ONOFRI (1999) e ARENZ *et al.* (2014), os micro-organismos representam uma das principais fontes de vida distribuídas nos diversos ecossistemas da Antártica. Dentro da comunidade microbiana cultivável da Antártica, os fungos se sobressaem pela capacidade adaptativa às condições extremas, apresentando como vantagem a capacidade de colonizar diversos substratos com baixo gasto energético, além da sua facilidade de dispersão (RUISI *et al.*, 2007; BRIDGE & SPOONER, 2012).

As principais comunidades de fungos encontradas nos ecossistemas antárticos incluem espécies dos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Rozellomycota*, *Calcarisporiellomycota* e *Zoopagomycota* (ROSA *et al.*, 2019; ROSA *et al.*, 2020; da SILVA *et al.*, 2021). Alguns micologistas também incluem espécies de *Straminopila* (*Oomycota*) e protistas anteriormente classificados como fungos (BRIDGE & SPOONER, 2012). Contudo, pode ser que uma grande parte da diversidade e filos dos fungos presentes na Antártica sejam desconhecidos (ROSA *et al.*, 2019). Em termos gerais, cerca de mil espécies de fungos cultiváveis ou macroscópicos não-liquenizados já foram descritos (BRIDGE & SPOONER, 2012), os quais compreendem aqueles com características: psicrofílicas, capazes de crescer a 0 °C, com temperatura ótima de crescimento entre 15 e 20 °C; psicrotolerantes, capazes de crescer a 0 °C, e temperatura ótima acima de 20 °C; e cosmopolitas, adaptados ao frio e encontrados em várias regiões do mundo. Esporos de fungos cosmopolitas podem ser transportados por longas distâncias e possuem a capacidade de crescer e se reproduzir em baixas temperaturas (RUISI *et al.*, 2007).

A diversidade de fungos é diferente na Península Antártica se comparada a continental, essa característica pode ser justificada pelas diferentes condições ambientais entre o continente e a península (ROSA *et al.*, 2019). As regiões da Península Antártica possuem plantas, vertebrados e invertebrados que fornecem nutrientes e matéria orgânica essenciais para a colonização e estabelecimento dos fungos residentes; ao contrário, a região continental possui poucos nutrientes e matéria orgânica em substratos como solos, rochas, gelo e neve, resultando em habitats ultra-oligotróficos, que parecem abrigar uma diversidade fúngica menor quando comparada àquela encontrada na região peninsular (ROSA *et al.*, 2019).

3.3 Gênero *Pseudogymnoascus* (RAILLO, 1929) e a síndrome do Nariz-branco [*White Nose Syndrome* (WNS)]

O gênero *Pseudogymnoascus* (anteriormente classificado como *Geomyces*), possui 19 espécies de fungos filamentosos descritas no *Mycobank* (<http://www.mycobank.org>) e no *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org>), dentre as quais dez delas já foram relatadas na Antártica, conforme especificado na **Tabela 1**. No entanto, em alguns trabalhos não foi possível a identificação em nível de espécie e as linhagens foram identificadas como *Pseudogymnoascus* sp. (LI *et al.*, 2008; BRUNATI *et al.*, 2009; TSUJI *et al.*, 2013; EDGINGTON *et al.*, 2014; FURBINO *et al.*, 2014; CHÁVEZ *et al.*, 2015; FIGUEROA *et al.*, 2015; GODINHO *et al.*,

2015; GONÇALVES *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2015; CONELL *et al.*, 2018; PURÍĆ *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2019).

Tabela 1. Espécies do gênero *Pseudogymnoascus* spp. encontradas na Antártica.

Espécies	Referência
<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i>	COWAN <i>et al.</i> , 2014; GOMES <i>et al.</i> , 2018
<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	GODINHO <i>et al.</i> , 2013; COWAN <i>et al.</i> , 2014; GOMES <i>et al.</i> , 2018; ALVES <i>et al.</i> , 2019; GODINHO <i>et al.</i> , 2019
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	KERRY, 1990; BAUBLIS <i>et al.</i> , 1991; LI <i>et al.</i> , 2008; ROSA <i>et al.</i> , 2010; GONÇALVES <i>et al.</i> , 2012; HENRÍQUEZ <i>et al.</i> , 2014; KOCHKINA <i>et al.</i> , 2019
<i>P. pannorum</i> var. <i>pannorum</i>	MÖLLER & DREYFUSS, 1996; ZUCCONI <i>et al.</i> , 1996; FENICE <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudogymnoascus vinaceus</i>	KOCHKINA <i>et al.</i> , 2019
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>	GODINHO <i>et al.</i> , 2019; GOMES <i>et al.</i> , 2018; OGAKI <i>et al.</i> , 2020
<i>Pseudogymnoascus antarcticus</i>	
<i>Pseudogymnoascus australis</i>	VILLANUEVA <i>et al.</i> , 2021
<i>Pseudogymnoascus griseus</i>	
<i>Pseudogymnoascus lanuginosus</i>	

As espécies de *Pseudogymnoascus* parecem ter a capacidade de colonizar e utilizar diferentes fontes de carbono e são abundantes em ecossistemas com temperaturas mais baixas (ARENZ & BLANCHETTE, 2011). Já foram relatadas no Ártico, Alpes, regiões temperadas e Antártica (MERCANTINI *et al.*, 1989; ONOFRI, 1999), bem como Europa e Ásia Paleártica (ZUKAL *et al.*, 2016). Entre as espécies de *Pseudogymnoascus*, *P. destructans* é o mais conhecido, pois representa um fungo psicrófilo patogênico capaz de reduzir a população de morcegos por meio da Síndrome do Nariz-branco [*White Nose Syndrome* (WNS)], em regiões temperadas da América do Norte e Europa (LORCH *et al.*, 2011). De acordo com LANGWIG *et al.* (2015), durante a hibernação, o sistema imunológico dos morcegos diminui tornando-os vulneráveis à infecção por *P. destructans*. No que se refere as linhagens antárticas de *Pseudogymnoascus*, até o momento não há nenhuma informação sobre o seu potencial virulento frente aos animais da região.

A WNS vem sendo relatada de forma exponencial em morcegos na fase de hibernação na América do Norte, Europa e Ásia Paleártica (BLEHERT *et al.*, 2009; LORCH *et al.*, 2011; DREES *et al.*, 2017). Os relatos sugerem que mais de 6 milhões de morcegos já foram atingidos

desde 2006 (HAMÃ *et al.*, 2016; THAPA *et al.*, 2016) e em algumas localidades indicam uma redução de 90% (HOYT *et al.*, 2020), o que demonstra a importância do estudo desse patógeno quanto aos seus fatores de virulência e possíveis consequências que ele pode trazer, não somente para a população de morcegos, mas para outros animais.

A hibernação consiste em uma série de episódios prolongados de torpor que pode durar dias ou até mesmo semanas, durante os quais a temperatura corporal e a taxa metabólica são substancialmente reduzidas, interrompidas por excitações e períodos breves de termorregulação (TURBILL & GEISER, 2008). Embora os detalhes dos mecanismos da relação imunológica e infecciosa ainda sejam desconhecidos (LILLEY *et al.*, 2016), já é sabido que durante a hibernação, os morcegos estão mais propensos a infecção por *P. destructans* devido a redução da temperatura corporal e a resposta imunológica comprometida (BLEHERT *et al.*, 2009; LORCH *et al.*, 2011).

Além disso, há o desenvolvimento de características diferenciadas como saída precoce do período de hibernação, mudanças fisiológicas que resultam em perda de peso (PUECHMAILL *et al.*, 2011), desidratação, desequilíbrios eletrolíticos (COLEMAN & REICHARD, 2014; BERNARD & MCCRACKEN, 2017) e aumento da frequência de excitação (REEDER *et al.*, 2012; WARNECKE *et al.*, 2012). Para exemplificar os estágios da infecção, DZAL & CRAIG *et al.* (2020) desenvolveram um fluxograma indicando cada etapa, conforme a **Figura 1**.

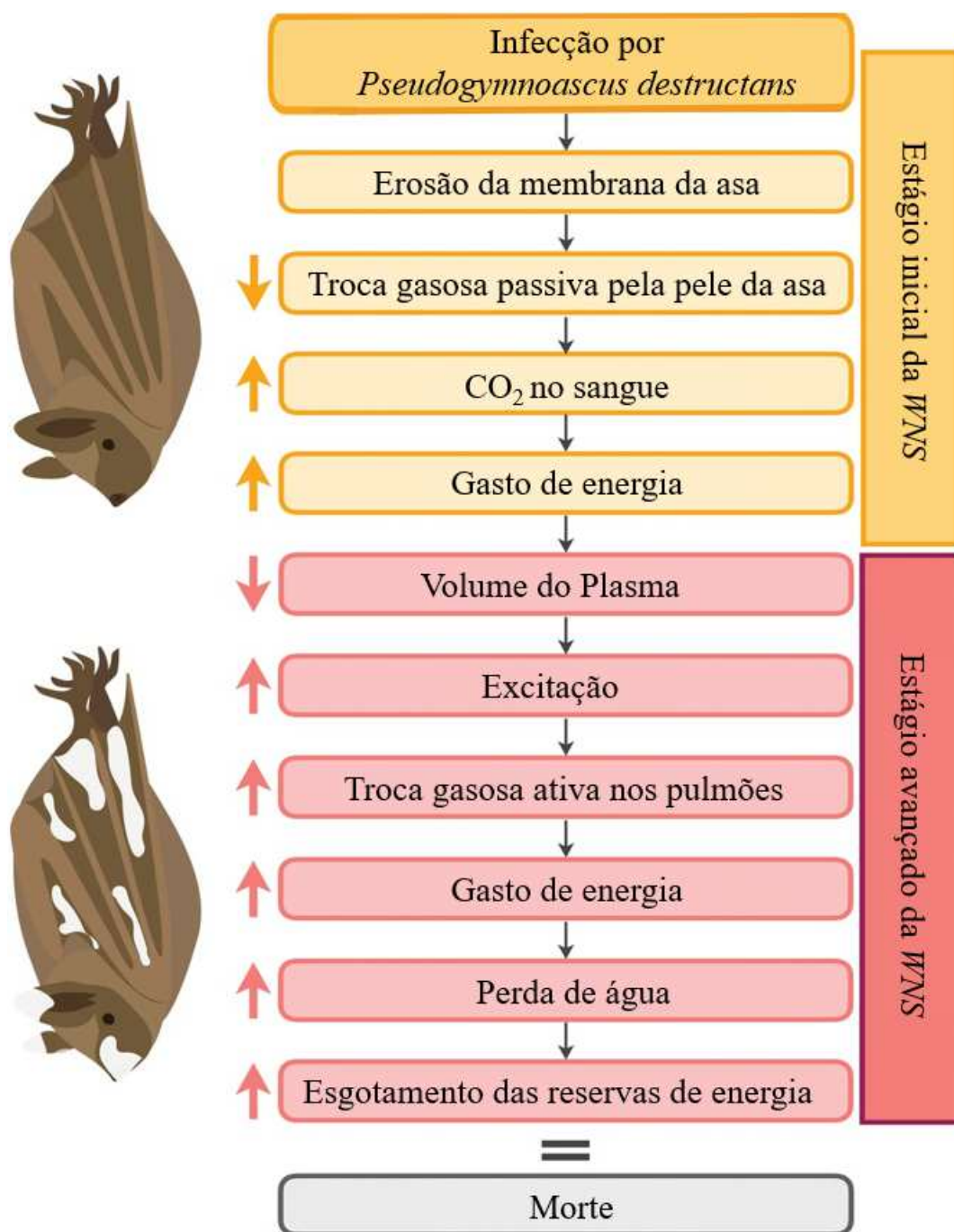


Figura 1. Fases da infecção em morcegos por *Pseudogymnoascus destructans* (DZAL & CRAIG *et al.*, 2020 – com modificações).

Os morcegos infectados com *P. destructans* podem apresentar crescimento fúngico visível no focinho (**Figura 2**) e na membrana da cauda (BLEHERT, 2012; FISHER *et al.*, 2012). Até o momento, há relatos de infecções superficiais (LORCH *et al.*, 2011; WARNECKE *et al.*, 2012; COLEMAN & REICHARD, 2014; PALMER *et al.*, 2018), com invasões na epiderme e derme (BLEHERT *et al.*, 2009; CRYAN *et al.*, 2010; PIKULA *et al.*, 2017; VESELSKÁ *et al.*,

2020), que podem acometer as asas por meio de erosões (BANDOUCHOVA *et al.*, 2015), não sendo descrito o acometimento de órgãos por *P. destructans* em morcegos.



Figura 2. Morcego com crescimento fúngico visível no focinho devido a *White Nose Syndrome* (WNS) (Fonte: NWHC-USGS, 2018).

A causa precisa da morte por Síndrome do Nariz Branco ainda não é conhecida, no entanto alguns aspectos básicos da fisiopatologia indicam que *Pseudogymnoascus destructans* invade agressivamente, digere e corrói os compostos epidérmicos das asas e da membrana da cauda dos morcegos (GARGAS *et al.*, 2009; METEYER *et al.*, 2009; REICHARD e KUNZ 2009; FULLER *et al.*, 2011; LORCH *et al.*, 2011; PIKULA *et al.*, 2012; PIKULA *et al.*, 2017). O estágio inicial da infecção pela Síndrome do Nariz Branco envolve a invasão do fungo na pele das asas do morcego, provocando sua erosão e posterior dano nas trocas gasosas, levando a um aumento de CO₂ no sangue e consequente acidose (acúmulo de ácido no fluxo sanguíneo) (VERANT *et al.*, 2014). Antes da manifestação dos sinais clínicos, os morcegos apresentam duplo gasto de energia e altas concentrações de CO₂ plasmático, essas características se apresentam de forma letal para a maioria dos mamíferos (VERANT *et al.*, 2014). Conforme a

progressão da infecção, há um aumento da erosão da pele das asas do morcego e uma saída precoce da hibernação, promovendo um aumento nas trocas gasosas e consequente sobrecarga pulmonar, o pulmão por sua vez procura remover o excesso de CO₂ para reestabelecer a homeostase e equilibrar o pH sanguíneo. Com a tentativa, há uma sobrecarga do aparelho respiratório, levando a um esgotamento das reservas de energia (THOMAS e CLOUTIER, 1992; THOMAS e GEISER, 1997).

A medida que a Síndrome do Nariz Branco avança (estágio avançado), esses efeitos são aumentados. O dano na epiderme leva a hipovolemia (diminuição do volume de plasma sanguíneo), desidratação hipotônica (quando se perde mais eletrólitos que água), alteração no equilíbrio eletrolítico (quando o nível de partículas sanguíneas carregadas eletricamente fica muito alto ou muito baixo) e saída precoce da hibernação (WARMECKE *et al.*, 2012, 2013). Por fim, a infecção com *P. destructans* pode levar os morcegos à morte (LORCH *et al.*, 2011; WARNECKE *et al.*, 2013; COLEMAN & REICHARD, 2014). Além de ser importante no voo de mamíferos, a pele da asa também exerce um fator crítico na manutenção da homeostase fisiológica (BLEHERT, 2012). Para que não haja perda de água através da pele da asa dos morcegos, esta precisa estar intacta, ajudando a liberar dióxido de carbono, por meio da troca cutânea que ocorre passivamente, auxiliando na regulação da pressão sanguínea e no processo de termorregulação (BLEHERT, 2012).

Segundo REICHARD & KUNZ (2009), ao final da hibernação, os morcegos dependem das reservas de gordura remanescentes para migrarem, além disso, as fêmeas precisam de reservas de gordura para a produção de leptina, necessária para induzir a cascata de outros hormônios, o que leva posteriormente a gestação. Caso não ocorra a morte, os impactos adversos por meio da WNS provavelmente se estenderão além do período de hibernação, limitando a migração e potencialmente reduzindo o sucesso reprodutivo durante o verão (REICHARD & KUNZ, 2009). De acordo com LILLEY *et al.* (2016), a resposta imune durante a hibernação para morcegos infectados por *P. destructas* não é duradoura, podendo ter efeitos negativos para a sobrevivência de morcegos. Uma hipótese para explicar a mortalidade relacionada a WNS é que os morcegos aumentam a duração e/ou a frequência da hibernação, resultando em perda de energia, devido à redução de elementos essenciais ao organismo (COLEMAN & REICHARD, 2014).

3.4 Gênero *Aspergillus* (MICHELI, 1729)

O gênero *Aspergillus* abriga fungos filamentosos, sapróbios, ubíquos, que apresentam inúmeras características que auxiliam a sobrevivência em ecossistemas como as regiões desérticas e regiões polares (GUARRO, 2012; VERWEIJ *et al.*, 2016; MESQUITA-ROCHA, 2019). Os conídios, propágulos assexuados das espécies de *Aspergillus*, possuem grande facilidade de se dispersarem pelo ar, ampliando assim sua distribuição tanto em ambientes abertos quanto fechados, como os hospitais (MESQUITA-ROCHA, 2019).

Até o momento foram descritas 250 espécies deste gênero, das quais 40 são consideradas patógenos oportunistas de humanos. As espécies que mais provocam doenças em humanos são: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ustus* (GUARRO, 2012; BRASIL, 2021). Com um percentual que varia de 85 a 90%, a Aspergilose Invasiva (AI) é uma das principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos e estima-se que mais de um milhão de casos de aspergiloses ocorram no Brasil, incluindo as versões invasivas e broncopulmonar crônica (GIACOMAZZI *et al.*, 2016; MESQUITA-ROCHA, 2019).

A via respiratória é a principal porta de entrada do *Aspergillus*, enquanto a árvore broncopulmonar e os seios nasais são os sítios de desenvolvimento da aspergilose (GIACOMAZZI *et al.*, 2016). A facilidade de penetração nesses sítios se deve ao tamanho dos conídios, medindo entre 2 a 5 µm de diâmetro. Após a inalação, pode ocorrer a deposição nos bronquíolos ou no espaço alveolar. Além dessa deposição, a infecção pode invadir os vasos sanguíneos, causando necrose de tecidos e trombose, essa capacidade invasiva é dependente de enzimas como as proteases e elastases (PASQUALOTTO, 2009; MESQUITA-ROCHA, 2019).

A forma mais grave é a AI, com altas taxas de mortalidade, sendo causada principalmente pelo *A. fumigatus*. Os pacientes que apresentam essa forma estão associados a patologias de risco, como neoplasias hematológicas, neutropenia prolongada ou disfunção de neutrófilos, ao uso prolongado de corticosteróide e a realização de transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea (NUCCI *et al.*, 2010). A espécie *A. fumigatus* é vista como patógeno responsável por formas alérgicas da doença, como a alveolite alérgica extrínseca ou “pulmão de fazendeiro”, condição clínica observada entre os indivíduos expostos repetidamente aos conídios; ou aspergiloma, um supercrescimento do fungo na superfície de cavidades preexistentes nos pulmões de pacientes em tratamento de tuberculose (LATGÉ, 1999; LEE, 2019; FERREIRA *et al.*, 2021).

3.5 Gênero *Rhodotorula* (HARRISON, 1928)

Descrito em 1928, o gênero *Rhodotorula* pertence ao filo *Basidiomycota*, família *Cryptococcaceae* e subfamília *Rhodotorulalodeae* (KWON-CHUNG *et al.*, 1992; VARTIVARIAN *et al.*, 1993; SAMPAIO, 2011). As espécies *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula minuta* são consideradas patógenos emergentes e associadas principalmente a pacientes imunocomprometidos. No entanto alguns casos de rodotorulose já foram descritos em pacientes imunocompetentes (MAEDER *et al.*, 2003; THANOS *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2021; SUNDARARAJU *et al.*, 2021). Conhecida anteriormente como *Rhodotorula rubra*, a *Rhodotorula mucilaginosa* possui distribuição mundial estando presente em ambientes terrestres, aquáticos e marinhos, além de apresentar a possibilidade de colonização de uma ampla variedade de substratos (FELL *et al.*, 1998; SAMPAIO, 2011). Já foi isolada do ar, solo e plantas, sendo relatada também como parte da microbiota humana, em sítios anatômicos como pele, unhas, trato gastrointestinal, urinário e respiratório (CHAUD *et al.*, 2016).

Não há relatos de casos de infecções por *Rhodotorula* anterior a 1985 e 43 casos envolvendo esse patógeno associado a corrente sanguínea foram relatados entre os anos de 1996 a 2000 (GOLDANI e WIRTH, 2012). Desta forma, nas últimas décadas, houve um aumento significativo das infecções fúngicas humanas por *Rhodotorula* spp., sendo o principal patógeno emergente por infecção fúngica de leveduras não *Candida* (XIAO *et al.*, 2018). Segundo GOMEZ-LOPEZ *et al.* (2005), NUNES *et al.* (2013) e JARROS *et al.* (2020), é a terceira levedura mais isolada de hemoculturas, sendo comumente isolada das mãos de funcionários e pacientes hospitalares.

Considerado um patógeno oportunista, *Rhodotorula* está associada principalmente a indivíduos imunocomprometidos (JARROS *et al.*, 2020). Segundo IOANNOU *et al.* (2018), as infecções por *Rhodotorula* spp. compreendem principalmente infecções da corrente sanguínea, acometendo principalmente pacientes em uso de cateter venoso central. Embora, já tenha sido registrada causando infecções cutâneas, peritonite, ceratite, ventriculite, infecções oculares e outras infecções menos frequentes (MOHD NOR *et al.*, 2015; FERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2017; FRANCONIERI *et al.*, 2018) e também endocardite em pacientes imunocompetentes (LOSS *et al.*, 2011; SIMON *et al.*, 2014). Em geral, os pacientes mais afetados por este patógeno, são os portadores de doença graves como leucemia, câncer ou outros tumores sólidos, doença linfoproliferativa, HIV, diabetes mellitus e aqueles sujeitos a inúmeros tipos de cirurgia (de

ALMEIDA *et al.*, 2008; TUON E COSTA, 2008; MIGLIETTA *et al.*, 2015; FALCES-ROMERO *et al.*, 2018).

Casos de infecções causadas por *Rhodotorula* spp. em outros animais são escassos e exemplificados por relatos de infecção de pele em galinhas e infecção pulmonar em ovelha, ambos ocasionados por *R. mucilaginosa* (ARUO, 1980; MONGA e GARG, 1980). Além desses relatos, *Rhodotorula* spp. também foi associada como causadora de lesões cutâneas em leão-marinho, dermatite e mastite em gato (COSTA *et al.*, 1993; KADOTA *et al.*, 1995), otite em bovinos (DUARTE *et al.*, 2001). Há contribuições ainda deste patógeno causando infecções no trato respiratório em avestruzes, pássaros, pombos selvagens e macacos (AMARAL *et al.*, 1998; LORD *et al.*, 2010).

3.6 Patogenicidade dos fungos

A patogenicidade pode ser classificada como a capacidade de um determinado micro-organismo causar dano ao hospedeiro (CASADEVALL & PIROFSKI, 1999). Esse dano precisa causar lesões ao ponto de prejudicar a homeostase, levando a uma ação microbiana nos tecidos, o que posteriormente desencadeará uma resposta imunológica do hospedeiro contra o micro-organismo (CASADEVALL, 2007; CASADEVALL, 2017). De acordo com CALO *et al.* (2013) e CAVICCHIOLI *et al.* (2019), os micro-organismos possuem elevada capacidade adaptativa às condições ambientais, sendo esta uma condição fundamental para ser capaz de causar infecção em seu hospedeiro, o que implica em deixar de ser sapróbio e se tornar um parasita.

Os determinantes da patogenicidade que permitem a sobrevivência de micro-organismos são conhecidos como fatores de virulência (HOGAN *et al.*, 1996). Esses fatores são de grande importância para a capacidade de adesão, penetração, disseminação, produção de enzimas, além do crescimento em temperaturas específicas dos hospedeiros (TOMEI & KAUFFMAN, 2000; KHAN *et al.*, 2010). Segundo LASZLO (1988), a capacidade de micro-organismos se adaptarem e sobreviverem quando expostos a determinadas temperaturas é conhecida como termotolerância. Neste contexto, a avaliação da capacidade de crescer em uma faixa de temperatura se torna um fator de virulência determinante e essencial (LASZLO, 1988).

Segundo PARRISH & RIEDEL (2014), cerca de 400 espécies de fungos já foram descritas como causadoras de infecções em humanos. A partir da década de 1990, a detecção

de infecções fúngicas aumentou rapidamente devido à melhoria no diagnóstico (KHAN *et al.*, 2010). Os fungos são capazes de causar doenças em outros seres vivos e possuem a capacidade de expressar diferentes fatores de virulência tais como: capacidade de aderir a tecidos (CASADEVALL & PIROFSKI, 2007); produzir melanina (OLSZEWSKI *et al.*, 2010), cápsula polissacarídica (FERREIRA-PAIM *et al.*, 2012), enzimas hidrolíticas (GOSTINCAR *et al.*, 2011), biofilme (NIKOLAEV & PLAKUNOV, 2007); apresentar dimorfismo e mudança fenotípica (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1984); causar danos ao sistema imunológico do hospedeiro (CASADEVALL, 2007); reduzir o tamanho dos conídios (LATGE, 2001; AHMED, 2012); possuir atividade hemolítica (WATANABE *et al.*, 1999); crescer em diferentes temperaturas (CASADEVALL, 2012) e pH (DAVIS, 2009).

A aderência a tecidos está ligada à capacidade de células leveduriformes e hifas expressarem moléculas específicas e importantes no processo de colonização e posterior invasão do fungo no tecido do hospedeiro (CASADEVALL & PIROFSKI, 2007; CHIN *et al.*, 2016; VILA *et al.*, 2020). Outro fator importante é a produção de melanina, que, ambientalmente, exerce o papel de proteção do fungo aos estresses físicos como radiação ultravioleta e extremos de temperaturas (BELOZERSKAYA *et al.*, 2017; CORDERO & CASADEVALL, 2017). No processo infeccioso, as células melanizadas são menos suscetíveis a degradação enzimática e ação de antifúngicos (HOGAN *et al.*, 1996; MCFADDEN & CASADEVALL, 2001; OLSZEWSKI *et al.*, 2010; BELOZERSKAYA *et al.*, 2017; POMBEIRO-SPONCHIADO *et al.*, 2017; AGUSTINHO & NOSANCHUK 2017; FREITAS *et al.*, 2019). Outras ações importantes dessas moléculas são: resistência contra fagocitose, interferindo na capacidade de *burst* oxidativo dos macrófagos – habilidade que os fagócitos possuem para englobar material particulado (SILVA, 2001; PONATH & KAINA, 2017); produção de óxido nítrico na fagocitose do fungo, sendo um mecanismo primário contra alguns patógenos e até mesmo, inibindo a apoptose de macrófagos após a fagocitose de células melanizadas; modulação de citocinas, alterando ou até mesmo inibindo sua produção; e geração de uma resposta efetiva de anticorpos que podem contribuir de forma importante (NOSANCHUK, 2003; YOUNGCHIM *et al.*, 2004; TABORDA *et al.*, 2008; CASADEVALL, 2012; CANEPPA *et al.*, 2019; PIACENZA *et al.*, 2019).

Alguns fungos possuem uma cápsula polissacarídica que atua inibindo a fagocitose, impedindo dessa forma a ação do sistema imune do hospedeiro (HOGAN *et al.*, 1996; MCFADDEN & CASADEVALL, 2001; FERREIRA-PAIM *et al.*, 2012). A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares como proteinases, lipases, fosfolipases e ureases causam

danos teciduais, intensificando o processo de adesão e disseminação do fungo no organismo, sendo responsáveis pela hidrólise de uma ou mais ligações ésteres de glicerofosfolípidos, dos quais a membrana celular é constituída, e por isso representam importantes parâmetros para estabelecer um estado de infecção (GOSTINCAR *et al.*, 2011).

Algumas comunidades microbianas possuem organizações celulares que estabelecem adesões a uma superfície, sendo envoltas por uma matriz adesiva excretada pelas células e por células mortas, conhecido como biofilme (NIKOLAEV & PLAKUNOV, 2007). Em geral, quando há ocorrência de biofilme, é possível perceber a resistência a agentes antimicrobianos que pode ocorrer por diversas razões, como pela presença de células persistentes quando expostas a antimicrobianos, idade do biofilme, aumento da expressão das bombas de efluxo, produção de enzimas que inativam os antimicrobianos, adsorção dos antibióticos na matriz exopolimérica e resposta fisiológica dos micro-organismos ao ambiente existente nos biofilmes (MARTINEZ & CASADEVALL, 2005).

O dimorfismo é caracterizado como a capacidade de mudar a forma celular de uma hifa ambiental para uma forma leveduriforme, por meio de mudanças na composição da parede celular, presença de moléculas antigênicas, alterações na composição de lipídeos da membrana celular remodelando e reorganizando-a (MARESC & KOBAYASHI, 2000), além da expressão de fatores de virulência (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1984). Os patógenos fúngicos apresentam mecanismos que ao longo do tempo foram selecionados para sua proteção, como a formação do tubo germinativo dentro do macrófago. De acordo com CASADEVALL (2007), a produção de cápsula diminui o recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção, reduzindo a produção de anticorpos. Outra consequência é a produção de espécies reativas de oxigênio, que proporciona um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e antioxidantes, dentre outros (ZANUTO *et al.*, 2001).

Além dos diversos fatores que prejudicam a resposta imunológica que já foram citados, há ainda o tamanho dos conídios, que são esporos formados a partir da reprodução assexuada dos fungos e que podem ser dispersados na atmosfera. De acordo com LATGE (2001), conídios com 2 a 5 µm de diâmetro podem chegar aos alvéolos pulmonares. Já aqueles maiores que 5 µm de diâmetro são capazes de se depositar nos seios paranasais e vias aéreas superiores (AHMED, 2012). Desta forma o tamanho dos conídios representa um importante fator de virulência para a disseminação e capacidade de invasão de fungos patogênicos (TOMEI & KAUFFMAN, 2000).

Organismos patogênicos possuem a capacidade de adquirir ferro para manutenção da sua sobrevivência, durante infecções causadas em mamíferos (PAYNE, 1993; HOWARD, 1999). Alguns patógenos são capazes de causar a lise em hemácias, liberando íons de ferro e é comum encontrar essa característica em fungos patogênicos (MANNS *et al.*, 1994; LUO *et al.*, 2001; BONASSOLI *et al.*, 2005; AKTAS & YIGIT, 2015). Muitos patógenos conseguem adquirir ferro indiretamente a partir de substâncias que englobam o ferro, como a hemoglobina (MANNS *et al.*, 1994). Para que isso ocorra, o patógeno deve destruir o grupo heme para extrair o ferro (WATANABE *et al.*, 1997; LUO *et al.*, 2001). Os micro-organismos com essa característica secretam fatores hemolíticos para obter ferro a partir de fontes como a hemoglobina e grupo heme, processo já observado *in vitro* (LEWIS & DYER, 1995; WATANABE *et al.*, 1999).

A temperatura dos hospedeiros representa uma barreira importante para a infecção fúngica. A presença de mecanismos moleculares relacionados à termotolerância dos fungos patogênicos é considerada um fator de virulência importante que contribui com o aumento da virulência (ZARAGOZA *et al.*, 2002). Dessa forma, as infecções fúngicas em mamíferos e aves ocorrem raramente, sendo mais perigosas ao hospedeiro em situações de imunossupressão ou de baixa temperatura corpórea, em relação à temperatura corporal média desses animais (CASADEVALL, 2012). Já a adaptação de fungos a diversos pH é decisiva e pode ocorrer rapidamente, pois permite aos patógenos invadir a corrente sanguínea e tecidos, além de sobreviver em sítios anatômicos distintos, conferindo a capacidade de provocar infecções disseminadas (DAVIS, 2009).

As enzimas superóxido dismutases, catalases e peroxidases protegem o patógeno contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) que são produtos metabólicos de células do sistema imunológico e apresentam propriedades antimicrobianas (CASADEVALL & ALMEIDA, 2005). Essas enzimas neutralizam os radicais livres decorrentes do metabolismo dos fagócitos. As fosfolipases contribuem na degradação da membrana celular, importante característica para a invasão do tecido do hospedeiro (MISSALL *et al.*, 2004; CHATURVEDI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2015). A substância peróxido de hidrogênio leva à produção de várias espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito, desta forma, os fungos são capazes de tolerar concentrações que apresentam potencial para resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, como a fagocitose. No entanto, não há dados que levem a uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) ideal para este gradiente (FERREIRA *et al.*, 2013). Uma enzima importante na patogenicidade dos fungos é a lacase, que catalisa a oxidação de uma grande

variedade de compostos fenólicos e aminas aromáticas, utilizando oxigênio molecular comoceptor de elétrons. São amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas por uma grande variedade de plantas, fungos, bactérias e insetos. Deste modo, as lacases fúngicas estão envolvidas na produção de radicais livres do oxigênio (SAPARRAT, *et al.*, 2002; KUNAMNENI *et al.*, 2007).

Diversos fungos patogênicos possuem atividade de urease positiva em humanos. A urease produzida durante o período de conversão da fase saprofítica para a fase parasítica é, em parte, responsável pela produção da amônia intracelular liberada no meio extracelular tornando-o alcalino, o que influencia na determinação do pH local (COLE, 1997). Demonstrado por COX *et al.* (2000), a urease pode ser importante para *Cryptococcus deneoformans* (*neoformans*) sobreviver em hospedeiros humanos. Utilizando modelos murinos, OLSZEWSKI *et al.* (2004) estudaram o papel da urease em infecção com *Cryptococcus* no sistema nervoso central. A inoculação direta de *C. deneoformans* no cérebro de camundongos, quando comparada ao isolado com deleção para o gene da urease e do mutante reconstituído, não demonstraram diferenças significativas na colonização do sistema nervoso central. Entretanto, quando o fungo foi inoculado via endovenosa, o padrão de disseminação para os diferentes órgãos e para o cérebro foi de uma menor disseminação cerebral nos camundongos com deleção para o gene da urease, sugerindo que a urease facilita a invasão do fungo em órgãos vitais por via hematogênica (OLSZEWSKI *et al.*, 2004). De acordo com COX *et al.* (2000), a urease age facilitando a invasão de fungos no sistema nervoso central do hospedeiro, altera a função dos leucócitos e exerce influência na esporulação de fungos patogênicos como *Coccidioides immitis*.

Classificada como deficiência de oxigênio, a hipóxia interfere na respiração oxidativa aeróbica e constitui uma causa comum e muito importante na lesão e morte celular (SOUZA, 2013). A hipóxia é um estresse microambiental que ocorre durante infecções fúngicas pulmonares *in vivo*, e as concentrações de oxigênio nos locais das infecções podem cair até 1%, podem ainda influenciar na composição da parede celular fúngica de alguns fungos (GRAHL, 2011).

Em tecidos dos hospedeiros, as tensões de oxigênio são baixas, o que deve ser superado pelos patógenos durante o processo de infecção (CHUN *et al.*, 2007). A hipóxia em fungos como *Candida albicans* (SETIADI *et al.*, 2006), *Cryptococcus deneoformans* (CHUN *et al.*, 2007), *Aspergillus niger* (DIANO *et al.*, 2009) e *Trichoderma reesei* (BONACCORSI *et al.*, 2006), tem sido estudado pela sua importância na patogenicidade. Esses trabalhos têm demonstrado que a hipóxia modifica a expressão de genes para a conservação no metabolismo

de carbono, além da resposta ao estresse (CHUN *et al.*, 2007). Outro importante fator na patogenicidade é a halotolerância, as diferentes concentrações de sal podem afetar o crescimento e a esporulação de fungos filamentosos (EVANS *et al.*, 2013). De acordo com MULDER *et al.* (1989); MAHDY *et al.* (1996); MULDER & EL-HENDAWY (1999) e MANDEEL (2006), em concentrações de sal maiores que 5%, há uma tendência ao aumento na esporulação.

4. Materiais e métodos

4.1 Origem dos fungos

Diferentes estudos têm sido realizados a partir de amostras coletadas pela equipe do Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais (MicroPolar) em diferentes ilhas da Península Antártica e continente nos últimos anos. Entre estes fungos, *Pseudogymnoascus* spp., *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram selecionados no presente trabalho (**Tabela 2**).

Tabela 2. Fungos da Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG selecionados para caracterização do potencial patogênico.

Fungo	UFMGCB	Local	Substrato	Referência
<i>Aspergillus thermomutatus</i>	17415	Ilha Rei George (Península Keller)	<i>Permafrost</i>	(da SILVA <i>et al.</i> , 2022)
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	8532 8562	Ilha Elefante	<i>Usnea antarctica</i>	(SANTIAGO <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	10326 10378 10381 10386 10392	Ilha Nelson	Solo	(GOMES <i>et al.</i> , 2018)
	10394	Ilha Rei George		
	10472	Ilha Robert		
	10479			
	10504			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	17448	Ilha Rei George (Arctowski)	<i>Permafrost</i>	(da SILVA <i>et al.</i> , 2022)
	17473	Ilha Deception (Whalers Bay)		

4.2 Delineamento experimental

Os isolados fúngicos selecionados seguiram fluxos diferentes (**Figura 3**). Após finalização dos experimentos *in vitro*, os táxons *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532, *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415, *Rhodotorula* cf. *mucilaginosa* UFMGCB 17448 e *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 17473 foram selecionados para estudos de patogenicidade por meio de testes *in vivo* utilizando modelo invertebrado, seguido por modelo em camundongos BALB/c (**Figura 3**).

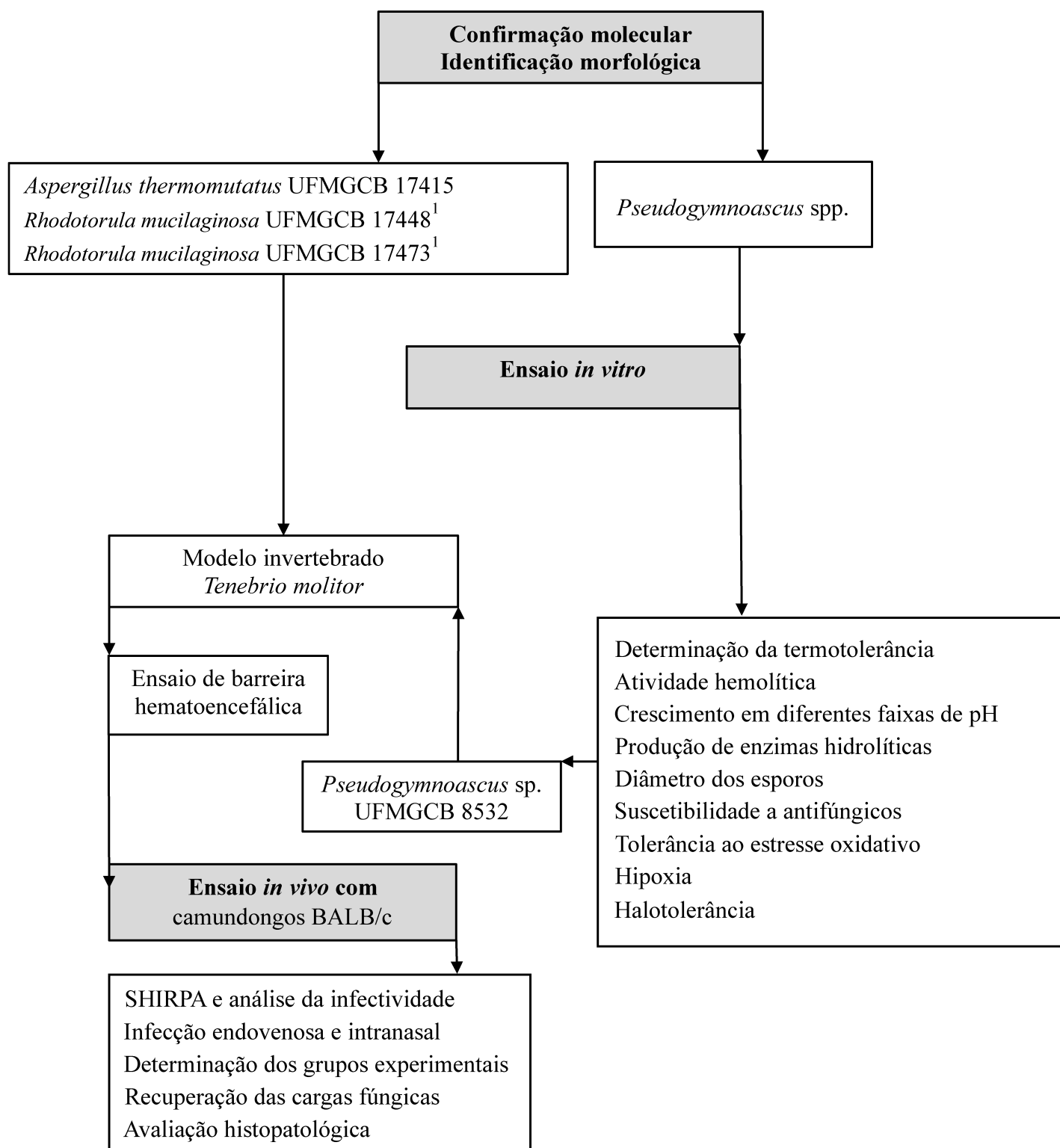


Figura 3. Fluxograma dos experimentos realizados. ¹Isolados submetidos ao ensaio de barreira hematoencefálica.

4.3 Confirmação da identificação dos isolados fúngicos

Todos os isolados depositados na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG selecionados para o trabalho foram submetidos a identificação taxonômica polifásica confirmativa. Para isso, os fungos filamentosos e leveduras foram submetidos à extração do DNA total e posterior amplificação e sequenciamento de regiões específicas.

4.3.1 Identificação dos fungos filamentosos

4.3.1.1 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por ROSA *et al.* (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por um período de 7 dias em meio ágar YM, posteriormente o micélio fúngico foi fragmentado e adicionado em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl – Tris (Hidroximetil) Aminometano Hydrochloride - Cloridrato 0,05 M, EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS - sódio dodecil sulfato 1%) e incubado a –20 °C por aproximadamente 10 minutos. O micélio foi triturado com auxílio de esferas de aço inoxidável (*beads*) (3,175 mm de diâmetro) em homogeneizador *Next Advance Bullet Blender®*. Após essa etapa, foi adicionado 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 30 minutos a 65 °C. Posteriormente, foi acrescentado 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

Após homogeneização, os tubos foram incubados por 30 minutos a 0 °C (em gelo). Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo esterilizado de 1,5 mL, e acrescido 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3 M. O conteúdo do tubo foi vertido para homogeneização, incubado a 0 °C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo esterilizado e, em seguida, adicionado 50% do volume de isopropanol (*Merck*) e a suspensão cuidadosamente homogeneizada. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. Em seguida, adicionados 200 µL de etanol 70% gelado (*Merck*), sendo os tubos homogeneizados e submetidos à centrifugação a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado novamente por inversão e os tubos incubados à temperatura ambiente por 2 minutos. Foi realizada outra lavagem com 200 µL de etanol 70%

p/v gelado (*Merck*) e, por último, uma nova centrifugação 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 5 minutos, seguido de descarte do sobrenadante. A amostra ficou à temperatura ambiente no modo *overnight*, e então foi adicionado 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). A amostra foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA e, posteriormente, armazenada em *freezer* a -20 °C. O DNA obtido a partir dos isolados foi quantificado em espectrofotômetro (*NanoDrop* - ND 1000 Technologies) (SCIENTIFIC, 2008) e armazenado a -20 °C até sua utilização.

4.3.1.2 Amplificação da região ITS utilizando os iniciadores ITS-1 e ITS-4

Para amplificação da região transcrita interna ITS1-5.8S da região do gene rRNA foram utilizados os iniciadores (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), conforme descrito por WHITE *et al.* (1990). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3 µL de MgCl₂ 25mM (Fermentas), 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 a 10 pmol-1 (Invitrogen), 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentas), 1 a 5 µL do DNA - de modo que a reação contenha entre 50 a 500 ng e água ultrapura esterilizada q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador *Eppendorf Mastercycler nexus* GSX1. O programa de ciclagem consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C, 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese (Loccus biotecnologia model LPS – 300h), em gel de agarose 1,0% (Avati Mod.: AV – 0110), em tampão TBE 0,5X, submetidos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed™ (Biotium), e os géis visualizados sob luz UV e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, serial 0518816 – França).

4.3.2 Identificação das leveduras

4.3.2.1 Extração do DNA total

Para extração do DNA total das leveduras, os isolados foram crescidos em meio ágar YM. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl), EDTA (0,005 M), NaCl 0,1 M e SDS [sódio dodecil sulfato 1% (p/v)] e incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Após essa etapa, foram adicionados 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico – 25:24:1 (*Sigma*, EUA) aos tubos e os mesmos vedados com parafilme, homogeneizados em vórtex e centrifugados a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) durante 15 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado isopropanol (*Merck*) (v/v). Os tubos foram homogeneizados por inversão e permanecendo em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitação do DNA. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e ao *pellet* formado foi acrescentado 200 µL de etanol 70% (*Merck*) refrigerado. Efetuou-se novamente uma centrifugação a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e uma segunda lavagem com 200 µL de etanol 70% gelado e centrifugação a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 10 minutos foram realizadas. Após o descarte do sobrenadante por inversão, os tubos foram incubados no modo *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Após essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão Tris-EDTA 0,1M (TE), pH 8,0 e estocado a -20 °C.

4.3.2.2 Amplificação do domínio D1/D2

Para confirmação da identificação das leveduras, os isolados foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, para isto, na reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL1 (5'– GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG– 3') e NL4 (5'– GGTCCGTGTTTCAAG ACGG – 3') (WHITE *et al.*, 1990; O'DONNELL 1993; KURTZMAN & ROBBETT 1998; LACHANCE *et al.*, 1999). Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão de PCR 10X (*Sinapse*), 2 µL de MgCl₂ 25 mM (*Sinapse*), 2 µL de dNTP 10mM, 1 µL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol (Invitrogen, EUA) 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 5U (*Sinapse*) e 1 ou 2 µL de DNA (entre 50 e 300 ng de DNA). O volume final da reação foi completado com água ultrapura, para 50 µL. A reação foi realizada em um termociclador PCR *Eppendorf Mastercycler nexus* GSX1 e apresentou as seguintes

condições: desnaturação inicial a 95 °C por dois minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 25 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguidos de uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, em tampão TBE 0,5X, submetidos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição GelRed™ (Biotium), visualizadas sob UV e fotografadas pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, serial 0518816 – França).

4.3.3 Purificação dos produtos de PCR

Os amplicons gerados pelas reações de PCR foram purificados utilizando etanol-EDTA. Ao produto de PCR – 47 µL, foram adicionados 11,25 µL de EDTA e 141 µL de etanol absoluto por 15 minutos em temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 25 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. A seguir, foi adicionado 120 µL de etanol 70% gelado, o tubo centrifugado a 13.200 r.p.m. (12.856 xg) por 10 minutos e o etanol descartado por inversão. O tubo ficou à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Foi adicionado 10 µL de água ultrapura e o conteúdo do tubo homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, o tubo foi incubado em estufa a 37 °C por 30 minutos. O produto da PCR purificado e quantificado em *NanoDrop* ND 1000 (*NanoDrop* Technologies, EUA) (SCIENTIFIC, 2008) e armazenado a -20 °C até o momento da reação de sequenciamento.

4.3.4 Reação de sequenciamento e precipitação das amostras

Para as reações de sequenciamento, foi utilizando o kit *Big Dye* versão 3.1 (*Applied Biosystems*, EUA), em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730 (*Applied Biosystems*, EUA). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (*Applied Biosystems*, EUA) preparada para um volume final de 10 µL, em que foram colocados: 1 µL do iniciador – 5 µmol⁻¹, 1 µL de tampão – presente no kit de sequenciamento, 1 µL de *Big Dye*, 1 a 5 µL de DNA – de modo que a reação final contenha entre 50-500 ng/µL e o restante de água esterilizada para completar o volume. O programa de ciclagem consiste em uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 minuto, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e 4 minutos de extensão final a 60 °C.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de amônio e 50 µL de etanol 96% (*Merck*) em cada poço. A placa foi homogeneizada com auxílio de um vórtex brevemente e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 r.p.m. (1010 xg) à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (*Merck*) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 r.p.m. (1010 xg) à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço acrescentado 10 µL de Formamida HI-DI (*Applied Biosystems*, EUA). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até a adição das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (*Applied Biosystems*, EUA).

4.3.5 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos depositadas no *GenBank* e pertencentes a coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLASTn – *Basic Local Alignment Search Tool* (versão 2.215) do BLAST 2.0 disponível no portal NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology*. Os fungos com valor de E = 0, cobertura e identidade $\geq 99\%$, bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente utilizando o programa MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA *et al.*, 2013) foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequências com valor de E diferente de 0 e cobertura, e identidade $\leq 98\%$, os mesmos foram identificados em nível de gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. Além disso, para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência. Para identificação molecular foram utilizadas as sequências ≥ 300 pares de bases.

4.3.6 Identificação morfológica

Para caracterização morfológica, os isolados de *Pseudogymnoascus* foram submetidos às temperaturas de 5, 10, 15 e 25 °C em ágar Sabouraud dextrose com clorafenicol (*Himedia*, Índia) com o objetivo de avaliar suas características com o aumento da temperatura. No centro de cada placa de Petri foram inoculado um disco micelial de 5 mm de diâmetro de crescimento

do fungo. A velocidade de crescimento micelial foi determinada semanalmente até 21 dias de incubação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando diferenças significativas entre os isolados forem encontradas, as médias foram separadas pelo teste de diferença mínima significativa (DMS) com $P = 0,05$.

Para identificação morfológica, foram confeccionadas lâminas montadas em placas de microcultivo de acordo com a técnica de RIDDEL (1950) a 7 °C por 16 dias em *Corn Meal Agar* - CMA, conforme utilizado por GARGAS *et al.* (2009). O algodão da placa de microcultivo foi umedecido com água destilada esterilizada, a fim de criar uma câmara úmida para a incubação das placas. A partir dessas placas de microcultivo, as lâminas foram preparadas, sendo fixadas em etanol 95% e coradas com lactofenol-azul/azul de algodão, para posterior registro fotográfico das estruturas reprodutivas utilizando o sistema de captura de imagem (Leica DFC425, EUA).

Para a microscopia eletrônica de varredura, os fungos foram inoculados em Sabouraud dextrose com clorafenicol (*Himedia*, Índia) e incubados entre 5 e 25 °C por 14 dias. Os micélios foram fixados em 2% de glutaraldeído em tampão NaPO_4 0,1 M e lavado em OsO_4 tamponado a 1% por 2 h. O material foi desidratado usando um etanol graduado série (10, 25, 40, 60, 75, 85, 95 e 100%) durante 15 minutos por concentração. O material foi seco, revestido com ouro e analisado em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200, EUA).

4.4 Testes *in vitro* de patogenicidade

4.4.1 Determinação da termotolerância

Para a determinação do perfil de termotolerância os fungos foram crescidos em placas de Petri contendo o meio de cultura YM a 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30 e 37 °C por 14 dias. Discos miceliais de 5 mm do crescimento fúngico foram inoculados em placas de Petri contendo ágar YM. Os resultados foram determinados pelo tamanho da colônia em mm. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.2 Atividade hemolítica

A capacidade hemolítica dos isolados foi avaliada de acordo com SOUSA *et al.* (2017) e ALVES *et al.* (2019), com adaptações. Para tal, discos de 5 mm de crescimento fúngico foram inoculados em placas contendo Ágar Sabouraud (*Himedia*, Índia) suplementado com 7% de

sangue de carneiro e 200 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias e o tipo de hemólise foi classificado a partir da característica do halo ao redor da colônia (**Tabela 3**), quando presente e o ensaio foi realizado em triplicata. Como controle positivo foi utilizado *Candida albicans* (ATCC 10231) e como controle negativo *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) que não promove a formação de halo de hemólise. A atividade foi avaliada conforme o índice hemolítico obtido pela fórmula (PRICE *et al.*, 1982):

$$\frac{[\text{diâmetro da colônia} + \text{diâmetro da colônia mais a zona de precipitação}]}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Tabela 3. Classificação dos tipos de hemólise a partir da característica do halo hemolítico (LUO *et al.*, 2001).

Tipo Hemólise	Característica halo	Capacidade hemolítica
Alfa-Hemólise (α)	Esverdeado	Parcial
Beta-Hemólise (β)	Transparente	Total

4.4.3 Crescimento em diferentes faixas de pH

Os fungos foram submetidos a testes de tolerância em diferentes pH, utilizando o meio de cultura YM com o pH ajustado para: 4 (próximo ao pH vaginal), 7 (próximo ao pH do sangue humano) e 9 (próximo ao pH intestinal). Os inóculos foram preparados como descrito anteriormente e as placas foram incubadas por 7 dias a 28 °C. Os resultados foram expressos pela presença ou ausência de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.4 Determinação da produção de enzimas hidrolíticas

Os fungos foram submetidos aos testes de produção das enzimas proteinase, esterase e fosfolipase. A produção de proteinases e esterases foram avaliadas por meio da metodologia proposta por AOKI *et al.* (1990), enquanto para fosfolipase foi utilizado o método em placa com gema de ovo, descrito por PRICE *et al.* (1982).

Para a avaliação da produção da enzima proteinase os isolados foram inoculados em Ágar de Soro Bovino (ASB) (11,7% de *Yeast Carbon Base*; 1% de extrato de levedura; 2% de albumina de soro bovino e 2% de ágar – pH 5) esterilizado por filtração, e incubados por 7 dias a 28 °C. A atividade da proteinase foi medida pelo tamanho do halo de opacidade da hidrólise do ASB, única fonte de nitrogênio do meio.

A produção de esterase foi avaliada através do meio de cultura YM acrescido de 10g de peptona, 5g de NaCl, 0,1g de CaCl₂, 15g de ágar e q.s.p para 1L de água destilada, com pH ajustado para 6,5. Depois de autoclavado, o meio foi arrefecido para cerca de 50 °C, sendo acrescentado 5 mL de Tween 80 autoclavado. Os isolados foram incubados a 28 °C por 14 dias.

Para a detecção de fosfolipases os isolados fúngicos foram inoculados em um meio base (2% de glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 5,88% de cloreto de sódio; 0,055% de cloreto de cálcio e 2% de ágar) acrescido de emulsão de ovo a 50% em solução fisiológica e incubados por 14 dias na temperatura de 28 °C. As atividades enzimáticas de esterase (AOKI *et al.*, 1990), e fosfolítica foram classificadas de acordo com a **Tabela 4** e avaliadas pela fórmula (PRICE *et al.*, 1982):

$$\frac{[\text{diâmetro da colônia} + \text{diâmetro da colônia mais a zona de precipitação}]}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Para a atividade de urease, os isolados foram inoculados a 28 °C por 7 e 14 dias em ágar de Christensen. A produção de urease é indicada por uma cor rosa avermelhada, enquanto o resultado negativo o meio de cultura utilizado permanece inalterado (CHRISTENSEN, 1946).

Tabela 4. Classificação da atividade enzimática proteolítica e fosfolítica (AOKI *et al.*, 1990, com adaptações).

Nível	Valores
Forte positivo	$\leq 0,69$
Forte	0,70 - 0,79
Média	0,80 - 0,89
Fraca	0,90 - 0,99

4.4.5 Determinação do diâmetro dos esporos

Os fungos foram inoculados em placas contendo meio CMA a temperatura de 7 °C por 14 dias sendo inoculados em lâmina a fresco em microscópio óptico (*Leica DFC425*, EUA). Foram medidos 25 esporos e posteriormente foi estabelecida a média com desvio padrão, determinando assim o tamanho dos esporos de cada isolado.

4.4.6 Suscetibilidade a antifúngicos: anfotericina B, itraconazol, fluconazol

Os isolados de fungos filamentosos foram testados quanto à sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B (*Sigma*, EUA), itraconazol (*Sigma*, EUA) e fluconazol (*Sigma*, EUA) por meio do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), seguindo o CLSI (2008). Para a realização dos ensaios, os isolados de fungos filamentosos foram anteriormente crescidos em meio CMA a 7 °C por 16 dias, as colônias foram cobertas com solução salina (0,85% NaCl) esterilizada. O líquido contendo os esporos foi transferido para um tubo de ensaio esterilizado e após sedimentação, por decantação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado e homogeneizado em vórtex por aproximadamente 15 segundos. Os esporos foram observados e contados em câmara de Neubauer e uma solução padronizada a 10^6 esporos/mL. Os testes foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços. Assim, os antifúngicos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (anfotericina B e itraconazol) e água (fluconazol), as soluções estoque das drogas foram diluídas em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (com 15 glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol - *Sigma*, EUA).

Para os testes, a solução estoque foi diluída cinco vezes em RPMI para se conseguir uma concentração duas vezes a necessária e em seguida foram feitas as diluições. Na primeira coluna teremos apenas 200 µL de meio RPMI, na coluna 2 foram inoculados 200 µL das drogas diluídas em RPMI, e nas colunas 3 a 11 foi inoculado 100 µL de meio RPMI. Para a diluição seriada, 100 µL da droga foi inoculado da fileira 2 para a fileira 3 e assim, sucessivamente, até a fileira 11. Em seguida o inóculo foi acrescido da coluna 2 até a coluna 12, em todos os poços. Ao final do experimento, após inoculação dos fungos a serem testados, o volume final de cada poço foi de 200 µL, de forma que tanto as concentrações dos antifúngicos quanto as concentrações dos inóculos caíam de 2X para 1X, atingindo assim os valores desejados. Dessa forma, as concentrações das drogas variam de 8 µg/mL a 0,007 µg/mL para anfotericina B, 64 µg/mL a 0,062 µg/mL para fluconazol, 16 µg/mL a 0,015 µg/mL para itraconazol. O controle

de esterilidade do meio RPMI foi inoculado na coluna 1. O controle de crescimento dos fungos foi inoculado na coluna 12. A **Figura 4** ilustra o esquema do ensaio de susceptibilidade, bem como a distribuição dos controles do teste. A leitura da CIM foi realizada após 7 dias de incubação a 28 °C. Todos os testes foram realizados em duplicata para cada isolado e interpretados de acordo com o protocolo M38 – A2 (CLSI, 2008).

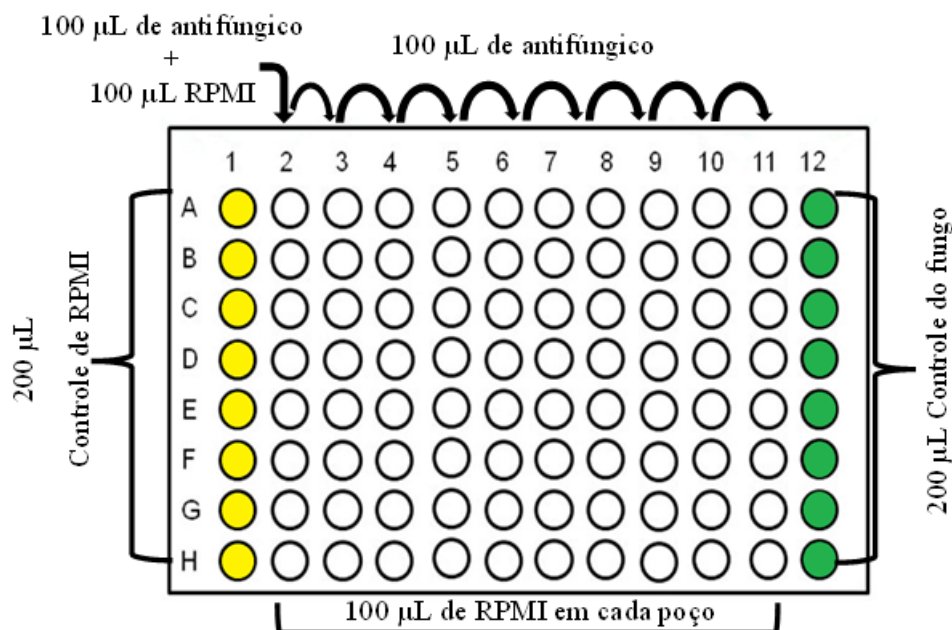


Figura 4. Esquema da placa de 96 poços utilizada no ensaio de susceptibilidade aos antifúngicos e distribuição dos controles.

4.4.7 Tolerância ao estresse oxidativo

A tolerância ao estresse oxidativo foi realizada conforme adaptações do protocolo estabelecido por CUNHA *et al.* (2010). Os isolados foram tratados com peróxido de hidrogênio – H₂O₂ (Merck, EUA) nas concentrações finais de 0,005, 0,05 e 0,5 M. Os conídios foram preparados conforme estabelecido no item 4.5.2 - Preparo do inóculo fúngico, na concentração de 10⁶/mL, e incubados em RPMI-1640 acrescido das concentrações de peróxido de hidrogênio mencionadas acima, por 1 hora a 28 °C. Posteriormente, 50 µL da solução acima, foram incubados em placas de 24 poços contendo 500 µL de meio ágar Czapek Dox a 3%. As culturas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. Os testes foram realizados em duplicata e o resultado foi avaliado pela ausência ou presença de crescimento micelial.

4.4.8 Hipóxia

Para a determinação das condições de hipóxia, os isolados foram inoculados em meio YM e incubados em jarra de microaerofilia por 7 dias a 28 °C, com base no protocolo realizado por GRAHL *et al.* (2011), com adaptações. Os testes foram realizados em duplicata e foram considerados positivos os isolados que apresentaram crescimento nas condições citadas.

4.4.9 Ensaio de halotolerância

A halotolerância foi determinada de acordo com os protocolos que foram estabelecidos por EVANS *et al.* (2013) e CHATURVEDI *et al.* (2018), com adaptações. Os isolados foram inoculados em placas contendo YM e foram incubados a 28 °C por 7 dias com 2 % de NaCl. O teste foi realizado em duplicata e foram considerados positivos os isolados que apresentaram crescimento micelial nas condições citadas.

4.4.10 Testes com o invertebrado *Tenebrio molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*)

Os isolados *Aspergillus. thermomutatus* UFMGCB 17415, *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532, *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 17448 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473 foram inoculados em larvas de *Tenebrio molitor*. Primeiramente, foi realizado um experimento piloto para determinação do inóculo a ser utilizado dos isolados acima. Para isso, o isolado fúngico de *Pseudogymnoascus* o foi mantido em CMA por 16 dias a 7 °C e posteriormente os conídios foram preparados conforme estabelecido no item 4.5.2, nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios. O inóculo ideal escolhido foi aquele que apresentou mortalidade intermediária dos invertebrados. Para o isolado *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 foi utilizado o ágar batata, sendo incubado a 30 °C por 7 dias, já as leveduras *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473 foram inoculadas também em ágar batata e incubadas a 30 °C por 72 horas e posteriormente os conídios foram preparados conforme estabelecido no item 4.5.2, nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios e 10^5 e 10^6 conídios respectivamente.

As larvas de *T. molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) foram pesadas e selecionadas aquelas que apresentaram peso entre 100 a 200 mg. Foram mantidos grupos de 10 larvas com farelo de trigo ou aveia. Para a realização do experimento, antes da inoculação, foi realizada a assepsia do local da infecção por meio de swab embebido em álcool 70%. Os experimentos foram realizados em triplicata, em dias diferentes, com a presença de um grupo controle positivo (*Candida albicans* SC5314), um grupo controle negativo (somente PBS).

Para determinação do inóculo, as larvas de *T. molitor* foram infectadas com 10 µL da solução de células nas concentrações relatadas acima. As larvas foram mantidas a 37 °C durante o andamento do experimento, a morte foi constatada visualmente e através da ausência de movimento após toque com uma pinça. O inóculo de 10^6 foi escolhido para o isolado

Pseudogymnoascus sp. 8532. Já os isolados de *Aspergillus* e *Rhodotorula*, foram inoculados na concentração de 10^5 . O ensaio de sobrevivência também foi realizado conforme descrito.

4.4.11 Avaliação da disseminação das linhagens em barreira hematoencefálica

4.4.11.1 Cultivo celular

Para a avaliação da disseminação dos isolados em barreira hematoencefálica foi utilizada a linhagem celular *Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells* (hCMEC/D3) (Merck-Millipore - Catálogo N° SCC066), da *Human Brain Microvascular Endothelial Cells* (HBMEC). Estas foram cultivadas em EBM-2 (Lonza – Catálogo N° CC3156) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 5%, penicilina-estreptomicina 1%, hidrocortisona 1,4 mM (Sigma-Aldrich, Catálogo N°H0888-1G), ácido ascórbico 5 µg/mL (Sigma-Aldrich, Catálogo N°A4403), concentrado lipídico quimicamente definido 1% (Gibco, Catálogo N°11905-031), HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich, Catálogo N° H0887) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) 1 ng/mL (Gibco, Catálogo N° PHG0266- 25µg). As células foram cultivadas sobre uma camada de colágeno (150 µg/mL) e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 4 a 6 dias com troca de meio a cada dois dias para obtenção de uma monocamada de células. Para uso posterior, as células foram dissociadas com o uso de tripsina/EDTA (Merck. Catálogo N° SM-2003-C) e, em seguida, adicionadas de SFB e DMSO 10%. As passagens foram armazenadas em freezer -80 °C.

Após descongelamento, as células foram cultivadas em frascos para cultura de tecidos de área de 25 cm². Com uma confluência de 90%, foi feito o repique celular e estas foram transferidas em sua totalidade para um frasco de cultura de tecidos com área de 75 cm², onde foram mantidas e conservadas, sempre realizando seu repique celular depois de alcançada a confluência de 90%. Para o repique celular, as garrafas foram lavadas com solução de PBS 1X (1,5 mM NaCl; 40 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄; pH 7,2) e tratadas por 5 minutos com tripsina 0,2% + EDTA 0,02% para dissociação enzimática das células, desfazendo a monocamada. Para a neutralização da enzima, a garrafa foi lavada com o meio citado acima e as células em suspensão foram centrifugadas a 3.500 r.p.m. (903 xg), a 25 °C por 5 minutos. O sedimento celular formado foi suspenso em 1 mL de meio e 250 µL deste foi transferido novamente para a garrafa, onde um novo meio de cultivo celular também foi adicionado.

4.4.11.2 Ensaios de transcitose

Foram realizados os ensaios de transmigração dos isolados de *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 10473 no sistema da barreira hematoencefálica *in vitro*. Para isso, o aparato *transwell* com uma membrana com poros de 8 µm coberta de colágeno foi utilizado. As células hCMEC/D3 foram cultivadas como descrito anteriormente na parte superior dessa membrana utilizando-se cerca de 5×10^4 células por cm² até que uma confluência de 100% foi observada.

Após esse período, células fúngicas em meio RPMI (cerca de 1×10^6 células) foram adicionadas na parte apical da câmara e depois coletadas na parte inferior para medição por UFC. Diferentes tempos de coleta (3, 9 e 24 horas) do meio na parte inferior foram testados para avaliar o tempo de passagem dos fungos pela barreira. Como controle negativo, poços sem a adição das linhagens foram utilizados, como controle positivo foi utilizado o *Cryptococcus*.

Para quantificar as células de leveduras que atravessaram a camada de células, foi realizado a contagem de UFC. Para isso, o meio coletado na parte basal das câmaras foi submetido a diluição 10^{-2} e, em seguida, 100 µL de cada diluição foi plaqueada em placas de Petri. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas a 30 °C. Após esse período, foi realizada a contagem das UFC por meio da fórmula: $\text{UFC} = (\text{número de colônias na placa} \times \text{inverso da diluição onde a contagem foi realizada}) / \text{volume plaqueado em mL}$.

4.5 Testes *in vivo* com camundongos BALB/c

4.5.1 Isolados e animais experimentais utilizados

Para realização dos ensaios *in vivo* com os camundongos BALB/c foi obtida autorização junto ao Comitê de Ética, com registro CEUA: 172/2020, conforme anexo 1. Após a caracterização *in vitro*, foi selecionado um isolado de *Pseudogymnoascus* sp. para análise da virulência em modelo murino de infecção intranasal. Além disso, os isolados *A. thermomutatus* UFMGCB 17415, *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473 provenientes de *permafrost* da Antártica foram selecionados por apresentarem resultados promissores após testes *in vitro* (HOLANDA, 2020).

Para a execução dos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com seis a oito semanas de idade, adquiridos no biotério do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram divididos em grupos

de seis por gaiola, inclusive para os grupos controles. Foi fornecido água e ração *ad libitum* (à vontade) e ciclos de claro/escuro foram mantidos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFMG). Previamente a qualquer experimentação, os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com solução de ketamina (Syntec) 80 mg/Kg e xilazina (Ceva) 10 mg/Kg diluídas em PBS (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄). Para realização dos testes *in vivo*, o projeto experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sendo registrado com o protocolo CEUA: 172/2020, conforme anexo 1.

4.5.2 Preparo do inóculo fúngico

Para realização dos testes *in vivo*, o isolado selecionado de *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 foi cultivado em ágar CMA e incubado por 16 dias a temperatura de 7 °C. Após esse período, os inóculos foram preparados para obtenção dos conídios, conforme adaptação do protocolo estabelecido por SANTOS & HAMDAN (2005). O isolado *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 foi inoculado em ágar batata e incubado a 30 °C por 7 dias, já as leveduras *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473 foram inoculadas também em ágar batata e incubadas a 30 °C por 72 horas.

Após crescimento micelial, conforme descrito acima, as colônias de fungos filamentosos foram cobertas com solução salina (0,85% NaCl) esterilizada. O líquido contendo os esporos foi transferido para um tubo de ensaio esterilizado e após sedimentação, por decantação, o sobrenadante foi transferido e homogeneizado em vórtex por aproximadamente 15 segundos. Os esporos foram corados com Azul de Trypan para detecção da viabilidade e procedida a contagem em câmara de Neubauer.

Para as leveduras, uma alçada dos isolados de *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473 foi adicionado, em solução salina (0,85% NaCl) esterilizada. O líquido contendo os esporos foi transferido para um tubo de ensaio esterilizado e na sequência homogeneizado em vórtex por aproximadamente 15 segundos. Os esporos foram corados com Azul de Trypan e procedida a contagem em câmara de Neubauer.

4.5.3 Análise de sobrevivência

Os camundongos foram submetidos à imunossupressão (Decadron/Aché 10 mg/kg/dia via intraperitoneal) por 5 dias antes de serem infectados, pois os isolados do presente trabalho são conhecidos por apresentarem um perfil de patógenos oportunistas. Após 5 dias da imunossupressão, o inóculo preparado foi administrado por via intranasal (*Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *A. thermomutatus* UFMGCB 17415) e endovenosa (*R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473). Cabe ressaltar que a escolha das vias de administração e da padronização do inóculo foi feita de acordo com ZHANG *et al.* (2019) para *Aspergillus* e LOURIA *et al.* (1967) para as leveduras.

Para a administração intranasal, foram utilizados 50 µL de inóculo contendo 1×10^8 esporos e para administração endovenosa, 50 µL de inóculo contendo 1×10^6 células, introduzidas assepticamente na veia caudal. Posteriormente, manteve-se o protocolo de imunossupressão 10 mg/kg/dia via intraperitoneal conforme descrito por LIMA *et al.* (2016). Após a infecção, os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas separadas, os animais foram monitorados diariamente. Os animais que apresentassem sinais de morbidade, como perda de peso, alteração da frequência respiratória, encurvamento dorsal e piloereção acentuados foram anestesiados e eticamente eutanasiados, conforme requerido pelas normas do CEUA.

4.5.3.3 Análise comportamental (SHIRPA)

Paralelo à análise de sobrevivência também foi analisado o perfil comportamental dos diferentes grupos experimentais, por meio do protocolo SHIRPA (*SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/Phenotype Assessment*). Este teste mimetiza as manifestações gerais, neurológicas e psiquiátricas que ocorrem em humanos (ROGERS *et al.*, 1997). Os parâmetros individuais avaliados pelo SHIRPA foram agrupados em quatro categorias funcionais descritas na **Tabela 5** (função reflexa e sensorial; estado neuropsiquiátrico; comportamento motor e função autonômica), de acordo com LACKNER *et al.* (2006).

Tabela 5. Classificação das categorias funcionais do teste *SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/Phenotype Assessment* (SHIRPA) de acordo com os parâmetros avaliados (ROGERS *et al.*, 1997).

Categorias Funcionais	Parâmetros Avaliados
Função reflexa e sensorial	Posicionamento visual, <i>pinna reflex</i> , reflexo corneal, beliscada da pata traseira e postural.
Estado neuropsiquiátrico	Atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, mordida provocada, medo, irritabilidade, agressão e vocalização.
Comportamento motor	Posição corporal, tremor, atividade locomotora, elevação pélvica, ambulação, elevação da cauda, encurvamento do tronco, segurar as patas traseiras, manobra do arame e <i>geotaxis</i> negativa.
Função autônoma	Taxa de respiração, defecação, micção, fechamento de pálpebras, piloereção, cor da pele, frequência cardíaca, lacrimejamento, salivagem e temperatura corporal.

4.5.4 Recuperação das cargas fúngicas

Após a análise da curva de sobrevivência, os tempos para eutanásia foram estabelecidos para avaliação de carga fúngica e análise histopatológica. Novos grupos de animais não infectados (inoculados com PBS 1x esterilizado) e infectados, compostos de quatro animais cada, foram então sacrificados em 2 e 5 dias, conforme descrito no item 4.5.3. Antes do sacrifício, os animais foram anestesiados com solução de ketamina 80 mg/kg (Syntec) e xilazina 10 mg/kg (Ceva), conforme estabelecido no protocolo CEUA 172/2020. Após a perda total dos reflexos, os animais foram eutanasiados. Os órgãos alvos foram extirpados e preparados imediatamente. Na infecção intranasal os órgãos avaliados foram o baço e o pulmão, já na infecção endovenosa foi avaliado o cérebro, baço e sague. Com o auxílio de um homogeneizador manual, as células

foram rompidas por maceração em 1 mL de PBS e submetidas até a diluição de 10^{-2} da suspensão extraída dos órgãos e do sangue. Foram plaqueadas 100 μ L da suspensão e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} em placas de Petri contendo ágar aveia e incubadas a 15°C por 7 dias, para *Pseudogymnoascus* e em ágar batata e incubadas a 30 °C por 2 dias no caso de *Aspergillus* e *Rhodotorula*. O resultado foi expresso em UFC por grama de tecido ou em mL de sangue. Todos os fungos recuperados foram comparados por meio de técnicas morfológicas e de biologia molecular para confirmação das espécies.

4.5.5 Avaliação histopatológica

Para avaliação histopatológica dos órgãos foram preparadas lâminas do baço e pulmão a partir dos animais infectados com *Pseudogymnoascus* e *Aspergillus*, do cérebro e baço a partir dos animais infectados com os isolados de *Rhodotorula* e os órgãos de cada de cada animal foram previamente fixados e mantidos em álcool 70%. Em seguida os fragmentos de tecidos foram desidratados com álcool em concentrações crescentes (80, 90 e 100%) com posterior diafanização em xilol. Após este procedimento estes tecidos foram imersos em parafina para confecção dos blocos, que em seguida foram seccionados em micrótomo a 3 μ m de espessura e aderidos a lâminas de vidro e corados pela Hematoxilina e Eosina. Para a avaliação histopatológica, foi atribuída uma pontuação de classificação de acordo com a intensidade das lesões inflamatórias encontradas sendo: 0 (zero) ausência de lesão, 1(um) lesão discreta, 2 (dois) lesão moderada e 3 (três) lesão intensa; Ausência de agentes intralesionais 0 (zero) e presença de agentes intralesionais 1 (um). Informações a respeito do tipo de células que compunham o processo inflamatório bem como sua extensão e estruturas adjacentes envolvidas foram descritas.

4.5.6 Análise estatística dos dados

Os resultados foram analisados utilizando-se o *software* PRISMA 5.0 (GrapPad, EUA). O teste ANOVA foi empregado para análise de sobrevida e análise de UFC para comparação entre os grupos experimentais. O nível de 95% de significância foi considerado para que os valores sejam significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Confirmação da identificação dos fungos

Para confirmação da identificação dos fungos estudados, os isolados de *Pseudogymnoascus* spp. e *A. thermomutatus* foram submetidos ao sequenciamento da região ITS, enquanto os isolados de *R. mucilaginosa* ao sequenciamento da região ITS1 e dos domínios D1/D2 da subunidade maior do rDNA. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de espécies tipo depositadas no GenBank (**Tabela 6**). Para os isolados de *Pseudogymnoascus* a identificação foi confirmada apenas em nível de gênero e por isso técnicas taxonômicas morfo-fisiológicas foram adotadas. Por outro lado, os resultados obtidos por meio da análise molecular confirmaram a identificação do isolado UFMGCB 17415 como *Aspergillus thermomutatus*. Os isolados UFMGCB 17448 e UFMGCB 17473 foram confirmados como *Rhodotorula mucilaginosa*.

5.2 Caracterização fisio-morfológica *Pseudogymnoascus* spp.

Para a caracterização morfológica, os isolados de *Pseudogymnoascus* foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose nas temperaturas de 5, 10, 15 e 25 °C por 21 dias. Em todas as temperaturas de cultivo as características macromorfológicas das colônias como micélio cottonoso, frente com centro em tons amarelos e bordas brancas, verso em tons amarelos foram observadas em todos os isolados do gênero (**Figura 5**).

Os testes de velocidade de crescimento micelial foram realizados para obtenção de informações sobre a fisiologia dos isolados (**Tabela 7**). Os resultados indicam que para alguns isolados (*Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e UFMGCB 8562) o aumento no tamanho das colônias foi proporcional ao aumento da temperatura até 20 °C e a redução ocorreu quando foram incubados a 25 e 28 °C. Complementarmente, o isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 foi submetido ao crescimento em ágar aveia e em CMA a 15 °C por 28 dias (**Figura 6**). A partir do cultivo em ágar aveia foi possível observar colônias de micélio

cotonoso, frente com tons cinzas e verso com tons amarelos e centro cinza (**Figura 6a, b**). A partir do cultivo em CMA, os isolados apresentaram colônias pulverulentas com frente e verso cinzas (**Figura 6c, d**).

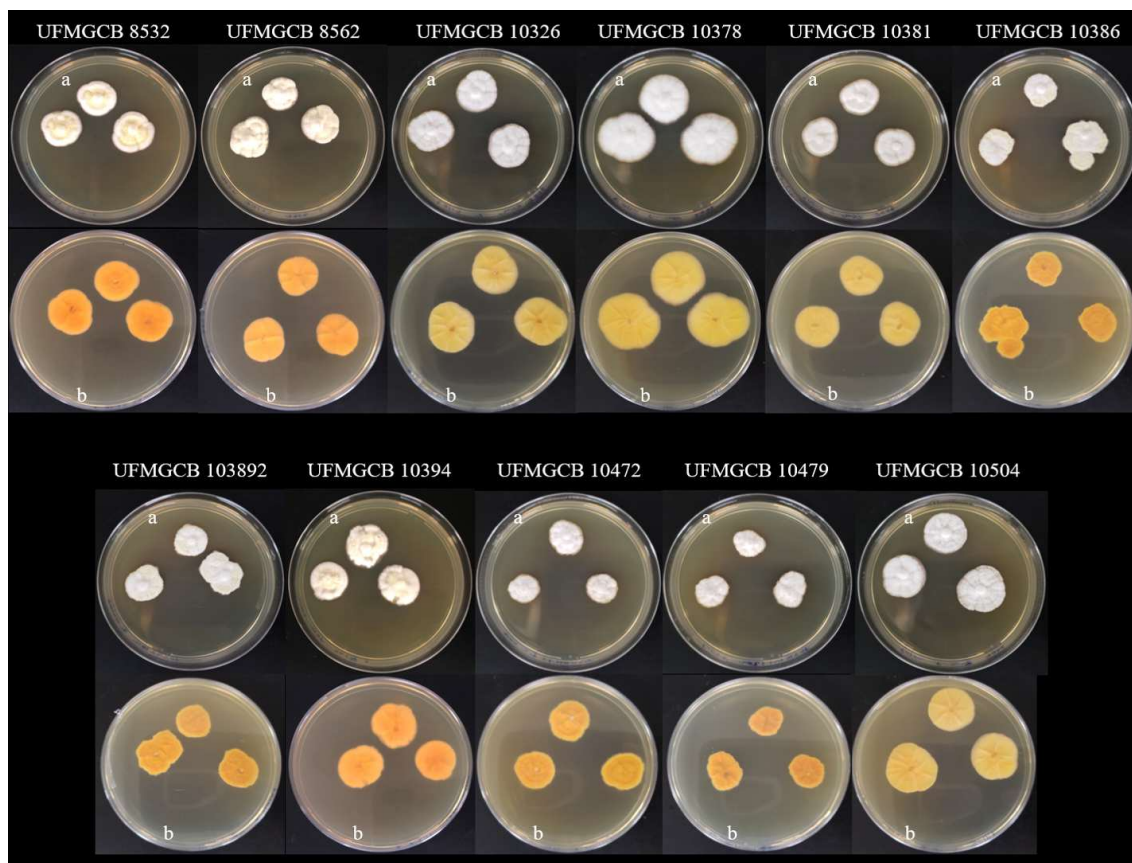


Figura 5. Macromorfologia das colônias dos isolados de *Pseudogymnoascus* spp. provenientes da Antártica em ágar Sabouraud após 14 dias a 15 °C. a = frente da colônia e b = verso da colônia.

Tabela 6. Identificação pela região ITS e D1/D2 por meio da comparação de sequências obtidas, utilizando o programa BLASTn e o banco de dados do NCBI *GenBank*.

UFMGCB ^a	Local	Substrato	Resultado Top BLAST (número de acesso no <i>GenBank</i>)	CB (%)	ID (%)	Nº de pb analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto
17415	Ilha Rei George (Península Keller)	<i>Permafrost</i>	<i>Neosartorya pseudofischeri</i> (EF669734) ¹	100	100	468	<i>Aspergillus thermomutatus</i>
8532	Ilha Elefante	<i>Usnea antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838) ¹	98	98	523	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
8562			<i>P. destructans</i> (NR111838) ¹	98	98	524	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10326	Ilha Nelson	Solo	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> (MH858631) ¹	100	99	362	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10378	Ilha Rei George		<i>P. destructans</i> (EU884921) ¹	99	99	300	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10381			<i>P. destructans</i> (NR111838) ¹	97	98	539	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10386			<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> (KJ755525) ¹	98	98	492	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10392			<i>P. roseus</i> (MH858631) ¹	100	99	454	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10394			<i>P. destructans</i> (EU884921) ¹	100	99	400	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10472	Ilha Robert		<i>P. destructans</i> (EU884921) ¹	100	99	390	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10479			<i>P. destructans</i> (EU884921) ¹	100	99	413	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
10504			<i>P. destructans</i> (EU884921) ¹	100	98	417	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
17448	Ilha Rei George (Ponta Thomas)	<i>Permafrost</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (KY109056) ^{1,2}	100	100	405	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
17473			<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (KY109056) ^{1,2}	100	100	560	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

^aUFMGCB = Coleção de micro-organismos e células da Universidade Federal de Minas Gerais. - = isolados ainda não sequenciados. **CB** = cobertura. **ID** = identidade. ¹Região ITS, ²D1/D2.

Tabela 7. Velocidade em dias do crescimento micelial (mm) dos isolados de *Pseudogymnoascus* spp. provenientes da Antártica.

Tempo (d) em dias/temperatura (°C) e medida em milímetros (mm)												
UFMGCB*	5 °C				10 °C				15 °C			
	3d**	7d	14d	21d	3d	7d	14d	21d	3d	7d	14d	21d
8532	3 – 4***	6 - 7	10 - 11	16 – 18	4 - 5	8 -10	15 - 18	24 - 25	5 - 6	11 - 13	18 - 23	29 - 33
8562	4 – 5	6 - 8	11 - 14	15 – 18	3 - 4	8 - 9	15 - 17	22 - 24	5 - 6	11 - 13	19 - 21	30 - 31
10326	4 – 5	7 - 8	11 - 14	15 – 17	4 - 5	8 - 9	15 - 16	22 - 25	4 - 5	11 - 14	17 - 20	21 - 25
10378	4 – 5	7 - 8	10 - 11	13 – 14	9 - 12	13 - 14	15 - 18	17 - 18	4 - 6	12 - 14	21 - 22	28 - 31
10381	4 – 5	6 - 8	11 - 14	13 – 14	4 - 5	8 - 9	11 - 13	15 - 19	3 - 4	10 - 11	19 - 21	23 - 27
10386	4 – 5	6 - 8	10 - 11	15 – 17	9 - 12	14 - 17	17 - 19	21 - 20	4 - 5	8 - 9	21 - 22	29 - 32
10392	4 – 5	6 - 7	10 - 11	13 – 15	3 - 4	8 - 11	15 - 18	21 - 24	5 - 6	12 - 15	22 - 25	32 - 35
10472	4 – 5	6 - 8	10 - 11	14 – 15	4 - 5	7 - 8	11 - 14	16 - 19	7 - 8	10 - 12	17 - 23	31 - 34
10479	4 – 5	6 - 7	10 - 11	13 – 14	4 - 5	7 - 8	10 - 11	12 - 14	6 - 7	11 - 14	18 - 21	31 - 35
10504	4 – 5	6 - 7	11 - 14	13 – 14	3 - 4	7 - 10	12 - 15	15 - 18	5 - 6	12 - 15	19 - 20	22 - 25

UFMGCB	20 °C				25 °C				28 °C			
	3d	7d	14d	21d	3d	7d	14d	21d	3d	7d	14d	21d
8532	6 - 7	14 - 16	26 - 28	35 – 38	4 - 5	11 - 13	19 – 21	28 - 30	3 - 4	3 - 4	3 - 4	4 - 5
8562	6 - 7	12 - 15	22 - 24	32 – 34	5 - 6	10 - 13	18 – 21	27 - 28	3 - 4	4 - 6	4 - 6	6 - 7
10326	4 - 5	13 - 16	19 - 21	24 – 28	5 - 7	10 - 11	13 – 16	17 - 19	3 - 4	4 - 5	4 - 6	6 - 7
10378	5 - 7	10 - 12	16 - 17	22 – 24	4 - 5	5 - 6	6 – 8	9 - 10	3 - 4	4 - 5	4 - 5	5 - 6
10381	6 - 8	12 - 15	17 - 19	21 – 26	5 - 6	8 - 9	15 – 19	21 - 20	3 - 4	4 - 5	4 - 6	6 - 7
10386	4 - 5	13 - 15	16 - 20	23 – 28	6 - 7	8 - 9	15 – 17	19 - 23	3 - 4	3 - 4	4 - 5	5 - 6
10392	5 - 6	11 - 14	18 - 21	25 – 28	4 - 5	4 - 5	7 – 9	9 - 11	3 - 4	4 - 6	7 - 8	8 - 9
10472	6 - 7	13 - 16	18 - 22	23 – 26	4 - 5	8 - 9	13 – 14	17 - 24	3 - 4	3 - 4	4 - 5	5 - 6
10479	6 - 8	13 - 16	17 - 22	26 – 29	4 - 5	7 - 10	15 – 18	21 - 26	3 - 4	4 - 5	4 - 5	5 - 6
10504	6 - 7	12 - 15	18 - 22	24 – 27	5 - 7	9 - 12	12 – 15	17 - 22	3 - 4	4 - 5	4 - 5	5 - 6

*UFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG, **dias, ***milímetros.

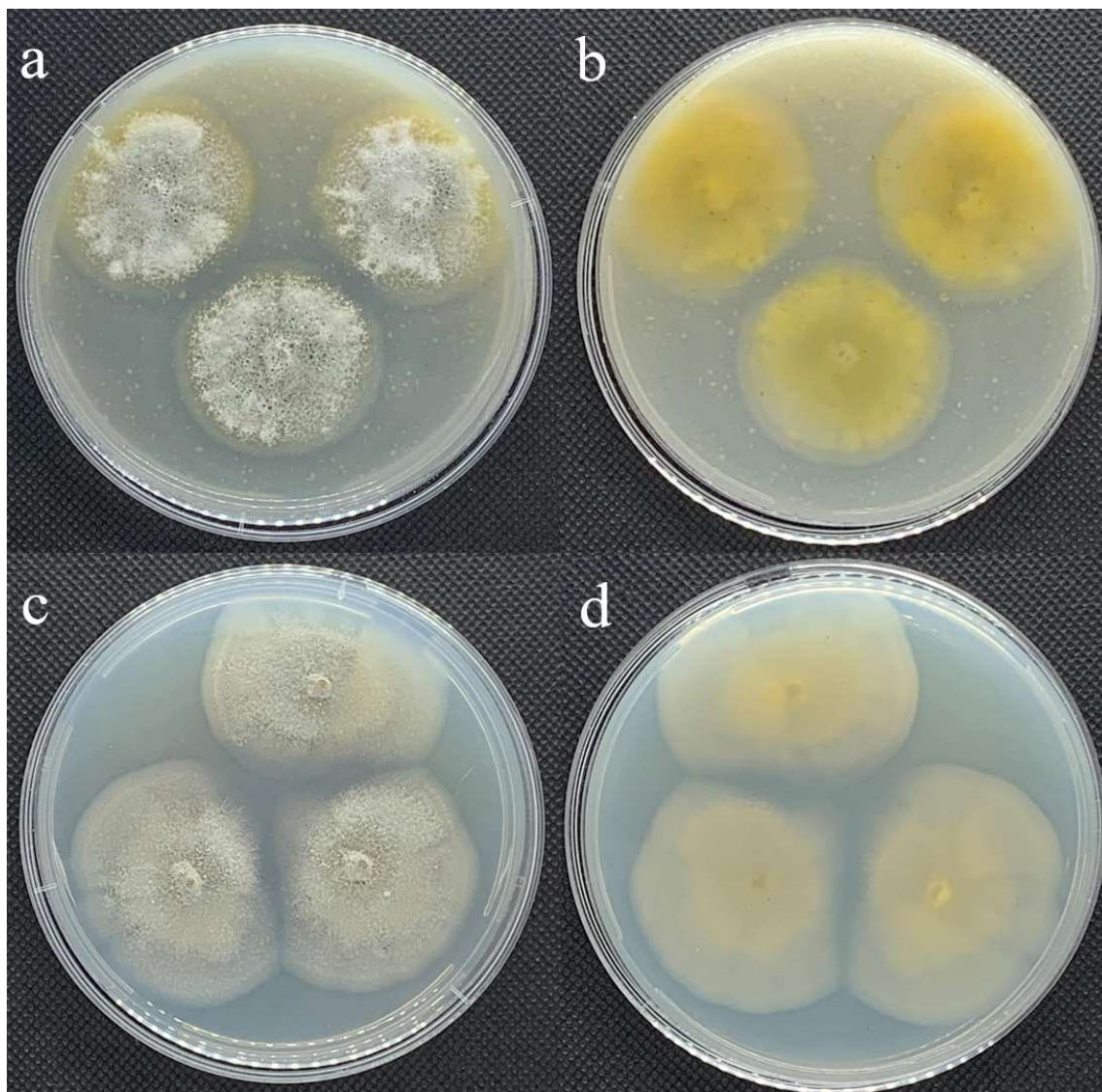


Figura 6. Macromorfologia do isolado *Pseudogymnoascus* spp. UFMGCB 8532 em **(a, b)** ágar aveia 15 °C por 28 dias e **(c, d)** CMA a 15 °C por 28 dias. a, c = frente da colônia e b, d = verso da colônia.

Lâminas de microcultivo foram preparadas a partir do cultivo em CMA a 7 °C por 16 dias (**Figura 7**), onde foi possível observar esporos cilíndricos a ovóides, além de hifas septadas (**Figura 7a**). O isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 foi selecionado para análise em MEV. As imagens em microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 possui esporos verrugosos (**Figura 7b**), o que o difere de *P. destructans* que possui esporos em formato de foice.

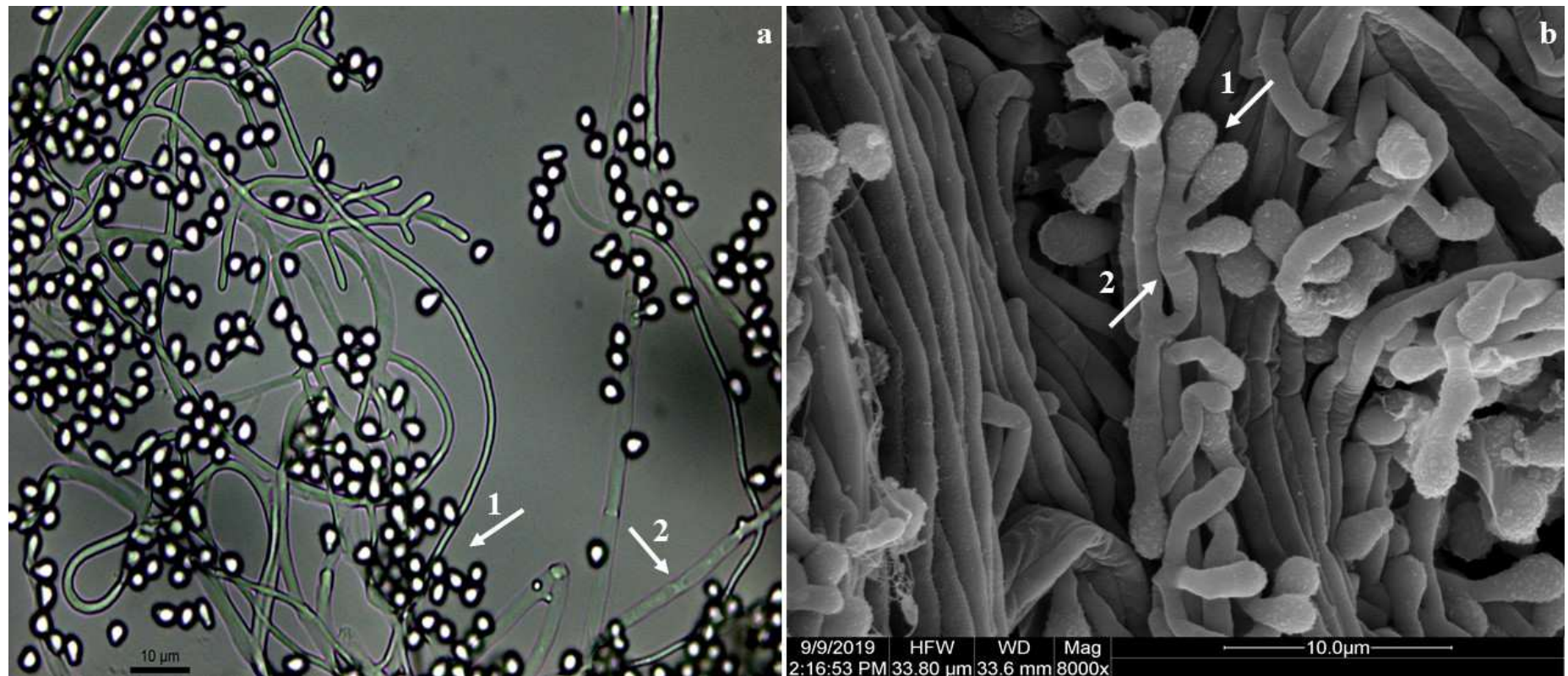


Figura 7. Microestruturas do isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 em microscopias óptica e eletrônica em varredura.

(a) Microestruturas em microscopia óptica; 1 = conídios com diferentes morfologias e 2 = hifa septada. **(b)** Microestruturas em microscopia eletrônica de varredura; 1 = conídios verrugosos e 2 = hifa septada.

5.3 Testes de patogenicidade *in vitro* para *Pseudogymnoascus* spp.

Os experimentos *in vitro* foram realizados com os isolados de *Pseudogymnoascus* spp. selecionados para o presente trabalho. Para avaliar a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas, todos os isolados foram submetidos ao cultivo a 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30 e 37 °C. Todos os isolados apresentaram crescimento até 28 °C e nenhum isolado cresceu nas temperaturas de 30 e 37 °C. Os resultados dos testes de atividade hemolítica, crescimento em diferentes pH, produção de enzimas hidrolíticas, diâmetros dos esporos, tolerância ao estresse oxidativo, hipóxia e halotolerância foram compilados na **Tabela 8**.

Para determinação da atividade hemolítica, os isolados foram submetidos ao cultivo em meio ágar sangue a 28 °C por 7 dias. Nove isolados apresentaram capacidade hemolítica parcial e foram classificados com o perfil alfa-hemolítico (α). Para determinação do crescimento em diferentes pH, os isolados foram submetidos ao cultivo em meio YM com pH ajustado para 4, 7 e 9, a 28 °C por 14 dias. De acordo com os resultados obtidos, todos os isolados foram capazes de crescer em todas as condições testadas.

A determinação da produção de fosfolipase, proteinase, esterase e urease foi realizada em meios de cultura específicos e as placas foram incubadas a 28 °C por 14 dias. Todos os isolados apresentaram um perfil negativo quanto à produção de proteinase. A maioria foi capaz de produzir fosfolipase (10 isolados) e classificados como forte positivo. Para esterase nove isolados apresentaram perfil fortemente positivo. Oito isolados apresentaram resultado positivo para o teste de urease.

O diâmetro dos esporos foi analisado por meio da média e desvio padrão do tamanho de 25 esporos de cada isolado. Para isso, os isolados foram cultivados em CMA a 7 °C por 16 dias. O diâmetro dos esporos variou de $2,13 \pm 0,51 \times 3,28 \pm 0,74$ (*Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 10386) a $3,20 \pm 0,79 \times 3,98 \pm 1,33$ (*Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 10394).

Tabela 8. Caracterização dos fatores de virulência *in vitro* de *Pseudogymnoascus* spp. provenientes de diferentes substratos da Antártica.

UFMGCB ^a	Atividade hemolítica		Crescimento a 28 °C em diferentes pH			Produção de enzimas hidrolíticas				Diâmetro dos esporos (µm)	Tol ^q	Hip ^r	Hal ⁿ
	Hi ^b	H ^c	pH 4	pH 7	pH 9	Fos ^l (Pz)	Pro ^g (Pz) ^h	Est ^j (Pz)	Ure ^m				
8532	0,99	γ ^d	+	+	+	0,60	- ⁱ	0,72	++ ⁿ	2,68 ± 0,48 x 3,50 ± 0,61	- ⁱ	-	- ⁱ
8562	0,99	γ	+ ^f	+	+	0,23	-	0,75	++	2,55 ± 0,80 x 2,95 ± 0,80	-	+ ^f	+ ^f
10326	0,50	α ^e	+	+	+	0,99	-	0,67	-	2,39 ± 0,44 x 3,08 ± 0,55	-	-	-
10378	0,52	α	+	+	+	0,20	-	0,71	++	2,61 ± 0,38 x 3,86 ± 0,43	-	+	+
10381	0,70	α	+	+	+	0,35	-	0,70	++	2,38 ± 0,31 x 3,38 ± 0,62	-	+	+
10386	0,68	α	+	+	+	0,51	-	0,73	+ ^{-o}	2,13 ± 0,51 x 3,28 ± 0,74	-	+	+
10392	0,74	α	+	+	+	0,30	-	0,72	+ ^p	2,36 ± 0,43 x 3,42 ± 0,60	-	+	+
10394	0,57	α	+	+	+	0,54	-	0,90	+ ⁻	3,20 ± 0,79 x 3,98 ± 1,33	-	-	-
10472	0,37	α	+	+	+	0,55	-	CT ^k	-	2,16 ± 0,44 x 2,57 ± 0,65	-	-	-
10479	0,71	α	+	+	+	0,16	-	CT	-	2,59 ± 0,41 x 3,30 ± 0,42	-	+ ⁻	+
10504	0,48	α	+	+	+	0,32	-	0,99	+	2,22 ± 0,44 x 2,93 ± 0,56	-	-	-

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG. ^bHi = Índice Hemolítico. ^cH = Tipo de hemólise. ^dγ = Gama. ^eα = Alfa. ^f(+) = crescimento. ^gPro = Atividade de proteinase. ^hPz = Forte positivo (Pz ≤ 0,69), forte (Pz entre 0,70-0,79 mm), média (Pz entre 0,80-0,89 mm) ou fraca (Pz entre 0,90-0,99 mm). ⁱ(-) = ausência de crescimento. ^jEst = Atividade de esterase. ^kCT = Crescimento total na placa. ^lFos = Atividade de fosfolipase. ^mUre = Atividade de urease. ⁿ(++) = Forte positivo. ^o(+-) = Positivo. ^p(+) = Fraco positivo. ^qTol = Tolerância ao estresse oxidativo. ^rHip = Hipóxia. ^sHal = Halotolerância.

Os resultados de tolerância ao estresse oxidativo, hipóxia e halotolerância foram obtidos a partir de meios de cultura específicos incubados a 28 °C por 14 dias. Todos os isolados apresentaram um perfil negativo quanto a tolerância ao estresse oxidativo na concentração de 0,05 M de H₂O₂. Seis isolados foram considerados positivos, sendo capazes de crescer em condição de hipóxia e sete isolados apresentaram crescimento na concentração de 2% de NaCl.

A suscetibilidade a antifúngicos foi realizada por meio da técnica de CIM em microplacas incubadas a 28 °C por 7 dias (**Tabela 9**). Quatro isolados cresceram em todas as concentrações de fluconazol e, portanto, apresentaram CIM > 64 µg/mL. O perfil de suscetibilidade ao itraconazol variou entre 0,125 a 0,5 µg/mL e para anfotericina B a CIM ficou entre 0,125 a 1 µg/mL. No entanto, para o isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 10326 não foi possível determinar a CIM para o fluconazol e anfotericina B e para o isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 10472 não foi possível determinar a CIM para todos os antifúngicos testados.

Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima de *Pseudogymnoascus* spp. provenientes de diferentes substratos da Antártica.

UFMGCB ^a	CIM ^b a 28 °C por 7 dias (µg/mL)		
	Itra ^c	Fluc ^d	Anf B ^e
8532	0,25	>64	0,5
8562	0,5	>64	0,125
10326	0,25	Np	Np
10378	0,25	16	1
10381	0,125	8	0,25
10386	0,5	0,5	0,5
10392	0,125	4	0,5
10394	0,5	>64	0,5
10472	Np ^f	Np	Np
10479	0,25	>64	0,5
10504	0,25	16	0,5

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG. ^b(CIM)= Concentração inibitória mínima. ^cItra= itraconazol. ^dFluc = fluconazol. ^eAnf B = anfotericina B. ^fNp = Não foi possível determinar o resultado.

5.4 Testes de patogenicidade *in vitro* para *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa*

Os resultados dos testes de patogenicidade *in vitro* para os fungos *A. thermomutatus* e *R. mucilaginosa* foram realizados em parceria com o estudo “*Does maritime Antarctic permafrost harbor environmental fungi with pathogenic potential?*”, o qual se encontra aceito pela revista *Fungal Biology Journal*. O artigo com todos os resultados *in vitro* para os referidos fungos se encontra no anexo 2 dessa tese.

5.5 Testes de patogenicidade *in vivo* utilizando larvas de *Tenebrio molitor*

A taxa de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* foi observada após serem infectadas com os isolados de fungos filamentosos selecionados para o presente estudo (**Figura 8**). Os diferentes isolados de *Pseudogymnoascus* spp., *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8526 se destacaram por apresentar letalidade em até dois dias de contato com as larvas (**Figura 8a**). Já o isolado *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 provocou a morte de todas as larvas em seis dias após inoculação, enquanto o controle (*C. albicans* SC5314) levou dez dias para provocar o mesmo resultado (**Figura 8b**).

A taxa de sobrevivência das larvas de *T. molitor* após serem infectadas com os isolados de *R. mucilaginosa* podem ser observadas na **Figura 9**. A infecção com o isolado *R. mucilaginosa* UFMGCB 17473 acarretou uma letalidade de aproximadamente 75% no primeiro dia, evoluindo para 100% no terceiro dia. Já o isolado *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 apresentou letalidade próxima de 40% no primeiro dia, evoluindo para 100% ao final de três dias.

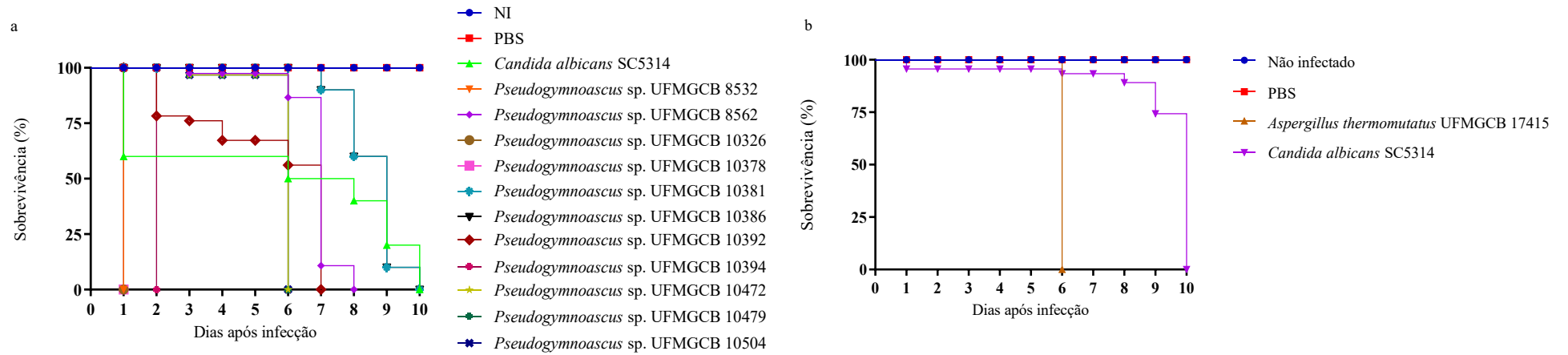


Figura 8. Curva de sobrevivência expressa em percentagem (%) de larvas de *Tenebrio molitor* submetidas à infecção por (a) diferentes isolados de *Pseudogymnoascus* spp. e (b) *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415. O teste Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para todos os ensaios, $p < 0,0001$. (NI) não infectado.

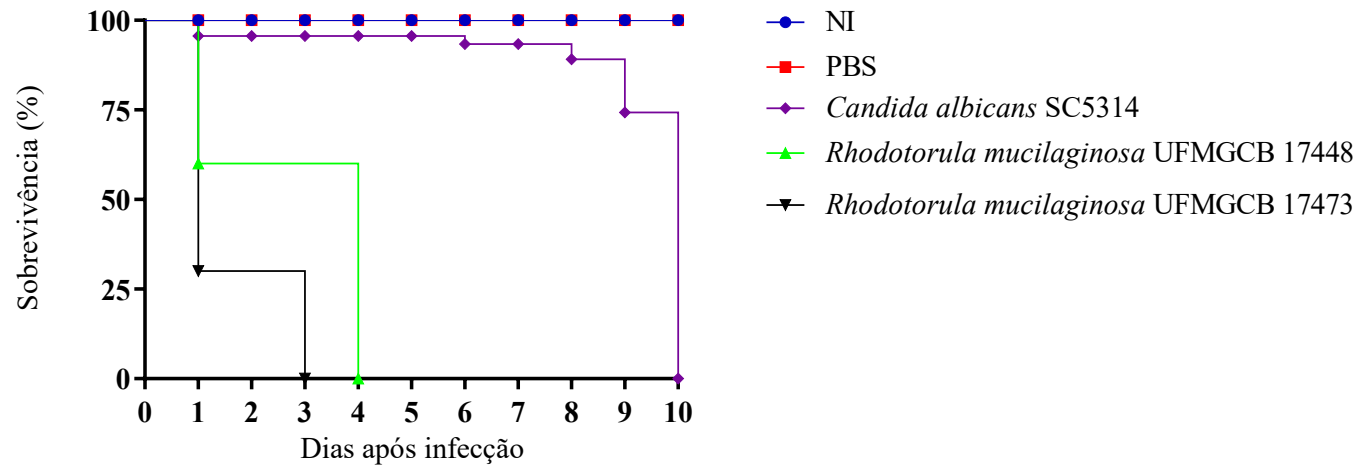


Figura 9. Curva de sobrevivência expressa em percentagem (%) de larvas de *Tenebrio molitor* submetidas à infecção por *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473. O teste Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para este ensaio, $p < 0,0001$. (NI) não infectado.

5.5.1 Testes *in vivo* com camundongos BALB/c

5.5.1.1 Análise de sobrevida

Para avaliar a resposta da infecção dos fungos filamentosos estudados em um modelo *in vivo*, camundongos previamente imunossuprimidos foram infectados com 10^6 esporos e as curvas de sobrevida foram construídas (**Figura 10**). É possível observar que a sobrevivência dos camundongos BALB/c foi afetada pelos isolados *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 (**Figura 10a**). Destaca-se ainda que no 25º dia após a infecção com esporos de *A. thermomutatus* UFMGCB 17415, os animais apresentaram perda de pelo acentuado no focinho, característica conhecida como barbeamento (**Figura 11**).

Para a construção da curva de sobrevida após a infecção com os isolados das leveduras *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473, os animais previamente imunossuprimidos foram infectados com 10^8 células e os resultados apresentados na **Figura 12**. A taxa de sobrevida foi reduzida a oitenta por cento, trinta dias após infecção com o isolado *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 (**Figura 12a**).

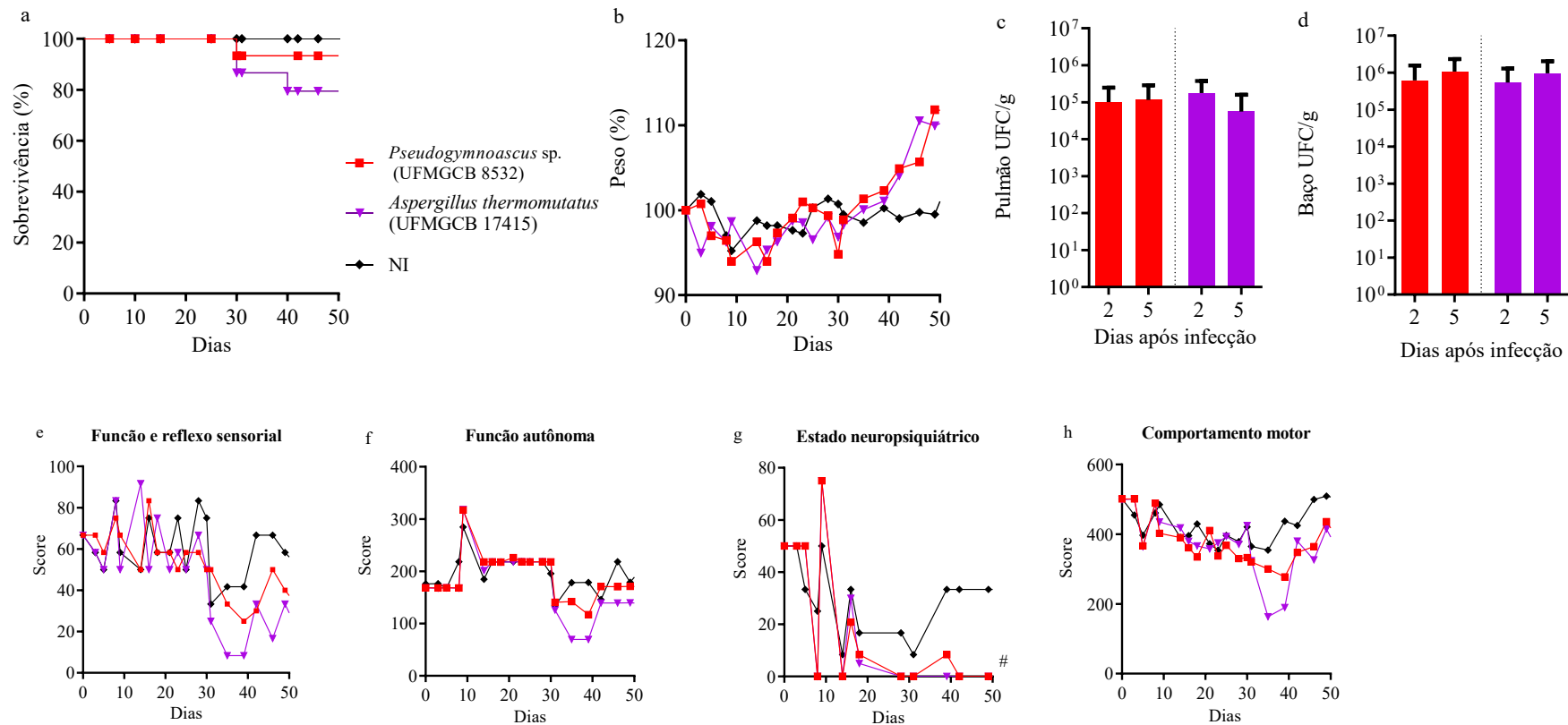


Figura 10. Sobrevida, unidades formadoras de colônias (UFC) e comportamento dos camundongos BALB/c após infecção com *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415. **(a)** Curva de sobrevida de camundongos infectados por via intranasal com 10^8 UFC. **(b)** Variação de peso dos camundongos expressa em porcentagem (%) após infecção. **(c)** Carga fúngica recuperada do pulmão após 2 e 5 dias de infecção. **(d)** Carga fúngica recuperada do baço após 2 e 5 dias de infecção. **(e)** Função e reflexo sensorial. **(f)** Função autônoma. **(g)** Estado neuropsiquiátrico. **(h)** Comportamento motor. **(NI)** Não infectado. **(#)** Em relação ao NI $p < 0,05$.

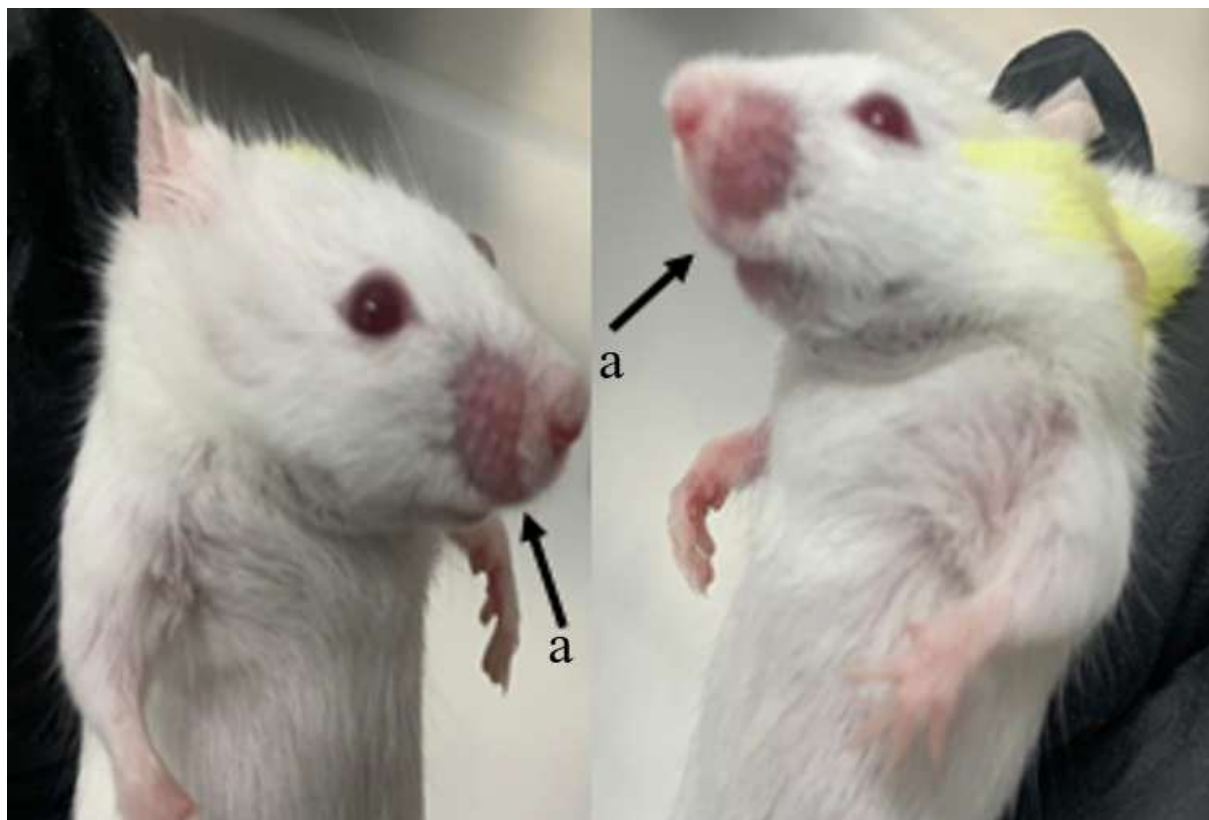


Figura 11. Animais com barbeamento. Camundongos BALB/c inoculados com *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415 que apresentaram perda de pelo acentuado no focinho (barbeamento) no 25º dia após a infecção. a = barbeamento. Foto: Eldon C.Q. Gomes.

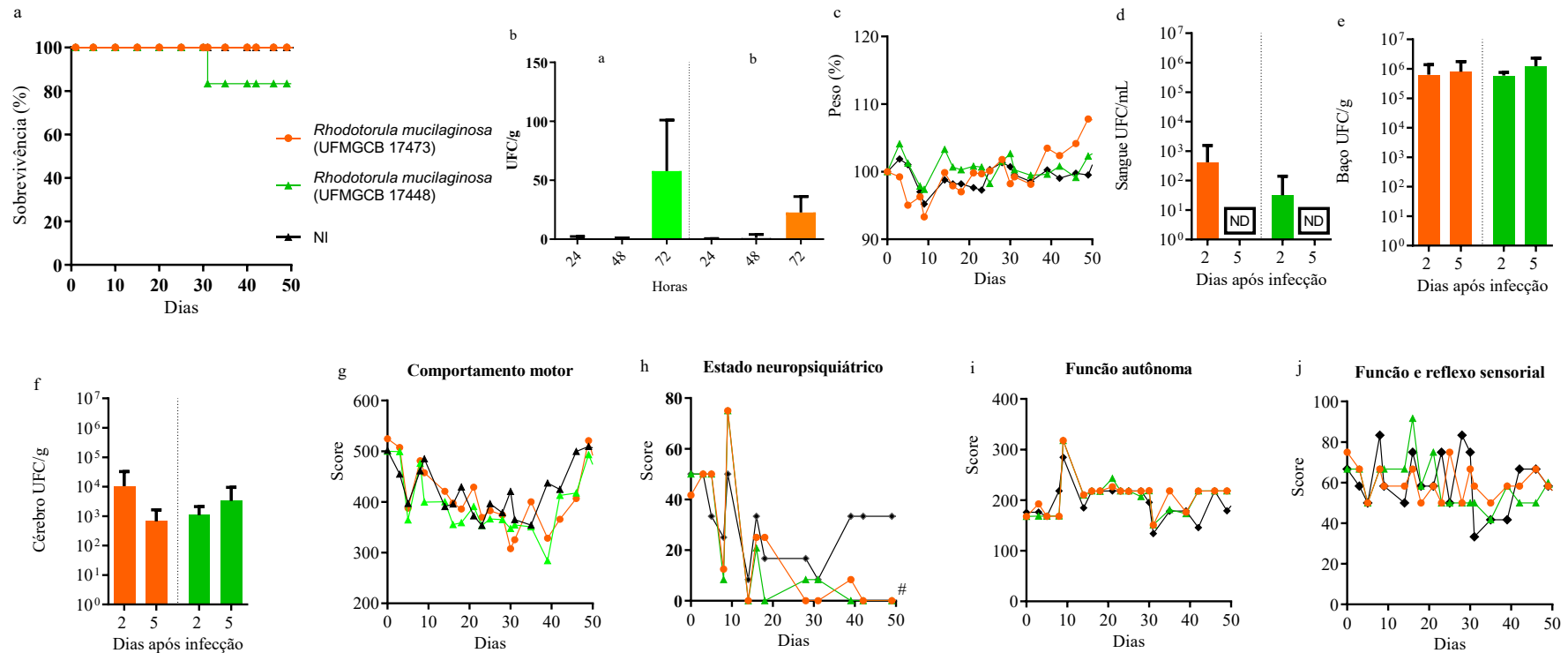


Figura 12. Sobrevida, unidades formadoras de colônias (UFC) e comportamento dos camundongos BALB/c após infecção com os isolados de *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 174473 e UFMGCB 17448. **(a)** Curva de sobrevivência de camundongos infectados por via endovenosa com 10^6 UFC. **(b)** Ensaio de barreira hematoencefálica. **(c)** Variação de peso dos camundongos expressa em porcentagem (%) após infecção. **(d)** Carga fúngica recuperada do sangue após 2 e 5 dias de infecção. **(e)** Carga fúngica recuperada do baço após 2 e 5 dias de infecção. **(f)** Carga fúngica recuperada do cérebro após 2 e 5 dias de infecção. **(g)** Comportamento motor. **(h)** Estado neuropsiquiátrico. **(i)** Função autônoma. **(j)** Função e reflexo sensorial. **(NI)** Não infectado. **(#)** Em relação ao NI $p < 0,05$.

5.5.1.2 Análise comportamental (SHIRPA)

Para análise comportamental, por meio do protocolo SHIRPA, foi realizado o acompanhamento dos camundongos infectados por 50 dias. Observou-se que os animais infectados com os isolados *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 apresentaram oscilações entre ganho e perda de peso (**Figura 10b**). Na função e reflexo sensorial (**Figura 10e**) houve uma maior alteração das pontuações nos grupos infectados, após 30 dias de infecção. Para a função autônoma (**Figura 10f**) os modelos testados iniciaram com pontuação próxima ao controle e após 30 dias de infecção, os grupos infectados com os isolados *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 e apresentaram queda com posterior recuperação aos quarenta dias. Na avaliação do estado neuropsiquiátrico (**Figura 10g**), é possível notar que a pontuação nos grupos de animais infectados com os isolados *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 e *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 sofreu uma redução expressiva se comparada ao grupo controle, a partir do 18º dia.

De maneira similar aos grupos infectados com os isolados de fungos filamentosos, é possível notar oscilações entre ganho e perda de peso nos grupos infectados com os isolados *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 (**Figura 12c**). Para o comportamento motor, apesar das variações de pontuações entre os grupos infectados com as leveduras o grupo não infectado, ao final do experimento a pontuação é similar em todos os grupos (**Figura 12g**). Para o estado neuropsiquiátrico (**Figura 12h**), após algumas flutuações no comportamento, os grupos de animais infectados com as leveduras apresentaram uma pontuação igual a zero ao final do experimento, diferentemente do grupo não infectado. Já para a função autônoma (**Figura 12i**) e função e reflexo sensorial (**Figura 12j**) os grupos de animais infectados apresentaram pontuação semelhante ao grupo controle ao final da avaliação.

5.6 Recuperação das cargas fúngicas

Foi realizada a análise da carga fúngica a partir do baço e pulmão dos animais infectados com os fungos filamentosos (**Figura 10**). A carga fúngica recuperada é ligeiramente menor do que o que foi inoculado no pulmão e baço (**Figura 10c, d**). Os grupos de animais infectados com os isolados *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 tiveram o sangue, baço e cérebro analisados conforme (**Figura 12**). A eutanásia dos animais ocorreu após a infecção nos tempos de dois e cinco dias. A recuperação dos isolados no sangue foi verificada no segundo dia de

Os fungos filamentosos obtidos após recuperação e quantificação da carga fúngica foram submetidos à análise molecular por meio da PCR utilizando-se a técnica de microsatélite com o iniciador (GTG)₅. Com base no perfil eletroforético dos produtos amplificados é possível dizer que dentre os isolados obtidos após inoculação e eutanásia dos camundongos, todos apresentaram o mesmo padrão de bandas, indicando que os fungos inoculados permaneceram nos camundongos durante o período analisado (**Figura 13**).



Figura 13. Perfil de bandeamento, utilizando o iniciador (GTG)₅, dos inóculos fúngicos recuperados. **(a)** *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415 **(b)** *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532. Br = Branco; PM = Padrão de peso Molecular.

5.6.2 Confirmação macromorfológica dos inóculos obtidos na quantificação da carga fúngica para *Rhodotorula*

As leveduras obtidas após recuperação e quantificação da carga fúngica foram analisadas conforme suas características macromorfológicas. Todos os isolados apresentaram o mesmo padrão macromorfológico (**Figura 14**), indicando que as leveduras inoculadas permaneceram nos camundongos durante o período analisado.

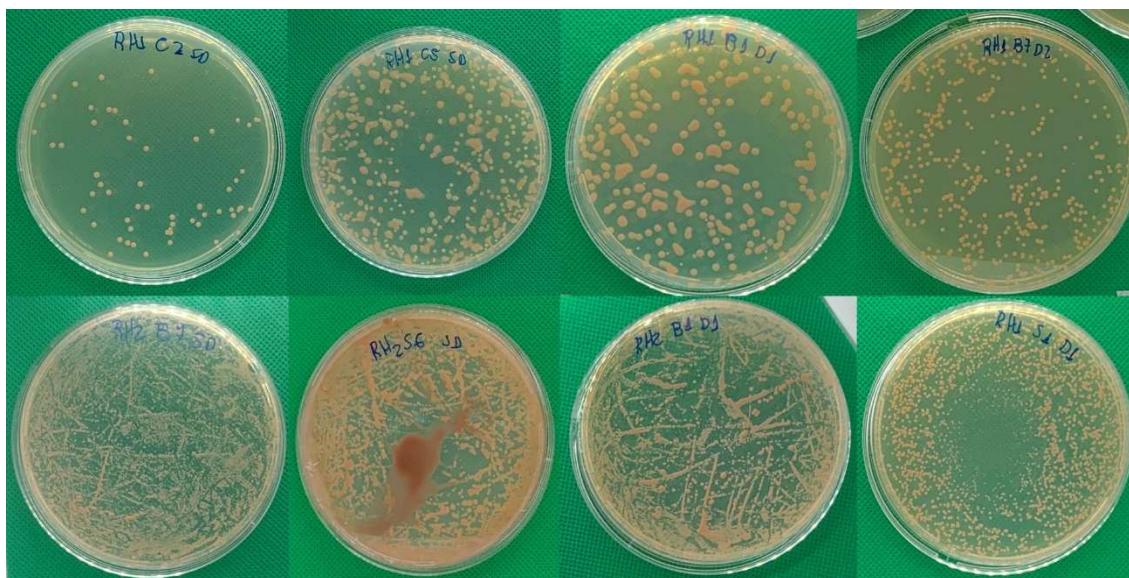


Figura 14. Perfil macromorfológico das colônias dos isolados *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 após recuperação da carga fúngica nos camundongos BALB/c.

5.7 Avaliação histopatológica de camundongos BALB/c infectados com *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415

Por meio dos resultados histopatológicos de órgãos de camundongos BALB/c infectados com *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 (**Figura 15**), podemos observar que o isolado foi capaz de provocar um processo inflamatório, pois há um grande número de neutrófilos, discreto número de macrófagos, acúmulo de líquido no interior dos pulmões (edema pulmonar) e intensa hiperemia (alteração na circulação sanguínea), tanto com dois (**Figura 15a e b**) quanto cinco (**Figura 15c e d**) dias de infecção. Na **Figura 15** é possível verificar intenso infiltrado inflamatório disposto preferencialmente ao redor de bronquíolos, distribuídos de forma multifocal a coalescente, composto por grande quantidade de neutrófilos (íntegros e degenerados), discreto número de macrófagos epitelioides associado a raras quantidades de estruturas de aproximadamente 3µm, cápsula delgada, caracterizada por um halo claro (não corado) circundando o núcleo, que por vezes apresentava coloração eosinofílica, sendo por vezes visualizadas no citoplasma de macrófagos. Em um discreto número de bronquíolos foi possível observar infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico. Nos septos alveolares foi encontrado espessamento multifocal e discreto, associado à presença de neutrófilos. Além destas alterações observou-se moderada hiperemia multifocal, presença de conteúdo amorfo e eosinofílico no interior de alvéolos (edema) distribuídos de forma multifocal a coalescente, além de áreas multifocais de discreta hemorragia.

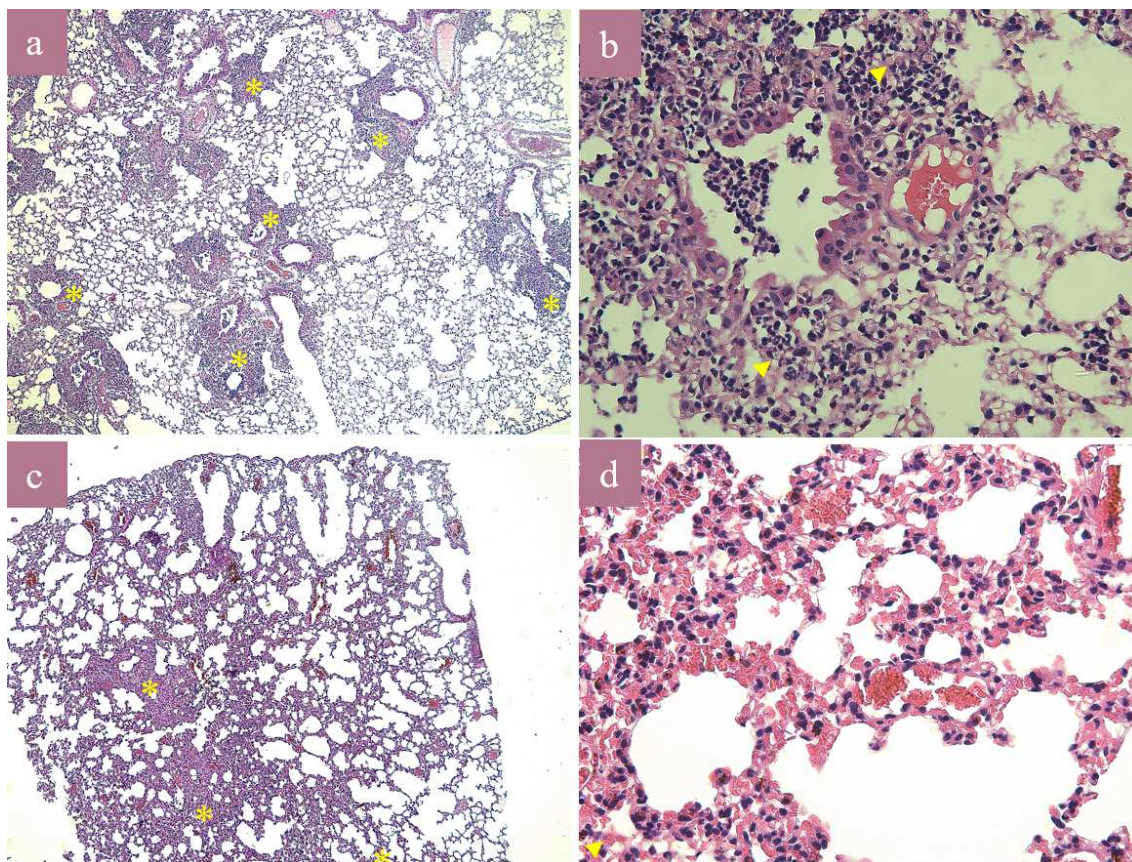


Figura 15. Pulmão de camundongos BALB/c com dois dias pós-infecção com *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532, via intranasal. **(a)** Áreas multifocais de intenso moderado inflamatório (*), localizado principalmente ao redor de bronquíolos. Coloração de hematoxilina-eosina (HE), objetiva 5x. **(b)** Infiltrado inflamatório (*) composto por grande quantidade de neutrófilos, discreto número de macrófagos, por vezes de aspecto epitelióide, associados a moderada quantidade de estruturas de aproximadamente 3µm, cápsula espessa, caracterizada por um halo claro (não corado) circundando o núcleo, que por vezes apresentou coloração anfofílica e foram visualizadas no citoplasma de macrófagos (cabeça de seta amarela), além de moderado edema pulmonar e intensa hiperemia. HE, objetiva 40x. **(c)** Animais avaliados 5 dias pós-infecção demonstrando áreas multifocais de discreto infiltrado inflamatório. HE objetiva 5x. **(d)** Infiltrado inflamatório (*) composto por um grande número de neutrófilos e raros macrófagos epitelióides, associados a quantidade discreta de estruturas de aproximadamente 3µm, exibindo cápsula espessa, caracterizada por um halo claro (não corado) circundando o núcleo, que por vezes apresentou coloração anfofílica e foram visualizadas no citoplasma de macrófagos (cabeça de seta amarela), além de moderado edema pulmonar e intensa hiperemia. HE, objetiva 40x.

Os resultados histopatológicos dos órgãos dos camundongos BALB/c infectados com *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 demonstram que o isolado foi capaz de provocar um processo inflamatório, caracterizado pela presença de um grande número de neutrófilos ao redor dos bronquíolos, moderado número de macrófagos e acúmulo de líquido no interior dos pulmões (edema pulmonar), além de intensa hiperemia (alteração na circulação sanguínea) (**Figura 16**). De acordo com a **Figura 16**, observou-se nas lâminas analisadas intenso infiltrado inflamatório disposto preferencialmente ao redor de bronquíolos, distribuídos de forma multifocal a coalescente, composto por grande quantidade de neutrófilos (íntegros e degenerados), discreto número de macrófagos epitelioides associado a raras quantidades de estruturas de aproximadamente 3 µm, cápsula delgada, caracterizada por um halo claro (não corado) circundando o núcleo, que por vezes apresentava coloração eosinofílica, sendo por vezes visualizadas no citoplasma de macrófagos. Em um discreto número de bronquíolos foi possível observar infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico. Nos septos alveolares foi encontrado espessamento multifocal e discreto, associado à presença de neutrófilos. Além destas alterações observou-se moderada hiperemia multifocal, presença de conteúdo amorfo e eosinofílico no interior de alvéolos (edema) distribuídos de forma multifocal a coalescente, além de áreas multifocais de discreta hemorragia.

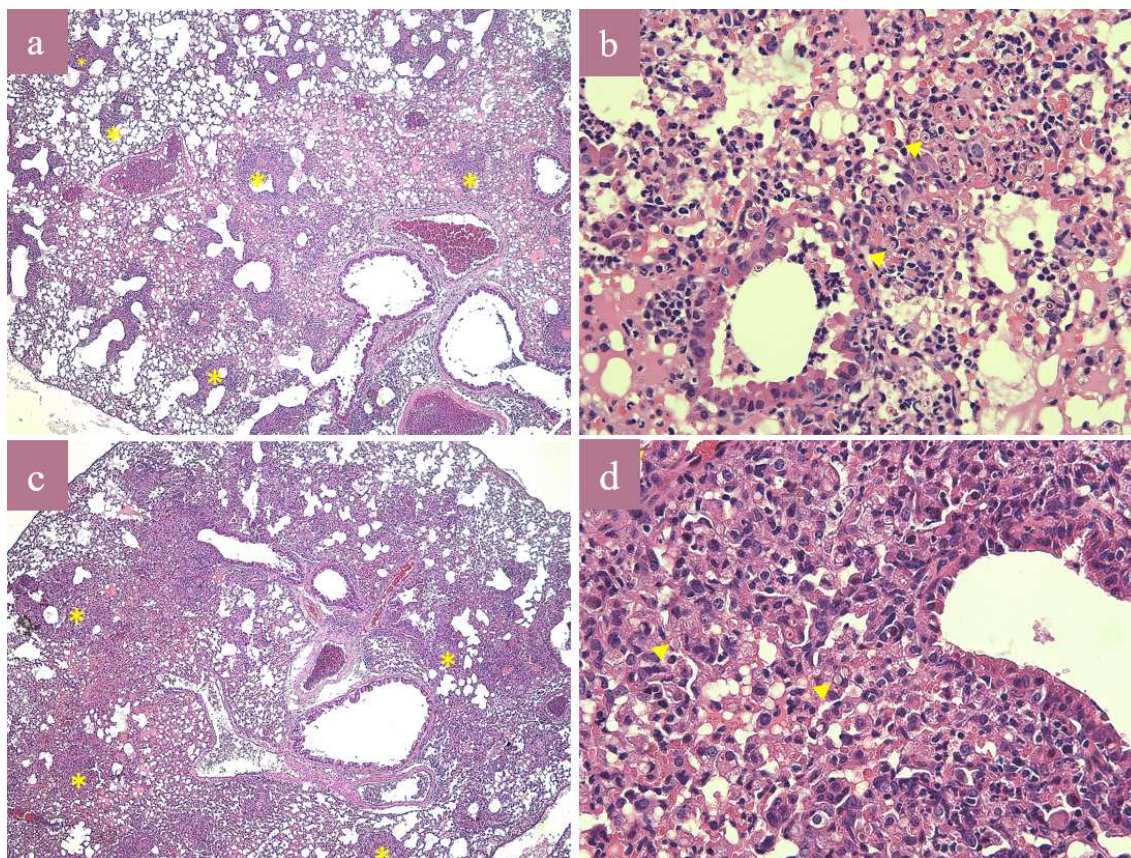


Figura 16. Pulmão de camundongos BALB/c com dois dias pós-infecção com *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415 via intranasal. **(a)** Áreas multifocais de intenso infiltrado inflamatório (*), localizado principalmente ao redor de bronquíolos. Coloração de hematoxilina-eosina (HE), objetiva 5x. **(b)** Infiltrado inflamatório (*) por grande quantidade de neutrófilos, moderado número de macrófagos epitelioides associados a intensa quantidade de estruturas de aproximadamente 5 μ m, cápsula espessa, caracterizada por um halo claro (não corado) circundando o núcleo, que por vezes apresentou coloração anfofílica, sendo visualizadas no citoplasma de macrófagos (cabeça de seta amarela), além de moderado edema pulmonar e intensa hiperemia. HE, objetiva 40x. **(c)** Animais avaliados 5 dias pós-infecção demonstrando áreas multifocais de intenso infiltrado inflamatório (*). HE, objetiva 5x. **(d)** Infiltrado inflamatório (*) composto por grande quantidade de neutrófilos e macrófagos epitelioides, associados a quantidade de estruturas de aproximadamente 5 μ m, cápsula espessa, caracterizada por um halo claro (não corado) circundando o núcleo, que por vezes apresentou coloração anfofílica, sendo visualizadas no citoplasma de macrófagos (cabeça de seta), além de moderado edema pulmonar e intensa hiperemia. HE, objetiva 40x.

A partir da avaliação de lobos pulmonares infectados com o isolado *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 foi constatado alterações em todos os órgãos analisados, sendo que a média na pontuação atribuída para a infecção com dois e cinco dias foram seis e cinco pontos, respectivamente (**Figura 17, a2 e a5**). Na avaliação histopatológica de lobos pulmonares infectados com o isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 alterações foram observadas em todos os órgãos avaliados. A média na pontuação atribuída para a infecção com dois e cinco dias foram quatro e três, respectivamente (**Figura 17, b2 e b5**). A **Figura 17** representa em forma gráfica os resultados obtidos.

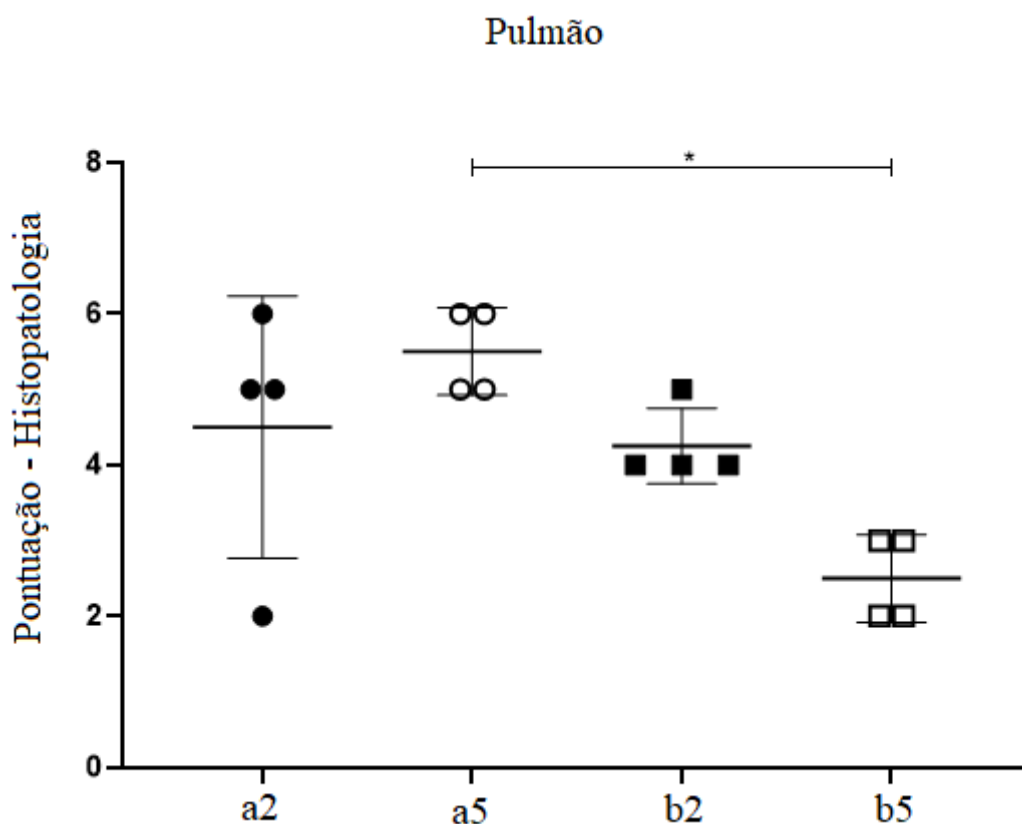


Figura 17. Avaliação do escore histopatológico do pulmão de camundongos BALB/c (n=4) infectados por via intranasal (v.in) com *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415 eutanasiados 2 dias pós-infecção (**círculo preto, a2**) e 5 dias pós-infecção (**círculo claro, a5**) e, infectados com *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 eutanasiados 2 dias pós-infecção (**quadrado preto, b2**) e ao 5 dias pós-infecção (**quadrado claro, b5**). Os resultados foram verificados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA e analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$).

6. Discussão dos resultados

6.1 Confirmação da identificação dos fungos

Por meio do sequenciamento da região ITS todos os isolados sequenciados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus*. RICE & CURRAH (2006), BLEHERT *et al.* (2009) e GARGAS *et al.* (2009) utilizaram a região ITS para identificação de espécies de *Pseudogymnoascus*. Entretanto, MINNIS & LINDNER (2013) utilizaram, além da região ITS, o complexo multiprotéico MCM7. Recentemente, para caracterização de novas espécies de *Pseudogymnoascus*, VILLANUEVA *et al.* (2021) utilizaram o sequenciamento da região ITS, o complexo multiprotéico (MCM7), a subunidade maior (LSU) do rDNA, a RNA polimerase II (RPB2) e o fator de Elongação (TEF1) – 1 alpha. Nesse estudo, as regiões RPB2 e TEF1 foram sequenciadas, mas os amplicons não apresentaram qualidade suficiente para uma definição em nível de espécie. Contudo, o sequenciamento da região codificadora MCM7 deve ser realizada na tentativa de determinar a espécie de *Pseudogymnoascus*.

A análise molecular da região ITS do isolado *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 confirmou a identificação proposta por DA SILVA (2020). SAMSON *et al.* (2014) analisaram a filogenia do gênero *Aspergillus* e também utilizaram a região ITS para a identificação dos isolados. Para os isolados UFMGCB 17448 e UFMGCB 17473, o sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do rDNA conforme estabelecido por KURTZMAN & ROBNETT (1998) confirmou a identificação da espécie *R. mucilaginosa*. OSMAN *et al.* (2022) utilizaram também a região ITS para identificar isolados de *R. mucilaginosa*.

6.2 Caracterização fisio-morfológicas dos isolados de *Pseudogymnoascus* spp.

Isolados de *Pseudogymnoascus* spp. podem apresentar alterações fenotípicas como variações na velocidade de crescimento, produção de exsudato, secreção e pigmentos, cor da frente e verso da colônia com diversas tonalidades como branca, cinza, cinza-verde e variações que vão do marrom ao preto, quando submetidos a diferentes condições de cultivo (GARGAS *et al.*, 2009; CHATURVEDI *et al.*, 2010; VERANT *et al.*, 2012; KHANKHET *et al.*, 2014).

RICE & CURRAH (2006) descrevem colônias de *Pseudogymnoascus* com verso amarelo e frente branca, produção de exsudato amarelo, características estas muito semelhantes aos resultados observados para os isolados antárticos do presente trabalho, corroborando para confirmação do gênero *Pseudogymnoascus*. No entanto, RICE (2006) descreve as características macromorfológicas de colônias de *Pseudogymnoascus verrucosus* a 28 °C por

15 dias, com frente branca ou cinza claro e verso laranja a alaranjado claro. Tais características também foram observadas nas colônias dos isolados selecionados para esse estudo, em ágar aveia a 15 °C por 28 dias (**Figura 5**). As características micromorfológicas observadas por RICE & CURRAH (2006) para *P. verrucosus* são semelhantes as características observadas para o isolado utilizado neste trabalho. Também foi possível observar que o isolado estudado possui hifas septadas e esporos globosos e alongados. Por meio da MEV (**Figura 6a**), observou-se esporos verrugosos e ovóides no isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532. Esses dados morfológicos sugerem que o isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 desse estudo possa ser *P. verrucosus*. Contudo, mais estudos taxonômicos são necessários para essa confirmação.

6.3 Testes de patogenicidade *in vitro*

GARGAS *et al.* (2009) descreveram que *P. destructans* isolados de morcegos apresentaram crescimento lento a 3, 8 e 14 °C e não é capaz de crescer a 24 °C. No entanto, no presente trabalho, os isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* spp. foram capazes de crescer lentamente até 28 °C. VERANT *et al.* (2012) avaliaram o crescimento de *P. destructans* em morcegos nas temperaturas de 0,8 a 21,4 °C e perceberam que os isolados foram capazes de crescer somente até 19,8 °C.

De acordo com VERANT *et al.* (2012), à medida que ocorre o aumento da temperatura todos os isolados de *P. destructans* apresentaram morfologia diferenciada com hifas irregulares, espessas e deformadas. MARROQUIN *et al.* (2017) relataram que o aumento dos níveis de umidade nos cultivos a 15 e 21 °C resultou em maior crescimento micelial de *P. destructans* isolado de morcegos. Esse crescimento em ambientes úmidos é importante para que a penetração do fungo no hospedeiro seja efetiva (WILDER *et al.*, 2011). Já CAMPBELL *et al.* (2020) observaram o crescimento de *P. destructans* em ágar Sabouraud (*Himedia*, Índia), BHI e BHI suplementado com sangue de carneiro a 10%, incubadas a 24, 30 e 37 °C, por 150, 60 e 15 dias, respectivamente. Os dados acima sugerem que *P. destructans* possui uma maior plasticidade e é capaz de se adaptar a temperaturas elevadas, fator importante na patogenicidade dos fungos.

Nove isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* spp. apresentaram lise parcial das hemácias, característica conhecida como α -hemólise. REYNOLDS & BARTON (2014) observaram o perfil de α -hemólise em isolados de *P. destructans* e sugerem que a atividade

hemolítica apresentada por isolados obtidos de morcegos ocorre quando há limitação de nutrientes. Essa característica pode não ser essencial para o crescimento do fungo no hospedeiro, mas facilita sua sobrevivência, auxiliando na obtenção de ferro, como suporte ao seu crescimento (REYNOLDS & BARTON, 2014).

De acordo com DAVIS (2009), o hospedeiro humano apresenta pH básico nas mucosas, pulmão e o intestino (grosso), enquanto alguns sítios anatômicos, como a vagina, apresentam pH ácido. Os fungos capazes de crescer em ambientes com pH distintos, possuem um diferencial na sua patogênese (GARBE & VYLKOVA, 2019). A maioria dos fungos patogênicos pode crescer em meios de cultura com pH básico, consequentemente, também no hospedeiro (DAVIS, 2009). No entanto, alguns fungos patogênicos para mamíferos como *Candida albicans*, *Cryptococcus deneoformans* e *A. nidulans* são tolerantes ao pH ácido, conferindo facilidade durante o processo de adesão e invasão tecidual às células do hospedeiro (DAVIS, 2009; GARBE & VYLKOVA, 2019).

Todos os isolados de *Pseudogymnoascus* spp. foram capazes de crescer nos pH 4 (próximo ao pH vaginal), pH 7 (próximo ao pH do sangue humano) e pH 9 (próximo ao pH intestinal). Esses resultados vão de encontro com os dados obtidos por CHATURVEDI *et al.* (2019), em que *P. destructans* e *P. pannorum*, isolados de morcegos e solo provenientes do Canadá, respectivamente, apresentaram perfil de crescimento nos mesmos pH testados, indicando uma alta plasticidade de crescimento e adaptação. RAUDABAUGH & MILLER (2013) demonstraram que *P. destructans* isolados de morcegos foram capazes de crescer em uma faixa de pH ainda maior como 5, 7, 9 e 11. CLARKE *et al.* (2016) evidenciaram que fungos patogênicos, como *C. deneoformans*, expressam peptidases extracelulares que contribuem para a invasão do fungo no hospedeiro, na aquisição de nutrientes e reprodução. Essas características podem contribuir para a patogenicidade e a adaptação do fungo ao pH ácido. Desta forma, os isolados de *Pseudogymnoascus* spp. reportados na **Tabela 5** apresentaram um perfil patogênico *in vitro* bastante versátil em relação a esse quesito.

No presente estudo, todos os isolados de *Pseudogymnoascus* antárticos apresentaram resultados negativos quanto a produção de proteinases, embora, de acordo com PANNKUK *et al.* (2015), o perfil do gênero seja de secretar essa enzima. A divergência desses resultados pode ser explicada pela limitação do teste utilizado, que permite a identificação de apenas duas classes frequentemente implicadas na patogênese fúngica, sendo elas a metaloproteases e serino-proteases (PANNKUK *et al.*, 2015). No entanto, há diferentes classes de proteases que

podem ser produzidas, como serino, treonina, aspártico, glutâmico, cisteína e metaloproteases (YIKE, 2011; HOLZ *et al.*, 2016).

Segundo WIBBELT (2018), a protease mais importante utilizada por *P. destructans* é a serina, a qual é responsável pelas atividades proteolíticas. Apesar de todos os isolados apresentarem um perfil negativo quanto a produção de proteases, é sabido que *P. destructans* obtidos de morcegos secretam estas enzimas durante a infecção, permitindo uma maior penetração micelial nos tecidos subjacentes do hospedeiro (CHATURVEDI *et al.*, 2010; METEYER *et al.*, 2012; PANNKUK *et al.*, 2015; WIBBELT, 2018).

O perfil de produção de esterase de nove isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* foi de forte a forte positivo conforme proposto por AOKI *et al.* (1990). CHATURVEDI *et al.* (2010) e RAUDABAUGH *et al.* (2013) relataram o aumento da atividade de esterase de *P. destructans* nos meios ágar Sabouraud e BDA. O gênero *Pseudogymnoascus* é conhecido como um produtor de esterase CHATURVEDI *et al.*, 2010; RAUDABAUGH & MILLER, 2013; HOLZ *et al.*, 2016) e *P. pannorum* (HE *et al.*, 2017), corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Dez isolados de *Pseudogymnoascus* apresentaram um perfil forte positivo para fosfolipase de acordo com as classificações apresentadas por AOKI *et al.* (1990). Esses resultados divergem do que foi encontrado por CHATURVEDI *et al.* (2010), em que isolados de *P. destructans* não mostraram atividade para fosfolipase. No entanto, patógenos fúngicos secretam enzimas hidrolíticas e as fosfolipases hidrolisam uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídios, ambos responsáveis pela expressão desses fatores de virulência (FRANK *et al.* 2016).

Oito isolados de *Pseudogymnoascus* spp. foram capazes de apresentar atividade de urease, indicando possível patogenicidade *in vitro* dos isolados testados. Vários autores já relataram a atividade de urease de espécies de *Pseudogymnoascus*, como por exemplo *P. pannorum* e *P. destructans* (FENICE *et al.*, 1997; CHATURVEDI *et al.*, 2010; HAYES, 2012; RAUDABAUGH & MILLER, 2013; REYNOLDS & BARTON, 2014). REYNOLDS & BARTON (2014) demonstraram que *P. destructans* produz enzimas como a urease seja quando infecta morcegos ou naturalmente no ambiente. De acordo com MORA & ARIOLI (2014), a urease é uma importante característica de virulência em fungos. Segundo RUTHERFORD (2014), durante a infecção pulmonar fúngica, a ureia presente no líquido epitelial dos pulmões é hidrolisada pela urease fúngica, e a amônia gerada inibe a função imunológica, contribuindo para a lesão do tecido pulmonar. Segundo GHOSH *et al.* (2009) e NAVARATHNA *et al.*

(2010), a produção de urease contribui para o catabolismo citoplasmático, permitindo que vias de sinalização dependentes da ureia utilizem dessa característica para ocasionar infecções.

De forma geral, o diâmetro dos esporos dos isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* apresentaram variação de $2,13 \pm 0,51 \times 3,28 \pm 0,74 \mu\text{m}$ (isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 10386) a $3,20 \pm 0,79 \times 3,98 \pm 1,33 \mu\text{m}$ (isolado *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 10394). De acordo com LATGE (2001), os conídios que apresentam de 2 a 5 μm de diâmetro podem chegar aos alvéolos pulmonares. As espécies de *Pseudogymnoascus* apresentam tamanho de conídios diferentes. *P. verrucosus* possui conídios de tamanho entre 2,5-4 x 2-3 μm (RICE & CURRAH, 2006), *P. roseus* entre 2,2 x 2-3,5 μm (SAMSON, 1972), enquanto *P. appendiculatus* entre 2,5-3,5 x 1,5-2,5 μm (RICE & CURRAH, 2006). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem a capacidade de todos os isolados de *Pseudogymnoascus* spp. avaliados penetrarem nos alvéolos pulmonares humano.

As espécies reativas de oxigênio são subprodutos tóxicos da respiração aeróbica que também são importantes para a mediação de diferentes funções celulares (ZHONG *et al.*, 2021). As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem regular o desenvolvimento, a diferenciação celular e mediar a resposta fúngica às mudanças ambientais (HELLER & TUDZYNSKI *et al.*, 2011; SEGAL & WILSON, 2018). Os isolados testados de *Pseudogymnoascus* apresentaram um perfil negativo quanto a tolerância ao estresse oxidativo na concentração de 0,05 M de H_2O_2 . Até o momento não há relatos que indiquem essa característica no gênero *Pseudogymnoascus*.

Na determinação de hipóxia, seis isolados de *Pseudogymnoascus* apresentaram crescimento nesta condição. Os mecanismos de adaptação às condições de hipóxia nos fungos são variáveis. Os fungos que crescem a esta condição passam por mudanças significativas em seu metabolismo, germinação e crescimento micelial (GRAHL *et al.*, 2011; BARKER *et al.*, 2012). Alguns autores sugerem que a hipóxia é um agente estressor *in vivo* utilizado por patógenos fúngicos humanos, podendo afetar diretamente as respostas imunológicas do hospedeiro durante a infecção fúngica (GRAHL *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2015; MAURER *et al.*, 2019). Além disso, as baixas concentrações de oxigênio influenciam a composição da parede celular fúngica de *Aspergillus*, resultando em níveis aumentados de (1,3)- β -D-glucano na parede celular (MAURER *et al.*, 2019). Até o momento, não há relatos de testes com isolados de *Pseudogymnoascus* para verificação da capacidade de resistir a condições de hipóxia.

As condições de halotolerância foram testadas na concentração inicial de 2% e sete isolados de *Pseudogymnoascus* foram capazes de crescer nesta condição. Segundo KOCHKINA *et al.* (2007), *P. pannorum* pode ser considerado halotolerante e sua tolerância ao

NaCl pode chegar a 20% (GILICHINSKY *et al.*, 2005). CHATURVEDI *et al.* (2019) testaram diferentes condições de halotolerância em *P. destructans* e *P. pannorum* e observaram que *P. destructans* foi capaz de crescer em 2% de NaCl, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho. CHATURVEDI *et al.* (2019) relataram que isolados de *P. pannorum* foram capazes de crescer em todas as concentrações de NaCl testadas (entre 1% e 10%).

Quatro isolados de *Pseudogymnoascus* antárticos apresentaram CIM > 64 µg/mL para fluconazol. O perfil de suscetibilidade ao itraconazol e anfotericina B variaram entre 0,125 e 0,5 e 0,125 a 1 µg/mL, respectivamente. De acordo com CHATURVEDI *et al.* (2011) algumas espécies de *Pseudogymnoascus* são susceptíveis aos antifúngicos existentes, como por exemplo *P. destructans*, o qual é suscetível a anfotericina B (CIM = 0,064 µg/mL), itraconazol (CIM = 0,004 µg/mL) e fluconazol (CIM = 16 µg/mL), semelhante à diferentes fungos patogênicos humanos. WILSON *et al.* (2017) relataram que a suscetibilidade de *P. destructans* a anfotericina B foi maior quando testado em temperatura mais alta, sendo CIM = 1,5 µg/mL a 4 °C e < 0,18 µg/mL a 15 °C. Tal observação indica que os mecanismos de resistência podem variar conforme a temperatura. WEINSTEIN *et al.* (2000) demonstraram que *P. pannorum* quando exposto a altas temperaturas possui ergosterol mais abundante na membrana plasmática. O que indica maior susceptibilidade a polienos e azóis (WILSON *et al.*, 2017). Apesar de algumas repetições, dois isolados *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 10326 e UFMGCB 10472 não tiveram a CIM determinada para os antifúngicos testados, por alguma limitação do isolado em crescer no meio de cultura preconizado para o teste.

6.4 Testes de patogenicidade *in vivo* utilizando larvas de *Tenebrio molitor*

Os diferentes isolados de *Pseudogymnoascus* spp. inoculados em larvas de *T. molitor* provocaram diferentes padrões de mortalidade. Vale ressaltar que os isolados *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8562 provocaram cem por cento das mortes entre o primeiro e o segundo dia. Esses resultados vão de encontro aos relatos de BEEKMAN *et al.* (2018), que utilizaram *Galleria mellonella* inoculadas com 10⁶ esporos de *P. destructans*. Os trabalhos realizados por FUCHS *et al.* (2018), inoculando *P. destructans* e *P. pannorum* na concentração de 10⁶ em larvas de *G. mellonella* demonstraram queda na taxa de sobrevivência em dois dias. Apesar de ser um modelo invertebrado diferente do utilizado neste trabalho, os resultados obtidos por FUCHS *et al.* (2018) corroboram com os resultados obtidos.

Destaca-se que a forma e/ou tamanho dos esporos, principalmente os mais alongados, apresentam maior resistência à fagocitose (ERWIG & GOW, 2016), desta forma é possível que um mecanismo semelhante permita que os esporos de *Pseudogymnoascus* possam resistir aos hemócitos, o que pode acelerar a infecção. Os invertebrados possuem um sistema imune inato e humoral com semelhanças a resposta imune inata dos vertebrados (TOJO *et al.*, 2000). Os hemócitos de *Galleria* apresentam semelhanças com neutrófilos de mamíferos, podendo fagocitar micro-organismos, gerar ERO e produzir estruturas que podem desencadear a morte microbiana (BROWNE *et al.*, 2013; RAPIN *et al.*, 2014). Até o momento foram descritos seis tipos de hemócitos em *Galleria* que estão envolvidos na fagocitose, encapsulamento e melanização (LAVINE & STRAND, 2002).

Experimentos realizados a partir da inoculação de esporos de *Aspergillus* têm demonstrado a redução da sobrevivência de larvas de *T. molitor* (RAMIREZ, 2018). Os autores demonstraram que a letalidade de *Aspergillus fumigatus* é acentuada após o segundo dia de infecção com estabilização a partir do quinto dia. No presente trabalho, o isolado *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 provocou a morte de todas as larvas em seis dias após inoculação, enquanto o controle *C. albicans* SC5314 levou 10 dias para provocar o mesmo resultado. Apesar dos isolados antárticos utilizados neste trabalho serem da espécie *A. thermomutatus*, os resultados obtidos por RAMIREZ (2018) demonstram que o gênero *Aspergillus* se apresenta como patogênico no modelo invertebrado utilizando *T. molitor*, desenvolvendo fatores de virulência que propiciam a morte das larvas a partir do primeiro dia de infecção, e corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

De acordo com de SOUZA *et al.* (2015) e JARROS *et al.* (2020) a utilização de *T. molitor* é um indicador para avaliação da virulência de leveduras com importância clínica. No presente estudo, os isolados *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e UFMGCB 17473 desencadearam uma letalidade de cem por cento nas larvas de *T. Molitor*, no terceiro dia. Os resultados obtidos por JARROS *et al.* (2020) em concentrações acima de 10^5 indicam que *R. mucilaginosa* levam a altas taxas de mortalidade, essa característica confirma a eficiência deste modelo para avaliar a virulência de leveduras patogênicas. Desta forma o modelo utilizado neste estudo confirma a utilização *T. molitor* para avaliar a potencialidade de virulência de *R. mucilaginosa* isolada da Antártica.

6.5 Testes *in vivo* com camundongos BALB/c

6.5.1 Análise de sobrevida, análise comportamental (SHIRPA) e recuperação e quantificação das cargas fúngicas

Diferentes modelos animais, dentre eles camundongos BALB/c, têm sido utilizados para avaliação da patogenicidade de *Aspergillus* spp. (CHANG *et al.*, 2002; ANAND & TIWARY, 2010; WANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019) e *Rhodotorula* spp. (LOURIA *et al.*, 1960; 1967; CHANG *et al.*, 2002; WIRTH *et al.*, 2012). No entanto, para *Pseudogymnoascus* spp. este é o primeiro estudo a utilizar camundongos BALB/c como modelo animal.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível comprovar que a sobrevida dos camundongos foi afetada pela infecção de *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *A. thermomutatus* UFMGCB 17415. É importante destacar que WANG *et al.* (2019) utilizaram camundongos BALB/c imunossuprimidos para avaliação da patogenicidade de *Aspergillus* spp. e verificaram que os isolados não esporulados contribuíram para o fenótipo não esporulado de isolados clínicos. Posteriormente, ZHANG *et al.* (2020) infectaram camundongos saudáveis, pela via intratraqueal com fragmentos de hifas de *Aspergillus* spp. na concentração de 10^8 , e verificaram uma mortalidade de 60% dos animais infectados.

Patógenos fúngicos emergentes têm sido descritos como causadores de doenças invasivas em pacientes imunocomprometidos (IOANNOU *et al.*, 2018). Dentre esses patógenos podemos citar alguns casos raros de *Rhodotorula* spp., reportadas principalmente na corrente sanguínea de pacientes em uso de cateter venoso central, no Sistema Nervoso Central (SNC) de pacientes com AIDS causando ceratites em lesões oculares (IOANNOU *et al.*, 2018). No presente estudo, verificou-se alteração da sobrevida após a infecção com os isolados da levedura *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448, os animais apresentaram uma sobrevida reduzida chegando a oitenta por cento. WIRTH *et al.* (2012) relataram uma mortalidade de 42% após a infecção com isolados de *R. mucilaginosa*.

Quando analisamos o comportamento dos animais testados neste trabalho, vislumbramos a capacidade de todos os isolados serem capazes de provocar doença, quando inoculados, causando algum impacto biológico. Houve ainda alterações de algumas condições como, perda de pelo acentuado no focinho de todos os animais. Esta condição ocorre apenas quando há algum animal dominante (MOREIRA, 2015), o que não ocorreu, pois todos apresentaram a mesma condição. Também foi evidenciado a alteração no estado

neuropsiquiátrico tanto para camundongos infectados com fungos filamentosos quanto leveduras, sugerindo que a encefalopatia (perturbação da função cerebral) (JEREMIAS, 2015) e variações de peso, dentre outras, estão presentes nos animais. Desta forma, verificamos que todos os isolados testados apresentam um potencial patogênico quando consideramos as condições dos pacientes imunossuprimidos.

Na recuperação da carga fúngica a partir do baço e pulmão dos animais infectados com os fungos filamentosos foi observado um número ligeiramente menor do que o que foi inoculado nos camundongos. Resultados similares foram obtidos por ZHANG *et al.* (2019), que registraram a recuperação da carga fúngica nos pulmões dos animais testados e visualizaram os conídios próximos dos brônquios com células inflamatórias ao seu redor. SVIRSHCHEVSKA *et al.* (2009) realizaram a imunossupressão de camundongos BALB/c, que posteriormente foram inoculados pela via intranasal com 10^7 conídios de *Aspergillus* spp. Os autores observaram indícios de infecções pulmonares e letalidade de 30%.

Apesar dos dados do presente estudo demonstrarem uma redução da carga fúngica recuperada dos isolados *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 no sangue, após cinco dias de infecção quando comparados a dois dias de infecção, a presença da levedura ainda é preocupante uma vez que há relatos de que infecções causadas por *Rhodotorula* estão geralmente associadas a cateteres e podem causar endocardite e meningite (FERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2017; FRANCONIERI *et al.*, 2018). A recuperação da carga fúngica no cérebro dos animais inoculados com *R. mucilaginosa* de origem antártica representa o primeiro relato de estudos com experimentação *in vivo* avaliando a infecção causada por essa levedura, além de ser pioneiro na sua detecção no cérebro. De acordo com TSIODRAS *et al.* (2011) 73% dos casos que tiveram uma suspeita de infecção por *Rhodotorula* foram confirmados como sendo *R. mucilaginosa*, os demais foram identificados como *Rhodotorula glutinis*. Somado a isso, é importante salientar que os resultados observados no ensaio *in vitro* de barreira hematoencefálica, indicaram que os isolados *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 foram capazes de ultrapassar essa barreira, corroborando com os resultados obtidos no modelo *in vivo*, o qual indicou que com 72 horas ambos isolados testados conseguiram ultrapassar a barreira hematoencefálica.

6.6 Avaliação histopatológica

A análise histopatológica de tecidos infectados com espécies de *Pseudogymnoascus* foi reportada em morcegos infectados com *P. destructans* até o momento, a qual foi realizada de forma superficial por meio de lâminas da epiderme/derme do focinho, asas e membrana da cauda, sendo considerada o padrão ouro para o diagnóstico da Síndrome do Nariz Branco (METEYER *et al.*, 2009; PIKULA *et al.*, 2017). De acordo com MOORE *et al.* (2018) infecções causadas por *P. destructans* levam a inflamação neutrofílica (aumento do número de neutrófilos no sangue, o que pode ser indicativo de infecções e doenças inflamatórias). Morcegos infectados com *P. destructans* apresentam um processo inflamatório lento que é drasticamente acelerado com o decorrer da hibernação (GARZOLI *et al.*, 2021).

Enquanto outros autores já avaliaram os efeitos histopatológicos de morcegos infectados com *P. destructans* (METEYER *et al.*, 2009; PIKULA *et al.*, 2017), este é o primeiro estudo mostrando as consequências em se tratando especificamente do fungo *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 em camundongos BALB/c. Neste trabalho foi evidenciado que os isolados *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532 e *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 foram capazes de induzir o processo inflamatório com presença de neutrófilos, macrófagos, edema pulmonar e hiperemia. Componente da imunidade inata, os neutrófilos são células fagocíticas, considerados a primeira linha de reconhecimento e defesa contra agentes infecciosos no tecido, que tradicionalmente iniciam uma inflamação aguda e são responsáveis por uma resposta imune pró-inflamatória eficaz (ABBAS *et al.*, 2019). Como os neutrófilos, os macrófagos possuem a capacidade fagocítica envolvida na eliminação de células/partículas estranhas ao organismo (ABBAS *et al.*, 2019). O edema pulmonar ocorre com o acúmulo de líquido nos alvéolos e interstícios pulmonares, condição que afeta diretamente o processo de oxigenação do sangue (WEST, 2013). Já a hiperemia consiste no aumento do volume sanguíneo localizado num órgão ou parte dele (FILHO, 2011).

7. Conclusões

As diferentes regiões inexploradas do planeta vêm chamando atenção quanto à sua biodiversidade residente, principalmente em relação a espécies e linhagens desconhecidas de micro-organismos, as quais podem ter impacto em diferentes processos biotecnológicos para aplicações industriais. Dentre essas regiões inexploradas, os ecossistemas extremos vêm sendo foco de estudos para conhecimento e caracterização dos micro-organismos extremófilos, pois, devido às mudanças climáticas globais, organismos originalmente restritos a esses ecossistemas

podem ser liberados de seus substratos/habitats e dispersos para outras regiões do planeta. Uma dessas regiões extremas é a Península Antártica, a qual sofre os maiores impactos frente às mudanças climáticas globais, principalmente o aumento gradual da temperatura que vêm ocorrendo nas últimas décadas. Essas mudanças climáticas também podem afetar a biota residente e muitos micro-organismos (incluindo os fungos) ali presentes (metabolicamente ativos ou em estado de latência) podem ser liberados e dispersos para fora da Antártica.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, a partir dos experimentos *in vitro*, foram evidenciados significativos e importantes fatores de virulência apresentados pelos isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* spp. e as espécies *A. thermomutatus* e *R. mucilaginosa*, os quais foram confirmados utilizando os modelos *in vivo*. *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532, *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 demonstraram significativa patogenicidade frente ao modelo *in vivo* com *T. molitor* e, por isso, foram selecionados para a avaliação do processo infeccioso também *in vivo* frente à camundongos BALB/c imunocomprometidos. Os fungos avaliados foram responsáveis por causar nos camundongos imunossuprimidos oscilações no peso e alterações no estado neuropsiquiátrico. Todas essas informações levam ao entendimento de que os fungos antárticos estudados causaram impacto biológico nos modelos testados e demonstraram a patogenicidade em modelos imunocomprometidos.

Desta forma, a patogenicidade *in vitro* e *in vivo* dos isolados de *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 8532, *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 e *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 e 17473 estudados neste trabalho, os quais foram obtidos de substratos/habitats que vêm sofrendo grandes impactos devido às mudanças climáticas na região, indicam que a Antártica pode abrigar fungos com diferentes fatores de virulência e patogenicidade para animais e humanos, principalmente aqueles com algum grau de imunossupressão. Os resultados desse estudo alertam que as mudanças climáticas na Antártica (principalmente o aumento da temperatura) podem favorecer a liberação e dispersão de fungos e outros micro-organismos patogênicos de humanos e animais, os quais se encontram isolados geograficamente e aprisionados em seus substratos/habitats característicos da Antártica, como talos de líquens endêmicos, solos únicos e *permafrost* de onde foram obtidos os fungos alvos desse estudo, os quais podem ser carregados da região para as diferentes localidades do globo por meio de vetores biológicos e não biológicos. Por isso, mais estudos com foco no levantamento da microbiota antártica e avaliação do seu potencial patogênico envolvendo testes com resposta inflamatória, recrutamento celular, teste em modelo não-imunossuprimido, entre outros, são de fundamental importância para o

entendimento, monitoramento e controle de micro-organismos patogênicos emergentes oriundos de ecossistemas naturais extremos.

8. Referências

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. (2019) *Imunologia Celular E Molecular*. 9^a ed. São Paulo, Elsevier.
- AGUSTINHO, D. P., NOSANCHUK, J. D. (2017) Functions of Fungal Melanins. Reference Module in Life Sciences b978-0-12-809633-8.12091-6.
- AHMED, M. M. (2012) Theoretical deposition of fungal aerosol particles in the human respiratory tract. *Journal of Advanced Research* 3(2):133-138.
- AKTAS, E., YIGIT, N. (2015) Hemolytic activity of dermatophytes species isolated from clinical 25 specimens. *Journal of Medical Mycology* 25(1):25-30.
- ALFIERI, S. C., CORREIA, C. E., MOTEGI, S. A., PRAL, E. M. (2000) Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *J Parasitol* 86:220-227.
- ALLEY, M. R.; GARTRELL, B. D. (2019) Wildlife diseases in New Zealand: Recent findings and future challenges. *N. Z. Vet. J.* 67: 1–11.
- ALMEIDA, F., WOLF, J. M., CASADEVALL, A. (2015) Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 14(12):1173–1185.
- ALVES, I. M. S. (2017) Fungos presentes em rochas da Antártica: taxonomia, diversidade, distribuição e avaliação dos seus fatores de virulência *in vitro*. Dissertação.
- ALVES, I. M. S., GONÇALVES, V. N., OLIVEIRA, F. S., SCHAEFER, C. E. G. R., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2019) The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. *Extremophiles* 23:327–336.
- ANAND, R., TIWARY, B. N. (2010) Th1 and Th2 cytokines in a self-healing primary pulmonary *Aspergillus flavus* infection in BALB/c mice. *Cytokine* 52:258–264.
- AOKI, S., ITO-KUWA, S., NAKAMURA, Y., MASUHARA, T. (1990) Comparative pathogenicity of wild-type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralbl Bakteriell* 273:332-343.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. (2000) Camundongo. In: ARAÚJO-JORGE, T. C., CASTRO, S. L. *Doença de Chagas – Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ 134-140.
- ARENZ, B. E., BLANCHETTE, R. A. (2011) Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Blanchette* 43:308–315.
- ARENZ, B. E., BLANCHETTE, R.A., FARRELL, R. L. (2014) Fungal Diversity in Antarctic Soils. Pages 35-53. *In Antarctic Terrestrial Microbiology: Physical and Biological Properties of Antarctic Soils*. D. Cowan (ed.) Springer, Berlin.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A., H. JRADI, T. DESAI, C. J. MORRISON (1999) Quantification of ergosterol content: Novel method for determination of Fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J. Clin Microbiol* 37:3332-3337.
- BANDOUCHOVA, H., BARTONICKA, T. BERKOVA, H., BRICHTA, J., CERNY, J., KOVACOVA, V., KOLARIK, M., KOLLNER, B., KULICH, P., MARTÍNKOVA, N., REHAK, Z., TURNER, G. G., ZUKAL, J., PIKULA, J. (2015) *Pseudogymnoascus destructans*: Evidence of Virulent Skin Invasion for Bats Under Natural Conditions, Europe. *Transbound Emerg Dis* 62:1–5.

- BARKER, B. M. (2012) Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* response using an oxygen – controlled fermenter. BMC Genomics. v.13, p.62.
- BAUBLIS J. A, WHARTON, R. A., VOLZ, P. A. (1991) Diversity of micro-fungi in an Antarctic dry valley. J Basic Microbiol 31:3–12.
- BEEKMAN, C. N., MECKLER, L., KIM, E., BENNETT, R. J. (2018) *Galleria mellonella* as an insect model for *P. destructans*, the cause of White-nose Syndrome in bats. PLOS ONE 13(9): e0201915.
- BELOZERSKAYA, T. A., GESSLER, N., AVER'YANOV (2017) Melanin Pigments of Fungi. Fungal Metabolites pp 263-291.
- BERNARD, R. F., McCracken, G. F. (2017) Winter behavior of bats and the progression of White-nose syndrome in the southeastern United States. Ecol Evol 7(5):1487-1496.
- BISCHOFF, V. (1996) Antártica - Trabalho de pesquisa apresentado como requisito para a obtenção do diploma de aprovação do curso superior de Defesa Continental. Disponível em: <<https://profmoraes.files.wordpress.com/2012/02/monografia-sobre-tratado-antartico.pdf>>. Acesso em: 07 abr. 20.
- BLEHERT, D. S. (2012) Fungal Disease and the Developing Story of Bat White-nose Syndrome. PLoS Pathog 8(7):e1002779.
- BLEHERT, D. S., HICKS, A. C., BEHR, M., METEYER, C. U., BERLOWSKI-ZIER, B. M., BUCKLES, E. L., COLEMAN, J. T. H., DARLING, S. R., GARGAS, A. NIVER, R., OKONIEWSKI, J. C., RUDD, R. J., STONE, W. B. (2009) Bat white-nose syndrome: An emerging fungal pathogen? Science 323:227.
- BONASSOLI, L. A., BERTOLI, M., SVIDZINSKI, T. I. E. (2005) High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. Journal of Hospital Infection 59(2):159-162.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.; DENNING, D. W. (2017) Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. J Fungi 3:57.
- BRASIL (2004) Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica - Módulo VII. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso em: 03 abr. 22.
- BRASIL, M. D. E. (2006) Coleção explorando o ensino - Antártica. Disponível em: <http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/EnsMed/vol09_meioambientantart.pdf>. Acesso em: 26 mar. 20.
- BRASIL. (2008) Brasil na Antártica - 25 anos de história. Disponível em: <https://www.marinha.mil.br/secirm/sites/www.marinha.mil.br/secirm/files/brasil_na_antartic_a.pdf>. Acesso em: 12 fev. 20.
- BRASIL. (2013) Ciência Antártica para o Brasil - Um plano de ação para o período 2013 – 2022. Disponível em: <<http://www.ufgrs.br/inctcriosfera/arquivos/231154.pdf>> . Acesso em: 05 abr. 202.
- BRASIL. (2017) Marinha, Programa Antártico Brasileiro - PROANTAR. Disponível em: <<https://www.mar.mil.br/secirm/portugues/proantar.html>>. Acesso em: 26 mar. 20.
- BRASIL. 2020. Nova Estação Antártica Comandante Ferraz foi inaugurada nesta quarta-feira (15). Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/salaImprensa/noticias/arquivos/2020/01/Nova_Est>

acao_Antartica_Comandante_Ferraz_sera_inaugurada_na_tercafeira_14.html>. Acesso em: 05 fev. 20.

BRIDGE, P.D., SPOONER, B. M. (2012) Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecology* 5:(4)381-394.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. (2012) Hidden killers: Human fungal infections. *Sci Transl Med* 4(165)13.

BROWNE, N., HEELAN, M., KAVANAGH, K. (2013) An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*. 4(7):597±603.

BRUNATI, M., ROJAS, J. L., SPONGA, F., CICILIATO, I., LOSI, D., GÖTTLICH, E., DE HOOG, S., GENILLOU, O., MARINELLI, F. (2009). Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics*. 2:43-50.

CALO, S., BILLMYRE, R. B., HEITMAN, J. (2013) Generators of phenotypic diversity in the evolution of pathogenic microorganisms. *PLOS Pathogens* 9 (3):1-4.

CHAHAL, K., BELIYA, E., CHOURASIA, N. K., CHOURASIA, A. (2021) CHAPTER - 2: OPPORTUNISTIC PATHOGENS: AN OVERVIEW. In: *New Vistas in Microbial Sciences: Volume - 1*: Ed: SHARMA, D. K. Integrated Publications New Delhi.

CAMPBELL, L. J., WALSH, D. P., BLEHER, D. S., LORCH, J. M. (2020) Long-term survival of *Pseudogymnoascus destructans* elevated temperatures. *J Wildl Dis* 56(2):278–287.

CANEPPA, A., de MEIRELLES, J. V., ROLLIN-PINHEIRO, R., DUTRA, X. M., LIPORAGI-LOPES, L. C., SOUZA, L., VILLELA, R. M. T., BARRETO-BERGTER, E. (2019). Structural Differences Influence Biological Properties of Glucosylceramides from Clinical and Environmental Isolates of *Scedosporium aurantiacum* and *Pseudallescheria minutispora*. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland) 5(3)62.

CASADEVALL, A. (2007) Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews*, 21(4):130-132.

CASADEVALL, A. (2012) Fungi and the Rise of Mammals. *PLoS Pathogens* 8:8.

CASADEVALL, A., ALMEIDA, F. (2015) Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 14(12):1173-85.

CASADEVALL, A. (2017) The Pathogenic Potential of a Microbe *mSphere* 2(1)e00015-17.

CASADEVALL, A., PIROFSKI, L. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity* 67:3703–3713.

CASADEVALL, A., PIROFSKI, L. (2007) Accidental Virulence, Cryptic Pathogenesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Environmental Microbes. *Eukaryotic Cell* 6(12):2169–2174.

CASELLAS J. (2010) Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal*. 5:1.1-7.

CASADEVALL, A., KONTOYIANNIS, D.P., ROBERT, V. (2019) On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. *mBio* 10.

CAVICCHIOLI, R., RIPPLE, W. J., TIMMIS, K. N., FAROOQ AZAM, LARS R. BAKKEN, MATTHEW BAYLIS, MICHAEL J. BEHRENFELD, ANTJE BOETIUS, P. W., BOYD, A., CLASSEN, T. W., CROWTHER, R. D., C. M. F., JEF, H., DAVID. A., HUTCHINS, J. K., JANSSON, D. M. K., BRITT, K., DAVID, B. M. W., JENNIFER. B. H. M., MARY. A. M., VICTORIA, J. O., D. S. R., JUSTIN, V. R., VIRGINIA, I. R., BRAJESH, K. S., LISA, Y. S., FRANK, J. S., MATTHEW, B. S., MADELEINE, J. H. V. O., SCOTT, C.

- W., ERIC, A. W., NICOL, E. S. W. (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat Rev Microbiol* 17:569–586.
- CHANG, C. Y., CHOU, H., TAM, M., TANG, R. B., LAI, H. Y., SHEN, H. D. (2002) Characterization of enolase allergen from *Rhodotorula mucilaginosa*. *J Biomed Sci*. 9(6 Pt 2):645-655.
- CHATURVEDI, S., RAJKUMAR, S. S., LI, X., HURTEAU, G. J., SHUTMAN, M., CHATURVEDI, V. (2011) Antifungal testing and high-throughput screening of compound library against *Geomyces destructans*, the etiologic agent of geomycosis (WNS) in bats. *PLoS One*. 6:1–6.
- CHATURVEDI, V., CHATURVEDI, S. (2011) *Cryptococcus gattii*: A resurgent fungal pathogen. *Trends in Microbiology* 19(11):564–570.
- CHATURVEDI, V., DEFIGLIO, H., CHATURVEDI, S. (2018) Phenotype profiling of white-nose syndrome pathogen *Pseudogymnoascus destructans* and closely-related *Pseudogymnoascus pannorum* reveals metabolic differences underlying fungal lifestyles. *F1000Res* 7:665.
- CHATURVEDI, V., DEFIGLIO, H., CHATURVEDI, S. (2019) Phenotype profiling of white-nose syndrome pathogen *Pseudogymnoascus destructans* and closely-related *Pseudogymnoascus pannorum* reveals metabolic differences underlying fungal lifestyles. *F1000Research* 7:665.
- CHATURVEDI, V., SPRINGER, D. J., BEHR, M. (2010) Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with White Nose Syndrome (WNS). *PLoS One* 5(5):e10783.
- CHÁVEZ, R., FIERRO, F., GARCÍA-RICO, R. (2015) Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Front Microbiol* 6:903
- CHEN, S. C., MEYER, W., SORRELL, C. (2014) *Cryptococcus gattii* *Infections* 27(4):980–1024.
- CHIN, V. K., LEE, T. Y., RUSLIZA, B., CHONG, P. P. (2016) Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host-Pathogen Interaction: A Review. *Int J Mol Sci* 17(10):1643.
- CHRISTENSEN, W. B. (1946) Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *J Bacteriol* 52(4):461–466.
- CHUN, C. D. LIU, O. W. MADHANI, H. D. (2007) A Link between Virulence and Homeostatic Responses to Hypoxia during Infection by the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* 3:(I).2.
- CLARKE, S. C., DUMESIC, P. A., HOMER, C. M., O'DONOGHUE, A. J., LA GRECA, F., PALLOVA, L., MAJER, P., MADHANI, H. D., CRAIK, C. S. (2016) Integrated Activity and Genetic Profiling of Secreted Peptidases in *Cryptococcus neoformans* Reveals an Aspartyl Peptidase Required for Low pH Survival and Virulence. *PLoS Pathog* 12(12):e1006051.
- CLSI (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- COELHO, L. C., de CARVALHO, C. R., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2021) Diversity, distribution, and xerophilic tolerance of cultivable fungi associated with the Antarctic angiosperms. *Polar Biology* 44:379-388.

- COLE, G. T. (1997) Ammonia production by *Coccidioides immitis* and its possible significance to the host–fungus interplay. In: VANDEN, B. H., STEVENS, D. A., ODDS, F. C. (Eds.), Host–Fungus Interplay: Proceedings of the Fifth Symposium on Topics in Mycology. National Foundation for Infectious Diseases, Bethesda, MD, pp. 247–263.
- COLEMAN, J. T. H., REIXHARD, J. D. (2014) Bat White-Nose Syndrome in 2014: A Brief Assessment Seven Years After Discovery of a Virulent Fungal Pathogen in North America *Outlooks on Pest Management* 25:(6)374-377(4).
- CONNELL, L., SEGEE, B., REDMAN, R., RODRIGUEZ, R. J, STAUDIGE, H. (2018) Biodiversity and abundance of cultured microfungi from the permanently ice-covered Lake Fryxell, Antarctica. *Life* 8:1–10.
- CORDERO, R. J. B., CASADEVALL, A. (2017) Functions of fungal melanin beyond virulence *Fungal Biology Reviews* 31(2)99-112.
- COSTA, M. C., SANTOS, J. R. A., RIBEIRO, M. J. A., de FREITAS, G. J. C., BASTOS, R. W., FERREIRA, G. F., MIRANDA, A. S., NASCIMENTO, R. D., SANTOS, A. P. C., MARTINS, F. S., PAIXÃO, T. A., TEIXEIRA, A. L., SOUZA, D. G., SANTOS, D. A. (2016) The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. *Journal of Medical Microbiology* 306(4):187-195.
- COWAN, D. A., MAKHALANYNE, T. P., DENNIS, P. G., HOPKINS, D. W. (2014) Microbial ecology and biogeochemistry of continental Antarctic soils. *Front Microbiol* 5:154.
- COX, G. M., MUKHERJEE, J., COLE, G. T., CASADEVALL, A., PERFECT, J. R. (2000) Urease as a Virulence Factor in Experimental *Cryptococcosis*. *Infect Immun* 443–448.
- CROSS, A. S., SAKARYA, S., RIFAT, S., HELD, T. K., DRYSDALE, B. E., GRANGE, P. A., CASSELS, F. J., WANG, L. X., STAMATOS, N., FARESE, A., CASEY, D., POWELL, J., BHATTACHARJEE, A. K., KLEINBERG, M., GOLDBLUM, S. E. (2003). Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem* 278(6):4112- 4120.
- CRUZ, M. C.; GOLDSTEIN, A. L., BLANKENSHIP, J. R., DEL, P. M., DAVIS, D., CARDENAS, M. E., PERFECT, J. R., MCCUSKER, J. H., HEITMAN, J. (2002) Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *EMBO J* 21(4):546–559.
- CUNHA, M. M., FRAZNZEN, A. J., SEABRA, S. H., HERBST, M. H. H., VUGMAN, N. V., BORBA, L. P., SOUZA, W., ROZENTAL, S. (2010) Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol* 10:80.
- D'IMPERIO-LIMA, M. R., EISEN, H., MINOPRIO, P., JOSKOWICZ, M., COUTINHO, A. (1986) Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology* 137: 353-356.
- da SILVA, M. B., MARQUES, A. F., NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A., TRAVASSOS, L. R., TABORDA, C. P. (2006) Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and Infection* 8(1):197-205.
- da SILVA, T. H., SILVA, D. A. S., THOMAZINI, A., SCHAEFER, C. E. G. R., ROSA, L. H. (2019) Antarctic Permafrost: An Unexplored Fungal Microhabitat at the Edge of Life. In: Rosa L. (eds) *Fungi of Antarctica*. Springer, Cham.
- da SILVA, T. H., SILVA, D. A. S., DE OLIVEIRA, F. S. SCHAEFER, C. E. G. R., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2020) Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. *Extremophiles* 24:565-576.

- da SILVA, T. H., CÂMARA, P. E. A. S., PINTO, O. H. B., CARVALHO-SILVA, M., OLIVEIRA, F. S., CONVEY, P., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2022) Diversity of Fungi Present in Permafrost in the South Shetland Islands, Maritime Antarctic. *Microb Ecol* 83:58–67.
- DAMVELD, R. A., ARENTSHORST, M., FRANKEN, A., VANKUYK, P. A., KLIS, F. M., HONDEL, C. A., RAM, A. F. (2005) The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. *Mol Microbiol* 58(1):305–319.
- DAVIS, D. A. (2009) How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr Opin Microbiol* 12:365–370.
- de HOOG S., ZALAR, P., VAN, D. E. B. G., GUNDE-CIMERMAN, N. (2005) Relation of Halotolerance to Human-Pathogenicity in the Fungal Tree of Life: An Overview of Ecology and Evolution under Stress. In: GUNDE-CIMERMAN, N., OREN, A., PLEMENITAS, A. (eds) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 9. Springer, Dordrecht.
- de HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J. F. M. J. (2000) *Atlas of clinical fungi*. 2. ed. ULFRECH e RÉUS: Centralbureau voor schimmeldcultures to universitat Rovira; Virgili, p. 126.
- de MENEZES, G. C. A., GODINHO, V. M., PORTO, B. A., GONÇALVES, V. N., ROSA, L. H. (2017) *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. *Extremophiles* 21:259–269.
- de MENEZES, G. C., AMORIM, S. S., GONÇALVES, V. N., GODINHO, V. M., SIMÕES, J. C., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2019) Diversity, Distribution, and Ecology of Fungi in the Seasonal Snow of Antarctica. *Microorganisms* 7:445.
- de MENEZES, G. C. A., CÂMARA, P. E. A. S., PINTO, O. H. B., CARVALHO-SILVA, M., OLIVEIRA, F. S., SOUZA, C. D., REYNAUD SCHAEFER, C. E. G. ; CONVEY, P., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2021) Fungal diversity present on rocks from a polar desert in continental Antarctica assessed using DNA metabarcoding. *Extremophiles* 25:193–202.
- de MENEZES, G. C. A., PORTO, BÁRBARA, A., RADICCHI, G. A., SOARES, F. C., ZARANKIN, A., ROSA, L. H. (2022) Fungal impact on archaeological materials collected at Byers Peninsula Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica. *Anais da Academia Brasileira de Ciência* 94:1–12.
- de SOUZA, P. C., MOREY, A. T., CASTANHEIRA, G. M., BOCATE, K. P., PANAGIO, L. A., ITO, F. A., FURLANETO, M. C., YAMADA-OGATTA, S. F., COSTA, I. N., MORA-MONTES H. M., ALMEIDA, R. S. (2015) *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *J Microbiol Methods* 118:182–186.
- de SOUZA, LÁUREN M. D., OGAKI, M. B., CÂMARA, P. E. A. S., PINTO, O. H. B., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2021) Assessment of fungal diversity present in lakes of Maritime Antarctica using DNA metabarcoding: a temporal microcosm experiment. *Extremophiles* 25:77–84.
- DIANO A., PEETERS J., DYNESEN J., NIELSEN J. (2009) Physiology of *Aspergillus niger* in oxygen-limited continuous cultures: influence of aeration, carbon source concentration and dilution rate. *Biotechnol Bioeng.* v. 103, p.956–965.
- DREES, K. P., LORCH, J. M., PUECHMAILLE, S. J., PARISE, K. L., WIBBELT, G., HOYT, J. R., SUN, K., JARGALSAIKHAN, A., DALANNA, M., PALMER, J. M., LINDNER, D. L., MARM-KILPATRICK A., PEARSON, T., KEIM, P. S., BLEHER, D. S.,

- FOSTER, J. T. (2017) Phylogenetics of a fungal invasion: origins and widespread dispersal of white-nose syndrome. *mBio* 8:e01941-17.
- DUARTE, J. L., FURST, C., KLISIEWICZ, D. R., KLASSEN, G., COSTA, A. O. (2013) Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espirito Santo, Brazil. *Exp Parasitol* 135(1):9-14.
- DURÁN, P., BARRA, P. J., JORQUERA, M. A., VISCARDI, S., FERNANDEZ, C., PAZ, C., MORA, M. L., BOL, R. (2019). Occurrence of Soil Fungi in Antarctic Pristine Environments. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 7:28.
- DURIEUX, M. F., MELLOUL, È., JEMEL, S., ROISIN, L., DARDÉ, M. L., GUILLOT, J., DANNAOUI, È., BOTTEREL, F. (2021) *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*, 12(1):818–834.
- EDINGTON, S., THOMPSON, E., MOORE, D., HUGHES, K. A., BRIDGE, P. (2014) Investigating the insecticidal potential of *Geomyces* (*Myxotrichaceae: Helotiales*) and *Mortierella* (*Mortierellaceae: Mortierellales*) isolated from Antarctica. *Springerplus* 3:289.
- EVANS, S., HANSEN, R. W., SCHNEEGURT, M. A. (2013) Isolation and Characterization of Halotolerant Soil Fungi from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Cryptogam Mycol* 34(4):329-341.
- ERWIG, L. P., GOW, N. A. (2016) Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14 (3):163±76.
- FELL, J. W., SCORZETTI, G., CONNELL, L., CRAIG, S. (2006) Biodiversity of micro-eukaryotes in Antarctic Dry Valley soils with <5% soil moisture. *Soil Biol Biochem* 38:3107–3119.
- FENICE, M., SELBMANN, ZUCCONI, L., ONOFRI, S. (1997) Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. *Polar Biol* 17:275-280.
- FERREIRA, G. F., BALTAZAR, L. M., SANTOS, J. R. A., MONTEIRO, A. S., FRAGA, L. A. O., RESENDE-STOIANOFF, M. A., SANTOS, D. A. (2013) The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother* 68:1801–1811.
- FERREIRA, G. F., SANTOS, J. R. A., da COSTA, M. C., de HOLANDA, R. A., DENADAI, Â. M. L., de FREITAS, G. J. C., SANTOS, A. R. C., TAVARES, P. B., PAIXÃO, T. A., SANTOS, D. A. (2015) Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(8):4600–4609.
- FERREIRA-PAIM, K., ANDRADE-SILVA, L., MORA, D. J., LAGES-SILVA, E., PEDROSA, A. L. (2012) Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia* 174:41-52.
- FIGUEROA, L., JIMÉNEZ, C., RODRÍGUEZ, J. (2015) 3-Nitroasteric acid derivatives from an Antarctic sponge-derived *Pseudogymnoascus* sp. fungus. *J Nat Prod* 78:919–923.
- FILHO, G. B. (2011) *Bogliolo Patologia*. 8ª ed. São Paulo: Guanabara.
- FISHER, M. C., HENK, D. A., BRIGGS, C. J., BROWNSTEIN, J. S., MADOFF, L. C., MCCRAW, S. L., GURR, S. J. (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484:186-194.
- FRANK, C. L., INGALA, M. R., RAVENELLE, R. E., DOUGHERTY-HOWARD, K., WICKS, S. O., HERZOG, C., RUDD, R. J. (2016) The Effects of Cutaneous Fatty Acids on

the Growth of *Pseudogymnoascus destructans*, the Etiological Agent of White-Nose Syndrome (WNS). PLOS ONE 11(4):e0153535.

FRATE, G. D., CARETTA, G. (1990) Fungi isolated from Antarctic material. Polar Biology 11:1-07.

FREITAS, D. F., VIEIRA-DA-MOTTA, O., MATHIAS, L. S., FRANCO, R. W. A., GOMES, R. S., VIEIRA, R. A. M., ROCHA, L. O., OLIVARES, F. L., SANTOS, L. P. (2019) Synthesis and role of melanin for tolerating *in vitro* rumen digestion in *Duddingtonia flagrans*, a nematode-trapping fungus, Mycology 10(4): 229-242.

FRICK, W. F., REYNOLDS, R., PARISE, K. L., DREES, K. P., HOYT, J. R., CHENG, T. L., KUNZ, T. H., FOSTER, J. T., KILPATRICK, A. M. (2015) Host and pathogen ecology drive the seasonal dynamics of a fungal disease, white-nose syndrome. Disponível em: <<http://rsos.royalsocietypublishing.org/content/282/1799/20142335.long>>. Acesso em: 04 abr. 20.

FRISVAD, J. C., LARSEN, T. O. (2016) Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and Other Pathogenic Species in *Aspergillus* Section Fumigati. Frontiers in microbiology 6:1485.

FUCHS, B. B., CHATURVEDI, S., ROSSONI, R. D., BARROS, P. P., TORRES-VELEZ, F., MYLONAKIS, E., CHATURVEDI V. (2018) *Galleria mellonella* experimental model for bat fungal pathogen *Pseudogymnoascus destructans* and human fungal pathogen *Pseudogymnoascus pannorum*, Virulence 9(1):1539-1547.

FURBINO, L. E., GODINHO, V. M., SANTIAGO, I. F., PELLIZARI, F. M., ALVES, T. M., ZANI, C. L., JUNIOR, A. S. P., ROMANHA, A. J., CARVALHO, A. G. O., GIL, L. H. V. G., ROSA, C. A., MINNIS, A. M., L. H. ROSA (2014). Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. Microbial ecology 67(4):775-787.

GARBE, E., VYLKOVA, S. (2019) Role of Amino Acid Metabolism in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. Curr Clin Micro Rpt 6:108–119.

GARGAS, A., TREST, M. T., CHRISTENSEN, M., VOLK T. J., BLHERT, D. S. (2009) *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. Mycotaxon 108:147–154.

GARZOLI, L., BOZZETTA, E., VARELLO, K., CAPPELLERI, A., PATRIARCA, E., DEBERNARDI, P., RICCUCCI, M., BOGGERO, A., GIROMETTA, C., PICCO, A. M. (2021) White-Nose Syndrome Confirmed in Italy: A Preliminary Assessment of Its Occurrence in Bat Species. Journal of Fungi 7(3):192.

GHOSH, S., NAVARATHNA, D. H., ROBERTS, D. D., COOPER, T. J., ATKIN, A. L., PETRO, T. M., NICKERSON, K. W. (2009) Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. Inf Immun 77:1596–1605.

GILICHINSKY, D., RIVKINA, E., BAKERMANS, C., SHCHERBAKOVA, V., PETROVSKAYA, L., OZERSKAYA, S., IVANUSHKINA, N., KOCHKINA, G., LAURINAVICHUIS, K., PECHERITSINA, S., FATTAKHOVA, R., TIEDJE, J. M. (2005) Biodiversity of cryopegs in permafrost. Microbiology Ecology 53:117–128.

GLASS, N. L., DONALDSON, G. C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol 61(4):1323-1330.

GODINHO, V. M., FURBINO, L. E., SANTIAGO, I. F., PELLIZZARI, F. M., YOKOYA, N. S., PUPO, D., ALVES, T. M. A., JUNIOR, P. A. S., ROMANHA, A. J., ZANI, C. L.,

- CANTRELL, C. L., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME journal* 7(7):1434-1451.
- GODINHO, V. M., GONÇALVES, V. N., SANTIAGO, I. F., FIGUEREDO, H. M., VITORELI, G. A., SCHAEFER, C. E. G. R., BARBOSA, E. C., OLIVEIRA, J. G., ALVES, T. M. A., ZANI, C. L., JUNIOR, P. A. S., MURTA, S. M. F., ROMANHA, A. J., KROON, E. G., CANTRELL, C. L., WEDGE, D. E., DUKE, S. O., ALI, A., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2015) Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles* 19:585-596.
- GOMES, D. M. A. (2014) Estudo sobre a ecologia e origem da virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* - caracterização de sua interação com *Acanthamoeba castellanii*. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/16085/3/2014_DiogoMagnaboscodeAlmeidaGome.s.pdf>. Acesso em: 26 mar. 20.
- GOMES, E. C. Q., GODINHO, V. M., SILVA, D. A. S., de PAULA, M. T. R., VITORELI, G. A., ZANI, C. L., ALVES, T. M. A., JÚNIOR, P. A. S., MURTA, S. M. F., BARBOSA, E. C., OLIVEIRA, J. G., OLIVEIRA, F. S., CARVALHO, C. R., FERREIRA, M. C., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2018) Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles* 1:1-13.
- GONÇALVES, V. N., CANTRELL, C. L., WEDGE, D. E., FERREIRA, M. C., AURÉLIO, M., JACOB, R. M., OLIVEIRA, F. S., GALANTE, D., RODRIGUES, F., ALVES, T. M. A., ZANI, C. L., POLICARPO, A. S. J., MURTA, S., ROMANHA, A. J., BARBOSA, E. C., KROON, E. G., OLIVEIRA, J. G., SILVA, B. G., GALETOVI, C. A., ROSA, L. H. (2015) Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds. *Environmental Microbiology* 1462-2920.
- GONÇALVES, V. N., VAZ, A. B. M., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2012) Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* 82:459-47.
- GHOSH, P. N.; BROOKES, L. M.; EDWARDS, H. M.; FISHER, M. C.; JERVIS, P.; KAPPEL, D.; SEWELL, T. R.; SHELTON, J. M. G.; SKELLY, E.; RHODES, J. L. (2020) Cross-Disciplinary Genomics Approaches to Studying Emerging Fungal Infections. *Life* 10:315.
- GOSTINAR, C., GRUBE, M., GUNDE-CIMERMAN, N. (2011). Evolution of fungal pathogens in domestic environments? *Fungal Biol.* 115:1008–1018.
- GRAHL, N., PUTTIKAMONKUL, S., MACDONALD, J. M., GAMCSIK, M. P., NGO, L. Y., HOHL, T. M., CRAMER, R. A. (2011) *In vivo* hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog* 7:e1002145.
- GUÉNET, J. L., BONHOMME, F. (2003) Wild mice: An ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet* 19:24-31.
- HAMÃ, K., HIBBARD, C., LUBECK, M. (2016) Bat with white-nose syndrome confirmed in Washington state. Washington Department of Fish and Wildlife and U.S. Geological Survey, Olympia, WA. Disponível em: <<https://www.usgs.gov/news/bat-white-nose-syndrome-confirmed-washington-state>>. Acesso em: 26 mar. 20.
- HAYES, M. A. (2012) The *Geomyces* fungi: Ecology and distribution. *BioScience* 62:819-823.

- HE, L., MAO, Y. ZHANG, L., WANG, H., ALIAS, S. A., GAO, B., WEI, D. (2017) Functional expression of a novel α -amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization. *BMC Biotechnol* 17:22.
- HELLER, J., TUDZYNSKI, P. (2011) Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development and disease. *Annu Rev Phytopathol.* 49:369–390.
- HENRÍQUEZ, M., VERGARA, K., NORAMBUENA, J., BEIZA, A., MAZA, F., UBILLA, P., ARAYA, I., CHÁVEZ, R., SAN-MARTÍN, R., DARIAS J., DARIAS, M., VACA, I. (2014) Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30:65-76.
- HOGAN, L. H., KLEIN, B. S., LEVITZ, S. M. (1996) Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 9(4):469-488.
- HOLZ, P., HUFSCHEID, J., BOARDMAN, W., CASSEY, P., FIRESTONE, S., LUMSDEN, L., PROWSE, T., REARDON, T., STEVENSON, M. (2016) Qualitative risk assessment: White-nose syndrome in bats in Australia. Disponível em: <https://www.wildlifehealthaustralia.com.au/Portals/0/Documents/ProgramProjects/WNS_Disease_Risk_Analysis_Australia.pdf>. Acesso em 04 mar. 19.
- HOSELTON, S. A., SAMARASINGHE, A. E., SEYDEL, J. M., SCHUH, J. M. (2010) An inhalation model of airway allergic response to inhalation of environmental *Aspergillus fumigatus* conidia in sensitized BALB/c mice. *Medical mycology* 48(8):1056–1065.
- HOWARD, S. J. (2014) Multiresistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathologia* 178:427–433.
- HOWARD, D. H. (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical microbiology reviews* 12(3):394–404.
- HOYT, J. R., CHENG, T. L., LANGWIG, K. E., HEE, M. M., FRICK, W. F., KILPATRICK, A. M. (2015) Bacteria Isolated from Bats Inhibit the Growth of *Pseudogymnoascus destructans*, the Causative Agent of White-Nose Syndrome. *PLOS ONE* 10(4): e0121329.
- HOYT, J. R., LANGWIG, K. E., SUN, K., PARISE, K. L., LI, A. *et al.* (2020), Environmental reservoir dynamics predict global infection patterns and population impacts for the fungal disease white-nose syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(13):7255-7262.
- IOANNOU, P., VAMVOUKAKI, R. SAMONIS, G. (2018) *Rhodotorula* species infections in humans: a systematic review. *Mycoses* 62(2)90-100.
- JARROS, I. C., VEIGA, F. F., CORRÊA, J. L., BARROS, I., GADELHA, M. C., VOIDALESKI, M. F., PIERALISI, N., PEDROSO, R. B., VICENTE, V. A., NEGRI, M., SVIDZINSKI, T. (2020). Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. *EXCLI journal* 19:687–704.
- JEREMIAS, I. C. (2015) Investigação das alterações imunológicas em camundongos submetidos ao modelo animal de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) com alterações cerebrais. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5165/tde-06112015-143205/publico/IsabelaCasagrandeJeremias.pdf>. Acessado em: 03 abr. 22.
- JOSHI, S., BAJPAI, A., JOHRI, B. N. (2021) Extremophilic fungi at the interface of climate change. In: *Fungi Bio-Prospect in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology*. Academic Press. Pages 1-22.

- KANAFANI, Z. A., PERFECT, J. R. (2008) Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases* 46:120-128.
- KHAN, M. S. A., AHMAD, I., AQIL, F., OWAIS, M., SHADID, M., MUSARRAT, J. (2010) Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In: Ahmad, I., OWAIS, M., SHAHID, M., AQIL, F. (Eds.) *Combating Fungal Infections: Problems and Remedy* 10:21-45.
- KARKOWSKA-KULETA, J., RAPALA-KOZIK, M., KOZIK, A. (2009) Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica* 09(56):211-224.
- KERRY, E. (1990) Effects of temperature on growth rates of fungi from subantarctic Macquarie Island and Casey, Antarctica. *Polar Biol* 10:293–299.
- KHAN, M. S. A., AHMAD, I., AQIL, F., OWAIS, M., SHADID, M., MUSARRAT, J. (2010) Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In: Ahmad, I., Owais, M., Shahid, M., Aqil, F. (Eds.) *Combating Fungal Infections: Problems and Remedy*. Springer- Verlag, Berlin 21-45.
- KHANKHET, J., VANDERWOLF, K. J., MCALPINE, D. F. (2014) Clonal expansion of *the Pseudogymnoascus destructans* genotype in North America is accompanied by significant variation in phenotypic expression. *PLoS One* 9(8):e104684.
- KHARE, R., GUPTA, S., ARIF, S., JENOFT, M. E., DENZIEL, P. H., RODEN, A. C., WIHELM, M. P., RZONABLE, R. R., WENGENACK (2014) Misidentification of *Neosartorya pseudofischeri* as *Aspergillus fumigatus* in a lung transplant patient. *J Clin Microbiol* 52:2722–2725.
- KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D. W., STALPERS, J. A. (2008). *Dictionary of the Fungi*: CABI. Wallingford, UK.
- KOCHKINA, G. A., IVANUSHKINA, N. E., AKIMOV, V. N. GILICHINSKII, D. A. OZERSKAYA, S. M. (2007) Halo- and Psychrotolerant *Geomyces* Fungi from Arctic Cryopegs and Marine Deposits. *Microbiology* 76:(1)31–38.
- KOCHKINA, G. A., IVANUSHKINA, N. E., LUPACHEV, A. V., STARODUMOVA, I. P., VASILENKO, O. V., OZERSKAYA, S. M. (2019) Diversity of mycelial fungi in natural and human-affected Antarctic soils. *Polar Biol* 42:1–18.
- KUNAMNENI, A., BALLESTEROS, A., PLOU, F. J., ALCALDE, M. (2007) Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Commun Curr Res Educ Top Trends Appl Microbiol* 233–245.
- LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACARI, E. M., MELO, N. T. (2002) *Tratado de micologia médica*. São Paulo: Sarvier.
- LANGWIG, K. E., HOYT, J. R., PARISE, K. L., KATH, J., KIRK, D., FRICK, W. F., FOSTER, J. T. F., KILPATRICK, A. M. (2015) Invasion Dynamics of White-Nose Syndrome Fungus, Midwestern United States, 2012–2014. *Emerging Infectious Diseases* 21(6):1023–1026.
- LASZLO, A. (1998) Evidence for two states of thermotolerance in mammalian cells. *Int J Hyperther* 4(5):513-526.
- LATGE, J. P. (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 9:382–389.
- LAVINE, M. D., STRAND, M. R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1295-309.

- LEE, J. R., RAYMOND, B., BRACEGIRDLE, T. J., CHADES, I., FULLER, R. A., SHAW, J. D., TERAUDS, A. (2017) Climate change drives expansion of Antarctic ice-free habitat. *Nature* 547:49-54.
- LESAGE, G., BUSSEY, H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(2):317–343.
- LEVIN, D. E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69 (2):262-291.
- LEWIS, L. A., DYER, D. W. (1995) Identification of an iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in the utilization of hemoglobin complexed to haptoglobin. *J Bacteriol* 177:1299–1306.
- LI, Y., SUN, B., LIU, S. (2008) Bioactive asterric acid derivatives from the Antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. *J Nat Prod* 71:1643–1646.
- LILLEY, T. M., JOHNSON, J. S., RUOKOLAINEN, L., ROGERS, E. J. R., WILSON, C. A., SCHELL, S. M. S., FIELD, K. A., REEDER, D. M. (2016) White-nose syndrome survivors do not exhibit frequent arousals associated with *Pseudogymnoascus destructans* infection. *Frontiers in Zoology* 2016:13:12.
- LIMA, P. S., CHUNG, D., BAILÃO, A. M., CRAMER, R. A., SOARES, C. M. A. (2015) Characterization of the *Paracoccidioides* Hypoxia Response Reveals New Insights into Pathogenesis Mechanisms of This Important Human Pathogenic Fungus. *PLoS Negl Trop Dis* 9(12):e0004282.
- LOHAN, D., JONSTON, S. (2005) Bioprospecting in antarctica. UNU-IAS. Disponível em: https://collections.unu.edu/eserv/UNU:3100/antarctic_bioprospecting_3.pdf. Acesso em: 27 abr. 20.
- LOQUE, C. P., MEDEIROS, A. O., PELLIZZARI, F. M., OLIVEIRA, E. C., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2010). Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar biology* 33(5):641-648.
- LORCH, J. M., METEYER, C. U., BEHR, M. J., BOYLES, J. G., CRYAN, P. M., HICKS, A. C., BALLMANN, A., COLEMAN, J. T. H., REDELL, D. N., REEDER, D., BLEHER, D. S. (2011) Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature* 480:376-378.
- LOURIA, D. B., GREENBERG, S. M., MOLANDER, D. W. (1960) Fungemia caused by certain nonpathogenic strains of the Family *Cryptococcaceae* - Report of Two Cases Due to *Rhodotorula* and *Torulopsis Glabrata*. *N Engl J Med* 263:1281-1284.
- LUO, G., SAMARANAYAKE, L. P., YAU, J. Y. Y. (2001) *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (8):2971-2974.
- MA, H., HAGEN, F., STEKEL, D. J., JHONSTON, S. A., SIONOV, E., FALK, R., POLACHEK, I., BOEKHOUT, T., MAY, R. C. (2009) The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31):12980–12985.
- MA, H., MAY, R. C. (2009) Chapter 5 - Virulence in *Cryptococcus* Species. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc. v.67.
- MAGALHÃES, L.E. (2012) A ciência e os animais de laboratório. **RESBCAL** 1:7-13.

- MAHDY HM, EL-SHEIKH HH, AHMED MS, REFAAT BM. (1996) Physiological and biochemical changes induced by osmolarity in halotolerant aspergilli. *Acta Microbiologica Polonica* 45:55–65.
- MALKUS, A., PI-FANG, L. C., ZUZGA, S. M., REN-KUANG, C., SHAO, J., CUNFER, B. M., ARSENIUKA, E., UENGE, P. P. (2006) RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. Mycological Research* 110:1152–1164.
- MANDEEL, Q. A. (2006) Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. *Journal of Basic Microbiology* 46:480–494.
- MANNS, J. M., MOSSER, D. M., BUCKLEY, H. R. (1994) Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 62(11):5154–5156.
- MARESC, B., KOBAYASHI, G. S. (2000) Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Contrib Microbiol* 5:201–216.
- MARESMÁ, B. G. M., CASTILLOL, B. G., FERNÁNDEZ, R. C., SILVA, E. S., MAIORANO, A. E., RODRIGUES, M. F. A. (2010) Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* IPT-301 to improve the production of β -fructofuranosidase. *J Microbiol* 41:1.
- MARROQUIN, C. M., LAVINE, J. O., WINDSTAM, S. F. (2017) Effect of Humidity on Development of *Pseudogymnoascus destructans*, the Causal Agent of Bat White-Nose Syndrome. *Northeastern Naturalist* 24(1):54–64.
- MARTINEZ, L. R., CASADEVALL, A. (2005) Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. *Infection and Immunity* 73(10):6350–6362.
- MASSIRONI, S. M. G. (2009) Padrão genético. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M., KO, G. M. *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório* 385–398.
- MAURER, E., AIGNER, M., LASS-FLÖRL, C., BINDER, U. (2019) Hypoxia Decreases Diagnostic Biomarkers for Aspergillosis *in vitro*. *J Fungi* 5:61.
- MAXEINER, J. H., KARWOT, R., HAUSDING, M., SAUER, K. A., SCHOLTES, P., FINOTTO, S. (2007) A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. *Nature Protocols* 2:105–112.
- MCFADDEN, D. C., CASADEVALL, A. (2001) Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 39(1):19–30.
- MERCANTINI, R., MARSELLAM, R., CERVELLATI, C. (1989) Keratinophilic fungi isolated from antarctic soil. *Mycopathologia* 106:47–52.
- METEYER, C. U., BARBER, D., MANDL, J. N. (2012) Pathology in euthermic bats with white nose syndrome suggests a natural manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Virulence* 3(7):583–588.
- METEYER, C. U., BUCKLES, E. L., BLEHERT, D. S., HICKS, A. C., GREEN, D. E., SHEARN-BOCHSLER, V. E., THOMAS, N. J., GARGAS, A., BEHR, M. J. (2009) Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. *J Vet Diagn Invest* 21(4):411–414.
- MEYER, G. H., MORROW, M. B., WYSS, O. (1967) Bacteria, fungi and other biota in the vicinity of Mirny Observatory. *Antarct J US* 2:248–251.
- MINNIS, A. M., LINDNER, D. L. (2013) Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biology* 117(9):638–649.

- MINOPRIO, P., BURLIN, O., PEREIRA, P., GUILBERT, B., ANDRADE L., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M., COUTINHO, A. (1988) Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lacks parasite specificity. *Scandinavian Journal of Immunology* 28:553-561.
- MISSALL, T. A., PUSATERI, M. E., LODGE, J. K. (2004) Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 51(5):1447–1458.
- MÖLLER & DREYFUSS, M. M. (1996) Microfungi from Antarctic lichens, mosses and vascular plants. *Mycologia* 88(6): 922-933.
- MOORE, M. S., FIELD, K. A., BEHR, M. J. TURNER, G. G., FURZE, M. E., STERN, D. W. F., ALLEGRA, P. R., BOUBOULIS, S. A., MUSANTE, C. D., VODZAK, M. E., BIRON, M. E., MEIERHOFER, M. B., FRICK, W. F., FOSTER, J. T., HOWELL, D., KATH, J. A., KURTA, A., NORDQUIST, G., JOHNSON, J. S., LILLEY, H. M., BARRETT, B. W., REEDER, D. M. (2018) Energy conserving thermoregulatory patterns and lower disease severity in a bat resistant to the impacts of white-nose syndrome. *J Comp Physiol B* 188:163–176.
- MORA, D., ARIOLI, S. (2014) Microbial Urease in Health and Disease. *PLoS Pathog* 10(12):e1004472.
- MOREIRA, V. B. (2015) Eficiência reprodutiva e comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/126631/000841528.pdf>
Acessado em: 03 abr. 22.
- MULDER J. L, GHANNOUM M. A., KHAMIS, L., ABU ELTEEN, K. (1989) Growth and lipid composition of some dematiaceous hyphomycete fungi grown at different salinities. *Journal of General Microbiology* 135:3393–3404.
- MULDER, J. L., EL-HENDAWY, H. (1999) Microfungi under stress in Kuwait's coastal saline depressions. *Kuwait Journal of Science and Engineering* 26:157–172.
- MÜLLER, F., ACKERMANN, P., MARGOT, P. (2012) Fungicides, Agricultural, 2. Individual Fungicides. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. *Mycologia* 88:922–933.
- NAVARATHNA, D. H. M. L. P., HARRIS, S. D., ROBERTS, D. D., NICKERSON, K. W. (2010) Evolutionary aspects of urea utilization by fungi. *FEMS Yeast Research* 10 10.
- NETT, J. E., GUITE, K. M., RINGEISEN, A., HOLOYDA, K. A., ANDES, D. R. (2008) Reduced Biocide Susceptibility in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 3411–3413.
- NIKOLAEV, Y. A., PLAKUNOV, V. K. (2007) Biofilm - “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologiya* 76 (2):149-63.
- NOBEL, H., RUIZ, C., MARTIN, H., MORRIS, W., BRUL, S., MOLINA, M., KLIS, F. M. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinase and in an Slr2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotole. *Microbiology* 146:2121-2132.
- NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cel Mic* 5(4)203-223.
- NWHC-USGS (2018) National Wildlife Health Center – White-Nose Syndrome Photo Gallery. Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/portfolio/compendia/normal/90926.img>>. Acesso em: 26 mar. 20.

- OGAKI, M. B., TEIXEIRA, D. R., VIEIRA, R. V., LÍRIO, J. M., FELIZARDO, J. P. S., ABUCHACRA, R. C., CARDOSO, R. P., ZANI, C. L., ALVES, T. M. A., JUNIOR, P. A. S., MURTA, S. M. F., BARBOSA, E. C., OLIVEIRA, J. G., CERAVOLO, I. P., PEREIRA, P. O., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2020) Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles* 24(2):227.
- OGAKI, M. B., PINTO, O. H. B., VIEIRA, R., NETO, A. A., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., ROSA, C. A., CÂMARA, P. E. A. S., ROSA, L. H. (2021) Fungi Present in Antarctic Deep-Sea Sediments Assessed Using DNA Metabarcoding. *Microbial Ecology* 82:157-164.
- OLSZEWSKI, M. A., NOVERR, M. C., CHEN, G. H., TOEWS, G. B., COX, G. M., PERFECT, J. R., HUFFNAGLE, G. B. (2004) Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* 164:1761–1771.
- OLSZEWSKI, M. A., ZHANG, Y., HUFFNAGLE, G. B. (2010) Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiology* 5(8):1269-1288.
- ONOFRI, S. (1999) Antarctic Microfungi. p. 323-336. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-94-011-4838-2_26.pdf>. Acesso em: 26 mar. 20.
- ONOFRI, S., SELBMANN, L., de HOOG, G. S., GRUBE, M., BARRECA, D., RUISI, S., ZUCCONI, L. (2007) Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Science Direct* 40:1657-1664.
- OSMAN, M. E., ABDEL-RAZIK, A. B., ZAKI, K. I., MANDOUH, N. (2022) Isolation, molecular identification of lipid-producing *Rhodotorula diobovata*: optimization of lipid accumulation for biodiesel production. *J Genet Eng Biotechnol* 20:32 .
- PANNKUK, E. L., RISCH, T. S., SAVARY, B. J. (2015) Isolation and Identification of an Extracellular Subtilisin-Like Serine Protease Secreted by the Bat Pathogen *Pseudogymnoascus destructans*. *PLoS One* 10(3):e0120508.
- PARRISH, N. M., RIEDEL, S. (2014) Microbiology Tools for the Epidemiologist. In: Nelson, K. E., Williams, C. M. (Eds) *Infectious disease epidemiology: theory and practice*, Jones & Bartlett Learning, Burlington, USA, Third Edition 198-204.
- PAYNE, S. M. (1993) Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology* 1(2):66–69.
- PEDROSO, V. S. P., VILELA, M. C., SANTOS, P. C., CISALPINO, O. S., ARANTES, R. M. E., RACHID, M. A., TEIXEIRA, A. L. (2010) Development of a murine model of neuroparacoccidioidomycosis. *J Neuroparasitology* 1: 39–44.
- PIACENZA, L., TRUJILLO, M., RADII, R. (2019) Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* 216(3):501–516.
- PIKULA, J., AMELON, S. K., BANDOUCHOVA, H., BARTONIČKA, T., BERKOVA, H., BRICHTA, J., HOOPER, S., KOKUREWICZ, T., KOLARIK, M., KÖLLNER, B., KOVACOVA, V., LINHART, P., PIACEK, V., TURNER, G. G., ZUKAL, J., MARTÍNKOVÁ, N. (2017) White-nose syndrome pathology grading in Nearctic and Palearctic bats. *PLOS ONE* 12(8): e0180435.
- POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R., SOUSA, G. S., ANDRADE, J. C. R., LISBOA, H. F., GONÇALVES, R. C. R. (2017) Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications. <http://dx.doi.org/10.5772/67375>.

- PONATH V., KAINA, B. (2017) Death of Monocytes through Oxidative Burst of Macrophages and Neutrophils: Killing in Trans. PLOS ONE 12(1): e0170347.
- POTTER, M. (1985) BALB/c Mouse. Current Topics in Microbiology and Immunology vol 122. Springer, Berlin, Heidelberg.
- PRICE, M. F., WILKINSON, L. D., GENTRY, L. O. (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 20:7-14.
- PRICE, P. B. (2000). A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(3):1247-1251.
- PUECHMAILLE, S. J., FRICK, W. F., KUNZ, T. H., RACEY, P. A., VOIGT, C. C., WIBBELT, G., TEELING, E. C. (2011) White-nose syndrome: is this emerging disease a threat to European bats? Trends Ecol Evol 26(11):570-576.
- PURIĆ J., VIEIRA, G., CAVALCA, L. B. (2018) Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. Lett Appl Microbiol 66:530–536.
- RAMIREZ, C. M. M (2018) Investigating the factors determining *Aspergillus fumigatus* virulence and the variations of virulence between clinical isolates. Disponível em: <https://researchdirect.westernsydney.edu.au/islandora/object/uws:51345/datastream/PDF/view>. Acesso em: 22 mar. 2022.
- RAPIN, N. JOHNS, K., MARTIN, L., WARNECKE, L., TURNER, J. M., BOLLINGER, T. K., WILLIS, C. K. R., VOYLES, J. MISRA, V. (2014) Activation of innate immuneresponse genes in little brown bats (*Myotis lucifugus*) infected with the fungus *Pseudogymnoascus destructans*. PLoS One. 9(11):e112285.
- RAUDABAUGH, D. B., MILLER, A. N. (2013) Nutritional capability of and substrate suitability for *Pseudogymnoascus destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. PLoS One (10):e78300.
- REEDER, D. M., FRANK, C. L., TURNER, G. G., METEYER, C. U., KURTA, BRITZKE, E. R., VODZAK, M. E., DARLING, S. R., STIHLER, C. W., HICKS, A. C., JACOB, R., GRIENEISEN, L. E., BROWNEE, S. A., MULLER, L. K., BLHERT, D. S. (2012) Frequent Arousal from Hibernation Linked to Severity of Infection and Mortality in Bats with White-Nose Syndrome. PLoS One 7:e38920.
- REICHARD, J. D., KUNZ, T. H. (2009) White-nose syndrome inflicts lasting injuries to the wings of little brown myotis (*Myotis lucifugus*). Acta Chiropt 11:457–464.
- REYNOLDS, H. T., BARTON, H. A. (2014) Comparison of the White-Nose Syndrome Agent *Pseudogymnoascus destructans* to Cave-Dwelling Relatives Suggests Reduced Saprotrophic Enzyme Activity. PLoS One 9(1):e86437.
- RICE, A. V., CURRAH, R. S. (2006) Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora*. Mycologia 98(2):307–318.
- RIDDELL, R. W. (1950) Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. Mycologia 42(2):265-70.
- ROSA, L. H., ALMEIDA VIEIRA, M. D. L., SANTIAGO, I. F., ROSA, C. A. (2010). Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl (Caryophyllaceae) in Antarctica. FEMS microbiology ecology 73(1):178-189.
- ROSA, L. H., VAZ, A. B., CALIGIORNE, R. B., CAMPOLINA, S., ROSA, C. A. (2009). Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia Antarctica* Desv. (Poaceae). Polar biology 32(2):161-167.

- ROSA, L. H., ZANI, C. L., CANTRELL, C. L., DUKE, S. O., DIJCK, P. V., DESIDERI, A., ROSA, C. A. (2019) Fungi in Antarctica: Diversity, Ecology, Effects of Climate Change, and Bioprospection for Bioactive Compounds. In: ROSA L. (eds) Fungi of Antarctica. Springer, Cham.
- ROSA, L., H., de MENEZES, G. C. A., PINTO, O. H. B., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., SIMÕES, J. C., ROSA, C. A., CÂMARA, P. E. A. S. (2022) Fungal diversity in seasonal snow of Martel Inlet, King George Island, South Shetland Islands, assessed using DNA metabarcoding. *Polar Biology* 45:627-636.
- ROSSI, M. A., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., GONÇALVES, S. (1986) Pathogenesis of the apical aneurysm in experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/C mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 80:990-991.
- RUISI, S., BARRECA, D., SELBMANN, L., ZUCCONI, L., ONOFRI, S. (2007). Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 6:127-141.
- RUSSO, M., STAROBINAS, N., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., MINOPRIO, P., EISEN, H., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. (1989) Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology* 11:385-395.
- RUTHERFORD, J. C. (2014) The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. *PLoS Pathog* 10:e1004062.
- SABLE, C.A., STROHMAIER, K.M., CHODAKEWITZ, J. A. (2008) Advances in antifungal therapy. *Annu Rev Med* 59:361-79.
- SAMSON, R. A. (1972) Notes on *Pseudogymnoascus*, *Gymnoascus* and related genera. *Acta bot Neeri* 21(5)517-527.
- SAMSON, R. A., VISAGIE, C. M., HOUBRAKEN, J., HONG, S.-B., HUBKA, V., KLAASSEN, C. H. W., PERRONE, G., SEIFERT, K. A., SUSCA, A., TANNEY, J. B., VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, G., YAGUCHI, T., FRISVAD, J. C. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78:141-173.
- SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F. (1984) Molecular aspects of fungal dimorphism. *Crit Rev Microbiol* 11:101-127.
- SANGLARD, D., ISCHER, F., MARCHETTI, O., ENTENZA, J., BILLE, J. (2003) Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* 48(4):959-976.
- SANTIAGO, I. F., SOARES, M.A., ROSA, C.H., ROSA, L.H. (2015) Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. *Extremophiles* 19:1087-1097.
- SANTIAGO, M., RAMÍREZ-SARMIENTO, C. A., ZAMORA, R. A. (2016) Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Front Microbiol* 7:1408.
- SANTOS, B. F. (2006) Criação e Manejo de Camundongos. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C. OLIVEIRA, R. S. Animais de laboratório: criação e experimentação. Fiocruz.
- SANTOS, D. A., HAMDAN, J. S. (2005) Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. *Jor of Clin Mic* 43(4):1917 - 1920.
- SANTOS, J. R., HOLANDA, R. A., FRASES, S., BRAVIM, M., ARAUJO, G. E. S., SANTOS, P. C., COSTA, M. C., RIBEIRO, M. J., FERREIRA, G. F., BALTAZAR, L. M.,

- MIRANDA, A. S., OLIVEIRA, D. B., SANTOS, C. M., FONTES, A. C., GOUVEIA, L. F., RESENDE-STOIANOFF, M. A., ABRAHÃO, J. S., TEIXEIRA, A. L., PAIXÃO, T. A., SOUZA, D. G. AND SANTOS, D. A. (2014) Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. PLoS One 9(11):e112669.
- SAPARRAT, M. C., GUILLEN, F., ARAMBARRI, A. M., MARTINEZ, A. T., MARTINEZ, M. J. (2002) Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Appl Environ Microbiol 68(4):1534–40.
- SCHAEFER, A. L., CEESAY, M., LEIER, J. A., TESCH, J., WISENDEN, B. D., PANDEY, S. (2020) Factors Contributing to Sex Differences in Mice Inhaling *Aspergillus fumigatus*. International journal of environmental research and public health 17(23):8851.
- SCIENTIFIC, T. F. (2008) NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. Disponível em: <<http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 20.
- SEGAL, L. M., WILSON, R. A. (2018) Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. Fungal Genet Biol. 110:1–9.
- SELBMANN, L., DE HOOG, G. S., MAZZAGLIA, A., FRIEDMANN, E. I., ONOFRI, S. (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. Stud Mycol 51:1-32.
- SETIADI, E. R., DOEDT, T., COTTIER, F., NOFFZ, C., ERNST, J. F. (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: Linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. J Mol Biol. p. 361:399–411.
- SHIVAJI, S., PRASAD, G. S. (2009) Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. p. 3-18. Disponível em: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-8292-4_1.pdf>. Acesso em: 26 mar. 20.
- SILVA, J. C., PIRMEZ, C., MORGADO, M. G., GALVÃO-CASTRO, B. (1985) Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: Correlation of immune complexes and other serological features with muscle lesions during the infection. Parasite Immunology 7:457-466.
- SILVA, S. O. (2001) Oxidação de Melatonina catalisada por Mieloperoxidase em neutrófilos ativados. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-03122006-222507/publico/dissertacao.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 20.
- SOARES, B. M., ALVES, O. A., FERREIRA, M. V. L., AMORIM, J. C. F., SOUSA, G. R., SILVEIRA, L. B. S., PRATES, R. A., AVILA, T. V., BALTAZAR, L. M., SOUZA, D. G. S., SANTOS, D. A., MODOLO, L. V., CISALPINO, P. S., PINOTTI, M. (2011) *Cryptococcus gattii*: In Vitro Susceptibility to Photodynamic Inactivation. Photochemistry and Photobiology 87(2):357–364.
- SILVA, D. L., MAGALHÃES, T. F., DOS SANTOS, J. R., DE PAULA, T. P., MODOLO, L. V., DE FÁTIMA, A., BUZANELLO MARTINS, C. V., SANTOS, D. A., DE RESENDE STOIANOFF, M. A. (2016) Curcumin enhances the activity of fluconazole against *Cryptococcus gattii*-induced cryptococcosis infection in mice. J Appl Microbiol 120(1):41-8.
- SOUZA, J. R. P., GONÇALVES, V. N., de HOLANDA, R. A., SANTOS, D. A., BUELONI, C. F. L. G., COSTA, A. O., PETRY, M. V., ROSA C. A., ROSA, L. H. (2017) Pathogenic potential of environmental resident fungi from ornithogenic soils of Antarctica, Fungal Biology 121(12):991-1000.

- SOUZA, R. K. F. (2013) Hipoxia durante o crescimento micelial induz o aumento de tolerância de conídios de fungos entomopatogênicos ao calor e ao menadione. Disponível em: <<https://biblioteca.univap.br/dados/000004/00000476.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 20.
- SWANSON, M. S., HAMMER, B. K. (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 54:567-613.
- TABORDA, C. P., da SILVA, M. B., NOSANCHUCK, J. D., TRAVASSOS, L. R. (2008) Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* 165(4-5):331-339.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- TATUR, A. (1989) Ornithogenic soils of the Maritime Antarctic. *Pol Polar Res* 4:481-532.
- THAPA, V., TURNER, G. G., HAFENSTEI, S., OVERTON, B. E., VANDERWOLF, K. J., ROOSSINCK, M. J. (2016) Using a Novel Partitivirus in *Pseudogymnoascus destructans* to Understand the Epidemiology of White-Nose Syndrome. *PLOS Pathogens* 12(12): e1006076.
- TSIODRAS, S., PAPAGEORGIOU, S., MELETIADIS, J., TOFAS, P., PAPPA, V., PANAYIOTIDES, J., KARAKITSOS, P., ARMAGANIDIS, A., PETRIKKOS, G. (2014) *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review. *Medical mycology case reports* 6:46-50.
- TOJO, S., NAGAUMA, F., ARAKAWA, K., YOKOO, S. (2000) Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 46:1129-35.
- TOMAZETT, P. K., CASTRO, N. S., LENZI, H. L., ALMEIDA, C. M. S., PEREIRA, M. (2011) Response of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 to stressor agents and cell wall osmoregulators. *Fungal Biology* 115(1):62-69.
- TOMEE, J. F. C. H., KAUFFMAN, H. F. (2000) Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical & Experimental Allergy* 30:476-484.
- TSUJI, M., FUJII, S., XIÃO, N., HANADA, Y., KUDOSH, S., KONDO, H., TSUDA, S., HOSHINO, T. (2013) Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. *FEMS Microbiol Lett* 346:121-130.
- TURBILL, C., GEISER, F. (2008) Hibernation in tree-roosting bats. *Journal of Comparative Physiology* 178B:597-605.
- VERANT, M. L., BOYLES, J. G., WALDREP, W. J. (2012) Temperature-dependent growth of *Geomyces destructans*, the fungus that causes bat white-nose syndrome. *PLoS One* 7(9):e46280.
- VILA, T.; SULTAN, A. S.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; JABRA-RIZK, M. A. (2020) Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J. Fungi* 6:15.
- VILLANUEVA, P., VÁSQUEZ, G., GIL-DURÁN, C., OLIVIA, V., DÍAZ, A., HENRÍQUEZ, M., ÁLVARES, E., LAICH, F., CHÁVES, R., VACA, I. (2021) Description of the First Four Species of the Genus *Pseudogymnoascus* from Antarctica. *Front. Microbiol.* 12:713189.
- WANG Y., CHEN L., LIU, X., CHENG, D., LIU, G., LIU, Y., DOU, S., HNATOWICH, D. J., RUSCKOWSKI, M. (2013) Detection of *Aspergillus fumigatus* pulmonary fungal infections in mice with (99m) Tc-labeled MORF oligomers targeting ribosomal RNA. *Nucl Med Biol* 40(1):89-96.
- WARNECKE, L., TURNER, J. M., BOLLINGER, LORCH, J. M., MISRA, V., CRYAN, P. M., WIBBELT, G., BLHERT, D. S., CRAIG, K. R. (2012) Inoculation of bats with European

Geomyces destructans supports the novel pathogen hypothesis for the origin of white-nose syndrome PNAS 109(18):6999-7003.

WARNECKE, L., TURNER, J. M., BOLLINGER, T. K., MISRA, V., CRYAN, P. M., BLHERT, D. S., WIBBELT, G., WILLIS, C. K. (2013) Pathophysiology of white-nose syndrome in bats: a mechanistic model linking wing damage to mortality. Biol. Letters 9:20130177.

WATANABE, T., TAKANO, M., MURAKAMI, M., TANAKA, H., MATSUHISA, A., NAKAO, N., MIKAMI, T., SUZUKI, M., MATSUMOTO, T. (1999) Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. Microbiology 145 (Pt 3):689–694.

WATANABE, Y., TAKAESU, G., HAGIWARA, M., IRIE, K., MATSUMOTO, K. (1997) Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway. Molecular and Cellular Biology 17(5):2615-2623.

WEINSTEIN, R. N., MONTIEL, P. O., JOHNSTONE, K. (2000) Influence of Growth Temperature on Lipid and Soluble Carbohydrate Synthesis by Fungi Isolated from Fellfield Soil in the Maritime Antarctic. Mycologia 92:222–229.

WEST, J. B. (2013) Fisiologia Respiratória: Princípios Básicos. 9ª ed. São Paulo: Artmed.

WIBBELT, G. (2018) White-Nose Syndrome in Hibernating Bats. In: SEYEDMOUSAVI, S., de HOOG G., GUILLOT, J., VERWEIJ, P. (eds) Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals. Springer, Cham.

WILDER, A.P., FRICK, W. F., LANGWIG, K. E., KUNZ, T. W. (2011) Risk factors associated with mortality from white-nose syndrome among hibernating bat colonies. Biology Letters 7:950–953.

WILSON, M. B., HELD, B. W., FREIBORG, A. H., BLANCHETTE, R. A., SALOMON, C. E. (2017) Resource capture and competitive ability of non-pathogenic *Pseudogymnoascus* spp. and *P. destructans*, the cause of white-nose syndrome in bats. PLoS ONE 12(6):e0178968.

WIRTH, F., GOLDANI, L. Z. (2012) Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. Interdiscip Perspect Infect Dis 2012:465717.

YAGI, K., USHIKUBO, M., MAESHIMA, A. (2019) Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus lentulus* in an adult patient: A case report and literature review. Journal of Infection and Chemotherapy 25:547–551.

YIKE, I. (2011) Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. Mycopathologia 171:299–323.

YOUNGCHIM, S., MORRIS-JONES, R., HAY, R., HAMILTON, A. J. (2004) Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. Journal of Medical Microbiology 53(3):175–181.

ZAJC, J., LIU, Y., DAI, W., YANG, Z., HU, J., GOSTINCAR, C., C. ZAJC, J., LIU, Y., DAI, W., YANG, Z., HU, J., Gostincar, C. GUNDE-CIMERMAN, N. (2013) Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absen. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/617/>. Acesso em: 04 abr. 22.

ZAJC, J., SAŠO, D., DRAGI, K., AHARON, O., SILVA, S., ROK, T., NINA, G. (2014) Chaophilic or chaotolerant fungi: a new category of extremophiles? Chaophilic or chaotolerant fungi: a new category of extremophiles? Front. Microbiol. 5:708.

ZANUTO, R. P. L., de PAULA, W. C. J., LORENZETI, L. C., MEDICI, F. (2011). Metabolismo celular. In: Loyelo T. (Ed). Biologia e Bioquímica bases aplicadas às Ciências da Saúde. Brasil: Phorte editora pp. 209-210.

- ZARAGOSA, O., de VIRGILIO, C., PONTÓN, J., GANCEDO, C. (2002) Disruption in *Candida albicans* of the TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. Microbiology. May;148(Pt 5):1281-90.
- ZHANG, T., XIANG, H. B., ZHANG, Y. Q., LIU, H. Y., WEI, Y. Z., ZHAO, L. X., YU, L. Y. (2013). Molecular analysis of fungal diversity associated with three bryophyte species in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. Extremophiles (5):757-765.
- ZHANG, Z, JIANG, Y., CHEN. J., CHEN, P., KONG, Q., LU, L., SANG, H. (2019) *In vitro* and *in vivo* characterization of two nonsporulating *Aspergillus fumigatus* clinical isolates from immunocompetent patients. Med Mycol 1:58(4):543-551.
- ZHONG, Z., McDONALD, B. A., PALMA-GUERRERO, J. (2021). A tolerância ao estresse oxidativo está associada tanto à resposta ao estresse oxidativo quanto ao crescimento inerente em um patógeno fúngico do trigo. Genetics 217(2): iyaa022.
- ZUCCONI, L., PAGANO, S., FENICE, M., SELBMAN, L., TOSI, S., ONOFRI, S. (1996) Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica. Polar Biol 16:53–61.
- ZUKAL, J., BANDOUCHOVA, H., BRICHTA, J., CMOKOVA, A., JARON, K. S., KOLARIK, M., KOVACOVA, V., KUBÁTOVÁ, A., KUBÁTOVÁ, A., ORLOV, O., PIKULA, J., PRIMOŽ PRESETNIK, ŠUBA, J., ZAHRDNÍKOVÁ, A. Jr., MARTÍNKOVÁ, N. (2016) White-nose syndrome without borders: *Pseudogymnoascus destructans* infection tolerated in Europe and Palearctic Asia but not in North America. Scientific Reports. 2016(6):1982.

9. Anexos

9.1 Anexo 1 – Protocolo 172/2020 - Aprovação CEUA/UFMG

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 172/2020 Título do projeto: Caracterização in vivo da virulência de linhagens de <i>Pseudogymnoascus</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Rhodotorula</i> isolados da Antártica Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Luiz Henrique Rosa Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas Departamento: Departamento de Microbiologia	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião "on line" do dia 14/09/2020. Validade: 14/09/2020 à 13/09/2025.	
Belo Horizonte, 14/09/2020.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG	

9.2 Anexo 2 – Does Maritime Antarctic permafrost harbor environmental fungi with pathogenic potential?

Fungal Biology xxx (xxxx) 1–10



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio



Does maritime Antarctic permafrost harbor environmental fungi with pathogenic potential?

Thamar Holanda da Silva^a, Eldon Carlos Queres Gomes^a, Vívian Nicolau Gonçalves^a,
Marliete Carvalho da Costa^a, Aline Dias Valério^a, Daniel de Assis Santos^a, Susana Johann^a,
Peter Convey^{b, c}, Carlos Augusto Rosa^a, Luiz Henrique Rosa^{a, *}

^a Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil

^b British Antarctic Survey, NERC, High Cross, Madingley Road, Cambridge, CB3 0ET, United Kingdom

^c Department of Zoology, University of Johannesburg, PO Box 524, Auckland Park, 2006, South Africa

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2022

Received in revised form 2 April 2022

Accepted 12 April 2022

Corresponding Editor: Filipa Cox

Keywords:

Antarctica

Climate changes

Pathogenicity

ABSTRACT

We assessed the potentially pathogenic fungi in Antarctic permafrost and the overlying active layer on King George, Robert, Livingston and Deception Islands in the South Shetland Islands archipelago, maritime Antarctica. Permafrost and active layer sub-samples were incubated at 37 °C to select fungi able to grow inside the human body. A total 67 fungal isolates were obtained, 27 from the permafrost and 40 from the active layer. These represented 18 taxa of the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhodotorula* and *Talaromyces*. The majority of fungi detected occurred exclusively either in the permafrost or the active layer at each site. Only *Aspergillus thermomutatus*, *Penicillium* cf. *chrysogenum* and *Rhodotorula* cf. *mucilaginosa* in both permafrost and active layer samples at the same site. The yeast *R. cf. mucilaginosa* was recovered from both in at least two sites. The genus *Penicillium* was the most abundant and widely distributed genus in both permafrost and active layer samples across the sites sampled. All fungal isolates were screened using enzymatic, pH and antifungal assays to identify their virulence potential. *Aspergillus hirsutiae*, *A. thermomutatus* and *R. cf. mucilaginosa*, known human opportunistic fungi, were identified, displayed phospholipase, esterase, proteinase and hemolytic activities. *A. thermomutatus*, *A. hirsutiae* and *R. cf. mucilaginosa* displayed the ability to grow at 40°, 45° and/or 50 °C and resistance to fluconazole and itraconazole; additionally, *R. cf. mucilaginosa* showed resistance to amphotericin B and viability after 100 d at –80 °C. *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 kill the entire larvae of *Tenebrio molitor* in six days and *R. cf. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and 17473 in three and four days, respectively. The melting of maritime Antarctica permafrost as a result of climate change may threaten the release wild strains of pathogenic fungi geographically isolated for long time, which may in turn be transported within and beyond Antarctica by different biological and non-biological vectors.

© 20XX

1. Introduction

Climatic changes have led to impacts globally, including on the biota and ecosystems of the cryosphere (Elster et al., 2017). The discovery of *Bacillus anthracis* in thawing Arctic permafrost (Reviv and Podolnaya, 2011) and of two new viruses (*Pithovirus sibericum* and *Mollivirus sibericum*) that retained their infectivity obtained permafrost frozen from prehistoric times (Legendre et al., 2015) highlighted the importance of increasing knowledge of the microbial diversity present in permafrost. The Antarctic Peninsula is a region that has experienced some of the

most rapid warming globally since the mid-Twentieth Century (Maxwell and Barrie, 1989; Ramos et al., 2017), leading to melting of permafrost and changes in thickness of the overlying soil active layer (Guglielmin and Cannone, 2012), and impacting its resident biota (Convey and Peck, 2019).

Permafrost is defined as ground (soil, sediment, rock) that remains frozen at temperatures ≤0 °C continuously for at least two consecutive years (Margesin and Collins, 2019). Antarctica hosts approximately 37% of the world's permafrost (French, 1996; Xue et al., 2020). In situations where permafrost temperatures remain constantly well below zero, between –18°–27 °C, viable microbes can be preserved for centuries or longer in the permafrost (Vorobyova et al., 1997).

Antarctic ecosystems host considerable fungal diversity. The dominant phyla are generally *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*

* Corresponding author. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, CEP 31270-901, Brazil.

E-mail address: lhrosa@icb.ufmg.br (L.H. Rosa).

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.04.003>

1878-6146/© 20XX

and *Mucoromycota* (Rosa et al., 2019) while others including *Rozellomycota*, *Chytridiomycota*, *Aphelidiomycota*, *Basidiobolomycota*, *Blastocladiomycota* and *Monoblepharomycota* are also noted (Rosa et al., 2022; de Souza et al., 2022). To survive the multiple extreme environmental stresses that characterize Antarctica, these fungi display a range of adaptations and strategies such as the ability to form multicellular spores, presence of melanin in the cell wall, production of cryoprotectants and the synthesis of low temperature functioning enzymes, amongst other features (Robinson, 2001; Buzzini et al., 2012).

In Antarctica, as elsewhere, fungal dormancy may be broken by temperature increase (Casadevall et al., 2019). If specific fungi are dormant but remain viable in permafrost, this raises the possibility of their release into active ecosystems, with potentially deleterious consequences for humans or other organisms. Many human fungal pathogens have environmental origin, causing disease when they occasionally and often accidentally enter into contact with human hosts (Casadevall, 2007; Bliska and Casadevall, 2009; Brunke et al., 2016). Elsewhere, reports are already available documenting the emergence of pathogens such as *Candida auris* and *Batrachochytrium dendrobatidis* connected directly with climatic changes (Hof et al., 2011; Casadevall et al., 2019).

The Earth's cryospheric ecosystems, including those of Antarctica, are changing quickly and, unfortunately, understanding of the ecology and diversity of their resident microorganisms is at a very early stage (Nikrad et al., 2016). In the current study, we characterized using culturing approaches the viable fungi present in permafrost and its overlying active layer on different islands in the South Shetland Islands archipelago (maritime Antarctica) and assessed their potential virulence *in vitro* and *in vivo* against the invertebrate model *Tenebrio molitor*.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Samples of permafrost and active layer soils were obtained during the Antarctic summer of 2017–2018 from sites on Robert, Livingston, King George (Thomas Point and Keller Peninsula), and Deception (Crater Lake and Whalers Bay) Islands, South Shetland Islands, maritime Antarctica (Fig. 1). Approximately 10 cm of superficial soil was first removed using a sterilized (70% alcohol) ice axe to reach the active layer (1–30 cm above the permafrost) and then the permafrost itself (5–30 cm depths). These were sampled using sterilized (70% alcohol) spatulas and stored in sterilized Whirl-Pak bags (Sigma–Aldrich, USA) in duplicate. At each collection site, 500 g each of active layer or permafrost soil were sampled and rapidly frozen at -20°C until processing.

2.2. Fungal isolation

For fungal isolation, 9 mL of 0.85% NaCl was mixed with 1 g of each sample and 100 μL of a 10^{-1} dilution of this mixture was inoculated into the following media: Minimal Media (MM) (peptone, 0.025%, glucose 0.5%, K_2HPO_4 0.698%, KH_2PO_4 0.544%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.11% and agar 2%), Dichloran Rose Bengal Agar (DRBC) (Oxoid, USA), Sabouraud Agar (SAB) (Himedia, India) or Dichloran Glycerol Agar (DG18) (Oxoid, USA). All media also contained 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of chloramphenicol (Sigma, USA). The Petri dishes containing the different media were incubated at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for a period of up to 30 d. Numbers of colony forming units (CFU) were used to assess the abundance of each taxon. YM medium (glucose 1%, yeast extract 0.03%, malt extract 0.03%, agar 2%, and peptone 0.05%) was used for purification of representative isolates of each fungal morphotype ob-

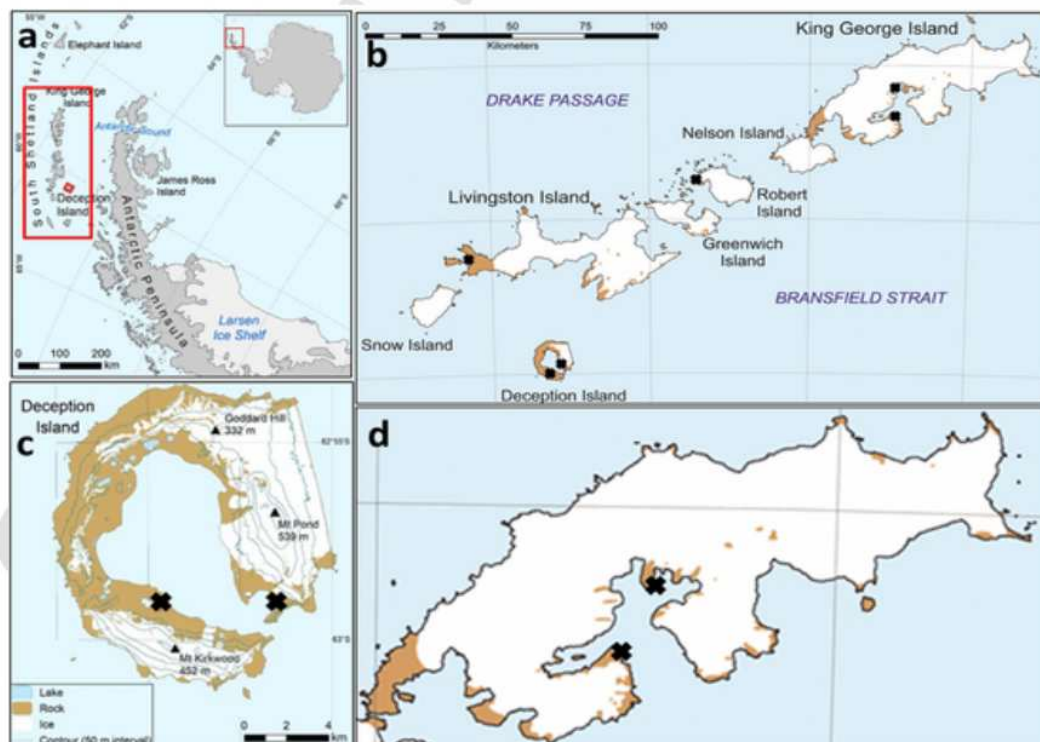


Fig. 1. The South Shetland Islands in maritime Antarctica where the samples were obtained. **a** = South Shetland Islands; **b** = Location of King George, Robert ($62^{\circ}37'S/59^{\circ}70'W$), Livingston ($62^{\circ}11'476''W/57^{\circ}16'475''S$) and Deception Islands; **c** = Deception Island, Whalers Bay ($60^{\circ}33'24.3''W/62^{\circ}58'40.1''S$) and Crater Lake ($60^{\circ}39'47.7''W/62^{\circ}58'52.8''S$); **d** = King George Island, Keller Peninsula ($58^{\circ}23'658''W/62^{\circ}04'894''S$) and Thomas Point ($58^{\circ}28'36.6''W/62^{\circ}09'32.2''S$).

tained, which were deposited in the form of Castellani using distilled water at room temperature (Castellani, 1967) and cryotubes at -80°C in the Collection of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal de Minas Gerais under the code UFMGCB.

2.3. Fungal identification and distribution

Fungal identification was performed using different protocols for filamentous fungi and yeasts. DNA extraction and the amplification of the transcribed internal spacer (ITS-5.8S) region, using primers ITS1 and ITS4, for filamentous fungi, was carried out as described by Rosa et al. (2009). Molecular identities for yeasts were confirmed by sequencing the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene using the primers NL1 and NL4 (White et al., 1990; Lachance et al., 1999). For genera that have a high polymorphism index, we performed a partial amplification of the β -tubulin gene, using the primers BT2a and BT2b (Glass and Donaldson, 1995), and ribosomal polymerase II gene, with primers RPB2 5F and RPB2 7R (Malkus et al., 2006). Sequences of each fungal taxon were deposited into GenBank database (Table 1). All sequences obtained were compared with sequences of ex type species retrieved from the NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen-

Bank database using the BLASTn program (Basic Locus Search Alignment Tool) (Altschul et al., 1997). Taxonomic information about fungal classification followed MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and the Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>). Venn diagrams were prepared as described by Bardou et al. (2014) to illustrate the comparison of fungal assemblages present in the permafrost and overlying active layer at the different sites sampled.

2.4. Inoculum standardization for in vitro pathogenic potential assays

Filamentous fungi were grown for 7 d on potato dextrose agar (PDA, Himedia/India) and discs of 5 mm diameter were used as inocula. Yeasts were grown in YM media for 48 h, and the transmittance of the medium was determined using a spectrophotometer at 530 nm. The inoculum used in the experiment showed 75–77% transmittance, which is equivalent to $0.5\text{--}5 \times 10^6$ CFU mL^{-1} . For the assays, 10 μL of the standardized suspension was inoculated.

Table 1

Identification of fungal isolates cultured at 37°C from permafrost and overlying active layer soils sampled from the South Shetland Islands, maritime Antarctica.

Island/Substrate	UFMGCB ^a	N ^o of isolates	Density (CFU ^b g^{-1})	Top BLAST search results (GenBank accession number)	QC ^c (%)	ID ^b (%)	N ^o of bp analyzed	Proposed taxa (GenBank accession number)
Deception (Whalers Bay)	17455 ^c	1	100	<i>Curvularia lunata</i> (NR138223)	100	100	395	<i>Curvularia</i> sp. (MW131303)
Active Layer	17457 ^c	4	> 300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NR077145)	100	100	417	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i> (MW165332)
	17461 ^f	1	> 300	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG055716)	100	100	396	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i> (MW177719)
Permafrost	17477 ^c	2	10	<i>Montagnula chromolaenica</i> (NR168866)	100	100	391	<i>Montagnula chromolaenica</i> (MW131304)
	17480 ^c	6	> 300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668)	100	100	650	<i>Penicillium</i> sp. 1 (MW177713)
	17475 ^c	1	25	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668)	100	99	865	<i>Penicillium</i> sp. 2 (MW177712)
	17478 ^c	1	110	<i>Talaromyces atroroseus</i> (NR137815)	95	100	457	<i>Talaromyces</i> sp. (MW131305)
	17473 ^g	1	> 300	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG055716)	100	99	424	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i> (MW165461)
King George (EACF)	17408 ^c	9	83.3	<i>Neosartorya pseudofischeri</i> (EF669734)	100	100	697	<i>Aspergillus thermomutatus</i> (MW177715)
Active Layer	17410 ^c	6	41.6	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NR077145)	100	100	463	<i>Penicillium</i> sp. (MW165331)
Permafrost	17415 ^c	1	10	<i>Neosartorya pseudofischeri</i> (EF669734)	100	100	468	<i>Aspergillus thermomutatus</i> (MW177714)
King George (Arctowski)	17431 ^c	1	10	<i>Alternaria sorghi</i> (NR160246)	100	99	400	<i>Alternaria</i> sp. (MW131306)
Active Layer	17434 ^c	11	91.8	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NR077145)	100	100	427	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i> (MW165333)
	17428 ^c	4	107.5	<i>Penicillium rubens</i> (JF909926)	100	100	658	<i>Penicillium rubens</i> (MW177717)
	17436 ^f	1	20	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG055716)	100	100	334	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i> (MW177720)
Permafrost	17442 ^d	1	> 300	<i>Aspergillus hiratsukae</i> (NR131310)	100	100	482	<i>Aspergillus hiratsukae</i> (MW139282)
	17445 ^c	5	> 300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668)	100	99	629	<i>Penicillium</i> sp. 3 (MW177716)
	17452 ^c	1	> 300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JF909937)	100	99	672	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i> (MW177718)
	17448 ^f	1	> 300	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG055716)	100	100	305	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i> (MW177721)
Livingston	16227 ^c	2	90	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (MH865983)	100	100	460	<i>Penicillium</i> cf. <i>tardochrysogenum</i> (MW165334)
Active Layer								
Permafrost	16225 ^c	7	> 300	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (MH865983)	100	100	465	<i>Penicillium</i> cf. <i>tardochrysogenum</i> (MW165335)

^a UFMGCB = Collection of microorganisms and cells from the Universidade Federal de Minas Gerais.

^b CFU = colony forming units. Taxa submitted to phylogenetic analysis based on.

^c ITS1-5.8S-ITS2.

^d β -tubulina.

^e RNA polymerase 2.

^f D1/D2.

^g Query cover (%).

^h Identity (%).

2.5. pH tolerance

The protocol established by Davis (2009) was used to assess the pH tolerance of the fungi obtained from the samples. All fungi were grown in Petri dishes with YM agar adjusted to simulate the pH of parts of the human body: pH 4 (vaginal pH), pH 7 (tissue and blood pH), or pH 9 (intestinal pH) at 37 °C for 7 d. The experiment was conducted in triplicate and the presence of fungal growth was assessed on completion.

2.6. Production of hydrolytic enzymes (proteinase and phospholipase)

Assays of phospholipase and proteinase production were performed for all fungi obtained. Assessment of production of hydrolytic enzymes followed protocols established by Price et al. (1982) and Aoki et al. (1990) for phospholipase and proteinase, respectively. For assessing phospholipase activity the medium consisted of sodium chloride (5.88%), calcium chloride (0.05%) and Sabouraud agar (2%). The medium was autoclaved, cooled to approximately 40 °C and egg yolk emulsion added to a final concentration of 4%. The plates were incubated at 37 °C for 7 d. Formation of a precipitation halo around colonies indicated phospholipase production. *Candida albicans* ATCC 10231 was used as the positive control and the experiment was performed in triplicate.

To assess proteinase activity, the fungi were inoculated on bovine serum albumin (BSA) plates (1.17% yeast carbon base, 0.1% yeast extract, 0.2% bovine serum albumin, 2% agar, at pH 5) and incubated for 7 d at 37 °C. A positive result was again given by the formation of a halo on the medium. The halo measurement was used to calculate the proteolytic enzymatic activity (Pz), based on the ratio between the diameter of the colony and of the degradation zone of the substrate. The degradation zone was classified as very strong (Pz ≤ 0.69), strong (Pz between 0.70 and 0.79), normal (Pz between 0.80 and 0.89), weak (Pz between 0.90 and 0.99) or not present (Pz = 1).

2.7. Hemolytic activity

All fungi obtained were inoculated on Sabouraud dextrose agar supplemented with sheep blood (7%) and 200 µg mL⁻¹ chloramphenicol to verify hemolytic capacity, following Luo et al. (2001) with modifications. The occurrence of hemolysis in the medium is indicated by the presence of clear halo (Donohue et al., 2006; Batool et al., 2013; Ghorbel et al., 2019).

2.8. Thermotolerance survival assay

Fungi were subjected to high temperature exposure to simulation a host feverish state. The isolates were grown in YM media and incubated at 40°, 45° or 50 °C for 7 d. Evaluation of fungal growth was carried out visually.

2.9. Esterase activity

Esterase activity was assessed following Carrasco et al. (2012). The isolates were grown in medium composed of 1% bacto peptone, 0.5% NaCl, 0.4% CaCl₂ 2H₂O, and 1% Tween 80. Esterase activity was indicated by the formation of a white precipitate around the fungal colony.

2.10. Antifungal susceptibility assay

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was assessed using microtiter plates. The methodology used followed the CLSI guidelines in the M-27-A3 protocol (CLSI, 2008). The antifungal compounds fluconazole, itraconazole and amphotericin B (Sigma-Aldrich, USA) were diluted to prepare stock solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Fluconazole was tested in the range

64–0.125 µg mL⁻¹, while itraconazole was used in the final concentration range of 16–0.03 µg mL⁻¹ and amphotericin B 8–0.015 µg mL⁻¹. RPMI medium with 0.165 mol L⁻¹ MOPS was the culture medium used in the test. The plates were incubated at 37 °C and visual reading was performed after 24 and 48 h. The microtiter plates in which the wells were 80% inhibition was observed and for amphotericin B the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) was evaluated in wells with 100% inhibition. Antifungal susceptibility testing was repeated at least three times on different days. The breakpoints for interpretation of MICs for antifungal agents were made using data from CLSI.

2.11. Freezing temperature survival

Fungi were held at –80 °C for to 100 days to determine their survival capabilities. The following controls were prepared: i) fungi + glycerol 15%; ii) fungi + H₂O; iii) fungi + saline solution 0.85%; iv) fungi alone. After the incubation period, three discs of isolates were placed on BDA plates and incubated at 37 °C for 7 d.

2.12. In vivo virulence assay in the host invertebrate model *Tenebrio molitor*

The *in vivo* assay model used larvae of the invertebrate *Tenebrio molitor* as described by Silva et al. (2018). Briefly, *T. molitor* beetle larvae were commercially obtained (Senhor Tenebrios Company, Brazil) and maintained in our laboratory. To perform survival analyses, larvae of 0.1–0.2 g mass without signs of contamination, spots or exoskeleton changes were selected. Each larva, after cleaning with 70% ethanol, was infected directly into the hemocele using a Hamilton syringe (701N, caliber 26, 10 µL capacity). Five microliters of 10⁵ suspensions for the isolates *Rhodotorula cf. mucilaginosa* UFMGCB 10448, *R. cf. mucilaginosa* UFMGCB 10473 (cells) or *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 10415 (spores) were injected into the *T. molitor* larvae. Each experimental group consisted of 10 larvae, using uninfected larvae, PBS infected larvae, larvae infected with the target fungi and or larvae infected with *C. albicans* SC5314 (positive control). The control group was inoculated with 5 µL of Phosphate Buffered Saline (PBS). Infected larvae and negative controls were incubated in Petri dishes at 37 °C and their viability was examined at 24 h intervals over 10 d. The larvae were considered dead if they did not respond to mechanical stimulus. Survival curves were plotted and statistical analyses were performed using the Log-rank (Mantel–Cox) test with Graph Pad Prism software and were considered statistically significant at *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Fungal taxonomy and distribution

A total of 67 fungal isolates were obtained, 27 from the permafrost and 40 from the overlying active layer sampled on Livingston, King George and Deception Islands (Table 1). All isolates were able to grow at 37 °C. The isolates represented in 18 taxa belonging to the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhodotorula* and *Talaromyces*; in addition, one taxon was identified at the family level as *Pleosporales* sp. The assemblages from Thomas Point Samples (King George Island) displayed the highest diversity (24 isolates). No fungal isolates were recovered from the samples obtained on Robert and Deception (Crater Lake) Islands.

The level of similarity between the fungal diversity detected in the permafrost and overlying active layer soils varied across the study sites (Fig. 2). The majority of fungi detected occurred exclusively in either permafrost or active layer soil and at a specific site. As exceptions to this, *A. thermomutatus*, *Penicillium cf. chrysogenum* and *Rhodotorula cf. mucilaginosa* were detected in both permafrost and active layer samples (Fig. 2a). The yeast *R. cf. mucilaginosa* was recovered in high densities (> 300 CFU g⁻¹) from both permafrost and active layer soils of Whalers

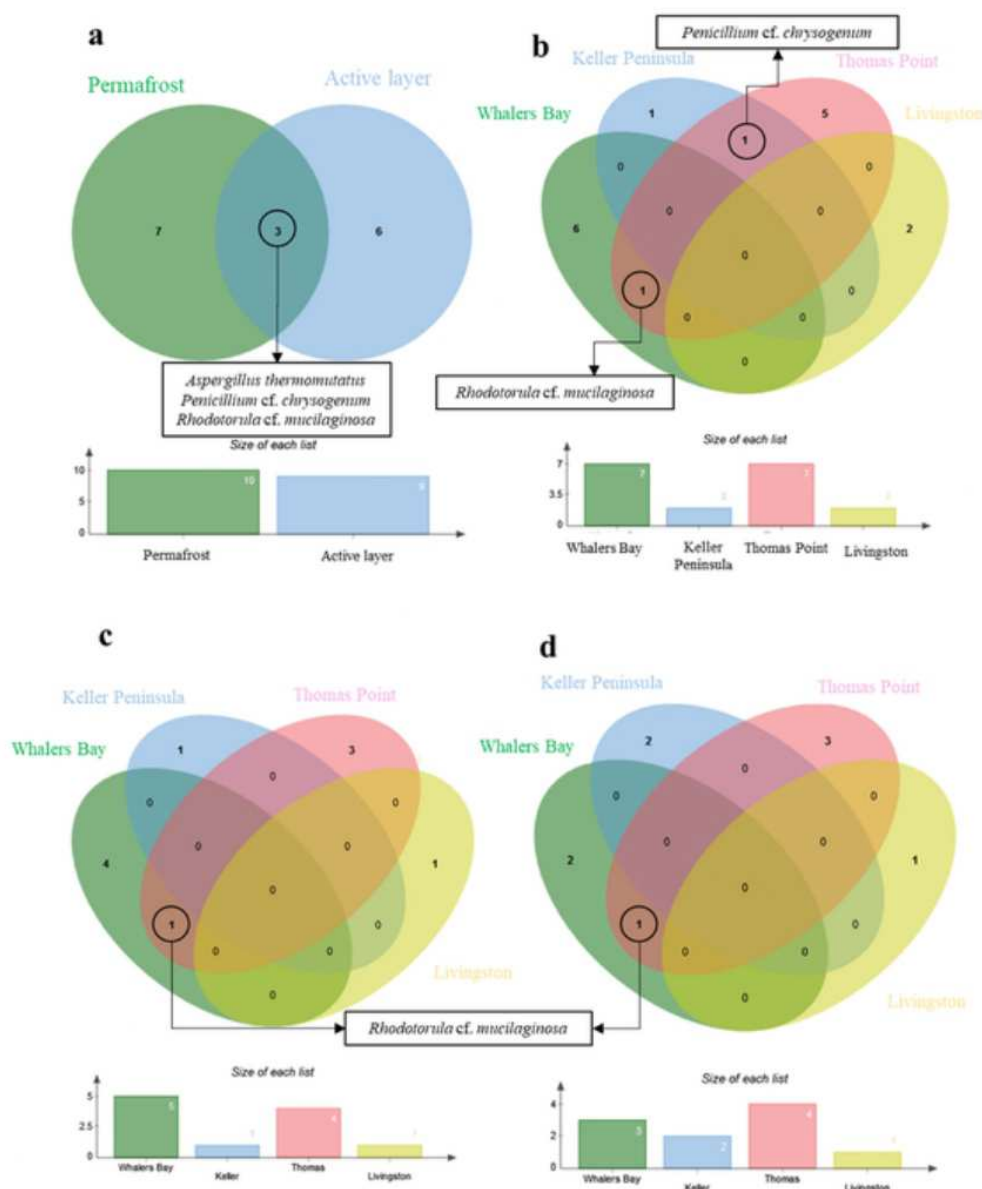


Fig. 2. Venn diagram of fungal taxa recovered from permafrost and overlying active layer soils sampled in different locations in the South Shetland Islands, maritime Antarctica. Fungal assemblage comparisons between (a) permafrost and overlying active layer soils, (b) permafrost and active layer at each sampling site, (c) permafrost at each sampling site, and (d) active layer at each sampling site.

Bay (Deception Island) and Thomas Point (King George Island) and *P. cf. chrysogenum* was detected in both layers at Thomas Point and Keller Peninsula (King George Island) (Fig. 2c and d). In addition, *Penicillium* was the most abundant and widely distributed genus in both permafrost and active layer soil samples across the sites.

3.2. *In vitro* pathogenicity

Table 2 shows the results of *in vitro* pathogenic assays. With the exception of *P. cf. chrysogenum* UFMGCB 16223, which did not grow at pH 4, all fungi assayed grew across the pH range 4–9. *Rhodotorula cf. mucilaginosa* isolates ranged in their phospholipase activities, and the isolates *R. cf. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and 17473 displayed positive production of phospholipase. *Penicillium* isolates and *R. cf. mucilaginosa* UFMGCB 17436 displayed strong proteinase activity. *Al-*

ternaria sp., *Penicillium* spp. and *R. cf. mucilaginosa* displayed partial hemolysis (α -hemolysis) activity.

The fungal taxa *R. cf. mucilaginosa* and *Aspergillus hiratsukae* and *A. thermomutatus*, reported as human opportunist infective agents, were screened for their thermal tolerance, esterase activity, antifungal susceptibility assays and resistance to freezing temperatures (Table 3). All *R. cf. mucilaginosa* isolates were able to grow at temperatures of 40°, 45° and 50 °C. *Aspergillus* spp. grew only up to 45 °C. In the esterase assay, both isolates of *R. cf. mucilaginosa* and *A. hiratsukae* were positive. *A. thermomutatus*, *A. hiratsukae* and *R. cf. mucilaginosa* isolates displayed resistance to fluconazole and itraconazole. In addition, all *R. cf. mucilaginosa* isolates showed resistance to amphotericin B and were viable after 100 d at –80 °C.

Table 2

In vitro virulence assays of fungi recovered from Antarctic permafrost and overlying active layer soils.

Island/site	Taxa	Substrate	UFMGCB	pH			(Pz1)	(Pz2)	(Hi)	HC
				pH 4	pH 7	pH 9				
Deception Island (Whalers Bay)	<i>Penicillium</i> sp. 1	AL	17456	+	+	+	NA	0.17	0.45	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 1	AL	17465	+	+	+	NA	0.20	0.35	Partial - α
	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i>	AL	17457	+	+	+	NA	0.18	0.32	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 1	AL	17464	+	+	+	NA	0.17	0.37	Partial - α
	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i>	AL	17461	+	+	+	1	1	0.54	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17469	+	+	+	NA	0.26	0.38	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17470	+	+	+	NA	0.26	0.38	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17471	+	+	+	NA	0.24	0.26	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17479	+	+	+	NA	0.27	0.38	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17480	+	+	+	NA	0.22	0.30	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17481	+	+	+	NA	0.21	0.31	Partial - α
	<i>R. cf. mucilaginosa</i>	P	17473	+	+	+	0.60	1	0.61	Partial - α
King George Island (Keller Peninsula)	<i>Aspergillus thermomutatus</i>	AL	17401	+	+	+	NA	NA	–	–
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17402	+	+	+	NA	NA	–	–
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17403	+	+	+	NA	NA	–	–
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17408	+	+	+	NA	NA	–	–
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17399	+	+	+	NA	NA	–	–
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17411	+	+	+	NA	NA	–	–
	<i>Penicillium</i> sp. 3	AL	17396	+	+	+	NA	1	0.85	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 3	AL	17397	+	+	+	NA	1	0.53	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 3	AL	17398	+	+	+	NA	1	–	–
	<i>A. thermomutatus</i>	P	17415	+	+	+	NA	NA	–	–
	<i>Rhodotorula</i> sp.	P	17417	+	+	+	0.53	1	0.45	Partial - α
	<i>Alternaria</i> sp.	AL	17431	+	+	+	NA	1	0.89	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 4	AL	17418	+	+	+	NA	0.21	0.41	Partial - α
King George Island (Thomas Point)	<i>Penicillium</i> sp. 4	AL	17424	+	+	+	NA	0.25	0.58	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 4	AL	17425	+	+	+	NA	0.33	0.47	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 4	AL	17433	+	+	+	NA	0.34	0.50	Partial - α
	<i>P. cf. chrysogenum</i>	AL	17434	+	+	+	NA	0.16	0.27	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 4	AL	17435	+	+	+	NA	0.26	0.46	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 4	AL	17438	+	+	+	NA	0.21	0.45	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 4	AL	17439	+	+	+	NA	0.25	0.45	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 4	AL	17441	+	+	+	NA	0.31	0.51	Partial - α
	<i>Rhodotorula</i> sp.	AL	17419	+	+	+	0.68	0.66	0.58	Partial - α
	<i>Rhodotorula</i> sp.	AL	17422	+	+	+	0.73	1	0.48	Partial - α
	<i>Rhodotorula</i> sp.	AL	17423	+	+	+	0.73	1	–	–
	<i>Rhodotorula</i> sp.	AL	17430	+	+	+	1	1	0.47	Partial - α
	<i>Penicillium rubens</i>	AL	17427	+	+	+	NA	0.13	0.27	Partial - α
	<i>P. rubens</i>	AL	17428	+	+	+	NA	0.16	0.19	Partial - α
	<i>P. rubens</i>	AL	17429	+	+	+	NA	0.26	0.59	Partial - α
	<i>P. rubens</i>	AL	17437	+	+	+	NA	0.15	0.22	Partial - α
	<i>R. cf. mucilaginosa</i>	AL	17436	+	+	+	1	0.48	0.67	Partial - α
	<i>Aspergillus hirsutiae</i>	P	17442	+	+	+	NA	NA	NA	NA
	<i>Penicillium</i> sp. 5	P	17443	+	+	+	NA	NA	–	–
	<i>Penicillium</i> sp. 5	P	17445	+	+	+	NA	0.25	0.29	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 5	P	17446	+	+	+	NA	0.24	0.54	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 5	P	17447	+	+	+	NA	0.24	0.54	Partial - α
	<i>P. cf. chrysogenum</i>	P	17452	+	+	+	NA	0.32	0.62	Partial - α
	<i>R. cf. mucilaginosa</i>	P	17448	+	+	+	0.76	1	0.44	Partial - α
	<i>Rhodotorula</i> sp.	P	17450	+	+	+	1	1	0.53	Partial - α
Livingston Island	<i>Rhodotorula</i> sp.	P	17451	+	+	+	1	1	0.45	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 6	AL	16228	+	+	+	NA	0.44	0.33	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 7	P	16220	+	+	+	NA	0.21	0.30	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 7	P	16221	+	+	+	NA	0.37	0.28	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 7	P	16222	+	+	+	NA	0.21	0.30	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 7	P	16223	–	+	+	NA	0.51	0.30	Partial - α
	<i>Penicillium</i> sp. 7	P	16224	+	+	+	NA	0.29	0.24	Partial - α
	<i>P. cf. tardochrysogenum</i>	P	16225	+	+	+	NA	0.21	0.31	Partial - α

AL = Active Layer; P = permafrost; Pz1 (Phospholipase activity); Pz2 (Proteinase activity); Hi (Hemolytic index); HC (Hemolytic classification); (–) negative; (NA) not applicable; Pz: very strong (≤ 0.69), strong (between 0.70 and 0.79), normal (between 0.80 and 0.89), weak (Pz between 0.90–0.99) or zero (Pz = 1).

3.3. *In vivo* virulence assay in *Tenebrio molitor*

Due the *in vitro* virulence results and prospect as opportunistic fungi, one isolate of *A. thermomutatus* and two of *R. cf. mucilaginosa* were selected to *in vivo* pathogenic assay model using *Tenebrio molitor* larvae. The lethality *in vivo* of the isolates *A. thermomutatus* UFMGCB 17415, *R. cf. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and *R. cf. mucilaginosa* 17473 were as-

sayed against *T. molitor* larvae (Fig. 3). *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 killed all larvae in 6 d and *R. cf. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and 17473 in 3 and 4 d, respectively. Both fungal isolates recovered from the permafrost displayed high *T. molitor* lethality when compared with the positive control *C. albicans* SC5314, which killed the larvae after 10 d. These differences were statistically significant (Mantel–Cox p value < 0.0001), indicating that *A. thermomutatus* UFMGCB 17415, *R.*

Table 3

Thermotolerance, esterase activity and antifungal susceptibility of *Rhodotorula cf. mucilaginosa* and *Aspergillus hiratsukae* and *Aspergillus thermomutatus* recovered from Antarctic permafrost.

Fungi	UFMGCB code*	Resistance to -80 °C	Thermotolerance (°C)			Esterase (Pz**)	MIC (µg mL ⁻¹)		
			40	45	50		AFB	FLC	ITC
<i>Aspergillus thermomutatus</i>	17415	++	++	+	-	NA	0.5	> 64	> 16
<i>Aspergillus hiratsukae</i>	17442	++	++	+	-	0.83	1	> 64	> 16
<i>Rhodotorula cf. mucilaginosa</i>	17448	++	++	++	+	0.54	0.5	> 64	0.5
<i>R. cf. mucilaginosa</i>	17473	++	++	++	+	0.54	0.5	> 64	0.5

*UFMGCB = Fungal culture collection of Federal University of Minas Gerais. ++ = strong culture growth; + = intermediate culture growth; - = no growth; NA = not applicable. **PZ = proteolytic enzymatic activity PZ = 1 (negative)/PZ < 1 (positive)/PZ < 0.5 (strongly positive). MIC = minimum inhibitory concentration AFB = Amphotericin B; FLC = Fluconazole; ITC = Itraconazole.

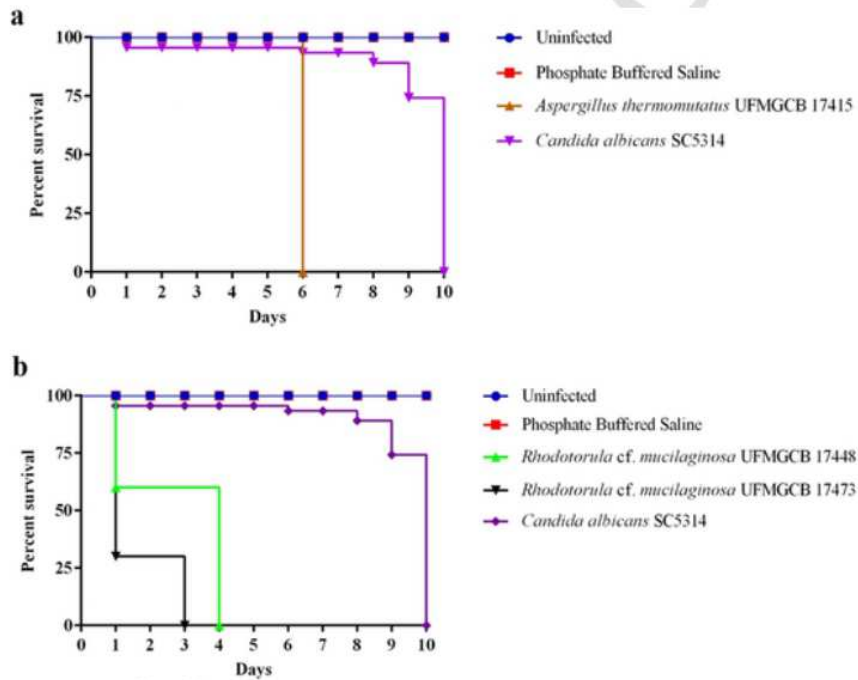


Fig. 3. Survival curve of *Tenebrio molitor* larvae subjected to infection with *Aspergillus thermomutatus* UFMGCB 17415 and *Rhodotorula cf. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and 17473 isolates. Log-rank (Mantel–Cox) Test for all assays was $p < 0.0001$.

cf. mucilaginosa UFMGCB 17448 and *R. cf. mucilaginosa* 17473 may be able to cause disease in immune-compromised animals and humans.

4. Discussion

4.1. Fungal taxonomy and diversity

Our study focused on assessing the diversity of mesophilic cultivable fungi present in permafrost and overlying active layer soils from the South Shetland Islands, maritime Antarctica. Several of the taxa obtained (*Curvularia* sp., *Talaromyces* sp., *A. thermomutatus* and *A. hiratsukae*) have not previously been reported from permafrost of maritime Antarctica. In addition, commonly reported fungi from different Antarctic environments (such as *Rhodotorula mucilaginosa*, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *P. cf. chrysogenum*, *Penicillium rubens* and *Pleosporeales* sp.) were also detected (Rosa et al., 2019).

The ability to growth at 37 °C, the isolation temperature used in the current study, is a key prerequisite for invasive fungal infections (Casadevall et al., 2019). *Aspergillus* and *Rhodotorula* species are among the most common fungi able to cause human and animal diseases. *Rhodotorula* (Basidiomycota) is a cosmopolitan yeast widely occurring in air, soil, freshwater and seawater, and as a food contaminant

(Tomsikova, 2002; Wirth and Goldani, 2012). In Antarctica, *R. mucilaginosa* represents one of the most widely isolated fungi, from both marine (Vaz et al., 2011; Godinho et al., 2013) and terrestrial habitats (Kochkina et al., 2012; Gonçalves et al., 2017; de Sousa et al., 2017; Alves et al., 2019; Ferreira et al., 2019; Gomes et al., 2019).

The genera *Aspergillus* and *Penicillium* (Ascomycota) include species with global distribution, primarily including saprophytic species commonly found in soil. Both genera include species with environmental, biotechnological and human medical importance (Tsang et al., 2018) and the capability to survive and function in extreme environments, including those with low temperatures (Houbraken et al., 2014). In Antarctica, *Aspergillus* and *Penicillium* species have been reported from various terrestrial and marine habitats and substrates, but are particularly associated with soils (Rosa et al., 2019).

4.2. In vitro and in vivo pathogenicity characteristics

Potentially pathogenic fungi have previously been reported from pristine environments such as Antarctic soils and rocks (Brunke et al., 2016; Gonçalves et al., 2017; Alves et al., 2019). New records of emergent fungal diseases indicate that widening of the geographical range of innately thermotolerant pathogenic fungi and the acquisition of viru-

lence characteristics in non-pathogenic thermotolerant environmental fungi may characterize the 21st Century as an era of expansion of fungal diseases affecting biota across the planet, as demonstrated for the opportunistic pathogen *C. auris* (Casadevall et al., 2019).

Lee et al. (2017) predicted that, by the end of the current century, warming may result in a 25% increase in extent of ice-free area across Antarctica, and up to a 300% increase in the Antarctic Peninsula region, inevitably affecting areas containing permafrost. Consequently, the resident microbial communities in these regions will be affected. It is possible that permafrost melting will release trapped organic matter, gases, and lead to the activation of viable but currently dormant microorganisms (Nikrad et al., 2016; Lulakova et al., 2019; da Silva et al., 2020).

Our *in vitro* assays potential virulence factors, confirmed that *R. cf. mucilaginosa*, *Aspergillus* and *Penicillium* taxa possessed various of these factors. *R. mucilaginosa* is the most widespread species within its genus and has been recognized in the last two decades as an emerging pathogen, especially in immune-compromised patients (Maeder et al., 2003; Thomson et al., 2017). The emerging pathogenic *Rhodotorula* species/strains call attention due the antifungal drug resistance. *Rhodotorula* species are usually display high level of resistance to fluconazole, tolerance to itraconazole and susceptibility to amphotericin B. Among the current antifungal drugs used for clinical treatment, amphotericin B and flucytosine display good activity against *Rhodotorula* species *in vitro*; however, fluconazole is inactive (Gomez-Lopez et al., 2005). According to Diekema et al. (2005), treatment of systemic infection caused by *Rhodotorula* species involve the administration of amphotericin B or azoles compounds with or without flucytosine. In addition, the voriconazole, ravuconazole and posaconazole display activities against *Rhodotorula* species *in vitro* and represent new antifungal drugs for *Rhodotorulosis* treatment (Lunardi et al., 2006; Miceli et al., 2011). Gonçalves et al. (2017) and Alves et al. (2019) reported *R. mucilaginosa* strains, recovered from within the surface layers of Antarctic rocks, which were able to growth at 37 °C and produced different pathogenic potential *in vitro*. de Sousa et al. (2017) recovered *R. mucilaginosa* strains also able to growth at 37 °C from Antarctic ornithogenic soils, which also displayed different virulence factor *in vitro*. In addition, *R. mucilaginosa* strains recovered from seasonal Antarctic snow grew at 37 °C and displayed resistance the antifungal compounds benomyl and fluconazole *in vitro* (de Menezes et al., 2019).

The isolates *A. thermomutatus* UFMGCB 17415 and *R. cf. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and 17473 were used as *in vivo* models against *T. molitor* larvae, leading to complete mortality in three to six days. *Aspergillus* species are saprophytic fungi commonly found in soils worldwide. However, some species are able to cause fatal diseases in humans, domestic and wild animals, in addition to allergic responses to inhaled conidia (Seyedmousavi et al., 2015). *A. hiratsukae* (= *Neosartorya hiratsukae*) and *A. thermomutatus* (= *Neosartorya pseudofischeri*) are among the *Aspergillus* species in the section *Fumigati* that are recognized as pathogenic (Frisvad and Larsen, 2016). Both species have been reported to cause aspergillosis, peritonitis and others diseases (Guarro et al., 2002; Järv et al., 2004; Alcazar-Fuoli et al., 2008; Ghebremedhin et al., 2009; Koutroutsos et al., 2010). In addition, recent studies have shown that *Aspergillus* is connected to fungal co-infection in COVID-19 patients (Alanio et al., 2020; Koehler et al., 2020; Mortezaee et al., 2020). de Sousa et al. (2017) isolated an *Aspergillus fumigatus* strain from Antarctic ornithogenic soils which grew at 37 °C, displayed hemolytic and phospholipase activities, produced tiny spores, capsule, and melanin, showed growth at different pH values and resistance to amphotericin B. Figueredo et al. (2020) recovered the opportunistic species *Aspergillus calidoustus* from geothermally-influenced soils on Deception Island, South Shetland Island, which was also capable of growth at 37 °C and showed resistance to different antifungal drugs, suggesting that these fungi can survive and colonize these soils.

Members of the genus *Penicillium* play multiple roles in natural processes in ecosystems. However, although rare, some species are opportunistic human pathogens able to cause invasive diseases. *Penicillium chrysogenum* is a causal agent of cerebral disease, intestinal invasion and invasive pulmonary mycosis, particularly in immune-compromised patients (Lyratzopoulos et al., 2002; Barcus et al., 2005; Geltner et al., 2013; Avilés-Robles et al., 2016). Gonçalves et al. (2017) and Alves et al. (2019) recovered several isolates of *P. chrysogenum* and *Penicillium tardochrysogenum* from Antarctic rocks that were able to produce tiny spores ($\leq 4 \mu\text{m}$ in diameter) at 37 °C, with morphological culture polymorphism at 15° and 37 °C.

5. Conclusions

Our study confirms that Antarctic permafrost soil contains various viable fungal taxa capable of growth at 37 °C, a key criterion that must be met for a fungus to cause opportunistic mycoses in humans or animals. *Rhodotorula cf. mucilaginosa* and species of *A. thermomutatus* and *Penicillium* present in the Antarctic permafrost demonstrated different *in vitro* and *in vivo* virulence and pathogenic capabilities, which now require further investigation using more complex biological models such as mice, and also the search for molecular markers of pathogenicity. The melting of permafrost in regions such as the maritime Antarctic threaten the release wild strains of currently dormant but viable fungal communities geographically isolated for a long time, which may in turn be transported within and beyond Antarctica by different biological and non-biological vectors. Our results highlight the importance studies of the influence of global climate changes on Antarctic permafrost and that of other regions of the cryosphere in order to characterize fungi and other microbiota with pathogenic potential to human and animals.

Uncited reference

Theeb et al., 2013, Alves et al., 2019.

Declaration of competing interest

All of the authors contributed substantially to the present research, which was prepared as an original article (*Does maritime Antarctic permafrost harbor environmental fungi with pathogenic potential?*) as a submission for publication in Fungal Biology journal. There is no conflict of interest among the authors.

Acknowledgements

This study received financial support from CNPq, CAPES, FNDCT, FAPEMIG, INCT Criosfera, PROANTAR. P. Convey is supported by NERC core funding to the British Antarctic Survey's 'Biodiversity, Evolution and Adaptation' Team.

References

- Alanio, A., Deliere, S., Fodil, S., Bretagne, S., Megarbane, B., 2020. High prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill COVID-19 patients. *Lancet Respir. Med.* 8, e48–e49.
- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L., 2008. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1244–1251.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Alves, I.M., Gonçalves, V.N., Oliveira, F.S., Schaefer, C.E., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2019. The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. *Extremophiles* 23, 327–336.
- Alves, I.M., Gonçalves, V.N., Oliveira, F.S., Schaefer, C.E.G.R., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2019. The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. *Extremophiles* 23, 327–336.
- Aoki, S., Ito-Kuwa, S., Nakamura, Y., Masuhara, T., 1990. Comparative pathogenicity of a

- wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralbl. Bakteriol.* 273, 332–343.
- Avilés-Robles, M., Gómez-Ponce, C., Reséndiz-Sánchez, J., Rodríguez-Tovar, A.V., Ceballos-Bocanegra, A., Martínez-Rivera, Á., 2016. Disseminated penicilliosis due to *Penicillium chrysogenum* in a pediatric patient with Henoch-Schönlein syndrome. *Int. J. Infect. Dis.* 51, 78–80.
- Barcus, A.L., Burdette, S.D., Herchline, T.E., 2005. Intestinal invasion and disseminated disease associated with *Penicillium chrysogenum*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 4, 21.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudé, F., Djemiel, C., Kiopp, C., 2014. An interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinf.* 15, 293.
- Bliska, J.B., Casadevall, A., 2009. Intracellular pathogenic bacteria and fungi—a case of convergent evolution? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 165.
- Brunke, S., Mogavero, S., Kasper, L., Hube, B., 2016. Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr. Opin. Microbiol.* 32, 89–95.
- Buzzini, P., Branda, E., Goratti, M., Turchetti, B., 2012. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 217–241.
- Carrasco, M., Rozas, J.M., Barahona, S., Alcaino, J., 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiol.* 12, 251.
- Casadevall, A., 2007. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol. Rev.* 21, 130–132.
- Casadevall, A., Kontoyiannis, D.P., Robert, V., 2019. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. *mBio* 10, e01397, 19.
- Castellani, A., 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. *Further Researches. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 161.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2008. 14. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test for Yeasts. Approved Standard, third ed. vol. 28. CLSI document M7-A3, p. 25.
- Convey, P., Peck, L.S., 2019. Antarctic environmental change and biological responses. *Sci. Adv.* 5, eaaz0888.
- da Silva, T.H., Silva, D.A.S., de Oliveira, F.S., Schaefer, C.E.G.R., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2020. Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. *Extremophiles* 24, 565–576.
- Davis, D.A., 2009. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 365–370.
- de Menezes, G.C., Amorim, S.S., Gonçalves, V.N., Godinho, V.M., Simões, J.C., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2019. Diversity, distribution, and ecology of fungi in the seasonal snow of Antarctica. *Microorganisms* 7, 445.
- de Sousa, J.R.P., Gonçalves, V.N., de Holanda, R.A., Santos, D.A., Bueloni, C.F.L.G., Costa, A.O., Petry, M.V., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2017. Pathogenic potential of environmental resident fungi from ornithogenic soils of Antarctica. *Fungal Biol.* 121, 991–1000.
- de Souza, L.M.D., Lirio, J.M., Coria, S.H., Lopes, F.A.C., Convey, P., Carvalho-Silva, M., Oliveira, F.S., Rosa, C.A., Câmara, P.E.A.S., Rosa, L.H., 2022. Diversity, distribution and ecology of fungal community present in Antarctic lake sediments uncovered by DNA metabarcoding. *Sci. Rep.* Submitted.
- Diekema, D.J., Petrolej, B., Messer, S.A., Hollis, R.J., Pfaller, M.A., 2005. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *J. Clin. Microbiol.* 43, 476–478.
- Donohue, M., Wei, W., Wu, J., Zawia, N.H., Hud, N., de Jesus, V., Schmechel, D., Hettick, J.M., Beezhold, D.H., Vesper, S., 2006. Characterization of nigerlysin, hemolysin produced by *Aspergillus niger*, and effect on mouse neuronal cells *in vitro*. *Toxicology* 219, 50–55.
- Elster, J., Margesin, R., Wagner, D., Häggblom, M., 2017. Editorial: polar and alpine microbiology—earth's cryobiosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, fiv221.
- Ferreira, E.M.S., de Sousa, F.M.P., Rosa, L.H., Pimenta, R.S., 2019. Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles* 23, 151–159.
- Figueredo, H.M., Gonçalves, V.N., Godinho, V.M., Lopes, D.V., Oliveira, F.S., Rosa, L.H., 2020. Diversity and ecology of cultivable fungi isolated from the thermal soil gradients in Deception Island, Antarctica. *Extremophiles* 24, 219–225.
- French, H.M., 1996. *The Periglacial Environment*, second ed. Longmans, Essex.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., 2016. Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Front. Microbiol.* 6, 1485.
- Gelmer, C., Lass-Flörl, C., Bonatti, H., Müller, L., Stelzmüller, I., 2013. Invasive pulmonary mycosis due to *Penicillium chrysogenum*: a new invasive pathogen. *Transplantation* 95, e21–e23.
- Ghebremedhin, B., Bluemel, A., Neumann, K.H., Koenig, B., Koenig, W., 2009. Peritonitis due to *Neosartorya pseudofischeri* in an elderly patient undergoing peritoneal dialysis successfully treated with voriconazole. *J. Med. Microbiol.* 58, 678–682.
- Ghorbel, D., Hadrich, I., Neji, S., Trabelsi, H., Belaï, H., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Makni, F., Ayadi, A., 2019. Detection of virulence factors and antifungal susceptibility of human and avian *Aspergillus flavus* isolates. *J. Mycol. Med.* 29, 292–302.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous *Ascomycetes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1323–1330.
- Godinho, V.M., Furbino, L.E., Santiago, I.F., Pellizzari, F.M., Yokoya, N.S., Pupo, D., Alves, T.M., Junior, P.A., Romanha, A.J., Zani, C.L., Cantrell, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2013. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J.* 7, 1434–1451.
- Gomes, E.C.Q., Figueredo, H., de Oliveira, F.S., Schaefer, C.E.G.R., Michel, R.F., Rosa, C., Rosa, L.H., 2019. Fungi present in soils of Antarctica. In: Rosa, L.H. (Ed.), *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications*. Springer, Berlin, pp. 43–67.
- Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., 2005. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 312–316.
- Gonçalves, V.N., Oliveira, F.S., Carvalho, C., Schaefer, C.E., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2017. Antarctic rocks from continental Antarctica as source of potential human opportunistic fungi. *Extremophiles* 21, 851–860.
- Guarro, J., Kallas, E.G., Godoy, P., Karenina, A., Gené, J., Stchigel, A., Colombo, A.L., 2002. Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hirsutiae*, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 989.
- Guglielmin, M., Cannone, N., 2012. A permafrost warming in a cooling Antarctica? *Clim. Change* 111, 177–195.
- Hof, C., Araújo, M.B., Jetz, W., Rahbek, C., 2011. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature* 480, 516–519.
- Houbraken, J., de Vries, R.P., Samson, R.A., 2014. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. In: Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Adv. Appl. Microbiol.* Academic Press, San Diego, pp. 199–249.
- Järvi, H., Lehtmaa, J., Summerbell, R.C., Hoekstra, E.S., Samson, R.A., Naaber, P., 2004. Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 925–928.
- Kochkina, G., Ivanushkina, N., Ozerskaya, S., Chigineva, N., Vasilenko, O., Firsov, S., Spirina, E., Gilichinsky, D., 2012. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 501–509.
- Koehler, P., Cornely, O.A., Böttger, B.W., Dusse, F., Eichenauer, D.A., Fuchs, F., Hallek, M., Jung, N., Klein, F., Rybníček, J., Kochanek, M., Boll, B., Shimabukuro-Vornhagen, A., 2020. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 63, 528–534.
- Koutrotsos, K., Arabatzis, M., Bougatsos, G., Xanthaki, A., Toutouza, M., Velegaki, A., 2010. *Neosartorya hirsutiae* peritonitis through continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Med. Microbiol.* 59, 862–865.
- Lachance, M.A., Bowles, J.M., Starmer, W.T., Barker, J.S.F., 1999. *Kodamaea kakaensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Can. J. Microbiol.* 45, 172–177.
- Lee, J.R., Raymond, B., Bracegirdle, T.J., Chades, I., Fuller, R.A., Shaw, J.D., Terauds, A., 2017. Climate change drives expansion of Antarctic ice-free habitat. *Nature* 547, 49–54.
- Legendre, M., Lartigue, A., Bertaux, L., Jeudy, S., Bartoli, J., Lescot, M., Alempic, J.M., Ramus, C., Bruley, C., Labadie, K., Shmakova, L., Rivkina, E., Couté, Y., Abergel, C., Claverie, J.M., 2015. In-depth study of *Mollivirus sibiricum*, a new 30,000-y-old giant virus infecting *Acanthamoeba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 112, E5327–E5335.
- Lulakova, P., Perez Mon, C., Šantrůčková, H., Růžička, J., Frey, B.W., 2019. High-Alpine permafrost and active-layer soil microbiomes differ in their response to elevated temperatures. *Front. Microbiol.* 10, 668.
- Lunardi, L.W., Aquino, V.R., Zimmerman, R.A., Goldani, L.Z., 2006. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin. Infect. Dis.* 43, e60–63.
- Luo, G., Samaranyake, L.P., Yau, J.Y.Y., 2001. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2971–2974.
- Lyratzopoulos, G., Ellis, M., Nerringer, R., Denning, D.W., 2002. Invasive infection due to *Penicillium* species other than *P. marneffei*. *J. Infect.* 45, 184–195.
- Maeder, M., Vogt, P.R., Schaefer, G., von Graevenitz, A., Günthard, H.F., 2003. Aortic homograft endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Infection* 31, 181–183.
- Malkus, A., Chang, P.F.L., Zugza, S.M., Chung, K.R., Shao, J., Cunfer, F.M., Arseniuk, E., Ueng, P.P., 2006. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycol. Res.* 110, 1152–1164.
- Margesin, R., Collins, T., 2019. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 2537–2549.
- Maxwell, J.B., Barrie, L.A., 1989. Atmospheric and climatic change in the arctic and antarctic. *Ambio* 42–49.
- Miceli, M.H., Díaz, J.A., Lee, S.A., 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect. Dis.* 11, 142–151.
- Mortezaei, V., Asadi Shahi Saraei, S., Ghazanfari, M., Ashrafi Khozani, M., Maleki, M., Hedayati, M.T., 2020. Invasive Aspergillosis in COVID-19: a review study and recommendations for diagnostic approaches. *J. Mazandaran Univ. Med. Sci.* 30, 169–178.
- Nikrad, M.P., Kerkhof, L.J., Häggblom, M.M., 2016. The subzero microbiome: microbial activity in frozen and thawing soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiv081.
- Price, M.F., Wilkinson, I.D., Gentry, L.O., 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.* 20, 7–14.
- Ramos, M., Vieira, G., de Pablo, M., Molina, A., Abramov, A., Goyanes, G., 2017. Recent shallowing of the thaw depth at Crater Lake, deception island, Antarctica (2006–2014). *Catena* 149, 519–528.
- Revich, B.A., Podolnaya, M.A., 2011. Thawing of permafrost may disturb historic cattle burial grounds in East Siberia. *Glob. Health Action* 4, 8482.
- Robinson, C.H., 2001. Cold adaptation in arctic and antarctic fungi. *New Phytol.* 151, 341–353.
- Rosa, L.H., Vaz, A.B., Caligiorno, R.B., Campolina, S., Rosa, C.A., 2009. Endophytic fungi associated with the antarctic grass *Deschampsia antarctica* desv. (poaceae). *Polar Biol.* 32, 161–167.
- Rosa, L.H., Zani, C.L., Cantrell, C.L., Duke, S.O., Van Dijk, P., Desideri, A., Rosa, C.A., 2019. Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. In: Rosa, L.H. (Ed.), *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications*. Springer, Berlin, pp. 1–18.
- Rosa, L.H., Ogaki, M.B., Lirio, J.M., Vieira, R., Coria, S.H., Pinto, O.H.B., Carvalho-Silva, M., Convey, P., Rosa, C.A., Câmara, P.E.A.S., 2022. Fungal diversity in a sediment

9.3. Anexo 3 – Produção acadêmica

9.3.1 Artigos e capítulos publicados e submetidos

1. da SILVA, T., GOMES, E., GONÇALVES, V., COSTA, M., VALÉRIO, A., SANTOS, D., JOHANN, S., CONVEY, P., ROSA, C., ROSA, L. (2022) Does Maritime Antarctic permafrost harbor environmental fungi with pathogenic potential? Fungal Biology FUNBIO-D-22-00029R1.
2. GONCALVES, V. N., GOMES, E. C. Q., LOUREIRO, P. H. R., ROSA, L. H. (2021) Fungos presentes em rochas da Antártica. In: Andrés Zarankin; Luiz Henrique Rosa; Rosa Maria Esteves Arantes; Fernanda Codevilla Soares. (Org.). Fungos presentes em rochas da Antártica. 1ed. Belo Horizonte: Imprensa Universitária da UFMG, 2021, v. 01, p. 163-177.
3. GOMES, E. C. Q., GODINHO, V. A M., ROSA, L. H. (2021) Fungos presentes em solos antárticos: diversidade e bioprospecção de substâncias bioativas. In: Andrés Zarankin; Luiz Henrique Rosa; Rosa Maria Esteves Arantes; Fernanda Codevilla Soares. (Org.). Fungos presentes em solos antárticos: diversidade e bioprospecção de substâncias bioativas. 1ed. Belo Horizonte: Imprensa Universitária da UFMG v. 01, p. 115-124.
4. COUTINHO, JOANA O. P. A., PEIXOTO, TAYNARA S., de MENEZES, G. C. A., CARVALHO, C. R., OGAKI, M. B., GOMES, E. C. Q., ROSA, C. A., ROSA, L. H., ARANTES, R. M. E., NICOLI, J. R., TIAGO, F. C. P., MARTINS, F. S. (2021) *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of the Probiotic Potential of Antarctic Yeasts. Probiotics and Antimicrobial 13(5):1338-1354
5. SOUSA, J. B., GOMES, E. C. Q., SOUZA., L. R., de MENEZES, G. C. A. (2019) Relatos sobre a XXI Semana Polar Internacional na Escola Estadual Menino Jesus de Praga sob a visão de pesquisadores polares e professores. Informativo APECS-Brasil, Brasil, p. 8-9.
6. GOMES, E. C. Q., FIGUEREDO, H. M., de OLIVEIRA, F. S., SCHAFER, C. E. G. R., MICHEL, R. F., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2019) Fungi Present in Soils of Antarctica. Fungi of Antarctica. 1ª ed. Springer International Publishing 43-67.
7. BRUZZI, T., LIMA, D., FERREIRA, J., ZARANKIN, A., SOARES, F., ROSA, L. H., ARANTES, R. M. E., GOMES, E. C. Q. (2018) Expedição Antártica. 1. ed. Belo Horizonte: Global Print Editora Gráfica, 2018. v. 500. 116p.

9.3.2 Resumos e participação em eventos de divulgação científica

1. Relatos sobre a XXI Semana Polar Internacional na Escola Estadual Menino Jesus de Praga sob a visão de pesquisadores polares e professores (2018 - APECS-Brasil);
2. ASM - Workshop de Comunicação e Divulgação Científica (DivulgaMicro – 2019).

9.3.3 Comissão avaliadora

1. Brasil - 17ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia (2018 - FEBRACE);
2. Brasil - Commission of Evaluation of short videos exhibited during the V Symposium APECS-Brazil (2018 - APECS - Brasil);
3. Brasil - Comissão avaliadora da 7ª Feira Brasileira de Colégios de Aplicação e Escolas Técnicas (2019 - 7ª FEBRAT).

9.3.4 Produção em eventos

1. Brasil – Organização do V Simpósio de Microbiologia da UFMG (2018 - VI SIM);
2. Brasil - Organização V Symposium APECS-Brazil - Achievements and challenges in a 20 decade of changes in national and international scene (2018 - APECS - Brasil);
3. Brasil – Organização do VI Simpósio de Microbiologia da UFMG (2019 - VI SIM);
4. Brasil - 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia (2019 - 30º CBM);
5. Chile - 2nd International Symposium on Extreme Environments and Extremophiles Organisms (2019 - 2ndo ISE3O).

9.3.5 Resumos apresentados em eventos

1. Brasil - Caracterização *in vitro* da virulência de isolados do gênero *Pseudogymnoascus* provenientes da Antártica (2019 - 30º CBM);
2. Brasil - Characterization of *in vitro* virulence of the genus *Pseudogymnoascus* of antarctic isolations (2019 - VI SIM);
3. Chile - Characterization of *in vitro* virulence of *Pseudogymnoascus* genus from Antarctic isolates (2019 - 2ndo ISE3O).
4. Chile - Permafrost Antarctic fungi and your potential for virulence factors *in vitro* (2019 - 1st. ISME).