

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Lislaina dos Santos Corrêa

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS AGROQUÍMICOS MANCOZEB E
CARBENDAZIM NA SUSCEPTIBILIDADE DE *Candida glabrata*, *Cryptococcus gattii* E
Cryptococcus neoformans AOS ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS.**

Belo Horizonte
2024

Lislaina dos Santos Corrêa

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS AGROQUÍMICOS MANCOZEB E
CARBENDAZIM NA SUSCEPTIBILIDADE DE *Candida glabrata*, *Cryptococcus gattii* E
Cryptococcus neoformans AOS ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS.**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Belo Horizonte
2024

043

Corrêa, Lislaina dos Santos.

Avaliação da influência dos agroquímicos mancozeb e carbendazim na susceptibilidade de *Candida glabrata*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* aos antifúngicos clínicos [manuscrito] / Lislaina dos Santos Corrêa. – 2024.

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Agroquímicos. 3. Farmacorresistência Fúngica Múltipla. 4. Saúde Única. I. Santos, Daniel de Assis. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **LISLAINA DOS SANTOS CORRÊA**

Nº REGISTRO: 2023665862

Às 14:00 horas do dia **12 de dezembro de 2024**, reuniu-se, presencialmente no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Gustavo José Cota de Freitas (Pós-doutorando do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Prof. Dr. Daniel de Assis Santos (Orientador) , para julgar o trabalho final "**Avaliação da influência dos agroquímicos mancozeb e carbendazim na susceptibilidade de *Candida glabrata*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* aos antifúngicos clínicos**", da aluna **Lislaina dos Santos Corrêa**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela 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. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2024

Dr. Gustavo José Cota de Freitas
Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

De acordo:

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Orientador)

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes
(Subcoordenador do Programa de Pós-graduação)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 12/12/2024, às 16:01, 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 12/12/2024, às 19:49, 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 **Caio Tavares Fagundes, Subcoordenador(a)**, em 13/12/2024, às 12:57, 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 **Gustavo José Cota de Freitas, Usuário Externo**, em 17/12/2024, às 13:47, 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 **3741747** e o código CRC **EBCD473E**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por seu amor, cuidado e sustento. Por estar sempre comigo permitindo que chegasse até aqui.

Ao meu pai Paulo e à minha mãe Marta pelo apoio, incentivo e por torcerem e orarem sempre por mim. Sem vocês não teria chegado até aqui. A minha irmã Letícia pelo apoio e amizade. Amo vocês!

À minha amiga Bárbara que me incentivou a me inscrever no processo seletivo e estava ao meu lado celebrando comigo no momento que vi que tinha sido aprovada na seleção do mestrado.

Aos meus amigos e irmãos da igreja Presbiteriana de Paraíba do Sul que sempre me sustentaram em oração. Aos amigos e irmãos da Nona igreja Presbiteriana de Belo Horizonte, por terem me acolhido na cidade e me recebido com tanto carinho.

Às meninas que moram comigo, Ana, Júlia e Melissa, pela amizade, por cada momento, risadas e conversas compartilhadas que tornaram essa jornada da pós-graduação mais leve.

Ao meu orientador Daniel pela confiança ao aceitar me orientar mesmo sem me conhecer. Agradeço por toda ajuda na condução desse trabalho e pelo incentivo ao longo desse processo. A professora Nalu, sempre disposta a ajudar a todos no laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de Micologia por cada conhecimento compartilhado, por toda ajuda em experimentos e pelos bons momentos e risadas compartilhadas. Agradeço em especial as minhas colegas de trabalho Bia, Bruna e Isabela. Obrigada meninas por todo apoio e por estarem comigo nos momentos difíceis dessa jornada me incentivando a não desistir.

Aos colegas, funcionários e professores do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos e suporte durante todo o período de mestrado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação durante toda a vida. Muito obrigada!

RESUMO

Cryptococcus gattii, *Cryptococcus neoformans* e *Candida glabrata* são leveduras presentes no ambiente e que já foram isoladas em diversas plantas. Por estarem presentes no solo, esses fungos estão sujeitos à ação de agroquímicos que podem exercer uma pressão seletiva nestes fungos, induzindo resistência. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos agroquímicos mancozeb e carbendazim na susceptibilidade a antifúngicos clínicos e em fatores de virulência de linhagens de *C. gattii*, *C. neoformans* e *C. glabrata*. Para avaliar a influência dos agroquímicos nas linhagens selecionadas, as mesmas foram expostas a concentrações crescentes dos antifúngicos agrícolas até que cessasse o crescimento, em um processo aqui denominado de adaptação. O teste foi feito a 30°C e 35°C. As linhagens adaptadas a 30°C foram capazes de tolerar maiores concentrações do agroquímico, mostrando que a temperatura é um fator importante nesse processo. Após a etapa de adaptação, foi avaliada a concentração inibitória mínima para antifúngicos clínicos dessas linhagens expostas ao agroquímico (adaptadas) comparando com linhagens não expostas (não adaptadas). Em algumas linhagens adaptadas, foi observada a redução da susceptibilidade ao fluconazol e/ou a 5-flucitosina, mostrando que houve resistência cruzada entre os agroquímicos e os antifúngicos clínicos. Algumas linhagens permaneceram resistentes ao FCZ e/ou a 5-FC mesmo após passagens sucessivas em meio livre de agroquímico indicando uma resistência cruzada permanente e outras retornaram à susceptibilidade inicial após cessada a exposição ao agroquímico indicando que houve resistência cruzada transitória. Mancozeb e carbendazim também alteraram a morfologia de linhagens de *Cryptococcus*, com redução do tamanho de cápsula e a linhagem de *C. gattii* R265 adaptada ao carbendazim formou pseudo-hifas. Ao avaliar a influência dos agroquímicos na formação de biofilme, foi observado que apenas as linhagens de *C. glabrata* sofreram alteração na capacidade de formar biofilme. Esses resultados corroboram com a ideia de que o uso de agroquímicos pode afetar de forma significativa patógenos humanos presentes no ambiente, afetando sua resistência a antifúngicos utilizados na prática clínica. Essa interconectividade entre a saúde humana e o meio ambiente respalda a necessidade de uma abordagem “*One Health*” no combate à crescente resistência antifúngica observada nos últimos anos.

Palavras chave: agroquímicos, resistência cruzada, One Health

ABSTRACT

Cryptococcus gattii, *Cryptococcus neoformans* and *Candida glabrata* are yeasts that occur in the environment and have already been isolated from various plantations. As they occur in the soil, these fungi are exposed to agrochemicals, which can exert selection pressure on these fungi and induce resistance. In this context, the aim of this work was to evaluate the influence of the agrochemicals mancozeb and carbendazim on the susceptibility to clinical antifungals and virulence factors of strains of *C. gattii*, *C. neoformans* and *C. glabrata*. To evaluate the impact of the agrochemicals on the selected strains, they were exposed to increasing concentrations of the agricultural antifungal agents until growth ceased, a process referred to here as adaptation. The test was carried out at 30°C and 35°C. The strains adapted to 30°C were able to tolerate higher concentrations of the agrochemical, showing that temperature is an important factor in this process. After the adaptation phase, the minimum inhibitory concentration for clinical antifungals of these strains exposed to the agrochemical (adapted) was evaluated in comparison to non-exposed strains (non-adapted). Reduced susceptibility to fluconazole and/or 5-flucytosine was observed in some adapted strains, indicating that there is cross-resistance between agrochemicals and clinical antifungals. Some strains remained resistant to FCZ and/or 5-FC after successive passages in agrochemical-free medium, indicating permanent cross-resistance, while others returned to their original susceptibility after cessation of exposure to the agrochemical, indicating transient cross-resistance. Mancozeb and carbendazim also altered the morphology of *Cryptococcus* strains, with a reduction in capsule size and the carbendazim-adapted strain *C. gattii* R265 forming pseudohyphae. When evaluating the effect of agrochemicals on biofilm formation, it was found that only the *C. glabrata* strains suffered changes in their ability to form biofilms. These results support the idea that the use of agrochemicals can significantly affect human pathogens present in the environment and impair their resistance to antifungal agents used in clinical practice. This interrelationship between human health and the environment underlines the need for a “One Health” approach to combat the increasing resistance to fungi observed in recent years.

Key words: agrochemicals, cross-resistance, One Health

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

µg micrograma (s)

µL microlitro (s)

10p 10 passagens

5-FC 5-flucitosina

A Adaptada

AIDS *Acquired immunodeficiency syndrome*

ANB Anfotericina B

Anvisa Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC *Antigen presenting cell*

ASD Agar Saborouad dextrose

BHE barreira hematoencefálica

CBZ Carbendazim

CIM Concentração inibitória mínima

CIMs Concentração inibitória mínima em meio sólido

CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMA Concentração máxima alcançada

FCZ Fluconazol

Ibama Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

MCF Micafungina

mL mililitro (s)

MZB Mancozeb

NA Não adaptada

nm nanômetro (s)

OMS Organização mundial de saúde

ROS *Reactive oxygen species*

SNC sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS	12
Figura 2: Mecanismos de ação antifúngica para as quatro principais classes de medicamentos. (1) Os Azóis se ligam e inibem a enzima ERG11 e a subsequente produção de ergosterol. (2) Os Polienos se ligam ao ergosterol e induzem a formação de poros na membrana celular, que causam vazamento de íons intracelulares. (3) As Equinocandinas se ligam e inibem a beta-glucana sintase, o que interrompe a arquitetura da parede celular. (4) Os Análogos de pirimidina são incorporados às moléculas de ácido nucleico e interrompem a síntese de DNA/RNA.	21
Figura 3: Esquema representando o processo de adaptação das linhagens ao agroquímico	32
Figura 4: Concentração inibitória mínima de antifúngicos de uso clínico e agroquímicos mancozeb e carbendazim para linhagens de <i>C. gattii</i> , <i>C. neoformans</i> e <i>C. glabrata</i>	36
Figura 5: Influência do mancozeb na morfologia de <i>Cryptococcus</i> spp. (A) Tamanho da cápsula de linhagens não adaptadas e adaptadas ao mancozeb, redução da cápsula após adaptação. Valor de $p < 0,05$. (B) Morfologia da cepa R265 antes e após adaptação. (C) morfologia da cepa 19/13ER antes e após adaptação.	44
Figura 6: Formação de biofilme em <i>Cryptococcus</i> spp. (A) atividade metabólica de células viáveis no biofilme. (B) Produção de biomassa.	45
Figura 7: Formação de biofilme em <i>C. glabrata</i> . (A) atividade metabólica de células viáveis no biofilme. (B) produção de biomassa. Valor de $p < 0,05$	46
Figura 8: Influência do carbendazim na morfologia de <i>C. gattii</i> . (A) Tamanho da cápsula de linhagens não adaptadas e adaptadas ao carbendazim, redução da cápsula de 24065 após adaptação. Valor de $p < 0,05$. (B) Morfologia da cepa R265 antes e após adaptação. (C) Morfologia da cepa 24065 antes e após adaptação.	52
Figura 9: Influência do carbendazim na morfologia de <i>C. neoformans</i> (A) Tamanho da cápsula de linhagens não adaptadas e adaptadas ao carbendazim, redução da cápsula após adaptação. Valor de $p < 0,05$. (B) Morfologia da cepa WM629 antes e após adaptação. (C) Morfologia da cepa 28957 antes e após adaptação.	53
Figura 10: Formação de biofilme em <i>Cryptococcus</i> spp. (A) atividade metabólica de células viáveis no biofilme de linhagens de <i>C. gattii</i> . (B) produção de biomassa de linhagens de <i>C. gattii</i> . (C) atividade metabólica de células viáveis no biofilme de linhagens de <i>C. neoformans</i> . (D) produção de biomassa de linhagens de <i>C. neoformans</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Linhagens de <i>C. neoformans</i> , <i>C. gattii</i> e <i>C. glabrata</i> utilizadas	29
Tabela 2 : Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico mancozeb e de antifúngicos clínicos para as linhagens de <i>C. gattii</i> , determinada por meio do método de microdiluição em caldo.	37
Tabela 3 : Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico mancozeb e de antifúngicos clínicos para as linhagens de <i>C. neoformans</i> , determinada por meio do método de microdiluição em caldo.....	38
Tabela 4 : Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico mancozeb e de antifúngicos clínicos para as linhagens de <i>C. glabrata</i> , determinada através do método de microdiluição em caldo.	38
Tabela 5 : Seleção de subpopulações de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> menos susceptíveis ao mancozeb	40
Tabela 6 : Seleção de subpopulações de <i>C. glabrata</i> menos susceptíveis ao mancozeb.....	41
Tabela 7 : Concentrações inibitórias mínimas de fluconazol, anfotericina B, 5-flucitosina e mancozeb para células não adaptadas (NA), adaptadas (A) e colônias adaptadas cultivadas 10 vezes em meio isento de agroquímicos (10p - 10 passagens) de linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp. Testes feitos a 30° e 35 °C.....	42
Tabela 8 : Concentrações inibitórias mínimas de fluconazol, anfotericina B, 5-flucitosina, micafungina e mancozeb para células não adaptadas (NA), adaptadas (A) e colônias adaptadas cultivadas 10 vezes em meio isento de agroquímicos (10p - 10 passagens) de linhagens de <i>C. glabrata</i> . Testes feitos a 30° e 37°C.	43
Tabela 9 : Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico carbendazim e de antifúngicos clínicos para as linhagens de <i>C. gattii</i> , determinada por meio do método de microdiluição em caldo.	47
Tabela 10 : Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico carbendazim e de antifúngicos clínicos para as linhagens de <i>C. neoformans</i> , determinada por meio do método de microdiluição em caldo.....	47

Tabela 11: Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico carbendazim e de antifúngicos clínicos para as linhagens de <i>C. glabrata</i> , determinada por meio do método de microdiluição em caldo.	48
Tabela 12: Seleção de subpopulações de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> menos susceptíveis ao carbendazim.....	50
Tabela 13: Concentrações inibitórias mínimas de fluconazol, anfotericina B, 5-flucitosina e carbendazim para células não adaptadas (NA), adaptadas (A) e colônias adaptadas cultivadas 10 vezes em meio isento de agroquímicos (10p - 10 passagens) de linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp. Testes feitos a 30° e 35 °C.....	51

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1. <i>Cryptococcus</i> spp.....	12
1.1.2. Fatores de virulência em <i>Cryptococcus</i> spp.	15
1.2. <i>Candida glabrata</i>	16
1.2.1. Candidíases.....	17
1.2.2. Fatores de virulência em <i>C. glabrata</i>	18
1.3. Tratamento de infecções fúngicas	19
1.4. Resistência a antifúngicos	22
1.5. Uso de agroquímicos e o impacto em fungos ambientais	24
2. Justificativa.....	27
3. Objetivos.....	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. Metodologia.....	29
4.1. Amostragem	29
4.2. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos	30
4.3. Teste de susceptibilidade em meio sólido.....	31
4.4. Adaptação dos fungos aos agroquímicos.....	31
4.5. Identificação de fatores de virulência.....	32
4.5.2. Análise de formação de biofilme em <i>C. glabrata</i> e <i>Cryptococcus</i> spp.	32
4.5.3. Avaliação da atividade metabólica do biofilme.....	33
4.6. Análise estatística	34
5. Resultados.....	35
5.1. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos clínicos e ao mancozeb.....	35
5.2. Adaptação das linhagens ao agroquímico mancozeb	38
5.3. Influência do mancozeb na morfologia de <i>Cryptococcus</i> spp.....	43
5.4. Influência do mancozeb na formação de biofilme.....	44
5.5. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos e ao carbendazim	46
5.6. Adaptação das linhagens ao agroquímico carbendazim.....	48

5.7.	Influência do carbendazim na morfologia de <i>Cryptococcus</i> spp.....	51
5.8.	Influência do carbendazim na formação de biofilme	53
6.	Discussão	55
7.	Conclusão	59
8.	Perspectivas	59
9.	Referências	60

1. Introdução




















Os fungos são organismos eucariotos unicelulares ou multicelulares capazes de causar infecções endêmicas e graves que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, sejam elas hígdidas ou imunocomprometidas. Fungos podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo humanos, animais e plantas, além de serem capazes de sobreviver em uma variedade de ambientes (Munzen; Goncalves Garcia; Martinez, 2023; Yiallouris et al., 2024).

Doenças fúngicas são a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo, principalmente nos casos de infecções invasivas, sendo *Candida*, *Aspergillus*, e *Cryptococcus* os patógenos mais comuns presentes nesse tipo de infecção (Parsons; Diekema, 2023; Spallone; Schwartz, 2021).

Nos últimos anos, alguns patógenos fúngicos tem emergido devido ao aumento da taxa de incidência, representando assim, uma ameaça à saúde pública global (Parsons; Diekema, 2023; Zhao et al., 2023). Espécies de *Candida* e *Cryptococcus* têm se destacado nesse quesito devido ao aumento de resistência a antifúngicos, morbidade e mortalidade; além de serem dois dos principais agentes etiológicos causadores de infecções fúngicas invasivas (Arendrup; Patterson, 2017; Beardsley et al., 2023; Rathore et al., 2022).

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou uma lista de patógenos fúngicos prioritários com o objetivo de orientar a pesquisa, o desenvolvimento e as ações de saúde pública frente à emergência de algumas espécies fúngicas (Figura 1) (World Health Organization, 2022). Dentre essas espécies são citadas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, agentes causadores da criptococose, que fazem parte do grupo de prioridade crítica e média, respectivamente; e *Candida glabrata*, fazendo parte do grupo de prioridade alta. No presente estudo, serão abordadas essas três espécies de leveduras.

Figura 1: Lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS

Critical group	High group	Medium group
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Fonte: World Health Organization, 2022

1.1. *Cryptococcus* spp.

O gênero *Cryptococcus* pertence ao filo Basidiomycota, classe Tremellomycetes, ordem Tremellales e família Tremellaceae. Esse gênero agrupa mais de 30 espécies e as duas espécies mais prevalentemente encontradas como patógenos humanos são *C. neoformans* e *C. gattii* (Hallas-Mølle et al., 2024; Yang et al., 2022). Além dessas, outras espécies como *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus diffluens*, *Cryptococcus liquefaciens*, *Cryptococcus adeliensis* e *Cryptococcus luteolus* já foram descritas causando infecção em humanos (Cano; Yetmar; Razonable, 2020; Morales-López; Garcia-Effron, 2021). *Cryptococcus* spp. são leveduras haploides que apresentam células globosas com 5–7 μm de diâmetro, envoltas por uma cápsula

polissacarídica composta pelos polissacarídeos Glucuronoxilomanana e galactoxilomanana (Beardsley et al., 2023; Freitas; Santos, 2021).

O ciclo de vida de *Cryptococcus* envolve tanto a reprodução assexuada quanto a sexuada. Na reprodução assexuada, células encapsuladas haploides se reproduzem por mitose com formação de brotamentos. A reprodução sexuada resulta da fusão de dois *mating types* (MATa e MAT α). Células haploides MATa e MAT α propagam no ambiente onde secretam feromônios que permitem que as mesmas se encontrem. Ocorre então fusão entre essas duas células haploides, que sofrem um dimorfismo formando hifas dicarióticas que se desenvolvem em basídios e leva à formação de basidiósporos (Kwon-Chung et al., 2014; Maziarz; Perfect, 2016).

C. gattii e *C. neoformans* residem em diversos nichos ecológicos no ambiente, ambas as espécies são encontradas de forma abundante em material em decomposição e dentro da cavidade de várias espécies arbóreas (May et al., 2016). *C. gattii* é encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais nas cascas e buracos de árvores, solo ao redor de árvores colonizadas e biomassa em decomposição. Esta espécie está comumente associada a diversas espécies de árvores de eucalipto, carvalhos e baobás. *C. neoformans* tem distribuição mundial, já foi isolado de mais de 36 gêneros de espécies arbóreas além de madeira em decomposição, troncos ocos de árvores, fezes de pássaros e solo associado a fezes de aves; sendo particularmente abundante em excretas de aves, principalmente pombos (Beardsley et al., 2023; Garcia-Bustos et al., 2024; Hallas-Mølle et al., 2024; Maziarz; Perfect, 2016).

1.1.1. Criptococose – infecção, disseminação e manifestações clínicas

C. neoformans e *C. gattii* são os principais agentes etiológicos da criptococose, uma infecção fúngica invasiva que acomete humanos e outros animais (Gushiken; Saharia; Baddley, 2021). *C. neoformans* é o fungo presente na maioria dos casos de criptococose (cerca de 80%) com taxa mortalidade variando entre 41% e 61% dos casos, principalmente em pacientes com infecção pelo HIV. Já *C. gattii*, ocorre com menos frequência; é responsável por causar 11 a 33% das infecções invasivas de criptococose em todo o mundo e apresenta taxa de mortalidade variando entre 10% e 25% (Beardsley et al., 2023; Kwon-Chung et al., 2014; World Health Organization, 2022).

A transmissão da criptococose geralmente ocorre por meio da inalação de basidiósporos ambientais ou pequenas células de levedura que em seguida, se depositam nos alvéolos pulmonares gerando uma infecção pulmonar primária que em geral é assintomática ou com poucos sintomas, podendo causar pneumonia em pacientes imunossuprimidos (Gushiken; Saharia; Baddley, 2021; Maziarz; Perfect, 2016). Em hospedeiros imunocompetentes, essa infecção pode ser resolvida pelo sistema imunológico e em alguns casos as células fúngicas estabelecem uma infecção latente assintomática. Então, com uma imunossupressão subsequente, o *Cryptococcus* pode reativar e se disseminar via hematogênica para outros órgãos do corpo como fígado, baço, linfonodos, pâncreas e principalmente, disseminam para o sistema nervoso central (SNC) onde causam meningoencefalite (Dai et al., 2024; May et al., 2016; Tai et al., 2024).

Para alcançar o cérebro, as células fúngicas atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) que tem como função bloquear a entrada de microrganismos no SNC. Existem três mecanismos que descrevem como isso ocorre. Um deles é conhecido como “cavalo de troia”, no qual o fungo atravessa a BHE dentro de células fagocíticas infectadas (escondendo-se dentro dos fagócitos). Outro mecanismo descrito é a paracitose, nesse mecanismo, as células de levedura fazem a migração entre as junções estreitas das células endoteliais do revestimento da microvasculatura da BHE, facilitada pela protease MPR1. A ligação e a invasão dependem de elementos do hospedeiro (como CD44 e anexina A2) e fatores fúngicos, como urease, fosfolipase B, secreção de ácido hialurônico e algumas metaloproteases. Por último, na transcitose o fungo é diretamente captado, atravessa pelas células endoteliais da BHE e transmigram através do citoplasma (Rathore et al., 2022; Zaragoza, 2019).

As apresentações clínicas mais comuns na criptococose incluem meningite e pneumonia, com os pacientes frequentemente exibindo sintomas como dores de cabeça, fadiga, perda de peso, anorexia e tontura (Tai et al., 2024). Durante a infecção pulmonar o indivíduo geralmente apresenta sintomas inespecíficos, como tosse, dispnéia, dor torácica e febre, entretanto pode ser totalmente assintomática (30 a 40% dos pacientes imunocompetentes) e em alguns casos, pode causar insuficiência respiratória. Os sintomas inespecíficos durante esta infecção provavelmente causam atrasos no diagnóstico e no tratamento adequado, resultando em maiores chances de disseminação da infecção por *Cryptococcus* (Setianingrum; Rautemaa-Richardson; Denning, 2019; Yamamura; Xu, 2021). Já na infecção do SNC, as manifestações clínicas da criptococose incluem uma infinidade de sinais e sintomas, como dor de cabeça, febre, neuropatias cranianas, alterações

mentais, letargia, perda de memória, sinais de irritação meníngea ou coma. Esses sintomas podem se desenvolver durante um período de 2 a 4 semanas (Maziarz; Perfect, 2016; Perfect; Casadevall, 2002).

1.1.2. Fatores de virulência em *Cryptococcus* spp.

Vários fatores de virulência associados à *Cryptococcus* spp. contribuem para que o fungo se instale no organismo causando a infecção, como por exemplo: aumento da cápsula polissacarídica, formação de melanina e a capacidade de crescer a 37°C (Bielska; May, 2015; Kwon-Chung et al., 2014).

A cápsula é o principal fator de virulência em *Cryptococcus* spp., durante a infecção, a produção de cápsulas é elevada. Fatores como alto nível de CO₂, pH alcalino, baixo nível de ferro e glicose, temperatura elevada, dentre outros, induzem a formação e alargamento da cápsula (Rathore et al., 2022). A cápsula é importante no escape imunológico e interfere nos mecanismos imunes do hospedeiro. No hospedeiro, a cápsula tem múltiplas funções de proteção, incluindo a inibição da fagocitose de macrófagos, a redução da capacidade de apresentação de antígenos das APCs, a regulação negativa dos níveis de citocinas inflamatórias e a depleção de componentes do complemento, o que contribui para a atenuação da resposta imune do hospedeiro. Além disso, quando a célula é fagocitada por macrófagos, a cápsula confere proteção contra o ataque de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (Casadevall et al., 2019; Yang et al., 2022).

A melanina é um polímero multifuncional responsável pela coloração escura em animais, plantas, fungos e bactérias. Nos fungos, a melanina contribui para a infecção do hospedeiro e protege contra vários estressores ambientais (Cordero et al., 2022). A melanina é catalisada pela enzima lacase e desempenha um importante papel na virulência de *Cryptococcus*, ela afeta as células imunológicas, alterando os níveis de produção de citocinas inflamatórias e/ou diminuindo a taxa de fagocitose, tem um papel importante na disseminação, protege contra o estresse oxidativo e reduz a suscetibilidade dos medicamentos antifúngicos ao se ligar aos medicamentos e diminuir a permeabilidade do medicamento na célula (Casadevall; Rosas; Nosanchuk, 2000; Rathore et al., 2022; Williamson, 1997).

A capacidade de sobreviver em temperaturas elevadas é fundamental para que os patógenos humanos sejam capazes de causar doenças invasivas. Em *Cryptococcus*, a capacidade de crescer a

37°C é regulada pela fosfatase calcineurina e permite que o fungo colonize e se multiplique dentro do hospedeiro (Bielska; May, 2015; Kwon-Chung et al., 2014).

1.2. *Candida glabrata*

O gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales e família Candidaceae; é caracterizado por ser heterogêneo e possui cerca de 300 espécies (Takashima; Sugita, 2022; Wang et al., 2008). Esse gênero representa um grande grupo polifilético de células caracterizadas pela presença de hifas e de colônias brancas, inicialmente agrupadas devido à sua morfologia semelhante e à falta de um teleomorfo definido (Kidd; Abdolrasouli; Hagen, 2023; Wang et al., 2008). Existem pelo menos 18 diferentes espécies de *Candida* que pode causar infecção em humanos. Entretanto, seis desses patógenos são os principais responsáveis por causar infecções invasivas (95% dos casos): *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, e *Candida krusei*. Dentre essas espécies, o patógeno mais comum no contexto clínico é *C. albicans* (Gómez-Gaviria; Ramírez-Sotelo; Mora-Montes, 2023; Talapko et al., 2021). Embora *C. albicans* seja a espécie causadora predominante dessas infecções, *C. glabrata* é um patógeno oportunista emergente que tem se destacado e atualmente ocupa o segundo lugar entre os principais agentes causadores das candidíases de acordo com a OMS (Angoulvant; Guitard; Hennequin, 2016; Castrejón-Jiménez et al., 2022; World Health Organization, 2022).

A *Candida glabrata* foi isolada pela primeira vez de fezes humanas por Anderson HW durante seu estudo em 1917 e denominada *Cryptococcus glabratus* (Anderson, 1917). Em 1938, essa espécie foi denominada *Torulopsis glabrata*, depois que Lodder e De Vries avaliaram que suas características morfofisiológicas e sua incapacidade de produzir pseudomicélio eram semelhantes às leveduras do gênero *Torulopsis* (Lodder; De Vries, 1938). Posteriormente, esse nome foi alterado para *Candida glabrata* quando a definição do gênero *Candida* foi alterada de “formação de pseudomicélio por todas ou pela maioria das cepas de todas as espécies e variedades” para “pseudohifas ausentes, rudimentares ou bem desenvolvidas” (Yarrow; Meyer, 1978). Finalmente, em 2003, devido aos avanços nos métodos moleculares, Kurtzman propôs a inclusão de *C. glabrata* em um clado que ele denominou Nakaseomyces (Kurtzman, 2003).

Candida glabrata é uma levedura assexuada e haploide com cerca de 1-4 µm de comprimento (Hassan; Chew; Than, 2021; Silva et al., 2012). É um fungo comensal presente em seres humanos hígidos, comumente encontrados dentro de múltiplos nichos no corpo como pele, cavidade oral e trato gastrointestinal (Roy; Thompson, 2015).

O nicho ecológico de *C. glabrata* é altamente específico, entretanto pode se adaptar a diferentes microambientes para proliferar de forma eficiente dentro do hospedeiro. *Candida glabrata* é comumente encontrada no ambiente, principalmente em flores, folhas, superfícies, água e solo. Já foi descrita sendo encontrada na fermentação de grãos de café, plantação de mandioca, fezes de várias espécies de aves e em bovinos, sendo nestes responsáveis por causar diarreia. Já foi isolada também em áreas próximas a habitações humanas o que pode ser interpretado como uma contaminação do meio ambiente por seres humanos. Em ambientes hospitalares, *C. glabrata* já foi isolada de superfícies abióticas e das mãos da equipe de saúde (Angoulvant; Guitard; Hennequin, 2016; Ferreira et al., 2010; Frías-De-león et al., 2021; Hassan; Chew; Than, 2021).

1.2.1. Candidíases

C. glabrata, apesar de fazer parte da microbiota, causa infecções oportunistas no ser humano chamadas candidíase (Pappas et al., 2018; Roy; Thompson, 2015). O termo candidíase é amplo e refere-se às infecções cutâneas, infecções de mucosas e infecções profundas causadas por fungos do gênero *Candida* (Pappas et al., 2018). A candidíase invasiva refere-se às infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida spp.* (candidemia) e infecções profundas como abscesso intra-abdominal, peritonite ou osteomielite (Frías-De-león et al., 2021).

C. glabrata tem a capacidade de aderir, colonizar e invadir diferentes nichos do hospedeiro, podendo causar infecções superficiais e infecções invasivas profundas com risco de vida no hospedeiro humano. O rompimento físico da camada epitelial é um fator de risco importante para a infecção sistêmica por *C. glabrata*, que geralmente ocorre em indivíduos imunocomprometidos (Duggan; Usher, 2023; Rasheed; Battu; Kaur, 2020)

A *C. glabrata* é responsável por causar candidíase da mucosa, principalmente orofaríngea, esofágica e vaginal. Na candidíase orofaríngea o fungo causa lesões inflamatórias pseudomembranosas e eritematosas que resultam em morbidade significativa com queimaduras, dor, disfagia, disgeusia e comprometimento nutricional (Angoulvant; Guitard; Hennequin, 2016).

É também um dos agentes causadores das infecções do trato urinário e é considerada segunda maior causadora de candidíase vulvovaginal. Os sintomas vaginais podem incluir edema, eritema vulvovaginal, sensibilidade e queimação. Esses sintomas geralmente são acompanhados de corrimento vaginal composto por epitélio descamado, células imunológicas, leveduras e fluido vaginal (Kennedy; Sobel, 2010; Kumar et al., 2019; Willems et al., 2020).

Apesar de causar infecções superficiais, a principal preocupação nas infecções por *C. glabrata* são as formas invasivas que podem levar a óbito. A rota usual da *C. glabrata* para alcançar a corrente sanguínea e conseqüentemente causar infecção invasiva, é por meio da quebra de barreiras naturais, como o uso de cateteres, trauma ou cirurgia. O risco da doença aumenta em determinadas condições, como AIDS e tuberculose, uso de imunossupressores e medicamentos contra o câncer, antibioticoterapia prolongada e hospitalização prolongada (Angoulvant; Guitard; Hennequin, 2016; Hassan; Chew; Than, 2021). As infecções da corrente sanguínea são comumente encontradas em indivíduos idosos, pacientes diabéticos e transplantados (Kumar et al., 2019).

1.2.2. Fatores de virulência em *C. glabrata*

A patogenicidade de *C. glabrata* está associada a muito fatores de virulência, como: aderência, formação de biofilme, capacidade de resistir a um alto grau de estresses variados, suprimir e/ou evitar a resposta imunológica e adaptar-se às mudanças nas condições ambientais (Galocha et al., 2019; Rasheed; Battu; Kaur, 2020).

A capacidade das espécies de *Candida* de aderir a superfícies bióticas ou abióticas contribui significativamente para sua virulência, permitindo a invasão e facilitando a formação de biofilme (Lass-Flörl et al., 2024). A adesão é facilitada por meio da produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lipases) por *C. glabrata* e sua liberação no ambiente local que causam a destruição dos tecidos do hospedeiro, incluindo a pele, as membranas da mucosa vaginal e oral (Frias-De-león et al., 2021).

A formação de biofilme é um fator de virulência que permite que a *C. glabrata* colonize e persista em diferentes tecidos do hospedeiro e forneça um ambiente protetor para resistir a medicamentos antifúngicos e ao ataque do sistema imunológico. Os biofilmes são caracterizados por uma estrutura compacta e densa de células de levedura envoltas por uma matriz extracelular composta por altos níveis de proteínas e carboidratos, incluindo β -1,3 glucana (Castrejón-Jiménez

et al., 2022; Kumar et al., 2019). Vários genes estão associados à formação de biofilme em *C. glabrata* com destaque os genes da família EPA que codificam adesinas importantes para esse processo (Roy; Thompson, 2015).

As células de levedura em seu habitat natural fazem muitos ajustes metabólicos em resposta a mudanças nos nutrientes presentes no meio extracelular. Essas alterações resultam na expressão gênica, que é regulada para maior ou menor expressão, dependendo dos requisitos ambientais (Hassan; Chew; Than, 2021). A adaptação da expressão gênica por meio da regulação da transcrição é um mecanismo significativo na resposta dos fungos às condições ambientais que mudam rapidamente. Essa adaptação permite inclusive que *C. glabrata* sobreviva e se multiplique dentro de macrófagos por um longo período de tempo. A sobrevivência de *C. glabrata* dentro do fagossomo é devido à sua capacidade de gerar fortes respostas de estresse contra ROS, neutralizando o ambiente fagocítico e, assim, escapando da fagocitose. Esse fenômeno requer a ativação de diferentes genes no patógeno (Skn7p, Yap1p, Msn2p e Msn4p) que codificam proteínas (fatores de transcrição Skn7, CgYap1, MSN2p, MSN4p) envolvidas na desintoxicação e no reparo, como catalases, superóxido dismutases, glutathione peroxidases e tioredoxinas (Castrejón-Jiménez et al., 2022; Frías-De-león et al., 2021).

1.3. Tratamento de infecções fúngicas

O arsenal de antifúngicos utilizados para tratamento das infecções é bem limitado devido a toxicidade que apresentam, o que gera um problema na administração das terapias antifúngicas. Um dos motivos para essa dificuldade ser maior em fungos é a natureza eucariótica tanto do microrganismo quanto do hospedeiro humano, com ambos compartilhando vias bioquímicas semelhantes e organelas. Muitos mecanismos de ação de antifúngicos atacam os fungos com moléculas tóxicas que também são tóxicas para os seres humanos. Sendo assim, o tratamento ideal é aquele que atinge uma eficácia favorável com o mínimo de danos às funções celulares do hospedeiro (Munzen; Goncalves Garcia; Martinez, 2023; Perfect, 2017).

Para muitas das micoses superficiais, são utilizados desde o século passado, uma série de medicamentos tópicos que tiveram sucesso moderado no controle de infecções comuns e que causam irritações. Em contrapartida, para as micoses invasivas, como a criptococose e a infecção profunda causada por *C. glabrata*, que exigem terapia antifúngica sistêmica, apenas quatro classes

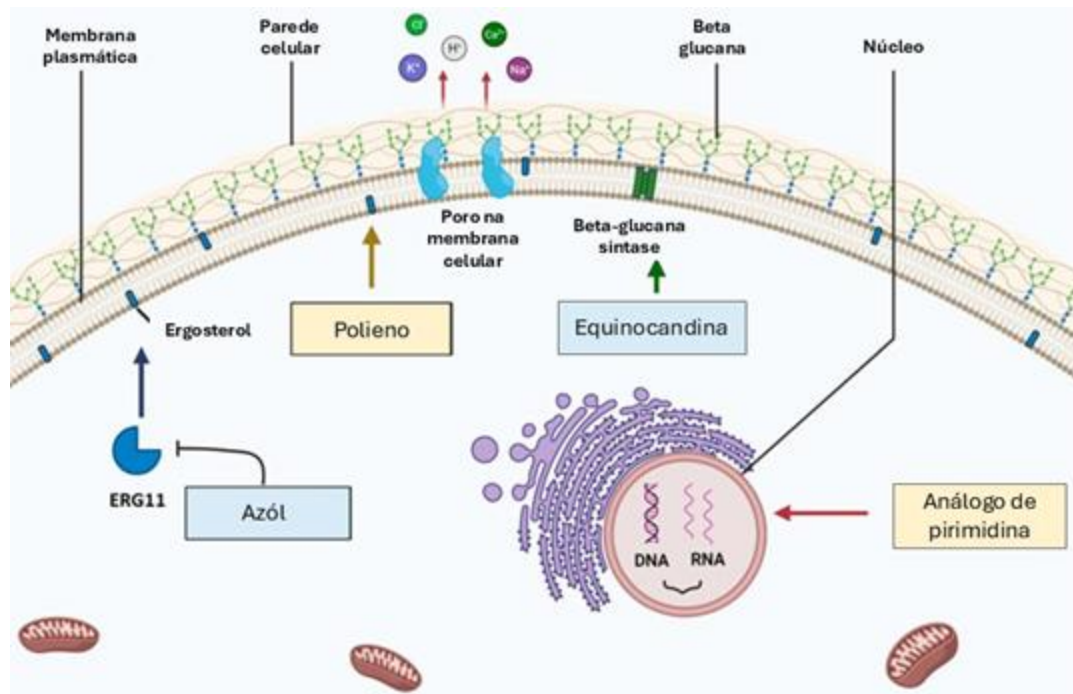
principais de agentes antifúngicos são utilizadas no tratamento: polienos (ex.: nistatina e anfotericina B), análogos de pirimidina (ex.: 5-flucitosina), azóis (ex.: fluconazol, posaconazol, voriconazol e itraconazol) e equinocandinas (ex.: anidulafungina, micafungina e caspofungina) (Figura 2) (Perfect, 2017; Rasheed; Battu; Kaur, 2020; Revie et al., 2018).

Os azóis atuam na biossíntese de ergosterol, um importante constituinte da membrana celular fúngica. Eles agem através da inibição da C14- α esterol demetilase (codificada pelo ERG11) que leva ao interrompimento da integridade da membrana celular devido ao acúmulo de precursores de esteróis e redução do ergosterol (Bhattacharya; Sae-Tia; Fries, 2020; Nett; Andes, 2016; Van Daele et al., 2019). Azóis são componentes chave do manejo clínico de micoses invasivas como agentes antifúngicos de amplo espectro. O fluconazol (FCZ), por exemplo, é amplamente prescrito devido à facilidade na administração (via oral), baixa toxicidade e baixo custo (Hassan; Chew; Than, 2021; Nett; Andes, 2016; Perfect, 2017).

Os análogos da pirimidina têm como modo de ação a inibição da síntese de DNA e de proteínas. Eles são nucleosídeos que imitam a estrutura natural das pirimidinas presentes nos ácidos nucleicos. A flucitosina (5-FC) é o único antifúngico dessa classe usado para tratamento humano, cuja atividade antimicótica resulta de sua conversão em 5-fluorouracil (5-FU) dentro da célula fúngica. Isso pode resultar em alterações no pool de aminoácidos e na inibição da síntese de proteínas e DNA (Ksiezopolska; Gabaldón, 2018; Vermes; Guchelaar; Dankert, 2000). Foi demonstrado que o 5-FC é ativo contra *Candida* spp. Entretanto, devido ao rápido desenvolvimento de resistência, ele deve ser usado em combinação com outros agentes antifúngicos, como ANB (Puia-Dumitrescu; Smith, 2017).

Os polienos se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica por meio de interações hidrofóbicas, formam poros na membrana levando ao vazamento de constituintes intracelulares e resultando em morte celular. Por esse motivo, os polienos são considerados fungicidas (Nett; Andes, 2016; Ostrosky-Zeichner et al., 2010; Padmavathi et al., 2024). Já foi descrito também que a anfotericina B (ANB), um antifúngico pertencente a essa classe, tem a capacidade de gerar estresse oxidativo nos fungos devido à produção de ROS (Carlson et al., 2021; Wang et al., 2021). Apesar da potente atividade fungicida dos polienos, o uso na clínica é limitado pela alta toxicidade ao hospedeiro devido semelhança estrutural entre o ergosterol presente na célula fúngica e o colesterol presente da membrana dos mamíferos (Robbins; Caplan; Cowen, 2017).

Figura 2: Mecanismos de ação antifúngica para as quatro principais classes de medicamentos. (1) Os **Azóis** se ligam e inibem a enzima ERG11 e a subsequente produção de ergosterol. (2) Os **Polienos** se ligam ao ergosterol e induzem a formação de poros na membrana celular, que causam vazamento de íons intracelulares. (3) As **Equinocandinas** se ligam e inibem a beta-glucana sintase, o que interrompe a arquitetura da parede celular. (4) Os **Análogos de pirimidina** são incorporados às moléculas de ácido nucleico e interrompem a síntese de DNA/RNA.



Fonte: Adaptada de CZAJKA et al., 2023

Equinocandinas atuam na inibição da biossíntese da parede celular fúngica, pois bloqueiam a 1,3- β -glucana sintase (Perfect, 2017; Revie et al., 2018). Essa enzima é codificada por FKS1 e FKS2 em *C. glabrata*. Um bloqueio na biossíntese de 1,3- β -glucana sintase resulta em uma ruptura da integridade da parede celular e em um desequilíbrio da pressão osmótica, causando um efeito fungicida na célula (Lee et al., 2021; Potruch et al., 2024). Essa classe antifúngica é considerada primeira linha de escolha para o tratamento de infecções hospitalares relacionadas à candidíase invasiva e candidemia, sendo seu uso em aproximadamente 60% casos (Barantsevich; Barantsevich, 2022; Perfect, 2017; Perlin; Rautemaa-Richardson; Alastruey-Izquierdo, 2017). As equinocandinas, entretanto, não são utilizadas no tratamento da criptococose uma vez que espécies de *Cryptococcus* não são susceptíveis a essa classe de antifúngicos (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021; Revie et al., 2018).

O padrão ouro de tratamento para criptococose é dividido em duas fases, inicialmente na fase de indução, é utilizado ANB isolada ou combinada à 5-FC, em seguida realiza-se a fase de manutenção do regime de tratamento com FCZ (Bielska; May, 2015; Kwon-Chung et al., 2014; Zhao et al., 2023). Apesar de ser considerado o tratamento padrão para criptococose, existem algumas limitações nesse tratamento como o custo elevado; a disponibilidade, 5-FC por exemplo nem sempre está disponível em locais onde a carga da doença e as taxas de mortalidade são mais altas; e a ANB que deve ser administrada por via intravenosa e apresenta toxicidades notáveis. Em locais onde a ANB e 5-FC não estão disponíveis, FCZ é utilizado na fase de indução em altas concentrações (Bielska; May, 2015; Maziarz; Perfect, 2016; World Health Organization, 2022).

1.4. Resistência a antifúngicos

A resistência a antifúngicos pode ser definida como a incapacidade de um antifúngico matar ou inibir o crescimento *in vitro* de fungos, e é classificada em intrínseca ou adquirida (BASTOS et al., 2021). A resistência intrínseca é aquela codificada geneticamente, refere-se às espécies fúngicas inerentemente não susceptíveis a determinados antifúngicos; já na resistência adquirida, ocorrem mutações que evoluem na população e são selecionadas após a exposição a um antifúngico. A resistência adquirida em geral desenvolve-se frente a um agente estressor como, por exemplo, antifúngicos ou seu análogo estrutural (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021; Carneiro et al., 2020a; Silva et al., 2012).

Um outro termo utilizado quando se trata de resistência é heteroresistência. Esse fenômeno acontece quando uma subpopulação de microrganismo se adapta e cresce na presença de concentrações mais elevadas de um antimicrobiano. A heteroresistência é reversível e, quando cessa o estímulo, o microrganismo retorna as suas características originais (Ferreira; Santos, 2017; Ferreira et al., 2015). Já o termo tolerância é usado de forma mais geral para descrever a capacidade dos microrganismos de sobreviver à exposição transitória ao estresse da droga sem uma mudança na concentração inibitória mínima (MIC), que é frequentemente alcançada pelo retardo da multiplicação da divisão celular (Ferreira; Santos, 2017). Outro fenômeno de resistência que também pode ocorrer é a resistência cruzada, na qual uma cepa de microrganismo apresenta resistência a um antimicrobiano e se torna resistente a outros compostos por possuírem alvos de ação semelhantes (Faria-Ramos et al., 2014; Rocha et al., 2016; Zhang et al., 2017).

A limitação nas opções para tratamento de infecções fúngicas é um fator extremamente relevante quando se trata de resistência, uma vez que resistência a qualquer classe de medicamentos pode limitar de forma significativa as opções de tratamento (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021; Zhao et al., 2023). Numerosos mecanismos de resistência já foram descritos estando presentes em espécies de *Cryptococcus* e *Candida*.

Existem vários mecanismos de resistência que os fungos utilizam na presença de azóis. Um dos mecanismos de resistência a azóis mais prevalentes, é alteração ou superexpressão do gene ERG11 que codifica a enzima alvo dos azóis, lanosterol 14 α -demetilase (Revie et al., 2018). Outro mecanismo importante é o aumento da expressão de bombas de efluxo que reduz a concentração intracelular da droga. Os transportadores mais comuns presente nos fungos são os transportadores ABC (Mdr1, Afr1, Pdr11) que requerem ATP para conduzir a droga para fora da célula (Yang et al., 2016; Yoo et al., 2024). Estudos realizados por Yang e colaboradores (2016) demonstraram que ao deletar os genes que codificam a bomba de efluxo AFR1 em *C. gattii*, a susceptibilidade ao FCZ aumenta. Em contrapartida, quando restaurada a expressão desses genes, pode-se observar resistência ao fármaco. Alterações ou mutações no ERG11 em *C. glabrata* não é um mecanismo muito comum (Hassan; Chew; Than, 2021; Whaley et al., 2017); o mecanismo mais presente é a superexpressão dos genes que codificam as bombas de efluxo ABC que em *C. glabrata* é o CDR1 e CDR2 (Pdh1) (MISAS et al., 2024). Galocha e colaboradores (2022) demonstraram que os transportadores de hexose (CgHxt4/6/7 e CgHxt6/7) afetam o acúmulo de azol em *C. glabrata*, desempenhando um papel importante na aquisição de resistência por isolados clínicos. Eles observaram que esses transportadores aumentam o acúmulo de azóis dentro da célula conferindo susceptibilidade à droga, enquanto que mutações com perda de função desses transportadores, levaram ao aumento da resistência (Galocha et al., 2019).

A resistência aos polienos é muito incomum uma vez que o seu alvo é uma molécula que tem papel central na biologia celular da levedura. A suscetibilidade reduzida aos polienos geralmente se deve a alterações na via de biossíntese de esteróis envolvendo mutações em genes como ERG2, ERG11 e ERG6, necessários para a função normal da membrana (Duggan; Usher, 2023; Silva et al., 2012).

A resistência à 5-FC surge rapidamente se usada como monoterapia devido às várias etapas em seu modo de ação. Algumas alterações, como o aumento da produção de pirimidina ou alterações nas enzimas-alvo UMP pirofosforilase, são responsáveis por reduzir a sensibilidade à

flucitosina (Arendrup; Patterson, 2017; Silva et al., 2012). A resistência a 5-FC pode se desenvolver por meio de mutações que impedem a entrada do fármaco na célula ou alterações enzimáticas que impedem a conversão de 5FC em 5-FU (McHale et al., 2023). Um estudo feito por Chang e colaboradores (2021) mostrou que mutações no gene UXS1 e a presença de seus supressores afetam os níveis de UDP-GlcUA intracelular em *Cryptococcus*. O acúmulo de UDP-GlcUA pode modular os níveis de expressão da citosina permease Fcy2 (principal permease conhecida pela absorção do 5-FC), resultando na suscetibilidade alterada à droga (Chang et al., 2021).

Por fim, a resistência à equinocandina entre as cepas de *C. glabrata* tem uma baixa prevalência, cerca de 4%. A resistência é adquirida por meio de mutações nos genes Fks1 e Fks2, principalmente no Fks2. Essa mutação altera a capacidade de ação antifúngica, uma vez que esses genes codificam a 1,3-D-glucano sintase, a enzima-alvo das equinocandinas (Czajka et al., 2023; Hassan; Chew; Than, 2021).

1.5. Uso de agroquímicos e o impacto em fungos ambientais

Fungos patogênicos, além de causar infecções entre seres humanos e animais, também causam danos agrícolas, gerando perda de alimentos na agricultura. Com isso, agroquímicos têm sido utilizados para controlar pragas agrícolas ao redor do mundo (Carneiro et al., 2020a; Woods; McAlister; Geddes-McAlister, 2023).

Apesar dos benefícios que trazem, o uso de agroquímicos tem se tornado motivo de preocupação uma vez que eles têm sido usados em grande quantidade gerando acúmulo no ambiente (Carneiro et al., 2020b). Dados mostraram que o uso de agroquímicos aumentou em média 93% no mundo nos últimos anos, e no Brasil, o uso de agrotóxicos aumentou 190% (Bastos et al., 2018).

Além de pesticidas causarem danos à saúde humana e animal, o uso generalizado de antifúngicos existentes na agricultura, acelerou a aquisição e o surgimento de resistência antifúngica. Esse aumento nos casos de resistência pode ser explicado pela pressão seletiva exercida pelos antifúngicos nos fungos presentes no ambiente (Bastos et al., 2018; Zhao et al., 2023).

Um dos agroquímicos mais utilizados na agricultura é o mancozeb. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), o mancozeb em 2023

foi o segundo ingrediente ativo mais comercializado no Brasil, tendo sido vendido neste mesmo ano, cerca de 52 mil toneladas desse composto (IBAMA, 2024).

Mancozeb é um fungicida pertencente ao grupo ditiocarbamato que atua inativando os grupos sulfidrila em aminoácidos e enzimas nas células fúngicas, e normalmente causam interrupção dos processos metabólicos e da função mitocondrial (Aprioku; Amamina; Nnabuenyi, 2023). É um fungicida eficaz com uma ampla gama de aplicações agrícolas (por exemplo, batata, tomate, videira e cítricos) e industriais, tendo como alvo cerca de 400 patógenos de plantas diferentes (Runkle et al., 2017).

Outro agroquímico importante é o carbendazim, um fungicida pertencente à classe dos benzimidazóis que atua na inibição de β -tubulinas, impedindo a divisão celular e levando o fungo à morte (Coutinho et al., 2006). É um fungicida sistêmico de amplo espectro amplamente utilizado ao redor do mundo como tratamento pré e pós-colheita para prevenir e erradicar uma variedade de doenças fúngicas em vários vegetais (Jin et al., 2023).

No Brasil, o uso do carbendazim foi descontinuado no ano de 2022 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), no entanto, o produto foi eliminado de forma gradual, uma vez que era amplamente utilizado por agricultores brasileiros (PEDUZZI et al., 2022). Até o ano de 2022, o carbendazim estava entre os 20 agrotóxicos mais comercializados no país com o uso agrícola até então aprovado para a modalidade foliar nas culturas de algodão, cana de açúcar, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo, e para a aplicação em sementes nas culturas de algodão, arroz, feijão, milho e soja (ANVISA, 2022). O último registro de vendas do agroquímico no Brasil de acordo com o Ibama foi de 89,89 toneladas no ano de 2023 (IBAMA, 2024).

Sabe-se que a resistência adquirida, em geral, ocorre frente à exposição prolongada a um antifúngico (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021). Entretanto existem casos de cepas resistentes em pacientes sem tratamento prévio com terapia antifúngica (Rocha et al., 2016). Uma vez que certos potenciais patógenos humanos podem ser facilmente isolados do material vegetal e do solo, sugere-se que a exposição aos agroquímicos, que seleciona cepas resistentes no ambiente, seja uma via de resistência a medicamentos de uso clínico (Bastos et al., 2021; Faria-Ramos et al., 2014).

Como alguns agroquímicos e antifúngicos de uso clínico compartilham o mesmo modo de ação e têm estruturas semelhantes, o risco de haver resistência cruzada entre esses compostos aumenta (Castelo-Branco et al., 2022). Como exemplo, a exposição *in vitro* ao agroquímico

procloraz leva a resistência estável aos antifúngicos fluconazol e ao voriconazol em *C glabrata* (Faria-Ramos et al., 2014).

Bastos e colaboradores (2019) mostraram em seus experimentos que a exposição ao agroquímico piraclostrobina, que atua na respiração mitocondrial da célula, pode induzir resistência cruzada permanente a antifúngicos clínicos. Bastos e colaboradores, determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos de uso clínico e da piraclostrobina em colônias de *C. gattii* e *C. neoformans* previamente adaptadas ao agroquímico e em colônias não adaptadas. Esses testes foram feitos nas temperaturas 30° e 35°C. Como resultado, puderam observar que a exposição à piraclostrobina induziu resistência cruzada temporária e permanente aos azóis clínicos de maneira dependente da temperatura, com uma maior taxa de resistência nas cepas incubadas a 30°C. Através da análise transcriptômica mostraram que houve aumento da expressão dos genes da bomba de efluxo (AFR1 e MDR1) nas cepas adaptadas ao agroquímico, sugerindo que os medicamentos antifúngicos são lançados para fora da célula. Foi observado também que a exposição ao agroquímico está relacionada à redução da virulência devido a menor expressão do gene CTR4 e outros possíveis genes envolvidos no metabolismo iônico, o que foi confirmado *in vivo* em camundongos.

Carneiro e colaboradores (2020) também obtiveram resultados semelhantes ao demonstrar que a exposição de *Cryptococcus spp.* ao agroquímico benomil pode induzir resistência cruzada ao fluconazol *in vitro*, devido ao aumento da expressão do gene MDR1, relacionado a bombas de efluxo.

Em outro estudo, Bastos e colaboradores (2018) ao estudar resistência cruzada de tebuconazol a antifúngicos de uso clínico em *C. gattii* e *C. neoformans*, observaram também que a resistência cruzada afeta a morfologia das células. Tendo o conhecimento prévio que características morfológicas das células de *Cryptococcus spp.* influenciam sua virulência, observaram que células adaptadas ao tebuconazol exibiram diâmetros maiores que as células não adaptadas e foram menos virulentas em ambas as espécies.

Em suma, fungicidas são usados em práticas agrícolas e depositados nas plantações, solos e água causando uma pressão seletiva em cepas ambientais de fungos, que posteriormente podem colonizar ou infectar humanos e outros animais, gerando nesses uma resistência cruzada a antifúngicos clínicos (Castelo-Branco et al., 2022; Rocha et al., 2016). Todo esse cenário se enquadra no contexto de Saúde Única (*One Health*), em se que reconhece a conexão entre a saúde

humana, animal e o ambiente (Castelo-Branco et al., 2022; Woods; McAlister; Geddes-McAlister, 2023).

2. Justificativa

Infecções causadas por fungos afetam milhões de pessoas em todo o mundo, segundo o *Global Action for Fungal Infections* (2024), cerca de dois milhões de pessoas morrem por ano no mundo de infecções fúngicas, ocupando o quinto lugar como maior causa de morte. Além disso, *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. são atualmente considerados pela OMS (2022), patógenos de prioridade devido ao aumento de morbidade, mortalidade e resistência.

A resistência antifúngica aumentou grandemente em leveduras nos últimos anos, o que coloca em risco a saúde das pessoas que são anualmente acometidas por candidíase e criptococose (World Health Organization, 2022). Essa situação torna-se ainda mais preocupante tendo em vista o limitado arsenal de antifúngicos disponíveis para tratamento (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021; Zhao et al., 2023).

Espécies como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. são exemplos de patógenos clinicamente relevantes encontrados de forma ubíqua no ambiente como em solo, plantas e matéria em decomposição; e que apresentam potenciais vetores de contato com humanos, animais, ou culturas agrícolas (Woods; McAlister; Geddes-McAlister, 2023). Por estarem presentes no solo, esses fungos estão sujeitos à ação de agroquímicos podendo ocorrer resistência cruzada aos antifúngicos de uso clínico como demonstrado em estudos anteriores (Bastos et al., 2018).

No Brasil, o uso de agroquímicos aumentou 700% nos últimos quarenta anos, sendo mais utilizado na região sudeste (SPADOTTO; GOMES, 2021). As vendas do agroquímico mancozeb por exemplo, aumentou de 6.821 toneladas em 2009 para 52.316 toneladas em 2023 (IBAMA, 2024). Esses dados tornam ainda mais preocupante a problemática da resistência antifúngica.

Quais classes de agroquímicos podem induzir resistência cruzada e quais mecanismos de resistência estão envolvidos são questões ainda pouco exploradas. Sendo assim, justifica-se a importância do presente trabalho tendo em vista a emergência da resistência dos fungos mencionados e a possibilidade do surgimento de resistência cruzada entre agroquímicos e antifúngicos de uso clínico.

3. Objetivos

Tendo em vista que o surgimento de resistência fúngica pode interferir na saúde humana, objetiva-se nesse estudo:

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência entre agroquímicos e antifúngicos de uso clínico na susceptibilidade de *Candida glabrata*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos clínicos fluconazol, anfotericina B, 5-flucitosina e micafungina; e aos agroquímicos carbendazim e mancozeb de *Candida glabrata*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*.
- Adaptar as linhagens dos fungos aos agroquímicos.
- Avaliar a susceptibilidade dos fungos aos antifúngicos de uso clínico após passarem por processo de adaptação aos agroquímicos e caracterizar linhagens adaptadas, bem como adaptadas e retiradas do contato com agroquímicos, com relação aos fatores de virulência.

4. Metodologia

4.1. Amostragem

Foram utilizadas neste estudo sete linhagens de *C. neoformans*, 10 de *C. gattii* e 10 de *C. glabrata* disponíveis na coleção de culturas do Laboratório de Micologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (Tabela1). As amostras foram mantidas em solução estoque no freezer à -80 °C. Posteriormente foram repicadas em meio Agar Sabouraud-dextrose (ASD) e incubadas por 48h - 72h a 37° C para a realização dos experimentos.

Tabela 1 : Linhagens de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. glabrata* utilizadas

Linhagens de <i>C. neoformans</i>	Origem
H99 (ATCC® 208821™)	Clínica – Nova York
WM 148 (ATCC® MYA-4564™)	Clínica – Austrália
WM 626 (ATCC® MYA-4565™)	Clínica – Austrália
WM 628 (ATCC® MYA-4566™)	Clínica – Austrália
WM 629 (ATCC® MYA-4567™)	Clínica – Austrália
ATCC 28957	Clínica - Lesão óssea humana
C31	Clínica
Linhagens de <i>C. gattii</i>	Origem
R265 (ATCC® MYA-4093™)	Clínica – Vancouver (Canadá)
ATCC 24065	Amostra referência
29/10893	Clínica
WM 178 (ATCC® MYA-4561™)	Clínica – Austrália
547 OTTI	Ambiental
19/13ER	Clínica
ICB 181	Ambiental - Brasil
WM 779 (ATCC® MYA-4563™)	Veterinária (Guepardo) – África do Sul
28/02	Clínica - Brasil
135L/03	Clínica
Linhagens de <i>C. glabrata</i>	Origem
ATCC 2001	Amostra referência
5	Clínica - Brasil
11A	Clínica - Brasil
11D	Clínica - Brasil
18A	Clínica - Brasil
31A	Clínica - Brasil
38B	Clínica - Brasil
40A	Clínica - Brasil
43	Clínica - Brasil
47	Clínica - Brasil

4.2. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos

A susceptibilidade das amostras fúngicas aos antifúngicos clínicos anfotericina B, fluconazol, 5-flucitosina e micafungina e aos agroquímicos mancozeb e carbendazim foi determinada segundo a metodologia de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para determinação da concentração inibitória mínima das linhagens de *C. gattii*, *C. neoformans* e *C. glabrata*.

Para o teste, foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços nas quais foi realizada a diluição seriada dos antifúngicos em caldo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) com vermelho de fenol, tamponado (pH 7,0) com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS). Foram obtidas nas placas 10 concentrações finais dos antifúngicos que variaram da seguinte forma: 64 – 0,125 µg/mL para fluconazol, 5-flucitosina e mancozeb; 32 – 0,06 para carbendazim e 16 – 0,03 µg/mL para ANB e micafungina. Aliquotas de 100 µl de cada diluição foram distribuídas nos poços da placa. O procedimento foi realizado em duplicata para cada linhagem e as concentrações foram distribuídas em ordem decrescente. Em cada placa havia controle de crescimento, contendo RPMI juntamente com o inóculo; e controle de esterilidade, contendo apenas o meio RPMI. Após a microdiluição das drogas, as placas foram fechadas, embaladas em filme transparente e refrigeradas a -20 °C até o momento do uso.

Para o preparo do inóculo, todos os microrganismos foram repicados em ágar Saborouad dextrose (ASD) e incubados nas temperaturas de 30° e 37°C por 24 horas para *C. glabrata* e 48 horas para *Cryptococcus* spp. O inóculo foi preparado pelo método espectrofotométrico. Foi preparada uma suspensão de células em tubos contendo 3 mL de solução salina 0,85% esterilizada. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e a transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530 nm, sendo ajustada para 75% a 77%, o que corresponde a uma suspensão de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Posteriormente, para o preparo da suspensão de trabalho, foi realizada uma diluição de 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão em meio líquido RPMI, resultando na concentração de 1×10^3 células/mL. Então, alíquotas de 100µL desse inóculo foram adicionados nas placas de 96 poços previamente preparadas contendo os antifúngicos.

As placas foram então incubadas nas temperaturas de 30° e 37°C por 48 horas para *Candida* spp. e 72 horas para *Cryptococcus* spp. A leitura foi realizada de forma visual, comparando o perfil

de crescimento na presença dos compostos em relação ao controle de crescimento. Para o fluconazol e 5-flucitosina foi considerado 50% de inibição em relação ao controle de crescimento e 100% de inibição para ANB, micafungina e os agroquímicos.

4.3. Teste de susceptibilidade em meio sólido

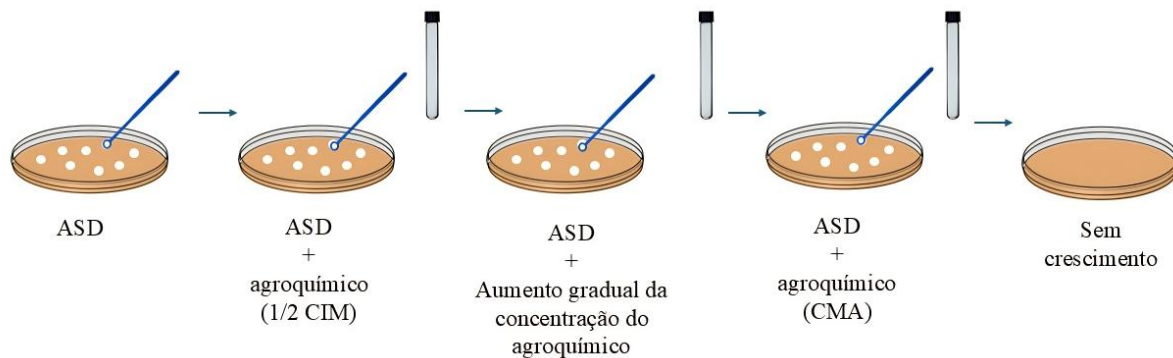
A concentração inibitória mínima para aos agroquímicos foi determinada também em ASD a fim de dar continuidade às demais etapas. Para isso, foram preparadas placas de ASD contendo diferentes concentrações dos agroquímicos (0,5 a 64 µg/mL). O inóculo, foi preparado utilizado espectrofotômetro. Suspensões de células em tubos contendo 3 mL de solução salina 0,85% esterilizada foram ajustados para 75% a 77% de transmitância (1×10^6 a 5×10^6 células/mL). Em seguida alíquotas de 5µL foram plaqueadas nas placas contendo ASD nas diferentes concentrações. As placas foram então incubadas nas temperaturas de 30° e 37°C por 48 horas para *Candida* spp. e 72 horas para *Cryptococcus* spp. A leitura foi realizada de forma visual.

4.4. Adaptação dos fungos aos agroquímicos

Depois de realizar teste de suscetibilidade em meio sólido, as cepas foram cultivadas em ASD com concentrações crescentes dos pesticidas para a adaptação dos fungos. Inicialmente todas as cepas foram cultivadas em meios suplementados com mancozeb e carbendazim separadamente na ½ CIM. Em seguida, foi feito o preparo dos inóculos em solução salina 0,85% estéril, e foram ajustados para 75% a 77% de transmitância (1×10^6 a 5×10^6 células/mL). Posteriormente, a suspensão foi inoculada em meio contendo os agroquímicos na CIM. As cepas foram cultivadas, de maneira gradual, em concentrações crescentes dos agroquímicos até a concentração na qual o crescimento cessou foi alcançada. A colônia então que cresceu na maior concentração, foi considerada adaptada ao agroquímico e a última concentração que houve crescimento, foi denominada concentração máxima alcançada (CMA) (Figura 3). Esses testes foram realizados a 30°C e 37°C. (Bastos et al., 2018). Por último, para avaliar se a exposição a crescentes doses de agroquímico influenciou na susceptibilidade, foi feito o teste de microdiluição em caldo (descrito no item 4.2) para estas colônias que cresceram na CMA. Foi feito ainda, 10 passagens sucessivas

em meio ASD sem agroquímico a partir das linhagens adaptadas para avaliar o efeito na susceptibilidade aos antifúngicos após cessar a exposição, essas linhagens foram denominadas 10p.

Figura 3: Esquema representando o processo de adaptação das linhagens ao agroquímico



Fonte: elaborada pelo autor

4.5. Avaliação de fatores de virulência

4.5.1. Formação de cápsula em *C. gattii* e *C. neoformans*

Colônias não adaptadas e adaptadas aos agroquímicos foram cultivadas em ASD e em ASD suplementado com os agroquímicos na CMA, por 72 h a 30°C e 37°C. Posteriormente, as células foram visualizadas em suspensão em tinta nanquim em microscópio óptico e os slides fotografados. A cápsula e diâmetro de pelo menos 50 células com formato regular foram medidos usando o software ImageJ 1,40 g. Para células com irregularidades na forma, foram realizadas análises qualitativas (Bastos et al., 2018).

4.5.2. Análise de formação de biofilme em *C. glabrata* e *Cryptococcus* spp.

Para avaliar a formação de biofilme, foram selecionadas as linhagens que apresentaram maior capacidade de adaptação bem como suas respectivas linhagens não adaptadas. Primeiramente, foi preparado um inóculo de 1×10^6 células/mL em solução salina estéril. Para a

etapa de pré-adesão, 100µL do inóculo foi colocado em placa de 96 poços de fundo chato com tampa e incubado em estufa a 37°C por 90 minutos. Após essa etapa, as placas foram lavadas duas vezes com 100µL de solução salina estéril. Foi adicionado então 100µL de meio RPMI nos poços após secagem e as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Passado esse tempo, os sobrenadantes foram removidos e os poços lavados cuidadosamente três vezes com salina estéril. Os biofilmes foram então fixados com etanol 99% durante 20 minutos e as placas foram deixadas em temperatura ambiente para secagem durante 30 minutos. Após o intervalo, foi adicionada a solução de cristal violeta a 0,4% e as placas ficaram em repouso durante 15 minutos. Em seguida, a solução de cristal violeta foi descartada e os poços lavados com salina. As placas ficaram mais 15 minutos em temperatura ambiente para secagem e logo após, com a adição de etanol a 95%, os biofilmes foram ressuspensos gentilmente e deixados em repouso durante 30 minutos, por último, o conteúdo das placas foi transferido para uma nova placa para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm. O teste foi realizado em quadruplicata.

4.5.3. Avaliação da atividade metabólica do biofilme

Para a avaliação da atividade metabólica do biofilme, inicialmente foi realizada a formação do biofilme. Um inóculo de 100µL contendo 1×10^6 células/mL em solução salina estéril foi colocado em placa de 96 poços de fundo chato com tampa e foi incubado em estufa a 37°C por 90 minutos (etapa de pré-adesão). Após essa etapa, as placas foram lavadas duas vezes com 100µL de solução salina estéril. Foi adicionado então 100µL de meio RPMI nos poços após secagem e as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Passado esse tempo, os sobrenadantes foram removidos e os poços lavados cuidadosamente três vezes com salina estéril mantendo no fundo da placa o biofilme formado. Foi adicionado aos poços 50µL de XTT na concentração de 1mg/mL e 4µL de Menadiona 10mM, preparada em acetona. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 2 horas para as culturas de *Candida* e por 5 horas para as culturas de *Cryptococcus*. Por último, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de ondas de 450nm. O teste foi realizado em quadruplicata.

4.6. Análise estatística

Todos os dados serão analisados utilizando o software GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados serão considerados estatisticamente significativos quando o p valor apresentar o nível de significância menor 0,05 ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos clínicos e ao mancozeb

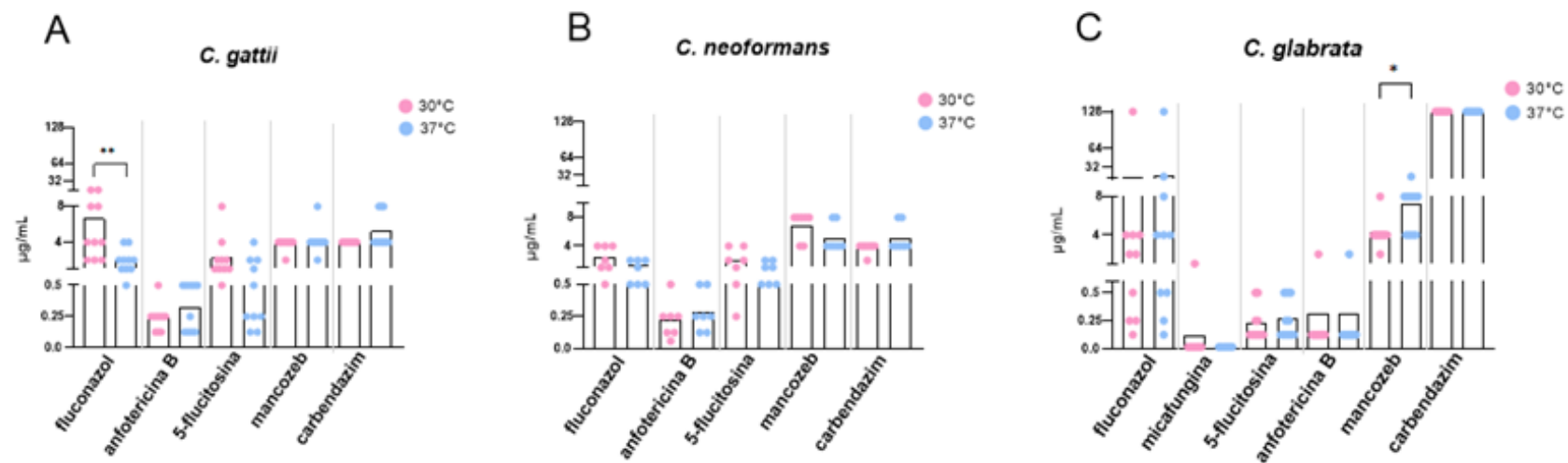
Primeiramente, foi determinado o perfil de susceptibilidade das linhagens frente aos antifúngicos de uso clínico (fluconazol, anfotericina B, 5-flucitosina e micafungina, sendo este último apenas para *C. glabrata*) e aos agroquímicos mancozeb e carbendazim. O experimento foi realizado em duplicata nas temperaturas de 30°C e 37°C. Houve diferença significativa da concentração inibitória mínima (CIM) entre as temperaturas apenas para fluconazol em *C. gattii* e para mancozeb em *C. glabrata* (Figura 4 – A e B).

Para *C. gattii* a CIM do agroquímico mancozeb variou entre 2 e 4 µg/mL a 30°C e entre 2 e 8 µg/mL a 37°C (Tabela 2). Quanto à CIM dos antifúngicos clínicos, a CIM₅₀, valor necessário para inibir 50% das linhagens, foi de 4 e 2 µg/mL para fluconazol e 1 e 0,25 µg/mL para 5-FC a 30°C e 37°C, respectivamente. Pode-se observar com isso que na temperatura de 30°C é necessária uma concentração maior para inibir uma parte das linhagens. Vale ressaltar que para as linhagens ICB 181 e WM 779, a CIM do fluconazol a 30°C foi 16 µg/mL, valor quatro vezes maior que a CIM₅₀; e para a linhagem 178 a CIM de 5-FC foi 8 µg/mL, valor oito vezes maior que a CIM₅₀. Em contrapartida, para ANB não foi observada diferença na CIM₅₀ entre as duas temperaturas (0,25 µg/mL em 30°C e 0,25 µg/mL em 37°C). Além disso, todas as linhagens apresentaram CIM ≤ 0,5 µg/mL para este antifúngico.

Nas linhagens de *C. neoformans* a CIM do mancozeb variou entre 4 e 8 µg/mL a 30°C e 37°C (Tabela 3). Nos antifúngicos clínicos, a concentração necessária para inibir 90% das linhagens (CIM₉₀) em FCZ foi de 4 µg/mL a 30°C e 2 µg/mL a 37°C, valores menores se comparado às linhagens de *C. gattii*. A CIM₉₀ do ANB foi 0,5 µg/mL em ambas as temperaturas e de 5-FC foi 4 e 2 µg/mL a 30°C e 37°C, respectivamente. É interessante destacar que nenhuma das linhagens apresentou um valor da inibição maior que a CIM₉₀.

Por último, para *C. glabrata* a 30°C a CIM de mancozeb variou entre 2 e 8 µg/mL e a 37°C variou entre 4 e 16 µg/mL (Tabela 4). Apenas a linhagem 11D apresentou um valor elevado da CIM para FCZ (>64 µg/mL), sendo considerada uma linhagem resistente de acordo com o CLSI M60. As demais linhagens apresentaram um valor menor ou igual ao CIM₉₀ para este antifúngico. Todas as linhagens tiveram seu crescimento inibido por ANB em uma concentração ≤ 0,5 µg/mL em

Figura 4: Concentração inibitória mínima de antifúngicos de uso clínico e agroquímicos mancozeb e carbendazim para linhagens de *C. gattii*, *C. neoformans* e *C. glabrata*.



ambas as temperaturas. Em relação ao 5-FC, 90% das linhagens apresentaram valor $\leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ na CIM e apenas a linhagem 40A apresentou CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$, valor maior que a CIM₉₀. Para *C. glabrata* também foi feito o teste com um antifúngico da classe das equinocandinas a qual *Cryptococcus* spp. apresenta resistência intrínseca, a micafungina (MCF). Para esse antifúngico, a linhagem 18A apresentou resistência a 30°C segundo ponto de corte definido pelo CLSI ($\geq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$), enquanto que as demais linhagens apresentaram valor $< 0,015$ $\mu\text{g/mL}$ em ambas as temperaturas.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico mancozeb e de antifúngicos clínicos para as linhagens de *C. gattii*, determinada por meio do método de microdiluição em caldo.

Linhagem	CIM ($\mu\text{g/mL}$)							
	Fluconazol		Anfotericina B		5-flucitosina		Mancozeb	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. gattii</i>								
R265 (ATCC® MYA-4093™)	4	2	0,5	0,5	0,5	4	4	8
ATCC 24065	2	1	0,25	0,125	1	0,125	2	2
29/10893	4	1	0,25	0,25	2	1	4	4
WM 178 (ATCC® MYA-4561™)	8	4	0,25	0,5	8	2	4	4
547 OTTI	8	2	0,125	0,125	2	0,5	4	4
19/13ER	4	2	0,125	0,125	1	0,25	4	4
ICB 181	16	2	0,25	0,5	1	0,25	4	4
WM 779 (ATCC® MYA-4563™)	16	4	0,25	0,5	2	0,25	4	4
28/02	2	1	0,25	0,5	1	0,125	4	4
135L/03	2	0,5	0,125	0,125	4	2	4	4
CIM ₅₀	4	2	0,25	0,25	1	0,25	4	4
CIM ₉₀	16	4	0,25	0,5	2	1	4	4

CIM₅₀: inibição do crescimento de 50% das linhagens

CIM₉₀: inibição do crescimento de 90% das linhagens

Linhagens em negrito indicam valores de susceptibilidade reduzida ao antifúngico

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico mancozeb e de antifúngicos clínicos para as linhagens de *C. neoformans*, determinada por meio do método de microdiluição em caldo

Linhagem	CIM (µg/mL)							
	Fluconazol		Anfotericina B		5-flucitosina		Mancozeb	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. neoformans</i>								
H99 (ATCC® 208821™)	4	2	0.5	0.25	0.5	2	8	8
WM 148 (ATCC® MYA-4564™)	4	2	0.06	0.25	2	0.5	8	4
WM 626 (ATCC® MYA-4565™)	2	1	0.25	0.5	1	0.5	4	4
WM 628 (ATCC® MYA-4566™)	1	0.5	0.125	0.125	2	1	8	4
WM 629 (ATCC® MYA-4567™)	0.5	0.5	0.25	0.25	4	2	8	4
ATCC 28957	1	0.5	0.125	0.125	0.25	0.5	4	4
C31	4	2	0.25	0.5	4	1	8	8
MIC ₅₀	2	1	0.25	0.25	2	1	8	4
MIC ₉₀	4	2	0.5	0.5	4	2	8	8

CIM₅₀: inibição do crescimento de 50% das linhagens

CIM₉₀: inibição do crescimento de 90% das linhagens

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico mancozeb e de antifúngicos clínicos para as linhagens de *C. glabrata*, determinada através do método de microdiluição em caldo.

Linhagem	CIM (µg/mL)									
	Fluconazol		Anfotericina B		Micafungina		5-flucitosina		Mancozeb	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. glabrata</i>										
ATCC 2001	4	16	0,25	0,5	<0,015	<0,015	0,125	0,125	8	16
5	2	4	0,25	0,25	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	8
11A	4	8	0,125	0,5	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	8
11D	>64	>64	0,5	0,5	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	8
18A	0,5	0,5	0,125	0,125	1	2	0,125	0,125	4	4
31A	0,25	0,5	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	4
38B	0,25	0,25	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	4
40A	0,125	0,125	0,5	0,25	<0,015	<0,015	1	1	2	4
43	4	4	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	8
47	2	4	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	8
MIC ₅₀	2	4	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	8
MIC ₉₀	4	16	0,5	0,5	<0,015	<0,015	0,125	0,125	4	8

CIM₅₀: inibição do crescimento de 50% das linhagens

CIM₉₀: inibição do crescimento de 90% das linhagens

Linhagens em negrito indicam valores de susceptibilidade reduzida ao antifúngico

5.2. Adaptação das linhagens ao agroquímico mancozeb

Inicialmente foi determinada a concentração inibitória mínima em meio sólido (CIM_s) para o antifúngico ambiental mancozeb. Nas linhagens de *Cryptococcus* spp pôde-se observar uma

média da CIM_s maior a 30°C (*C. gattii* – 6,8 µg/mL; *C. neoformans* – 6,9 µg/mL) que a CIM_s a 37°C em que o valor foi de 4 µg/mL para ambas as espécies (Tabelas 5).

As linhagens de *C. glabrata* apresentaram uma média da CIMs maior se comparado com as linhagens de *Cryptococcus*. A CIMs apresentou uma faixa de concentração de 4 a 16 µg/mL em ambas as temperaturas (Tabela 6).

Depois de determinada a CIM_s, as linhagens foram submetidas ao processo de adaptação no qual foram feitas passagens em meio com o agroquímico de forma gradual a partir do sub-CIM_s (valor correspondente à metade da CIM_s) até cessar o crescimento.

Após a passagem em ASD suplementado com mancozeb de forma gradual, 40% das cepas de *C. gattii* e 28,6% de *C. neoformans* foram capazes de tolerar maiores concentrações de mancozeb adicionadas ao meio sólido, quando o teste de adaptação foi realizado a 30°C (Tabela 5). As linhagens WM779 de *C. gattii* e WM629 de *C. neoformans* apresentaram uma maior capacidade de adaptação nesta temperatura com a concentração máxima alcançada (CMA) de 16 µg/mL. O coeficiente CMA/Sub-CIM_s apresentado nas tabelas 5 e 6, indica quantas vezes a concentração do antifúngico aumentou a partir do sub-CIM_s até alcançar uma concentração máxima de crescimento. Sendo assim, é possível concluir que as linhagens WM779 e WM629 foram capazes de tolerar oito vezes mais agroquímico que a concentração inicial a qual foram expostos.

No processo de adaptação feito a 37°C, 80% das cepas de *C. gattii* e 57,1% de *C. neoformans* toleraram uma maior concentração de mancozeb em meio sólido (Tabela 5). As linhagens de *C. gattii* R265 e 19/13ER apresentaram maior capacidade de adaptação com a CMA de 16 µg/mL e a relação CMA/Sub-CIM_s igual a oito.

Na adaptação das linhagens de *C. glabrata*, 30% das cepas toleraram uma maior concentração de mancozeb no meio sólido a 30°C, enquanto que a 37°C a porcentagem foi de 50% das cepas (Tabela 6). A ATCC 2001 e as linhagens 18A e 31A cresceram em meio com oito vezes mais antifúngico quando adaptadas a 30°C. Essas linhagens apresentavam inicialmente uma CIM de 8 µg/mL e ao final do processo apresentaram a capacidade de crescer a 32 µg/mL.

Tabela 5: Seleção de subpopulações de *C. gattii* e *C. neoformans* menos susceptíveis ao mancozeb

Linhagem	CIMs ($\mu\text{g/mL}$)		CMA ($\mu\text{g/mL}$)		CMA/Sub-CIMs	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. gattii</i>						
R265 (ATCC® MYA-40)	8.0	4.0	6.0	16.0	1.0	8.0
ATCC 24065	4.0	4.0	5.0	4.0	2.5	2.0
29/10893	8.0	4.0	6.0	4.0	1.0	2.0
WM 178 (ATCC® MYA-547 OTTI)	8.0	4.0	8.0	6.0	1.3	3.0
19/13ER	8.0	4.0	6.0	16.0	1.0	8.0
ICB 181	8.0	4.0	6.0	5.0	1.0	2.5
WM 779 (ATCC® MYA-28/02)	4.0	4.0	16.0	6.0	8.0	3.0
135L/03	4.0	4.0	5.0	7.0	2.5	3.5
135L/03	8.0	4.0	7.0	7.0	1.2	3.5
Faixa de concentração	4-8	4.0	5-16	4-16	1-8	2-8
Média geométrica	6.8	4.0	7.1	7.8	2.1	3.9
<i>C. neoformans</i>						
H99 (ATCC® 208821™)	8.0	4.0	7.0	4.0	1.2	2.0
WM 148 (ATCC® MYA-626)	4.0	4.0	7.0	6.0	3.5	3.0
WM 626 (ATCC® MYA-628)	8.0	4.0	4.0	6.0	0.7	3.0
WM 628 (ATCC® MYA-629)	8.0	4.0	7.0	6.0	1.2	3.0
WM 629 (ATCC® MYA-28957)	4.0	4.0	16.0	6.0	8.0	3.0
ATCC 28957	8.0	4.0	4.0	4.0	0.7	2.0
C31	8.0	4.0	7.0	4.0	1.2	2.0
Faixa de concentração	4-8	4	4-16	4-6	0,7-8	2-3
Média geométrica	6.9	4.0	7.4	5.1	2.3	2.6

CIM_s: Concentração Inibitória Mínima em meio sólido, antes do processo de adaptação. CMA: Concentração máxima alcançada através do mancozeb no teste de adaptação. Em negrito estão destacadas as cepas com maior capacidade de adaptação.

Tabela 6: Seleção de subpopulações de *C. glabrata* menos susceptíveis ao mancozeb

Linhagem	CIMs ($\mu\text{g/mL}$)		CMA ($\mu\text{g/mL}$)		CMA/Sub-CIMs	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. glabrata</i>						
ATCC 2001	8,0	16,0	32,0	18,0	8,0	2,3
5	16,0	16,0	12,0	8,0	1,5	1,0
11A	16,0	16,0	12,0	18,0	1,5	2,3
11D	16,0	16,0	12,0	18,0	1,5	2,3
18A	8,0	16,0	32,0	18,0	8,0	2,3
31A	8,0	16,0	32,0	18,0	8,0	2,3
38B	8,0	4,0	7,0	6,0	1,8	3,0
40A	4,0	4,0	2,0	2,0	1,0	1,0
43	16,0	16,0	12,0	16,0	1,5	2,0
47	16,0	16,0	12,0	16,0	1,5	2,0
Faixa de concentração	4,0-16,0	4,0-16,0	2,0-32,0	2,0-16	1,0-8,0	1,0-3,0
Média geométrica	11,6	13,6	16,5	13,8	3,4	2,0

CIMs: Concentração Inibitória Mínima em meio sólido, antes do processo de adaptação. CMA: Concentração máxima alcançada através do mancozeb no teste de adaptação. Em negrito estão destacadas as cepas com maior capacidade de adaptação.

Após o teste de adaptação, foram selecionadas linhagens de *Cryptococcus* spp. e *C. glabrata* que apresentaram valor do coeficiente CMA/Sub-CIMs igual a oito, maior valor apresentado nestas linhagens. Em seguida, foram feitas dez passagens em meio ASD sem agroquímico obtendo ao final, linhagens que foram denominadas 10p. Por último, foi determinada a CIM das linhagens adaptadas (A) e das linhagens 10p (tabelas 7 e 8).

Não foi observado um grande aumento da CIM de mancozeb nas linhagens de *C. gattii* após a adaptação, apesar disso, pode-se observar aumento da CIM de 5-FC nas três linhagens adaptadas na temperatura de 30° indicando que a exposição ao agroquímico mancozeb altera a susceptibilidade ao antifúngico clínico 5-FC (tabela 7). Vale ressaltar que a linhagem de *C. gattii* R265 após a adaptação apresentou aumento de 64 vezes na CIM de 5-FC a 30°C, com concentração inicial de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ na cepa NA e de 32 $\mu\text{g/mL}$ na cepa adaptada. Além disso, essa linhagem não retornou à susceptibilidade inicial mesmo após dez passagens em meio livre de agroquímico, permanecendo com uma concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ na cepa 10p, indicando uma resistência cruzada entre mancozeb e 5-FC (tabela 7). Na temperatura de 37°C apenas a linhagem de *C. gattii* 16/13ER apresentou aumento na CIM de 5-FC que foi 0,5 $\mu\text{g/mL}$ na cepa NA e 4 $\mu\text{g/mL}$ na cepa adaptada. A linhagem de *C. neoformans* WM629 apresentou aumento da CIM do mancozeb nas cepas adaptadas e 10p e aumento da CIM de FCZ em ambas as temperaturas tanto na linhagem adaptada quanto na 10p. A CIM das linhagens WM629 A e WM629 10p para FCZ aumentou de 0,5 $\mu\text{g/mL}$

para 16 µg/mL quando testadas a 30°C, um aumento de 32 vezes, e a 37°C aumentou de 0,5 µg/mL para 4 µg/mL, um aumento de 8 vezes. Esses resultados indicam uma possível resistência cruzada entre mancozeb e fluconazol nessa linhagem.

As linhagens adaptadas de *C. glabrata* 18A e 31A apresentaram aumento na CIM de 5-FC a 37°C se comparado com as linhagens NA (tabela 8). A CIM nestas linhagens aumentou de 0,125 µg/mL para 0,5 µg/mL, um aumento de quatro vezes. A linhagem *C. glabrata* 31A apresentou também aumento na CIM de FCZ em ambas as temperaturas, a 30°C a linhagem NA apresentou concentração de 0,25 µg/mL e após a adaptação a contração foi de 64 µg/mL (aumento de 256 vezes) e na temperatura de 37°C a concentração foi de 0,5 µg/mL na cepa NA para 64 µg/mL após adaptação (aumento de 128 vezes). É importante ressaltar que essas concentrações permaneceram mesmo após dez passagens em ASD sem o agroquímico, indicando que houve resistência cruzada permanente entre mancozeb e FCZ. Esses resultados demonstram que o agroquímico MZB influencia no aumento da susceptibilidade dos antifúngicos clínicos FCZ e 5-FC em *C. glabrata*. Não houve alteração na suscetibilidade de ANB e micafungina nas linhagens adaptadas e 10p e a linhagem *C. glabrata* 2001 não apresentou aumento da CIM após a adaptação em nenhuma das drogas testadas.

Tabela 7: Concentrações inibitórias mínimas de fluconazol, anfotericina B, 5-flucitosina e mancozeb para células não adaptadas (NA), adaptadas (A) e colônias adaptadas cultivadas 10 vezes em meio isento de agroquímicos (10p - 10 passagens) de linhagens de *Cryptococcus* spp. Testes feitos a 30° e 37 °C.

Linhagem	Fluconazol		Anfotericina B		5-flucitosina		Mancozeb	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
R265 NA	4,0	2,0	0,5	0,5	0,5	4,0	4,0	8,0
R265 A	8,0	4,0	0,125	0,125	32 (64x)	4,0	4,0	4,0
R265 10p	4,0	2,0	1,0	1,0	32 (64x)	1,0	4,0	8,0
19/13ER NA	4,0	2,0	0,125	0,125	1,0	0,25	4,0	4,0
19/13ER A	4,0	2,0	0,25	0,125	4 (4x)	4 (16x)	8,0	8,0
19/13ER 10p	2,0	4,0	0,25	0,5	4 (4x)	0,25	4,0	8,0
779 NA	16,0	4,0	0,25	0,5	2,0	0,25	4,0	4,0
779 A	32,0	4,0	0,25	0,125	8 (4x)	1,0	8,0	8,0
779 10p	16,0	4,0	0,5	0,5	4,0	0,25	4,0	8,0
WM 629 NA	0,5	0,5	0,25	0,25	4,0	2,0	4,0	4,0
WM 629 A	16,0 (32x)	4,0 (8x)	0,5	0,5	8,0	2,0	16,0 (4x)	8,0
WM 629 10p	16,0 (32x)	4,0 (8x)	0,5	0,5	8,0	2,0	16,0 (4x)	8,0

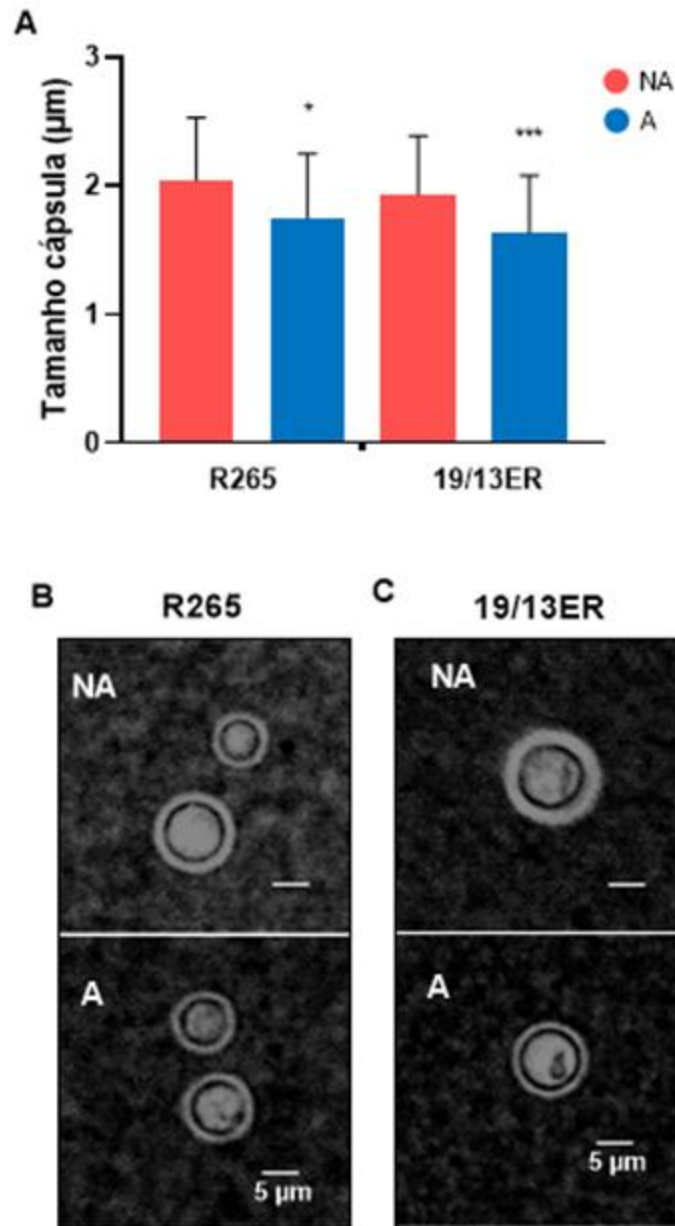
Tabela 8: Concentrações inibitórias mínimas de fluconazol, anfotericina B, 5-flucitosina, micafungina e mancozeb para células não adaptadas (NA), adaptadas (A) e colônias adaptadas cultivadas 10 vezes em meio isento de agroquímicos (10p - 10 passagens) de linhagens de *C. glabrata*. Testes feitos a 30° e 37°C.

Linhagem	Fluconazol		Anfotericina B		5-flucitosina		Micafungina		Mancozeb	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
2001 NA	4,0	16,0	0,25	0,5	0,125	0,125	0,015	0,015	8	16,0
2001 A	4,0	8,0	0,25	0,5	0,125	0,25	0,03	0,015	8	8,0
2001 10p	4,0	16,0	0,25	0,5	0,125	0,125	0,015	0,015	8	4,0
18A NA	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	1,0	2,0	4,0	4,0
18A A	0,25	0,5	0,25	0,25	0,125	0,5 (4x)	2,0	2,0	8,0	16,0 (4x)
18A 10p	0,5	1,0	0,25	0,25	0,125	0,25	2,0	2,0	8,0	8,0
31A NA	0,25	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,015	0,015	4,0	4,0
31A A	64,0 (256x)	64,0 (128x)	0,25	0,25	0,125	0,5 (4x)	0,03	0,015	32,0 (8x)	64,0 (16x)
31A 10p	64,0 (256x)	64,0 (128x)	0,25	0,25	0,125	0,5 (4x)	0,015	0,03	8,0	4,0

5.3. Influência do mancozeb na morfologia de *Cryptococcus* spp.

As cepas adaptadas e não adaptadas foram analisadas em relação a suas características morfológicas por meio da visualização no microscópio a fim de observar se a exposição ao agroquímico causa mudanças na morfologia celular. Não foram observadas mudanças no formato das células após a adaptação, entretanto, pode-se observar uma redução significativa do tamanho da capsula (Figura 5). Sabe-se que a cápsula é um importante fator de virulência para espécies de *Cryptococcus* spp (FRANCISCO; DE JONG; HAGEN, 2021), aqui podemos ver que a exposição ao agroquímico leva a uma redução da cápsula das cepas R265 e 19/13ER.

Figura 5: Influência do mancozeb na morfologia de *Cryptococcus* spp. (A) Tamanho da cápsula de linhagens não adaptadas e adaptadas ao mancozeb, redução da cápsula após adaptação. Valor de $p < 0,05$. (B) Morfologia da cepa R265 antes e após adaptação. (C) morfologia da cepa 19/13ER antes e após adaptação.



5.4. Influência do mancozeb na formação de biofilme

Linhagens adaptadas, NA e 10p foram analisadas quanto à formação de biofilme e atividade metabólica de células viáveis com o propósito de comparação.

As cepas NA, A e 10p da linhagem 19/13ER não apresentaram atividade metabólica pois não houve diferença significativa se comparado ao controle negativo onde não há atividade metabólica. As cepas de R265 apresentaram atividade metabólica, entretanto foi observada pouca mudança de cor após incubação da amostra com XTT. Apesar de apresentar células viáveis, não foi observada diferença significativa entre as cepas NA, A e 10p (Figura 6). Esse resultado mostra que a exposição ao mancozeb não interfere na capacidade de *Cryptococcus* em formar biofilme.

Em contrapartida, para as linhagens de *C. glabrata*, as células apresentaram uma atividade metabólica significativa (Figura 7). Mais ainda, pôde ser observada diferença na formação de biofilme entre as linhagens Na, A e 10p. Para a linhagem 18A observa-se que após a adaptação ela foi capaz de produzir maior quantidade de biofilme, e essa capacidade reduziu novamente na cepa 10p. A formação de biofilme é um importante fator de virulência nas espécies de *Candida*, aqui podemos ver que a exposição aos agroquímicos interferiu nesse fator. Nas cepas da linhagem 31A foi possível observar que a cepa NA já possuía uma alta capacidade de formação de biofilme, a exposição ao agroquímico levou a uma redução na formação do biofilme se comparado à cepa NA mas ainda significativamente maior se comparado ao controle, e a capacidade de formação do biofilme aumentou novamente na cepa 10p (Figura 7).

Figura 6: Formação de biofilme em *Cryptococcus* spp. (A) atividade metabólica de células viáveis no biofilme. (B) Produção de biomassa.

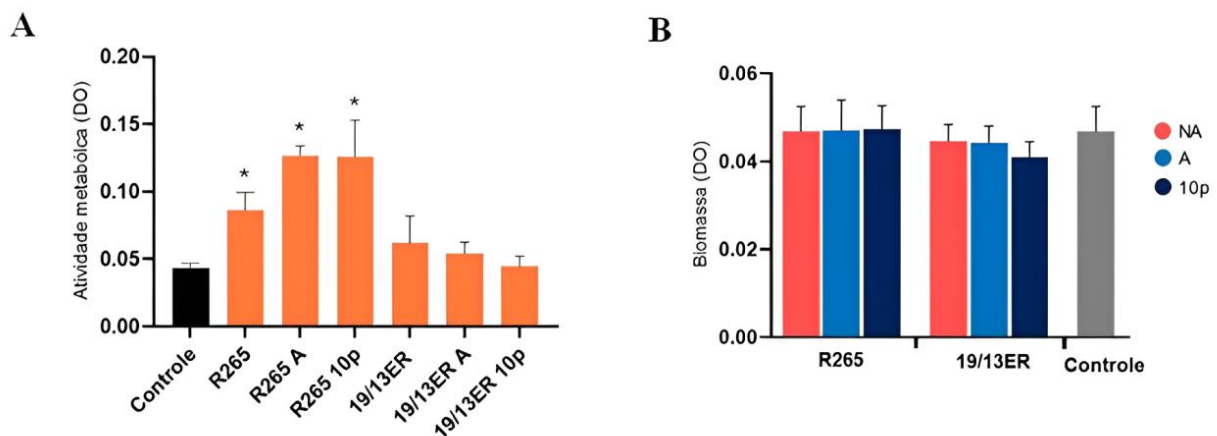
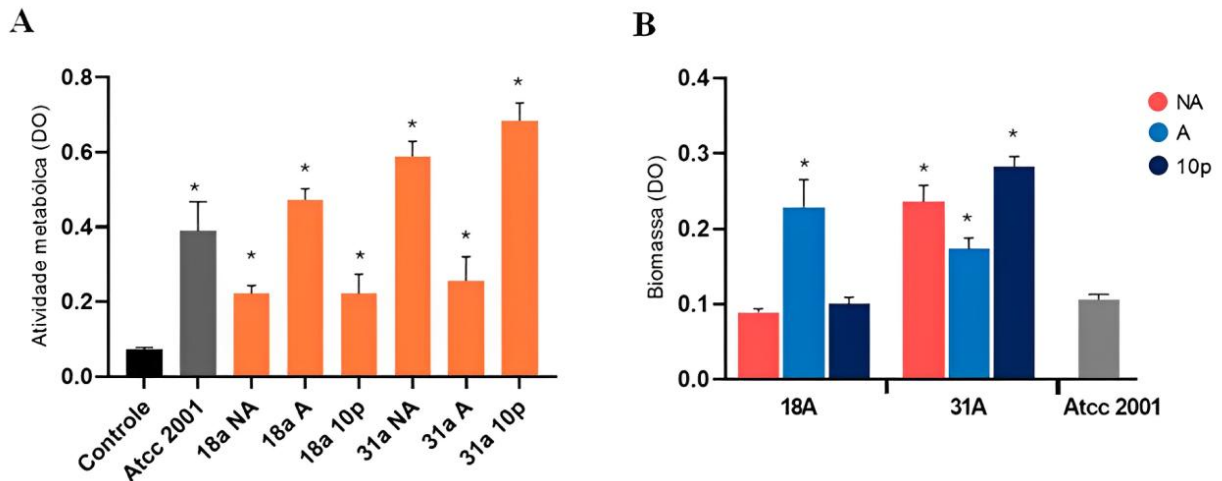


Figura 7: Formação de biofilme em *C. glabrata*. (A) atividade metabólica de células viáveis no biofilme. (B) produção de biomassa. Valor de $p < 0,05$.



5.5. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos e ao carbendazim

Foi determinada a CIM do agroquímico carbendazim e de antifúngicos clínicos (FCZ, ANB, 5-FC e MCF, sendo este último apenas para *C. glabrata*) para linhagens de *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. glabrata* em meio líquido. O experimento foi realizado em duplicata nas temperaturas de 30 e 37°C. Os resultados dos antifúngicos clínicos já foram descritos no item 5.1 e são colocados novamente nas tabelas 9, 10 e 11 para fins interpretativos.

A CIM do agroquímico carbendazim para *C. gattii* foi 4 µg/mL a 30°C para todas as cepas variou entre 4 e 8 µg/mL a 37°C, sendo a CIM₅₀ de 4 µg/mL em ambas as temperaturas. A CIM₉₀ para o agroquímico foi maior a 37°C (8 µg/mL) que a 30°C (4 µg/mL) (Tabela 9).

Nas linhagens de *C. neoformans* a CIM do carbendazim variou entre 2 e 4 µg/mL a 30° e a 37°C, entre 4 e 8 µg/mL (Tabela 10). A CIM₉₀ para o agroquímico foi maior a 37°C (8µg/mL) que a 30°C (4 µg/mL). É interessante destacar que nenhuma das linhagens apresentou um valor da inibição maior que a CIM₉₀.

Por último, as linhagens de *C. glabrata* não apresentaram suscetibilidade ao carbendazim na maior concentração testada (Tabela 11). Como as linhagens de *C. glabrata* não apresentou susceptibilidade ao agroquímico carbendazim, os demais testes em diante para avaliar a influência deste agroquímico, não foram realizados.

Tabela 9: Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico carbendazim e de antifúngicos clínicos para as linhagens de *C. gattii*, determinada por meio do método de microdiluição em caldo.

Linhagem	CIM ($\mu\text{g/mL}$)							
	Fluconazol		Anfotericina B		5-flucitosina		Carbedazim	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. gattii</i>								
R265 (ATCC® MYA-4093™)	4	2	0,5	0,5	0,5	4	4	4
ATCC 24065	2	1	0,25	0,125	1	0,125	4	4
29/10893	4	1	0,25	0,25	2	1	4	8
WM 178 (ATCC® MYA-4561™)	8	4	0,25	0,5	8	2	4	4
547 OTTI	8	2	0,125	0,125	2	0,5	4	4
19/13ER	4	2	0,125	0,125	1	0,25	4	8
ICB 181	16	2	0,25	0,5	1	0,25	4	4
WM 779 (ATCC® MYA-4563™)	16	4	0,25	0,5	2	0,25	4	4
28/02	2	1	0,25	0,5	1	0,125	4	8
135L/03	2	0,5	0,125	0,125	4	2	4	4
CIM ₅₀	4	2	0,25	0,25	1	0,25	4	4
CIM ₉₀	16	4	0,25	0,5	2	1	4	8

Tabela 10: Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico carbendazim e de antifúngicos clínicos para as linhagens de *C. neoformans*, determinada por meio do método de microdiluição em caldo.

Linhagem	CIM ($\mu\text{g/mL}$)							
	Fluconazol		Anfotericina B		5-flucitosina		Carbedazim	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. neoformans</i>								
H99 (ATCC® 208821™)	4	2	0,5	0,25	0,5	2	4	4
WM 148 (ATCC® MYA-4564™)	4	2	0,06	0,25	2	0,5	4	8
WM 626 (ATCC® MYA-4565™)	2	1	0,25	0,5	1	0,5	2	4
WM 628 (ATCC® MYA-4566™)	1	0,5	0,125	0,125	2	1	4	8
WM 629 (ATCC® MYA-4567™)	0,5	0,5	0,25	0,25	4	2	4	4
ATCC 28957	1	0,5	0,125	0,125	0,25	0,5	4	4
C31	4	2	0,25	0,5	4	1	4	4
MIC ₅₀	2	1	0,25	0,25	2	1	4	4
MIC ₉₀	4	2	0,5	0,5	4	2	4	8

Tabela 11: Concentração inibitória mínima (CIM) do agroquímico carbendazim e de antifúngicos clínicos para as linhagens de *C. glabrata*, determinada por meio do método de microdiluição em caldo.

Linhagem	CIM ($\mu\text{g/mL}$)									
	Fluconazol		Anfotericina B		Micafungina		5-flucitosina		Carbendazim	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. glabrata</i>										
ATCC 2001	4	16	0,25	0,5	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
5	2	4	0,25	0,25	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
11A	4	8	0,125	0,5	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
11D	>64	>64	0,5	0,5	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
18A	0,5	0,5	0,125	0,125	1	2	0,125	0,125	>32	>32
31A	0,25	0,5	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
38B	0,25	0,25	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
40A	0,125	0,125	0,5	0,25	<0,015	<0,015	1	1	>32	>32
43	4	4	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
47	2	4	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
MIC ₅₀	2	4	0,125	0,125	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32
MIC ₉₀	4	16	0,5	0,5	<0,015	<0,015	0,125	0,125	>32	>32

5.6. Adaptação das linhagens ao agroquímico carbendazim

Primeiramente foi determinada a concentração inibitória mínima em meio sólido (CIM_s) para o antifúngico ambiental carbendazim. Para todas as linhagens de *C. gattii* a CIM_s foi 4 $\mu\text{g/mL}$ a 30°C enquanto que a 37°C variou de 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$. Já para *C. neoformans* a CIM_s foi a mesma para todas as linhagens em ambas as temperaturas (4 $\mu\text{g/mL}$).

Depois de determinada a CIM_s, as linhagens foram submetidas ao processo de adaptação no qual foram feitas passagens sucessivas em meio suplementado com o agroquímico de forma gradual até que parasse o crescimento.

Após a passagem em meio sólido com os agroquímicos de forma gradual, 60% das cepas de *C. gattii* foram capazes de tolerar maiores concentrações de carbendazim adicionadas ao meio sólido a 30°C (Tabela 12). As linhagens R265, 24065, WM779 e 28/02 apresentaram maior capacidade de concentração, com a relação CMA/Sub-CIM_s maior ou igual a 16. A linhagem 24065 obteve CMA de 250 $\mu\text{g/mL}$, valor 125 vezes maior que a concentração inicialmente utilizada (2 $\mu\text{g/mL}$). Já para *C. neoformans* 42,8% das linhagens foram capazes de tolerar maiores concentrações do agroquímico adicionadas ao meio sólido, quando o experimento foi realizado a 30°C. A linhagem 28597 apresentou maior capacidade de adaptação sendo capaz de crescer até 128 $\mu\text{g/mL}$, valor 64 vezes maior que a concentração inicialmente utilizada.

Na temperatura de 37°C, 90% das cepas de *C. gattii* suportaram uma concentração maior que a CIM_s tendo crescido em até 3,5 vezes mais a concentração do sub CIM (CIM/2); e 57,1% de *C. neoformans* toleraram uma maior concentração de carbendazim em meio sólido (Tabela 12). Com destaque para a linhagem de *C. neoformans* WM629 que obteve maior capacidade de adaptação sendo capaz de crescer em meio com 128 µg/mL do agroquímico.

Após o teste de adaptação, foram selecionadas linhagens de *Cryptococcus* spp. que obtiveram maior capacidade de adaptação, com coeficiente CMA/Sub-CIMs maior ou igual a 16 (R265, 24068, WM779, 28/02, 28597 e WM629) e foram feitas dez passagens em meio ASD sem agroquímico. Essas linhagens foram denominadas 10p. Em seguida foi determinada a CIM das linhagens adaptadas (A) e das linhagens 10p (Tabela 13).

Foi observado aumento de 16 vezes na CIM de carbendazim das linhagens adaptadas a 30°C, que antes era 4 µg/mL e aumentou para 64 µg/mL. Todas as linhagens testadas apresentaram aumento da CIM de fluconazol na cepa adaptada a 30°C, sendo que as linhagens R625, WM779, WM629 e 28597 não retornaram à susceptibilidade inicial mesmo após dez passagens em meio livre de agroquímico. É interessante destacar também que as linhagens R265 e WM779 apresentaram aumento da CIM para fluconazol nas cepas A e 10p em ambas as temperaturas. Em R265 a CIM aumentou de 4 µg/mL para 64 µg/mL a 30°C e de 2 µg/mL para 32 µg/mL a 37°C, um aumento de 16 vezes nas duas temperaturas e as linhagens A e 10p de WM779 tiveram aumento de quatro vezes na CIM em ambas as temperaturas (Tabela 13). Todavia, não houve alteração da CIM para ANB. Esses resultados mostram que a exposição ao agroquímico carbendazim influencia na susceptibilidade ao fluconazol, indicando uma possível resistência cruzada entre estes antifúngicos.

Foi possível observar também redução na susceptibilidade de 5-FC a 30°C nas linhagens adaptadas de R265 (0,5 µg/mL – NA e 16 µg/mL – A), WM779 (2 µg/mL – NA e 16 µg/mL – A) e WM629 (4 µg/mL – NA e 16 µg/mL – A). As linhagens R625 e WM779 mantiveram a CIM aumentada mesmo após passagens pelo ASD sem agroquímico o que indica uma resistência cruzada permanente. Vale ressaltar que para a linhagem WM779 além do aumento da CIM a 30°, houve aumento da CIM nas cepas A e 10p a 37°C que antes era 0,25 µg/mL e passou para 1,0 µg/mL. Não houve alteração na CIM das cepas quando testadas com ANB (Tabela 13). Esses resultados tornam evidente que a exposição ao agroquímico carbendazim influencia na susceptibilidade ao 5-FC, indicando uma possível resistência cruzada.

Tabela 12: Seleção de subpopulações de *C. gattii* e *C. neoformans* menos susceptíveis ao carbendazim.

Linhagem	CIMs (µg/mL)		CMA (µg/mL)		CMA/Sub-CIMs	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
<i>C. gattii</i>						
R265 (ATCC® MYA-4093™)	4,0	4,0	128,0	6,0	64,0	3,0
ATCC 24065	4,0	4,0	250,0	5,0	125,0	2,5
29/10893	4,0	4,0	3,0	5,0	1,5	2,5
WM 178 (ATCC® MYA-4561™)	4,0	8,0	2,0	5,0	1,0	1,3
547 OTTI	4,0	4,0	9,0	5,0	4,5	2,5
19/13ER	4,0	8,0	4,0	5,0	2,0	1,3
ICB 181	4,0	4,0	9,0	5,0	4,5	2,5
WM 779 (ATCC® MYA-4563™)	4,0	4,0	128,0	7,0	64,0	3,5
28/02	4,0	4,0	32,0	7,0	16,0	3,5
135L/03	4,0	4,0	3,0	4,0	1,5	2,0
Faixa de concentração	4,0	4 - 8	2 - 250	4 - 7	2 - 125	1,3 - 3,5
Média geométrica	4,0	4,8	56,8	5,4	28,4	2,5
<i>C. neoformans</i>						
H99 (ATCC® 208821™)	4,0	4,0	4,0	10,0	2,0	5,0
WM 148 (ATCC® MYA-4564™)	4,0	4,0	12,0	6,0	6,0	3,0
WM 626 (ATCC® MYA-4565™)	4,0	4,0	3,0	3,0	1,5	1,5
WM 628 (ATCC® MYA-4566™)	4,0	4,0	3,0	4,0	1,5	2,0
WM 629 (ATCC® MYA-4567™)	4,0	4,0	14,0	128,0	7,0	64,0
ATCC 28957	4,0	4,0	128,0	6,0	64,0	3,0
C31	4,0	4,0	3,0	4,0	1,5	2,0
Faixa de concentração	4,0	4,0	3 - 128	3 - 128	1,5 - 64	1,5 - 64
Média geométrica	4,0	4,0	23,9	23,0	11,9	11,5

Tabela 13: Concentrações inibitórias mínimas de fluconazol, anfotericina B, 5-fluocitosina e carbendazim para células não adaptadas (NA), adaptadas (A) e colônias adaptadas cultivadas 10 vezes em meio isento de agroquímicos (10p - 10 passagens) de linhagens de *Cryptococcus* spp. Testes feitos a 30° e 35 °C.

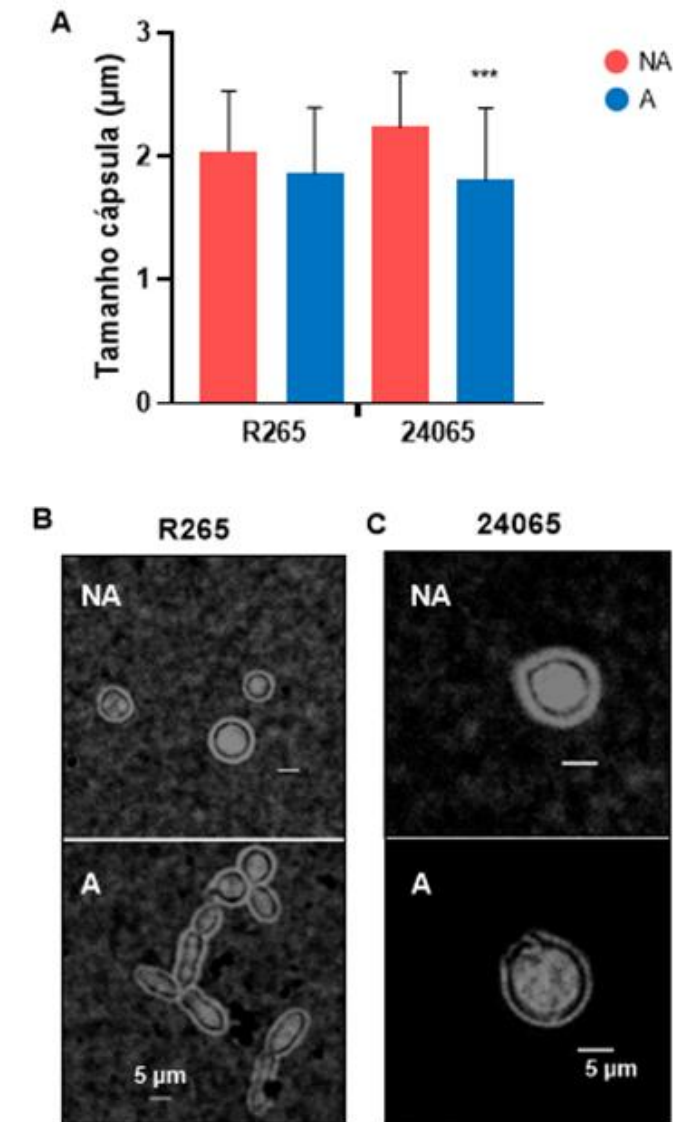
Linhagem	Fluconazol		Anfotericina B		5-fluocitosina		Carbendazim	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
R265 NA	4,0	2,0	0,5	0,5	0,5	4,0	4,0	4,0
R265 A	64,0 (16x)	32,0 (16x)	0,5	0,5	16,0 (32x)	4,0	64,0 (16x)	4,0
R265 10p	64,0 (16x)	32,0 (16x)	0,03	0,125	8,0 (16x)	0,5	4,0	4,0
ATCC 24065 NA	2,0	1,0	0,25	0,125	1,0	0,125	4,0	4,0
ATCC 24065 A	8,0 (4x)	1,0	0,25	0,125	1,0	0,125	64,0 (16x)	64,0 (16x)
ATCC 24065 10p	0,5	0,5	0,06	0,06	0,5	0,125	64,0 (16x)	64,0 (16x)
WM 779 NA	16,0	4,0	0,25	0,125	2,0	0,25	4,0	4,0
WM 779 A	64,0 (4x)	16,0 (4x)	0,25	0,25	16,0 (8x)	1,0 (4x)	64,0 (16x)	8,0
WM 779 10p	64,0 (4x)	16,0 (4x)	0,25	0,5	16,0 (8x)	1,0 (4x)	16 (4x)	8,0
28/02 NA	2,0	1,0	0,25	0,5	1,0	0,125	4,0	8,0
28/02 A	64,0 (32x)	8,0 (8x)	0,06	0,06	0,5	0,125	64,0 (16x)	64,0 (8x)
28/02 10p	2,0	1,0	0,06	0,5	1,0	0,125	8,0	8,0
WM 629 NA	0,5	0,5	0,25	0,25	4,0	2,0	4,0	4,0
WM 629 A	2,0 (4x)	0,5	0,125	0,06	16,0 (4x)	4,0	64,0 (16x)	64,0 (16x)
WM 629 10p	2,0 (4x)	0,5	0,25	0,5	8,0	2,0	8,0	16,0 (4x)
ATCC 28957 NA	1,0	0,5	0,125	0,125	0,25	0,5	4,0	4,0
ATCC 28957 A	8,0 (8x)	0,5	0,125	0,06	0,5	0,5	64,0 (16x)	8,0
ATCC 28957 10p	8,0 (8x)	2,0	0,125	0,25	0,5	1,0	8,0	8,0

5.7. Influência do carbendazim na morfologia de *Cryptococcus* spp.

As cepas adaptadas e não adaptadas foram analisadas em relação a suas características morfológicas através da visualização no microscópio para que fosse observado se a exposição ao agroquímico causa mudanças na morfologia celular.

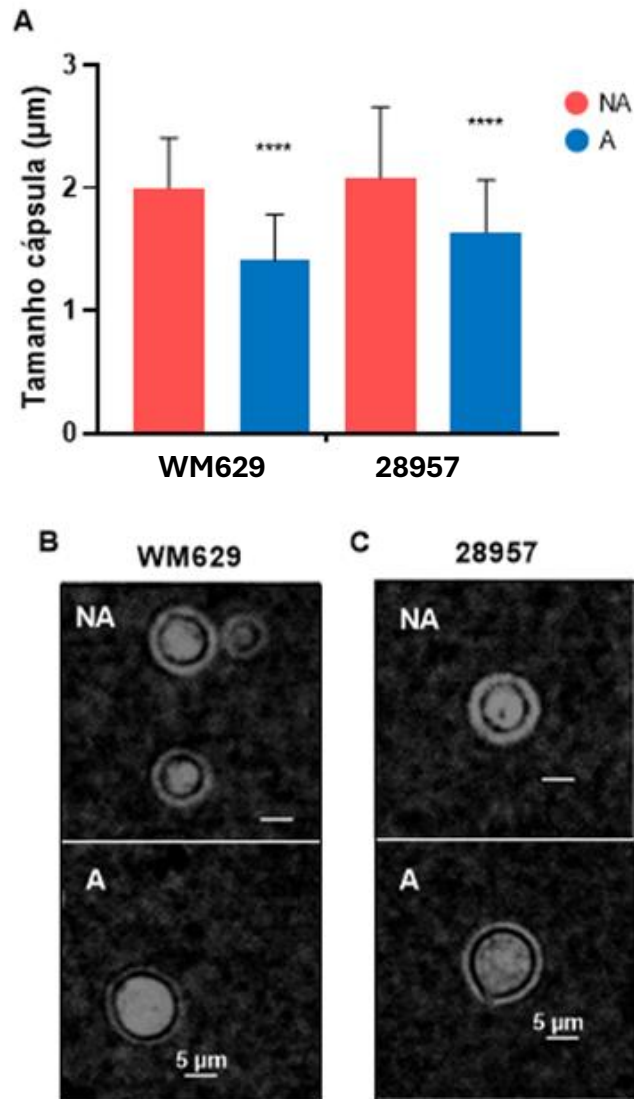
A exposição ao carbendazim causou alterações na morfologia das células de *C. gattii* R265. Nesta linhagem não houve diferença significativa no tamanho da cápsula, porém foi possível observar alterações na morfologia com presença de células irregulares, alongadas além da presença de pseudo-hifas após a adaptação ao CBZ (Figura 8-B). Na linhagem de *C. gattii* 24065 foi possível observar redução significativa na redução de tamanho de cápsula da população de células, reduzindo, portanto, a virulência dessa linhagem (Figura 8)

Figura 8: Influência do carbendazim na morfologia de *C. gattii*. (A) Tamanho da cápsula de linhagens não adaptadas e adaptadas ao carbendazim, redução da cápsula de 24065 após adaptação. Valor de $p < 0,05$. (B) Morfologia da cepa R265 antes e após adaptação. (C) Morfologia da cepa 24065 antes e após adaptação.



As linhagens de *C. neoformans* não apresentaram alterações na morfologia, entretanto foi possível observar redução do tamanho de cápsula após exposição ao CBZ nas linhagens WM629 e 28957 (Figura 9). Conclui-se, portanto que a exposição ao CBZ pode causar alterações morfológicas ou redução de cápsula em linhagens de *Cryptococcus* spp.

Figura 9: Influência do carbendazim na morfologia de *C. neoformans* (A) Tamanho da cápsula de linhagens não adaptadas e adaptadas ao carbendazim, redução da cápsula após adaptação. Valor de $p < 0,05$. (B) Morfologia da cepa WM629 antes e após adaptação. (C) Morfologia da cepa 28957 antes e após adaptação.

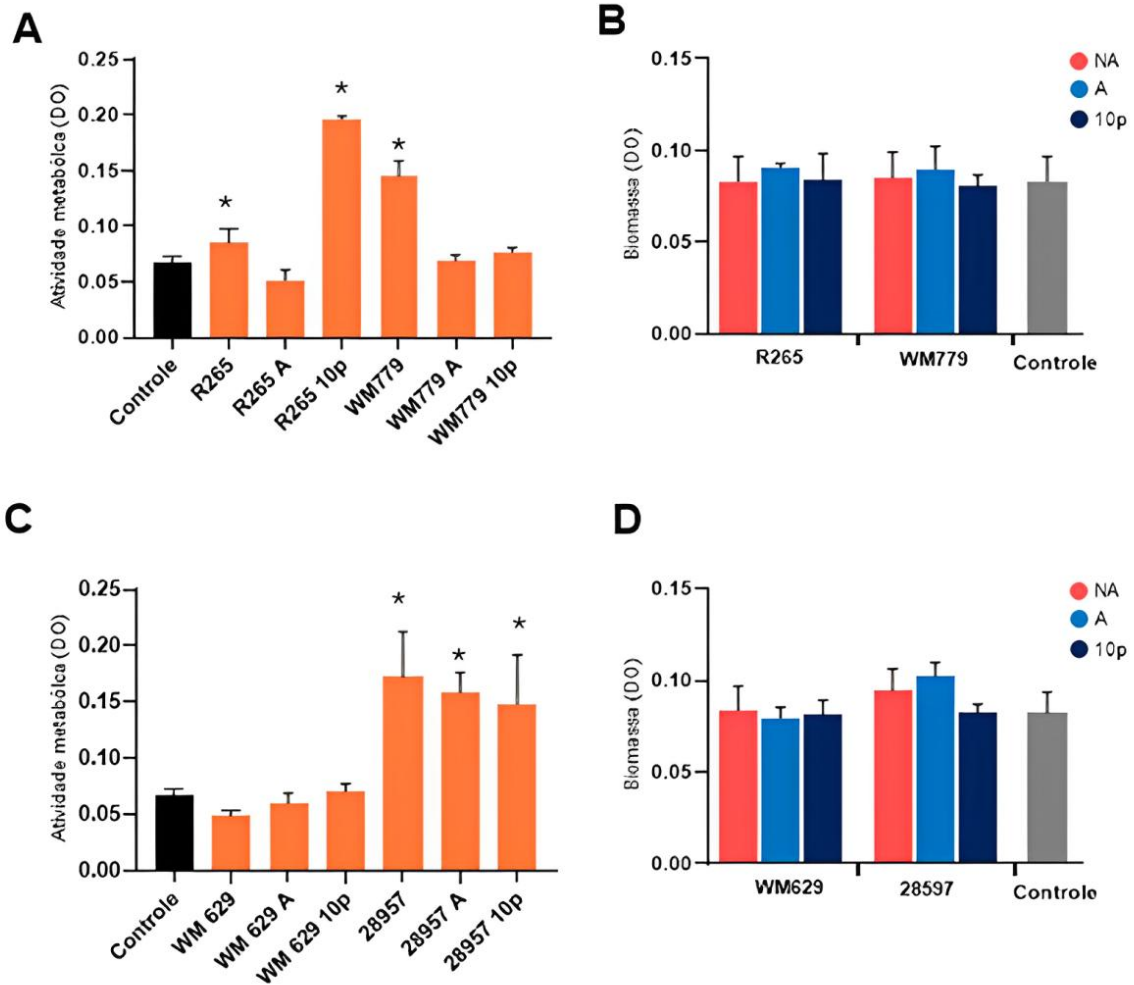


5.8. Influência do carbendazim na formação de biofilme

Linhagens adaptadas, NA e 10p de *Cryptococcus* spp. foram analisadas quanto à formação de biofilme e atividade metabólica de células viáveis com o intuito de comparação. Metade dos biofilmes formados não apresentaram atividade metabólica se comparado com o controle que representa a ausência de atividade. Além disso, não houve alteração na produção de biofilme em

linhagens A e 10p (Figura 10). Conclui-se, portanto, que a exposição ao CBZ não causa alterações na capacidade de formação de biofilme em *Cryptococcus* spp.

Figura 10: Formação de biofilme em *Cryptococcus* spp. (A) atividade metabólica de células viáveis no biofilme de linhagens de *C. gattii*. (B) produção de biomassa de linhagens de *C. gattii*. (C) atividade metabólica de células viáveis no biofilme de linhagens de *C. neoformans*. (D) produção de biomassa de



6. Discussão

Cerca de 20 a 40% da produção agrícola é perdida todo ano devido a doenças e pragas de plantas, acarretando um prejuízo de cerca de 220 bilhões de dólares. Boa parte dessa perda é causada por fungos e, como as doenças fúngicas são uma grande ameaça à produção agrícola, o uso de fungicidas no controle de problemas fúngicos se faz necessário para garantir o suprimento global de alimentos (Tleuova et al., 2020; Zubrod et al., 2019).

Mesmo com o uso intensivo de fungicidas, os fungos fitopatógenos ainda causam perdas de produtividade das culturas de commodities, esse problema pode ser em parte atribuído ao surgimento contínuo de resistência à variedade de fungicidas utilizados contra eles. Dependendo do genoma do patógeno e do modo de ação do fungicida, os patógenos fúngicos podem desenvolver resistência em poucos anos de exposição (Fisher et al., 2022; Zubrod et al., 2019).

Sabendo que *C. gattii*, *C. neoformans* e *C. glabrata* são leveduras encontradas no ambiente e que já foram isoladas em solo e plantações (Hallas-Mølle et al., 2024; Hassan; Chew; Than, 2021; May et al., 2016), esses fungos podem ser afetados pelo extensivo uso de agroquímicos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos agroquímicos mancozeb e carbendazim na susceptibilidade a antifúngicos clínicos bem como nas alterações morfológicas e de na formação de biofilme.

Os fungicidas ambientais são utilizados no controle de fungos fitopatogênicos; no entanto, a sua utilização está sendo progressivamente limitada devido aos impactos negativos dos pesticidas tanto no ambiente quanto na saúde humana, além do surgimento de variedades de fungos resistentes (Ribera; Zuñiga, 2012). Apesar disso, o Brasil consome mais de 300 mil toneladas de agrotóxicos por ano, sendo considerado um dos maiores consumidores do mundo (SPADOTTO; GOMES, 2021), aumentando o risco do surgimento de resistência não só nos fungos fitopatogênicos como também em patógenos humanos ambientais.

O agroquímico mancozeb é usado em plantações para o controle de cerca de 400 patógenos de plantas diferentes (Runkle et al., 2017). Neste estudo, mostramos que o agroquímico mancozeb também é capaz de inibir o crescimento de patógenos fúngicos humanos como *C. gattii*, *C. neoformans* e *C. glabrata*.

Foi possível observar que a exposição prévia de *C. gattii*, *C. neoformans* e *C. glabrata* ao agroquímico mancozeb resulta na diminuição da susceptibilidade das leveduras aos antifúngicos

clínicos FCZ e/ou 5-FC. Mostramos também que a exposição de *C. gattii* e *C. neoformans* ao carbendazim resultam em uma maior tolerância ao agroquímico e aos antifúngicos clínicos FCZ e 5-FC, dois dos principais antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose (Bielska; May, 2015; Zhao et al., 2023).

Estudos anteriores já mostraram que a exposição a agroquímicos podem levar a alteração na susceptibilidade a antifúngicos clínicos. Zhang e colaboradores, testaram as consequências da exposição prolongada de *A. fumigatus* a fungicidas triazólicos para resistência cruzada a três triazóis médicos (itraconazol, posaconazol e voriconazol). Eles descobriram uma resistência cruzada a triazóis clínicos em fungos que foram expostos a antifúngicos ambientais por um período de sete semanas (Zhang et al., 2017). Carneiro e colaboradores realizaram estudos *in vitro* e *in vivo* para compreender os efeitos do agroquímico benomil em *C. gattii*. A cepa exposta ao agroquímico apresentou resistência cruzada ao FCZ com aumento a expressão de bombas de efluxo, além de ter demonstrado ser hipervirulenta em camundongos, levando a sintomas graves de criptococose (Carneiro et al., 2020b).

O fungicida carbendazim possui meia-vida de 19 horas no solo e na água, entretanto, devido ao uso intenso, esse fungicida tornou-se poluente e muito persistente nestes ambientes. Resíduos de carbendazim e também seus metabólicos são fortemente ligados ou incorporados à matéria orgânica do solo por meio do anel imidazol da molécula do fungicida, tornando-os persistentes por mais de 3 anos (Coutinho et al., 2006). A persistência desse agroquímico no solo, leva a uma maior exposição de fungos ambientais a esse composto, podendo levar ao surgimento de resistência ao agroquímico e como mostrado neste estudo, pode haver a possibilidade de resistência cruzada a antifúngicos clínicos.

O mancozeb é um pesticida amplamente utilizado na agricultura e que já foi documentando como sendo tóxico para seres humanos apresentando neurotoxicidade, genotoxicidade e efeitos hematotóxicos (Aprioku; Amamina; Nnabuenyi, 2023). Portanto, além de ser tóxico para os seres humanos, vimos aqui que mancozeb pode estar relacionado à resistência cruzada em *Cryptococcus* e *Candida*.

A resistência cruzada pode ser transitória, quando a presença da primeira droga é necessária para permitir a resistência a uma segunda, ou permanente, quando a primeira droga já não é mais necessária e a célula é permanentemente resistente a outra (Bastos et al., 2018). Aqui, ambos os fenômenos ocorreram tanto para carbendazim quanto para mancozeb. Algumas linhagens

permaneceram resistentes ao FCZ e/ou a 5-FC mesmo após passagens sucessivas em meio livre de agroquímico e outras retornaram à susceptibilidade inicial após cessada e exposição ao agroquímico. Já foi demonstrado anteriormente tanto a resistência cruzada permanente quanto a transitória em *Cryptococcus* spp. (Bastos et al., 2018, 2019). Em *C. glabrata* foi demonstrada resistência cruzada entre agroquímico e triazóis clínicos que levou a mutação no gene PDR1, principal regulador do transportador ABC (Faria-Ramos et al., 2014).

No presente estudo, a resistência cruzada variou de forma dependente de temperatura. Quando o teste foi realizado a 30°C mais cepas de *C. gattii*, *C. neoformans* e *C. glabrata* apresentaram resistência cruzada ao FCZ e/ou a 5FC. Além disso na temperatura mais baixa, os fungos toleraram concentrações maiores do agroquímico que a 37°C. Algumas cepas adaptadas a 30°C apresentaram resistência cruzada em ambas as temperaturas o que mostra que esse surgimento de resistência no ambiente em temperatura mais baixa pode se manifestar em infecções animais onde a temperatura é mais alta. Da mesma forma, os casos em que houve resistência cruzada apenas na temperatura mais baixa mostram que essa resistência pode não ocorrer em mamíferos durante uma infecção. Esses resultados foram encontrados em ambos os agroquímicos testados. Bastos e colaboradores (2019) encontraram resultados semelhantes ao estudarem o efeito do agroquímico não azólico piraclostrobina na susceptibilidade ao FCZ em *C. gattii* e *C. neoformans*. De fato, a temperatura é um fator no crescimento de *Cryptococcus*. Estudos demonstram que a temperatura pode influenciar em fatores de virulência como tamanho de cápsula e melanina além da termotolerância que permite que sobreviva e se multiplique em mamíferos dentro de mamíferos (Kumari; Sachivkina; Pasrija, 2024; Kwon-Chung et al., 2014; Ni et al., 2024).

É interessante observar também que na adaptação ao agroquímico mancozeb, ocorre o fenômeno de tolerância uma vez que tanto algumas linhagens de *C. glabrata* quanto de *Cryptococcus* foram capazes de sobreviver a exposição transitória a altas concentrações do agroquímico sem que houvesse mudança da CIM.

Alterações morfológicas são fundamentais para a capacidade dos fungos de causar doenças em plantas e animais. Características de *Cryptococcus* como tamanho de cápsula influenciam em sua virulência, células com menor diâmetro de cápsula em geral são menos virulentas (Bielska; May, 2015; Lin; Idnurm; Lin, 2015). Aqui, foi possível observar que a exposição aos agroquímicos alterou a morfologia celular com redução do diâmetro da cápsula. A análise morfológica também

mostrou que células de *C. gattii* R265 adaptadas ao carbendazim apresentaram formação de pseudo-hifas, que são caracterizadas por células alongadas, com células-mãe e filhas fisicamente ligadas e formação de ramos laterais (Lee et al., 2012). Durante a infecção, as espécies de *Cryptococcus* estão na forma de levedura, entretanto, já foram relatadas outras morfologias no tecido do hospedeiro, incluindo pseudo-hifas (Lee et al., 2012; Zhai et al., 2013). *Cryptococcus* pode apresentar formação de pseudo-hifa em resposta ao estresse como: escassez de nutrientes e resposta ao sistema imune do hospedeiro (Lee et al., 2012; Lin; Idnurm; Lin, 2015).

Biofilmes fúngicos são estruturas tridimensionais compostas de células fúngicas e matriz extracelular, que têm as funções de adesão, agregação celular, proteção de agentes antimicrobianos e mecanismos de defesa do hospedeiro e fornecimento de nutrientes (Wang et al., 2024). Estruturas de biofilme podem ser observadas ao redor dos *Cryptococcus* no hospedeiro e ajudam a resistir aos efeitos imunológicos do hospedeiro (Yang et al., 2022). Para avaliar se a exposição a agroquímicos alteram a capacidade de fungos formarem biofilme, foi avaliada a formação de biofilme e atividade metabólica de biofilme em linhagens NA, A e 10p. Em *Cryptococcus* spp. algumas linhagens não apresentaram atividade metabólica e não houve diferença estatística entre as linhagens NA, A e 10p em nenhuma das cepas mostrando que a exposição ao mancozeb e ao carbendazim não interferiram nesse processo. Em contrapartida, a formação de biofilme é um importante fator de virulência em inúmeras espécies de *Candida* e a formação de biofilme em isolados de *C. glabrata* tem sido associada a maiores taxas de morbidade e mortalidade se comparado a isolados incapazes de formar biofilme (Silva et al., 2012). Aqui foi possível observar que a exposição ao agroquímico pode aumentar a capacidade de formar biofilme de forma temporária. Ao observar a linhagem 18A, nota-se que a cepa adaptada aumenta a quantidade de biofilme e após cessar o estímulo do agroquímico (linhagem 10p) a quantidade de biofilme formado reduz.

Em síntese, os dados aqui obtidos podem explicar em parte a resistência de *Cryptococcus* spp. e *C. glabrata* aos antifúngicos clínicos. Fungos presentes no ambiente, sofrem uma pressão seletiva devido à presença de pesticidas antifúngicos utilizados na agricultura e isso contribui com o surgimento de resistência (Bastos et al., 2018; Zhao et al., 2023). Assim, esses dados trazem perspectivas para futuros estudos do impacto de agroquímicos nos fungos e na indução de resistência a antifúngicos clínicos no ambiente.

7. Conclusão

A exposição prévia de *C. gattii* e *C. neoformans* aos agroquímicos mancozeb e carbendazim induziram alterações morfológicas importantes na célula e reduziram a susceptibilidade a 5-FC e/ou ao FCZ. Nas linhagens de *C. glabrata*, a exposição prévia ao mancozeb levou a alterações na capacidade de formação de biofilme e redução na susceptibilidade ao FCZ.

8. Perspectivas

- Analisar a expressão de genes de resistência por meio de rtPCR
- Avaliar a virulência *in vivo* com larvas de *Tenebrio molitor*.

9. Referências

ANDERSON, Harry Warren. **Yeast-Like Fungi of the Human Intestinal Tract**Source: **The Journal of Infectious Diseases**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/30084424>>.

ANGOULVANT, A.; GUITARD, J.; HENNEQUIN, C. **Old and new pathogenic *Nakaseomyces* species: Epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance**. **FEMS Yeast Research**Oxford University Press, , 1 mar. 2016.

APRIOKU, Jonah Sydney; AMAMINA, Ayanabia Monica; NNABUENYI, Perpetua Amarachi. Mancozeb-induced hepatotoxicity: protective role of curcumin in rat animal model. **Toxicology Research**, v. 12, n. 1, p. 107–116, 28 fev. 2023.

ARENDRUP, Maiken Cavling; PATTERSON, Thomas F. Multidrug-resistant candida: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. S445–S451, 15 jan. 2017.

BARANTSEVICH, Natalia; BARANTSEVICH, Elena. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2022.

BASTOS, Rafael W. *et al.* Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 12, p. e1010073, 9 dez. 2021.

BASTOS, Rafael Wesley *et al.* Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, 1 jan. 2018.

BASTOS, Rafael Wesley *et al.* From the environment to the host: How non-azole agrochemical exposure affects the antifungal susceptibility and virulence of *Cryptococcus gattii*. **Science of the Total Environment**, v. 681, p. 516–523, 1 set. 2019.

BEARDSLEY, Justin *et al.* **What's New in *Cryptococcus gattii*: From Bench to Bedside and Beyond**. **Journal of Fungi**MDPI, , 1 jan. 2023.

BEN-AMI, Ronen; KONTOYIANNIS, Dimitrios P. Resistance to Antifungal Drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 279–311, 1 jun. 2021.

BHATTACHARYA, Somanon; SAE-TIA, Sutthichai; FRIES, Bettina C. **Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance**. **Antibiotics**MDPI AG, , 1 jun. 2020.

BIELSKA, Ewa; MAY, Robin C. **What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen?** **FEMS Yeast Research**Oxford University Press, , 20 dez. 2015.

CANO, Edison J.; YETMAR, Zachary A.; RAZONABLE, Raymund R. Cryptococcus Species Other Than Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii: Are They Clinically Significant? **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, n. 12, 1 dez. 2020.

CARLSON, Tyler *et al.* Effects of environmental factors on sensitivity of Cryptococcus neoformans to fluconazole and amphotericin B. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 7, 1 abr. 2021.

CARNEIRO, Hellem Cristina Silva *et al.* Effect of non-antifungal agrochemicals on the pathogenic fungus Cryptococcus gattii. **Medical Mycology**, v. 58, n. 1, p. 47–53, 1 jan. 2020a.

CARNEIRO, Hellem Cristina Silva *et al.* Hypervirulence and cross-resistance to a clinical antifungal are induced by an environmental fungicide in Cryptococcus gattii. **Science of the Total Environment**, v. 740, 20 out. 2020b.

CASADEVALL, Arturo *et al.* **The capsule of Cryptococcus neoformans. Virulence** Taylor and Francis Inc., , 1 jan. 2019.

CASADEVALL, Arturo; ROSAS, Angel L.; NOSANCHUK, Joshua D. **Melanin and virulence in Cryptococcus neoformans. [S.l.: S.n.]**.

CASTELO-BRANCO, Débora *et al.* **Collateral consequences of agricultural fungicides on pathogenic yeasts: A One Health perspective to tackle azole resistance. Mycoses** John Wiley and Sons Inc., , 1 mar. 2022.

CASTREJÓN-JIMÉNEZ, Nayeli Shantal *et al.* Candida glabrata is a successful pathogen: An artist manipulating the immune response. **Microbiological Research**, v. 260, p. 127038, 1 jul. 2022.

CHANG, Yun C. *et al.* Moderate levels of 5-fluorocytosine cause the emergence of high frequency resistance in cryptococci. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

CORDERO, Radames J. B. *et al.* Melanin protects Cryptococcus neoformans from spaceflight effects. **Environmental Microbiology Reports**, v. 14, n. 4, p. 679–685, 1 ago. 2022.

COUTINHO, Cláudia F. B. *et al.* Carbendazim e o meio ambiente. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, v. 16, p. 63–70, 2006.

CZAJKA, Karolina M. *et al.* **Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic Candida Species. Cells** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 nov. 2023.

DAI, Fang Fang *et al.* Clinical features and prognostic factors of cryptococcal infections in HIV-infected patients: a 10-year study from an infectious disease specialist hospital. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, 2024.

DUGGAN, Seána; USHER, Jane. Candida glabrata: A powerhouse of resistance. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 10 OCTOBER, 1 out. 2023.

FARIA-RAMOS, Isabel *et al.* Environmental azole fungicide, prochloraz, can induce cross-resistance to medical triazoles in *Candida glabrata*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 1119–1123, 1 nov. 2014.

FERREIRA, Gabriella F.; SANTOS, Daniel A. **Heteroresistance and fungi**. **Mycoses** Blackwell Publishing Ltd, , 1 set. 2017.

FERREIRA, Gabriella Freitas *et al.* Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4600–4609, 1 ago. 2015.

FERREIRA, Nelson *et al.* Yeast microflora isolated from brazilian cassava roots: Taxonomical classification based on molecular identification. **Current Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 287–293, 2010.

FISHER, Matthew C. *et al.* **Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, , 1 set. 2022.

FREITAS, Gustavo J. C.; SANTOS, Daniel A. **Cryptococcus gattii polysaccharide capsule: An insight on fungal-host interactions and vaccine studies**. **European Journal of Immunology** John Wiley and Sons Inc, , 1 set. 2021.

FRÍAS-DE-LEÓN, María Guadalupe *et al.* **Candida glabrata antifungal resistance and virulence factors, a perfect pathogenic combination**. **Pharmaceutics** MDPI, , 1 out. 2021.

GALOCHA, Mónica *et al.* Divergent approaches to virulence in *C. Albicans* and *C. Glabrata*: Two sides of the same coin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 1 maio 2019.

GARCIA-BUSTOS, Victor *et al.* **The Ecology of Non-Candida Yeasts and Dimorphic Fungi in Cetaceans: From Pathogenicity to Environmental and Global Health Implications**. **Journal of Fungi** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 fev. 2024.

GÓMEZ-GAVIRIA, Manuela; RAMÍREZ-SOTELO, Uriel; MORA-MONTES, Héctor M. **Non-albicans Candida Species: Immune Response, Evasion Mechanisms, and New Plant-Derived Alternative Therapies**. **Journal of Fungi** MDPI, , 1 jan. 2023.

GUSHIKEN, Alexis C.; SAHARIA, Kapil K.; BADDLEY, John W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 493–514, 1 jun. 2021.

HALLAS-MØLLE, Magnus *et al.* *Cryptococcus neoformans*: plant–microbe interactions and ecology. **Trends in Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 984–995, 1 out. 2024.

HASSAN, Yahaya; CHEW, Shu Yih; THAN, Leslie Thian Lung. **Candida glabrata: Pathogenicity and resistance mechanisms for adaptation and survival**. **Journal of Fungi** MDPI AG, , 1 ago. 2021.

JIN, Yushen *et al.* Biotransformation of carbendazim in cowpea pickling process. **Food Chemistry**, v. 415, 30 jul. 2023.

KENNEDY, Melissa A.; SOBEL, Jack D. Vulvovaginal Candidiasis caused by non-albicans *Candida* species: New insights. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 6, p. 465–470, nov. 2010.

KIDD, Sarah E.; ABDOLRASOULI, Alireza; HAGEN, Ferry. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, 4 jan. 2023.

KSIEZOPOLSKA, Ewa; GABALDÓN, Toni. **Evolutionary emergence of drug resistance in candida opportunistic pathogens.** *GenesMDPI AG*, , 19 set. 2018.

KUMAR, Kundan *et al.* ***Candida glabrata*: A lot more than meets the eye.** *MicroorganismsMDPI AG*, , 1 fev. 2019.

KUMARI, Deepika; SACHIVKINA, Nadezhda; PASRIJA, Ritu. Investigation of the influence of pH and temperature on melanization and survival under oxidative stress in *Cryptococcus neoformans*. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 8, 1 ago. 2024.

KURTZMAN, Cletus P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorotulaspora*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 233–245, 2003.

KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* ***Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis.** [*S.l.*: *S.n.*]. Disponível em: <www.perspectivesinmedicine.org>.

LASS-FLÖRL, Cornelia *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2024.

LEE, Soo Chan *et al.* Pseudohyphal growth of *Cryptococcus neoformans* is a reversible dimorphic transition in response to ammonium that requires Amt1 and Amt2 ammonium permeases. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 11, p. 1391–1398, 2012.

LEE, Yunjin *et al.* **Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond.** *Chemical Reviews*American Chemical Society, , 24 mar. 2021.

LIN, Jianfeng; IDNURM, Alexander; LIN, Xiaorong. Morphology and its underlying genetic regulation impact the interaction between *Cryptococcus neoformans* and its hosts. **Medical Mycology**, v. 53, n. 5, p. 493–504, 1 jun. 2015.

LODDER, by J.; DE VRIES, N. F. **Some notes on *Torulopsis glabrata* (Anderson) nov. comb. (From the Centraalbureau veer Schimmelcultures and the Laboratorium veer Microbiologie der Technische Hoogeschool at Del/t).** [*S.l.*: *S.n.*].

MAY, Robin C. *et al.* **Cryptococcus: From environmental saprophyte to global pathogen.** *Nature Reviews Microbiology* Nature Publishing Group, , 1 fev. 2016.

MAZIARZ, Eileen K.; PERFECT, John R. **Cryptococcosis.** *Infectious Disease Clinics of North America* W.B. Saunders, , 1 mar. 2016.

MCHALE, Thomas C. *et al.* 5-Flucytosine Longitudinal Antifungal Susceptibility Testing of *Cryptococcus neoformans*: A Substudy of the EnACT Trial Testing Oral Amphotericin. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2023.

MORALES-LÓPEZ, Soraya E.; GARCIA-EFFRON, Guillermo. Infections due to rare *Cryptococcus* species. A literature review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, 1 abr. 2021.

MUNZEN, Melissa E.; GONCALVES GARCIA, Ariana D.; MARTINEZ, Luis R. **An update on the global treatment of invasive fungal infections.** *Future Microbiology* Newlands Press Ltd, , 1 nov. 2023.

NETT, Jeniel E.; ANDES, David R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, 1 mar. 2016.

NI, Yue *et al.* Unraveling the mechanism of thermotolerance by Set302 in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 8, 6 ago. 2024.

OSTROSKY-ZEICHNER, Luis *et al.* **An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond.** *Nature Reviews Drug Discovery*, set. 2010.

PADMAVATHI, Alwar Ramanujam *et al.* New arsenals for old armour: Biogenic nanoparticles in the battle against drug-resistant *Candida albicans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 194, 1 set. 2024.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 11 maio 2018.

PARSONS, Meredith G.; DIEKEMA, Daniel J. **What Is New in Fungal Infections? Modern Pathology** Elsevier B.V., , 1 jun. 2023.

PERFECT, John R. **The antifungal pipeline: A reality check.** *Nature Reviews Drug Discovery* Nature Publishing Group, , 1 set. 2017.

PERFECT, John R.; CASADEVALL, Arturo. **Cryptococcosis.** [*S.l.*: *S.n.*].

PERLIN, David S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. **The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management.** *The Lancet Infectious Diseases* Lancet Publishing Group, , 1 dez. 2017.

POTRUCH, Assaf *et al.* Comparative evaluation of Sensititre YeastOne and CLSI M38-Ed3 reference method for determining echinocandin minimum effective concentrations against *Aspergillus* isolates. **Microbiology Spectrum**, 3 out. 2024.

PUIA-DUMITRESCU, Mihai; SMITH, P. Brian. **Antifungal Drugs in Newborns and Children. Pediatric Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 dez. 2017.

RASHEED, Mubashshir; BATTU, Anamika; KAUR, Rupinder. **Host–pathogen interaction in *Candida glabrata* infection: current knowledge and implications for antifungal therapy. Expert Review of Anti-Infective Therapy** Taylor and Francis Ltd., , 2020.

RATHORE, Sudarshan Singh *et al.* **A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. Microbial Pathogenesis** Academic Press, , 1 maio 2022.

REVIE, Nicole M. *et al.* **Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. Current Opinion in Microbiology** Elsevier Ltd, , 1 out. 2018.

RIBERA, A. E.; ZUÑIGA, G. **Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: A review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 2012.

ROBBINS, Nicole; CAPLAN, Tavia; COWEN, Leah E. **Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance.** 2017.

ROCHA, Marcos Fábio Gadelha *et al.* Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: An environmental resistance school? **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 281–290, 1 maio 2016.

ROY, Sushmita; THOMPSON, Dawn. **Evolution of regulatory networks in *Candida glabrata*: learning to live with the human host. FEMS Yeast Research** Oxford University Press, , 1 dez. 2015.

RUNKLE, Jennifer *et al.* **A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. Environment International** Elsevier Ltd, , 2017.

SETIANINGRUM, Findra; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; DENNING, David W. **Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. Medical Mycology** Oxford University Press, , 1 fev. 2019.

SILVA, Sónia *et al.* ***Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews**, mar. 2012.

SPALLONE, Amy; SCHWARTZ, Ilan S. **Emerging Fungal Infections. Infectious Disease Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 jun. 2021.

TAI, Supeng *et al.* Cryptococcal invasion: a comprehensive case of adrenal and systemic infection amid immunosuppression. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, 1 dez. 2024.

TAKASHIMA, Masako; SUGITA, Takashi. **Taxonomy of Pathogenic Yeasts Candida, Cryptococcus, Malassezia, and Trichosporon: Current Status, Future Perspectives, and Proposal for Transfer of Six Candida Species to the Genus Nakaseomyces.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home/>>.

TALAPKO, Jasminka *et al.* Candida albicans-the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–19, 1 fev. 2021.

TLEUOVA, Aiyim B. *et al.* **Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture.** **Journal of Controlled Release** Elsevier B.V., , 10 out. 2020.

VAN DAELE, Ruth *et al.* Antifungal drugs: What brings the future? *In*: Oxford University Press, 1 jun. 2019.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 171–179, 2000.

WANG, Dandan *et al.* **Fungal biofilm formation and its regulatory mechanism.** **Heliyon** Elsevier Ltd, , 30 jun. 2024.

WANG, Lin *et al.* Occurrence and diversity of Candida genus in marine environments. **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 4, p. 416–420, 2008.

WANG, Xiaochun *et al.* **Delivery strategies of amphotericin B for invasive fungal infections.** **Acta Pharmaceutica Sinica B** Chinese Academy of Medical Sciences, , 1 ago. 2021.

WHALEY, Sarah G. *et al.* **Azole antifungal resistance in Candida albicans and emerging non-albicans Candida Species.** **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 12 jan. 2017.

WILLEMS, Hubertine M. E. *et al.* **Vulvovaginal candidiasis: A current understanding and burning questions.** **Journal of Fungi** MDPI AG, , 1 mar. 2020.

WILLIAMSON, Peter R. **LACCASE AND MELANIN IN THE PATHOGENESIS OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS** **Frontiers in Bioscience.** [S.l.: S.n.].

WOODS, Michael; MCALISTER, Jason A.; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. **A One Health approach to overcoming fungal disease and antifungal resistance.** **WIREs Mechanisms of Disease** John Wiley and Sons Inc, , 1 jul. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. n. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO., 2022.

YAMAMURA, Deborah; XU, Jianping. Update on Pulmonary Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 186, n. 5, p. 717–728, 1 out. 2021.

YANG, Chen *et al.* **Cryptococcus escapes host immunity: What do we know?** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Frontiers Media S.A., , 13 out. 2022.

YANG, Mai Lee *et al.* Fluconazole susceptibility in *Cryptococcus gattii* is dependent on the ABC transporter Pdr11. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 3, p. 1202–1207, 1 mar. 2016.

YARROW, David; MEYER, Sally A. **Proposal for Amendment of the Diagnosis of the Genus *Candida* Berkhout nom. cons.** *International Association of Microbiological Societies*. [S.l.: S.n.].

YIALLOURIS, Andreas *et al.* **Fungal diversity in the soil Mycobiome: Implications for ONE health.** *One Health* Elsevier B.V., , 1 jun. 2024.

YOO, Kyungyoon *et al.* With age comes resilience: how mitochondrial modulation drives age-associated fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, v. 15, n. 9, p. e0184724, 1 set. 2024.

ZARAGOZA, Oscar. **Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*.** *Virulence* Taylor and Francis Inc., , 1 jan. 2019.

ZHAI, Bing *et al.* Congenic strains of the filamentous form of *Cryptococcus neoformans* for studies of fungal morphogenesis and virulence. *Infection and Immunity*, v. 81, n. 7, p. 2626–2637, jul. 2013.

ZHANG, Jianhua *et al.* Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 284, n. 1863, 27 set. 2017.

ZHAO, Youbao *et al.* ***Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health.** *Infectious Diseases of Poverty* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2023.

ZUBROD, Jochen P. *et al.* Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science and Technology*, v. 53, n. 7, p. 3347–3365, 2 abr. 2019.

PEDRO PEDUZZI. **Anvisa proíbe uso do fungicida carbendazim em produtos agrotóxicos.** Agência Brasil. Publicado em 08/08/2022. Disponível em: < [Anvisa proíbe uso do fungicida carbendazim em produtos agrotóxicos | Agência Brasil](#)>. Acesso em 20/12/2024.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. **Carbendazim: Anvisa concluiu processo de reavaliação e mantém o banimento.** Publicado em 08/08/2022. Disponível em: < [Carbendazim: Anvisa concluiu processo de reavaliação e mantém o banimento — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa](#)>. Acesso em 20/12/2024.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Perfis Ambientais de Agrotóxicos**. Disponível em: < [Perfis Ambientais de Agrotóxicos — Ibama](#)>. Acesso em: 20/12/2024.

SPADOTTO, C.; GOMES, M. **Agrotóxicos no Brasil**. EMBRAPA. Publicado em: 22/12/2021. Disponível em:< [Agrotóxicos no Brasil - Portal Embrapa](#)>. Acesso em: 20/12/2024