

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

**João Carlos Maia Dornelas de Oliveira**

***Cryptococcus* - PLANTA: buscando novos modelos para compreender os  
mecanismos dessa interação**

Belo Horizonte

2021

**João Carlos Maia Dornelas de Oliveira**

***Cryptococcus* - PLANTA: buscando novos modelos para compreender os  
mecanismos dessa interação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

**Co-orientadora:** Dr.<sup>a</sup>. Marliete Carvalho da Costa

Belo Horizonte

2021

043

Oliveira, João Carlos Maia Dornelas de.

Cryptococcus - Planta: buscando novos modelos para compreender os mecanismos dessa interação [manuscrito] / João Carlos Maia Dornelas de Oliveira. – 2021.

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Aparecida de Resende Stoianoff. Co-orientadora: Dra. Marliete Carvalho da Costa.

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

1. Microbiologia. 2. Cryptococcus. 3. Plantas. 4. Interações Hospedeiro-Patógeno. 5. Agroquímicos. I. Stoianoff, Maria Aparecida de Resende. II. Costa, Marliete Carvalho da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

#### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE JOÃO CARLOS MAIA DORNELAS DE OLIVEIRA

Nº REGISTRO: 2017712846

Às 14:00 horas do dia 11 de novembro de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Vera Lúcia dos Santos (UFMG), Susana Johann (UFMG), Ludmila de Matos Baltazar (UFG), Rafael Wesley Bastos e Profa. Maria Aparecida de Resende Stoianoff – Orientadora, para julgar o trabalho final “Cryptococcus - Planta: Buscando Novos Modelos Para Compreender os Mecanismos Dessa Interação”, do aluno João Carlos Maia Dornelas de Oliveira, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Maria Aparecida de Resende Stoianoff, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma. Belo Horizonte, 11 de novembro de 2021.

#### Membros da Banca:

Dra. Vera Lúcia dos Santos

Dra. Susana Johann

Dra. Ludmila de Matos Baltazar

Dr. Rafael Wesley Bastos

#### De acordo:

Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianof  
(Orientadora)

Profa. Daniele da Glória de Souza

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Senhor meu Deus, responsável por tudo.

À minha mãe, Icléia, pela força, confiança e amor infinito.

Às minhas irmãs Camila e Aline, pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao Ramon, pelo imenso amor, paciência e companheirismo.

À Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.

A Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff, pela orientação, confiança e ensinamentos que foram de grande relevância para realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Dra. Marliete Carvalho da Costa, pelo amizade, disponibilidade e incentivo no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Daniel Assis pela confiança, disponibilidade, ajuda e prontidão na discussão e execução deste projeto de doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Micologia do ICB/UFMG, pelo auxílio e ajuda na condução do experimento, em especial ao Paulo, Vívian, Marliete e Bárbara.

À equipe do Laboratório de Físico-Química/SRVO da Funed, pela parceria e execução das análises cromatográficas, em especial ao Dr. Júlio César e Vinícius.

Ao amigo Paulo Henrique, pela amizade e valiosa ajuda e contribuição neste trabalho.

Aos amigos Lucas, Camila e Melina, pela amizade, risadas e troca de experiências.

A Profa. Dra. Nalu Peres pela contribuição e ensinamentos.

A Profa. Dra. Queila Gracia, Profa. Dra. Rosy Mary, Dra. Gracielle Bragança e Dra. Leilane Barreto, do departamento de Botânica da UFMG, pelo comprometimento, prontidão e conhecimento compartilhado.

Aos professores do programa de Pós-Graduação, por suas colaborações.

Aos membros da banca, pela prontidão ao convite para compor a mesa.

Aos meus companheiros de doutorado, pelos momentos que jamais serão esquecidos.

Obrigado a todos!

## RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica cujos principais agentes etiológicos são *Cryptococcus gattii* (Cg) e *C. neoformans* (Cn). Estes patógenos vivem saprofiticamente no solo e leveduras do gênero *Cryptococcus* já foram isoladas de dezenas de espécies vegetais. Entretanto, não se sabe ainda como a interação *Cryptococcus*-planta pode afetar o modelo vegetal e, principalmente, o fungo. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo desenvolver um modelo vegetal para estudar interação entre *Cryptococcus*-planta e verificar a influência de resistência a agroquímicos nesta interação. Para tanto, *C. gattii* L27/01 foi inoculada por diferentes métodos em três modelos vegetais: *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana tabacum* (Nt) e *N. benthamiana* (Nb). Após a inoculação, foram avaliadas alterações nos modelos vegetais e em Cg. Foi verificada maior recuperação fúngica após 7 dias de infecção em todos os modelos vegetais e os diferentes métodos de inoculação. A levedura não desempenha efeito patológico visível nos modelos vegetais e também não altera metabolismo primário e secundário (amido, lipídios, compostos fenólicos e lignina) destes. A infecção de Cg em Nb resulta em aumento no conteúdo de peróxido de hidrogênio e na atividade de enzimas do sistema antioxidante, como catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e glutatona redutase. A inoculação de Cg em Nb também acarretou aumento da auxina ácido indolilacético. Por isso, a inoculação em Nb pelo método de escarificação foi a melhor estratégia para estudos de interação. Cg exibiu aumento do diâmetro do corpo celular após interação com At e Nb. Houve diminuição da espessura capsular e da razão superfície/volume após passagem em At e Nb. O fungo apresentou maior crescimento e menor conteúdo de ergosterol após passagem em Nb. Na interação com macrófagos murinos, o índice fagocítico de Cg que passou por Nb foi aumentado no tempo de 3 horas e diminuído em 24 horas. A produção de espécies reativas de oxigênio foi menor para Cg após passagem em Nb. A recuperação de carga fúngica dos macrófagos foi elevada para a Cg após passagem em Nb. Estabelecido o modelo vegetal mais adequado para avaliar a interação *Cryptococcus*-planta, foi obtida a inoculação do modelo com diferentes linhagens de Cg e Cn não adaptadas e adaptadas aos agroquímicos piraclostrobina (PCT) e tebuconazol (TBZ). No que diz respeito, a interação das linhagens não adaptadas e adaptadas aos agroquímicos, o mesmo perfil foi observado. Cn adaptado a PCT (A PCT) foi menos recuperado de Nb, enquanto Cn adaptado e subcultivado por 10 passagens em meio sem agroquímico (10p PCT) apresentou maior recuperação. Cn A PCT e 10p PCT apresentaram maior diâmetro do corpo celular e espessura capsular após passagem em Nb. Cn não adaptado (NA) exibiu diminuição da espessura capsular e Cn A PCT e 10p PCT demonstraram redução na razão superfície/volume após passagem em Nb. Cn A TBZ foi menos recuperado e Cn 10p TBZ foi mais recuperado de Nb quando comparado a linhagem Cn NA. Cn A TBZ apresentou diminuição do diâmetro do corpo celular e aumento da espessura capsular e razão da superfície/volume após passagem em Nb. Cn 10p TBZ exibiu aumento do diâmetro do corpo celular e da espessura capsular, bem como diminuição da razão superfície/volume após passagem em Nb. Cn A TBZ exibiu menor susceptibilidade a anfotericina B (AMB) e Cn 10p TBZ também apresentou menor susceptibilidade para fluconazol (FCZ). Cn A TBZ e A PCT exibiram menor crescimento nos tempos de 24 e 48 horas após a passagem em Nb. Houve aumento da produção de lacase após a passagem em Nb para Cn NA, A TBZ, 10p TBZ, A

PCT. A atividade de fosfolipase foi reduzida após passagem em Nb em Cn NA, A TBZ e 10p TBZ. A atividade de fosfolipase foi aumentada para Cn A PCT e 10p PCT após passagem em Nb. Quando se avalia a interação de Cg com o modelo vegetal, foi observado que Cg 10p PCT exibiu maior recuperação de Nb. Foi verificado aumento do diâmetro celular para Cg NA após passagem em Nb. A espessura da cápsula e a razão superfície/volume foram reduzidas em ambas as linhagens após passagem em Nb. Cg NA e 10p PCT exibiram menor susceptibilidade para AMB e PCT após passagem em Nb. Cg 10p PCT foi mais susceptível a FCZ após passagem em Nb. O conteúdo de ergosterol foi aumentado para Cg 10p PCT e a atividade da lacase foi reduzida em Cg NA após passagem em Nb. A infecção de Cn e Cg reduziu a sobrevivência de *Tenebrio molitor*. Deste modo, o presente trabalho demonstra que a interação que os modelos vegetais podem apresentar na morfofisiologia e virulência de *Cryptococcus*, abrem perspectivas para utilização do modelo vegetal na busca de novos mecanismos envolvidos na resistência e virulência do fungo no ambiente.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus*. Modelo vegetal. Interação patógeno-hospedeiro. Agroquímicos.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis whose main etiological agents are *Cryptococcus gattii* (Cg) and *C. neoformans* (Cn). These pathogens live saprophytically in the soil and yeasts of the genus *Cryptococcus* have been isolated from dozens of plant species. However, it is not known how the *Cryptococcus*-plant interaction can affect the plant model and, especially, the fungus. In this sense, the present study aimed to develop a plant model to study the interaction between *Cryptococcus*-plant and to verify the influence of resistance to agrochemicals on this interaction. Therefore, *C. gattii* L27/01 was inoculated by different methods in three plant models: *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana tabacum* (Nt) and *N. benthamiana* (Nb). After inoculation, changes in plant models and in Cg were evaluated. Greater fungal recovery was verified after 7 days of infection in all plant models and different inoculation methods. Yeast has no visible pathological effect in plant models and also does not alter their primary and secondary metabolism (starch, lipids, phenolic compounds and lignin). Infection of Cg to Nb results in an increase in the hydrogen peroxide content and in the activity of enzymes of the antioxidant system, such as catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase. Inoculation of Cg in Nb also increased indolylacetic acid auxin. Therefore, inoculation in Nb by the scarification method was the best strategy for interaction studies. Cg exhibited increased cell body diameter after interaction with At and Nb. There was a decrease in capsular thickness and surface/volume ratio after passage in At and Nb. The fungus showed greater growth and lower ergosterol content after passage in Nb. In the interaction with murine macrophages, the phagocytic index of Cg that passed through Nb was increased in 3 hours and decreased in 24 hours. The production of reactive oxygen species was lower for Cg after passage in Nb. The recovery of fungal load of macrophages was high for Cg after passage in Nb. After establishing the most adequate plant model to evaluate the *Cryptococcus*-plant interaction, the model was inoculated with different strains of Cg and Cn not adapted and adapted to the agrochemicals pyraclostrobin (PCT) and tebuconazole (TBZ). With regard to the interaction of non-adapted and adapted strains to agrochemicals, the same profile was observed. Cn adapted to PCT (A PCT) was less recovered from Nb, while Cn adapted and subcultured for 10 passages in medium without agrochemical (10p PCT) showed greater recovery. Cn A PCT and 10p PCT showed greater cell body diameter and capsular thickness after passage in Nb. Unadapted Cn (NA) exhibited a decrease in capsular thickness and Cn A PCT and 10p PCT showed a reduction in surface/volume ratio after passage in Nb. Cn A TBZ was less recovered and Cn 10p TBZ was more recovered from Nb when compared to the Cn NA strain. Cn TBZ showed decreased cell body diameter and increased capsular thickness and surface/volume ratio after passage in Nb. Cn 10p TBZ exhibited increased cell body diameter and capsular thickness, as well as decreased surface/volume ratio after passage in Nb. Cn A TBZ exhibited lower susceptibility to amphotericin B (AMB) and Cn 10p TBZ also exhibited lower susceptibility to fluconazole (FCZ). Cn A TBZ and A PCT exhibited lower growth at times 24 and 48 hours after passage in Nb. There was an increase in laccase production after passage in Nb to Cn NA, A TBZ, 10p TBZ, A PCT. Phospholipase activity was reduced after passage on Nb in Cn NA, A TBZ and 10p TBZ. Phospholipase activity increased for Cn A PCT and 10p PCT after passage in Nb. When evaluating the interaction of Cg with the plant model, it was observed that Cg 10p PCT exhibited greater Nb recovery. It was verified an increase in cell



diameter for Cg NA after passage in Nb. Capsule thickness and surface/volume ratio were reduced in both strains after passage in Nb. Cg NA and 10p PCT exhibited lower susceptibility to AMB and PCT after passage in Nb. Cg 10p PCT was more susceptible to FCZ after passage on Nb. Ergosterol content was increased to Cg 10p PCT and laccase activity was reduced to Cg NA after passage in Nb. Cn and Cg infection reduced *Tenebrio molitor* survival. Thus, the present work demonstrates that the interaction that plant models can have on the morphophysiology and virulence of *Cryptococcus*, opening perspectives for using the plant model in the search for new mechanisms involved in the resistance and virulence of the fungus in the environment.

**Keywords:** Cryptococcus. Plant model. Pathogen-host interaction. Agrochemicals.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação das espécies patogênicas do gênero <i>Cryptococcus</i> : sorotipos e subtipos moleculares .....	27
<b>Figura 2.</b> Esquema de um teste de concentração inibitória mínima dos compostos antifúngicos e agroquímicos em placa de microdiluição de 96 poços. A numeração de 2 a 11 indicam as concentrações, que podem variar de acordo com o agente antifúngico. Os números 1 e 12 representam, respectivamente, o controle de crescimento (CC) e o controle de esterilidade (CE) .....	58
<b>Figura 3.</b> Macroscopia foliar de folha de Nb infectada com $10^5$ células de Cg L27/01 pelo método de escarificação e folha não infectada (NI) .....	62
<b>Figura 4.</b> Cinética de eliminação de Cg L27/01 em folha infectada com $10^5$ células pelos métodos de (A, B, C) escarificação, (D, E, F) infiltração e (G, H, I) abrasão para as espécies <i>Arabidopsis thaliana</i> (At), <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb) e <i>Nicotiana tabacum</i> (Nt). Após 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias foi realizada a recuperação da carga fúngica em folha infectada, folha não infectada e caule. * indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	64
<b>Figura 5.</b> Carga fúngica recuperada após 7 dias de infecção em folha infectada com $10^5$ células pelo método de escarificação para as espécies <i>Arabidopsis thaliana</i> (At), <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb) e <i>Nicotiana tabacum</i> (Nt). * indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	65
<b>Figura 6.</b> Conteúdo de (A) $H_2O_2$ e atividade das enzimas (B) catalase (CAT), (C) superóxido dismutase (SOD), (D) ascorbato peroxidase (APX) e (E) glutatona redutase (GR) nas folhas das espécies <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> e <i>Nicotiana tabacum</i> não infectadas, infectadas com PBS ou com $10^5$ células de Cg L27/01 após 7 dias. Dados correspondem à média de cinco repetições $\pm$ desvio padrão. * indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	66
<b>Figura 7.</b> Preparação de nanquim da linhagem Cg L27/01 (ASD) (A) antes e após passagem em <i>Arabidopsis thaliana</i> (At), <i>Nicotiana tabacum</i> (Nt) e <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb). Microscopia eletrônica de varredura para a linhagem de Cg L27/01 (B) antes e (C) após passagem em <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb) .....	67

<b>Figura 8.</b> Conteúdo de (A) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e atividade das enzimas (B) catalase (CAT), (C) superóxido dismutase (SOD), (D) ascorbato peroxidase (APX) e (E) glutathiona redutase (GR) nas folhas das espécies <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> e <i>Nicotiana tabacum</i> não infectadas, infectadas com PBS ou com 10 <sup>5</sup> células de Cg L27/01 após 7 dias. Dados correspondem à média de cinco repetições ± desvio padrão. * indica diferença significativa (p < 0,05) .....	68
<b>Figura 9.</b> Análise histológica de cortes de folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> (A) infectadas com 10 <sup>5</sup> células de Cg L27/01 pelo método de escarificação por 7 dias e (B) folhas não infectadas para avaliação da estrutura vegetal.....	69
<b>Figura 10.</b> Análise histoquímica de cortes de folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> (A) infectadas com 10 <sup>5</sup> células de Cg L27/01 pelo método de escarificação por 7 dias e (B) folhas não infectadas para determinação do conteúdo de amido, compostos fenólicos, lignina e lipídios .....	71
<b>Figura 11.</b> (A) Detecção e (B) quantificação da concentração de ácido indolilacético (IAA) em folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb) não infectadas, infectadas com PBS ou 10 <sup>5</sup> células de Cg L27/01 após 7 dias de infecção. * indica diferença significativa (p < 0,05) .....	72
<b>Figura 12.</b> (A) Taxa de crescimento, (B) conteúdo de ergosterol e atividade enzimática das enzimas (C) urease, (D) lacase, (E) fosfolipase e proteinase antes (L27 A) e após (L27 D) a passagem em <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb). * indica diferença significativa (p < 0,05) .....	73
<b>Figura 13.</b> (A) Índice fagocítico de Cg antes (ASD) e após passagem em <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb) por BMDM 3 e 24 horas após o desafio. (B) Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e (C) recuperação de carga fúngica de BMDM nos tempos de 3 e 24 horas pós-desafio. (D) Valores de concentração inibitória mínima (CIM; µg/mL) dos antifúngicos anfotericina B (AMB) e fluconazol (FCZ). A taxa de proliferação intracelular é a razão do número de células intracelulares do tempo de 24 horas sobre o tempo de 3 horas. * indica diferença significativa (p < 0,05) .....	74
<b>Figura 14.</b> (A) Cinética de eliminação de Cn H99 NA, H99 A PCT, H99 10p PCT em folha infectada com 10 <sup>5</sup> células pelo método de escarificação para a espécie <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb), após 24h, 7, 14, 21 e 30 dias. (B)	

Diâmetro do corpo celular, (C) espessura capsular e (D) razão superfície/volume de Cn H99 NA, H99 A PCT, H99 10p PCT antes e após a passagem em Nb. Microscopia eletrônica de varredura para (E) H99 NA e (F) H99 NA após passagem em Nb. (G) Valores de concentração inibitória mínima (CIM; µg/mL) para os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FCZ) e o agroquímico piraclostrobina (PCT). \* indica diferença significativa (p < 0,05) ..... 87

**Figura 15.** (A) Cinética de eliminação de Cn H99 NA, H99 A TBZ, H99 10p TBZ em folha infectada com 10<sup>5</sup> células pelo método de escarificação para a espécie *Nicotiana benthamiana* (Nb), após 24h, 7, 14, 21 e 30 dias. (B) Diâmetro do corpo celular, (C) espessura capsular e (D) razão superfície/volume de Cn H99 NA, H99 A TBZ, H99 10p TBZ antes e após a passagem em Nb. (E) Valores de concentração inibitória mínima (CIM; µg/mL) para os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FCZ) e o agroquímico tebuconazol (TBZ). \* indica diferença significativa (p < 0,05) ..... 89

**Figura 16.** Conteúdo de ergosterol das linhagens H99 NA, H99 A TBZ, H99 10p TBZ, H99 A PCT, H99 10p PCT antes e após passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb). Os dados correspondem à média de cinco repetições ± desvio padrão. \* indica diferença significativa (p < 0,05) ..... 90

**Figura 17.** (A e B) Taxa de crescimento e atividade das enzimas (C) urease, (D) lacase, (E) fosfolipase e proteinase das linhagens Cn H99 NA, H99 A PCT, H99 10p PCT, H99 A TBZ e H99 10p TBZ antes e após passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb). \* indica diferença significativa (p < 0,05) ..... 91

**Figura 18.** Sobrevida de *Tenebrio molitor* infectado com 10<sup>4</sup> UFC de *C. neoformans* H99 (A) NA, (B) A TBZ, (C) 10p TBZ, (D) A PCT e (E) 10p PCT antes (A) e a após (D) interação com *Nicotiana benthamiana* (Nb). \* indica diferença significativa em relação a PBS (p < 0,05) ..... 92

**Figura 19.** (A) Cinética de eliminação de Cg R265 NA e R265 10p PCT em folha infectada com 10<sup>5</sup> células pelo método de escarificação para a espécie *Nicotiana benthamiana* (Nb), após 24h, 7, 14, 21 e 30 dias. (B) Diâmetro do corpo celular, (C) espessura capsular e (D) razão superfície/volume de Cg R265 NA e R265 10p PCT antes e após a passagem em Nb. (E) Valores de concentração inibitória mínima (CIM; µg/mL) para os antifúngicos anfotericina

B (AMB), fluconazol (FCZ) e o agroquímico piraclostrobina (PCT). * indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	94
<b>Figura 20.</b> (A) Taxa de crescimento, (B) conteúdo de ergosterol e atividade das enzimas (C) urease, (D) lacase, (E) fosfolipase e proteinase das linhagens Cg R265 NA e Cg R265 10p PCT antes e após passagem em <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb). * indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	96
<b>Figura 21.</b> Sobrevida de <i>Tenebrio molitor</i> infectado com 104 UFC de <i>C. gattii</i> R265 (A) NA e (B) 10p PCT antes (A) e a após (D) interação com <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb). * indica diferença significativa em relação a PBS ( $p < 0,05$ ) .....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análises histoquímicas empregadas .....	47
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros de validação .....	72
<b>Tabela 3.</b> Relação das linhagens de <i>Cryptococcus gattii</i> e de <i>C. neoformans</i> que foram utilizadas neste trabalho .....	82

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

**AM** – Amido

**AMB** – Anfotericina B

**APX** – Ascorbato peroxidase

**ASD** – Ágar Sabouraud dextrose

**At** – *Arabidopsis thaliana*

**BHT** – Hidroxitolueno butilado

**BMDM** – Macrófagos derivados de medula óssea

**BSA** – Albumina de soro bovino

**CAT** – Catalase

**CC** – Controle de crescimento

**CE** – Controle de esterilidade

**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**CF** – Compostos fenólicos

**Cg** – *Cryptococcus gattii*

**Cn** – *Cryptococcus neoformans*

**CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetracético

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**FCZ** – Fluconazol

**GR** – Glutathione redutase

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**IAA** – Ácido indol-3-acético

**KI** – Iodeto de potássio

**LG** – Lignina

**LP** – Lipídios

**MDA** – Malondialdeído

**M-CSF** – Macrophage-Colony Stimulating Factor

**MOPS** – Ácido morfolino-propano-sulfônico

**Nb** – *Nicotiana benthamiana*  
**Nt** – *Nicotiana tabacum*  
**PAS** – Ácido periódico-schiff  
**PBS** – Phosphate Buffered Saline  
**PCT** – Piraclostrobina  
**PRN** – Peroxinitrito  
**PVP** – polyvinyl polypyrrolidone  
**PZ** – Atividade enzimática  
**RPMI** – Royal Park Memorial Institute  
**RUH** – Rapid Urea Broth  
**SFB** – Soro fetal bovino  
**SOD** – Superóxido dismutase  
**TBA** – Ácido tiobarbitúrico  
**TBARS** – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico  
**TBZ** – Tebuconazol  
**TCA** – Ácido tricloroacético  
**UFC** – Unidades formadoras de colônia  
**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais  
**YEPG** – *Yeast Extract-Glucose-Peptone agar*



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
	2.1 Criptococose .....	22
	2.2 <i>Cryptococcus</i> spp. ....	25
	2.3 O nicho de <i>Cryptococcus</i> spp. ....	30
	2.4 Fatores de virulência de <i>Cryptococcus</i> spp. ....	32
	2.5 O potencial patogênico de <i>Cryptococcus</i> spp. ....	35
	2.6 <i>Cryptococcus</i> e os modelos vegetais de infecção .....	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>43</b>
	CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO VEGETAL PARA ESTUDAR INTERAÇÃO ENTRE <i>Cryptococcus</i> -PLANTA ....	44
	3.1 Objetivos específicos .....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
	4.1 Manutenção e cultivo de <i>Cryptococcus gattii</i> .....	45
	4.2 Modelos vegetais .....	45
	4.3 Preparo do inóculo .....	45
	4.4 Métodos de inoculação .....	45
	4.5 Descontaminação dos modelos vegetais .....	46
	4.6 Determinação da carga fúngica .....	46
	4.7 Histologia e histoquímica vegetal .....	47
	4.8 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	47
	4.9 Ensaio enzimáticos vegetais .....	48
	4.9.1 Dosagem de proteínas .....	48
	4.9.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) .	48
	4.9.3 Determinação da atividade da catalase (CAT) .....	49
	4.9.4 Determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX) ...	49
	4.9.5 Determinação da atividade da glutatona redutase (GR) .....	49
	4.10 Peroxidação lipídica .....	50
	4.11 Análise morfométrica .....	50
	4.12 Microscopia eletrônica de varredura (MeV) .....	51
	4.13 Determinação de hormônio vegetal .....	51

4.13.2	Reagentes .....	52
4.13.2	Instrumentação .....	52
4.13.3	Material vegetal e preparação da amostra .....	52
4.13.4	Extração usando C18 SPE .....	53
4.13.5	Detecção de IAA .....	53
4.14	Taxa de crescimento .....	53
4.15	Avaliação da atividade enzimática de <i>Cryptococcus gattii</i> .....	54
4.15.1	Fosfolipase .....	54
4.15.2	Proteinase .....	54
4.15.3	Urease .....	55
4.15.4	Lacase .....	55
4.16	Quantificação de ergosterol .....	56
4.17	Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	56
4.17.1	Antifúngicos e preparo das soluções estoque .....	57
4.17.2	Preparo das placas .....	57
4.17.3	Preparo dos inóculos .....	57
4.17.4	Leitura e interpretação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	58
4.18	Ensaio com macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) .....	59
4.18.1	Questões éticas .....	59
4.18.2	Obtenção de BMDMs .....	59
4.18.3	Ensaio de fagocitose .....	60
4.18.4	Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	60
4.18.5	Atividade fungicida .....	61
4.19	Análises estatísticas .....	61
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
5.1	Efeitos patológicos da inoculação de Cg nos modelos vegetais .....	62
5.2	Susceptibilidade dos modelos vegetais à inoculação de Cg .....	62
5.3	Efeito da interação com modelos vegetais na morfologia e no conteúdo capsular de Cg .....	65
5.4	Efeito da inoculação de Cg no metabolismo antioxidante dos .....	67

modelos vegetais .....	
5.5 Efeito da inoculação de Cg na estrutura e no metabolismo primário e secundário de Nb .....	69
5.6 Efeito da interação de Cg na produção de IAA por Nb .....	72
5.7 Efeito da interação com Nb na taxa de crescimento, conteúdo de ergosterol e atividade enzimática de Cg .....	73
5.8 Efeito da interação com Nb no perfil de sobrevivência intracelular, na produção de ROS por BMDM e na susceptibilidade de Cg a antifúngicos .....	74
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Cryptococcus</i> RESISTENTES A AGROQUÍMICOS NA INTERAÇÃO EM MODELO VEGETAL DE <i>Nicotiana benthamiana</i>	81
3.2 Objetivos específicos .....	81
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>82</b>
4.20 Manutenção e cultivo de <i>Cryptococcus</i> spp. ....	82
4.21 Modelo vegetal, preparo do inóculo e método de inoculação ..	83
4.22 Determinação da carga fúngica .....	83
4.23 Análise morfométrica e microscopia eletrônica de varredura (MeV) .....	83
4.24 Taxa de crescimento, atividade enzimática e conteúdo de ergosterol .....	84
4.25 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	84
4.26 Ensaio de sobrevivência em modelo invertebrado .....	85
4.27 Análises estatísticas .....	85
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>86</b>
5.10 Cinética de eliminação e efeito da interação com Nb na morfologia e na susceptibilidade a antifúngicos de Cn H99 e Cg R265 .....	86
5.11 Efeito da interação com Nb no conteúdo de ergosterol, taxa de crescimento e atividade enzimática de Cn H99 .....	90
5.12 Efeito da interação com Nb na infecção de Cn H99 em	91

<i>Tenebrio molitor</i> .....	
5.13 Cinética de eliminação e efeito da interação com Nb na morfologia e na susceptibilidade a antifúngicos de Cg R265 .....	93
5.14 Efeito da interação com Nb na taxa de crescimento, conteúdo de ergosterol e atividade enzimática de Cg R265 .....	95
5.15 Efeito da interação com Nb na infecção de Cg R265 em <i>Tenebrio molitor</i> .....	96
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>98</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>103</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>124</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica que figura dentre as mais diagnosticadas em todo o mundo. Causada por espécies do gênero *Cryptococcus*, usualmente *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*, a criptococose é uma micose sistêmica associada a um alto número de casos que resultam em um número significativo de óbitos, principalmente em pacientes portadores do vírus HIV. Sobretudo, a América Latina representa um percentual considerável destes casos, de modo que o Brasil lidera o ranking dos países com maiores registros de criptococose.

Nos últimos anos, vem sendo observada a emergência de linhagens de *Cryptococcus* hipervirulentas e menos sensíveis aos antifúngicos disponíveis. Estudos têm demonstrado o papel que o contato com amebas de vida livre, a exposição à agroquímicos e a interação com hospedeiros vegetais podem ter na morfofisiologia, na virulência, na susceptibilidade a antifúngicos e na relação de *Cryptococcus* com células fagocíticas e em modelo murino de criptococose.

Compreender a interação de *Cryptococcus* com seus hospedeiros é de fundamental importância para o entendimento dos processos envolvidos nesta relação e, sobretudo, para elucidar os mecanismos associados a possíveis alterações ocorridas no hospedeiro e no fungo. Estabelecido que *Cryptococcus* possui um nicho ambiental e com base no isolamento de *C. gattii* e *C. neoformans* a partir de diversas espécies vegetais, buscou-se estabelecer um modelo de interação *Cryptococcus*-planta utilizando como modelos três espécies vegetais distintas. Acredita-se que, por meio dessa interação entre *C. gattii* e os modelos vegetais seja possível elucidar o papel que esta relação tem a planta, mas principalmente para o microrganismo.

Além disso, foi realizada a interação de linhagens expostas a agroquímicos com o modelo vegetal estabelecido. O consumo de agroquímicos tem crescido consideravelmente em todo o mundo, chegando a um aumento de 190% nos últimos anos. Conseqüentemente, houve um aumento da exposição de *Cryptococcus* que colonizam espécies vegetais a esses compostos.

Estudos anteriores demonstraram que a exposição de *Cryptococcus* a agroquímicos como benomil, tebuconazol e piraclostrobina podem alterar a

morfofisiologia, o perfil de susceptibilidade a antifúngicos clínicos, a interação com células fagocíticas e a virulência do fungo em modelo murino. Por isso, compreender como o contato destas linhagens com o modelo vegetal estabelecido atua na morfologia, fisiologia e nos fatores de virulência do fungo é de fundamental importância do ponto de vista ecológico e clínico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Criptococose

A frequência das infecções fúngicas têm se elevado drasticamente nas últimas duas décadas (PEMÁN; SALAVERT, 2012). Tal fato se deu em decorrência de uma série de fatores, como a maior utilização de drogas imunossupressoras e realização de transplantes; o aumento da expectativa de vida; maior incidência de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês AIDS); bem como o maior conhecimento da micologia clínica e, por fim, maior precisão nas técnicas diagnósticas (PASQUALOTTO, DENNING; 2005; KLEPSEK, 2011; MISHKIN, 2021).

Dentre as infecções fúngicas mais frequentemente diagnosticadas estão aquelas causadas por patógenos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* (RICHARDSON, 2005). Nesse cenário, a criptococose se faz extremamente importante por ser uma micose invasiva de ocorrência mundial associada a altos índices de morbidade e mortalidade, principalmente entre pacientes imunocomprometidos ou gravemente doentes (THOMAS *et al.*, 1998; PERFECT *et al.*, 2010).

A criptococose é uma micose sistêmica resultante da inalação de células fúngicas como basidiósporos ou leveduras dessecadas de *C. neoformans* e *C. gattii* (FONSECA *et al.*, 2010; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2014) a partir de fontes ambientais (SEVERO *et al.*, 2009). Normalmente, as células fúngicas são eliminadas ou ficam restritas ao pulmão, onde podem persistir em um estado latente indefinidamente sem produzir a doença. Entretanto, os propágulos infecciosos podem colonizar o trato respiratório, gerando um quadro clínico de pneumonia (KRONSTAD *et al.*, 2011; PRATES *et al.*, 2013; COGLIATI *et al.*, 2016; GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

Em caso de ausência de uma resposta imunológica efetiva, o fungo pode se disseminar via hematogênica causando infecções sistêmicas que podem envolver diversos órgãos como ossos, próstata, trato urinário ou o sistema nervoso central (SNC), causando o quadro mais grave da doença: a meningoencefalite, que, na ausência de uma terapia antifúngica, pode ser fatal (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006; LIN, 2009; MA; MAY, 2009; LI; MODY, 2010; KRONSTAD *et al.*,

2011; PRATES *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2014; BHATT *et al.*, 2021).

Para alcançar o SNC, a célula fúngica precisa atravessar a barreira hematoencefálica. Atualmente são estabelecidos três mecanismos pelo qual *Cryptococcus* consegue realizar essa travessia, sendo eles: (i) modelo transcelular, quando as células fúngicas aderem-se e atravessam as células endoteliais microvasculares do cérebro sem causar danos à morfologia e integridade destas células (CHANG *et al.*, 2004); (ii) modelo paracelular, em que as leveduras degradam a proteína transmembrana das junções entre as células epiteliais e atravessam a barreira hematoencefálica causando mudança morfológicas nas células dos hospedeiro (CHEN *et al.*, 2003); (iii) modelo cavalo de Tróia, mecanismo em que a levedura consegue alcançar o cérebro com auxílio de células fagocíticas que, ao fagocitar a levedura, acabam transportando-a através da barreira hematoencefálica para o SNC, não expondo as células de *Cryptococcus* sp. ao sistema imune (CHARLIER *et al.*, 2009; DEL POETA; CASADEVALL, 2012; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; SORRELL *et al.*, 2016; GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

Dados epidemiológicos indicam que, anualmente, em torno de um milhão de pessoas infectadas pelo HIV apresentam quadros de criptococose e que destes, aproximadamente 600.000 vão à óbito (PARK *et al.*, 2009; BUTTS *et al.*, 2013; COGLIATI, 2013; PRATES *et al.*, 2013). Na África subsaariana, a criptococose causada por *C. neoformans* é a maior causa de meningite entre os pacientes com SIDA, sendo associada a uma alta taxa de mortalidade (JARVIS *et al.*, 2010; GOVENDER *et al.*, 2011; WILLIAMSON *et al.*, 2017).

Um levantamento de dados realizado no ano de 2014 demonstrou que, de um total de 223.100 casos de meningite criptocócica, houve 181.100 mortes de pacientes portadores do vírus HIV (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*). Além disso, a maior parcela dos casos havia sido registrada na América Latina, com uma estimativa de 5.300 casos registrados por ano. Entretanto, é importante salientar o papel que *Cryptococcus* tem assumido também na infecção de indivíduos imunocompetentes (TOIVONEN *et al.*, 2021).

Na América Latina, países como Brasil e Colômbia apresentaram maior incidência da doença seguido da Argentina e México. Estudos ainda apontaram que



todos os sorotipos já descritos na literatura são encontrados em países da América Latina (RAJASINGHAM *et al.*, 2017; FICARATIVE *et al.*, 2018; SERNA-ESPINOSA *et al.*, 2021).

Em um estudo brasileiro em que foi avaliada a ocorrência de micoses sistêmicas entre os anos de 1996 e 2006, a criptococose foi mencionada em 50,9% das declarações de morte por SIDA (PRADO *et al.*, 2009). Dentre os registros de óbito relacionados à criptococose avaliados no período de 2000 a 2012, 80% deles eram associados a pacientes HIV-positivo ou a outros fatores de imunossupressão (SOARES, 2015). Dados mais recentes indicam que *Cryptococcus* spp. causa, dentre as micoses sistêmicas, o maior número de mortes em pacientes portadores do HIV no Brasil (FIRACATIVE *et al.*, 2018).

Dentre as regiões do Brasil, a que apresenta maior incidência de casos de criptococose é a Sudeste, provavelmente pelo maior número de casos de pacientes com HIV relatados (BRASIL, 2012). Um estudo realizado em São Paulo observou que 24% dos indivíduos avaliados com SIDA foram acometidos por meningite criptocócica (VIDAL *et al.*, 2008). No Rio de Janeiro um índice similar foi observado onde 26% dos pacientes com SIDA apresentaram meningite criptocócica, acarretando em uma letalidade de 50% no período de 2000 a 2004 (LEIMANN; KOIFMAN, 2009).

Uma pesquisa realizada no Rio Grande do Sul realizou um levantamento de casos de doenças fúngicas entre os anos de 2003 e 2015 por meio da análise de 13.707 amostras clínicas. Os autores verificam que 54% dos pacientes apresentaram quadro clínico de micose sistêmica. Dentre esse número, a criptococose apresentou maior prevalência, representando cerca de 73% dos casos (FAY *et al.*, 2019).

Em Minas Gerais, Gouveia *et al.* (2018) avaliaram as características clínicolaboratoriais da criptococose em pacientes admitidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais entre os anos de 2000 e 2013. Foi observado que 0,13% dos pacientes exibiram quadro de neurocriptococose que, por sua vez, foi associada a uma letalidade de 25%, à maior prevalência em homens e em indivíduos com idade entre 20 e 60 anos. Além disso, a neurocriptococose foi mais prevalente em pacientes imunocomprometidos, como aqueles em processo de quimio e corticoterapia, com neoplasias, com SIDA e transplantados.

É fato que desde a introdução da terapia antirretroviral, os casos de criptococose e o número de mortes decorrentes da infecção por HIV diminuíram substancialmente em países desenvolvidos. Entretanto, a meningite criptococócica ainda representa a terceira ou quarta doença mais relacionada à SIDA e é a segunda infecção mais prevalente no sistema nervoso central (SNC) nesses pacientes (MORA *et al.*, 2011). Em contrapartida, houve um aumento do número de casos de pacientes com criptococose que não apresentam fatores de imunodeficiência evidentes (BRATTON *et al.*, 2012; HENAO-MARTINEZ; BECKHAM, 2015). Por exemplo, no Nordeste são encontrados casos de infecção por *C. gattii* em pacientes HIV-negativos, sem evidência de imunodepressão (CHEN *et al.*, 2014). Nas regiões Norte e Nordeste há um grande número de casos, acarretando mortalidade de aproximadamente 40% (BRASIL, 2012).

Quando comparado a *C. neoformans*, a infecção por *C. gattii* apresenta envolvimento pulmonar mais frequente, com presença de grandes regiões com massa fúngica (criptococomas) nos pulmões e no sistema nervoso central (HOANG *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2021). Tal fato minimiza a eficácia da terapia antifúngica frente a *C. gattii* (THOMPSON *et al.*, 2012).

De fato, *Cryptococcus* spp. vem emergindo e, como consequência aumentando o número de infecções causadas por esses microrganismos frente a uma terapia que, além de ser tóxica para o paciente, nem sempre é eficaz, fatores que tornam a criptococose um problema de saúde pública mundial (DEL POETA, CASADEVALL, 2011).

## **2.2 *Cryptococcus* spp.**

*Cryptococcus* é um gênero do Filo Basidiomycota (ordem Filobasidiales, família Filobasidiaceae) e que apresenta a forma característica de células leveduriformes esféricas ou ovais, com brotamentos únicos ou múltiplos, envolvidas por uma cápsula polissacarídica (MA; MAY, 2009; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; SILVA *et al.*, 2012; ENGELTHALER *et al.*, 2014; COGLIATI *et al.*, 2016).

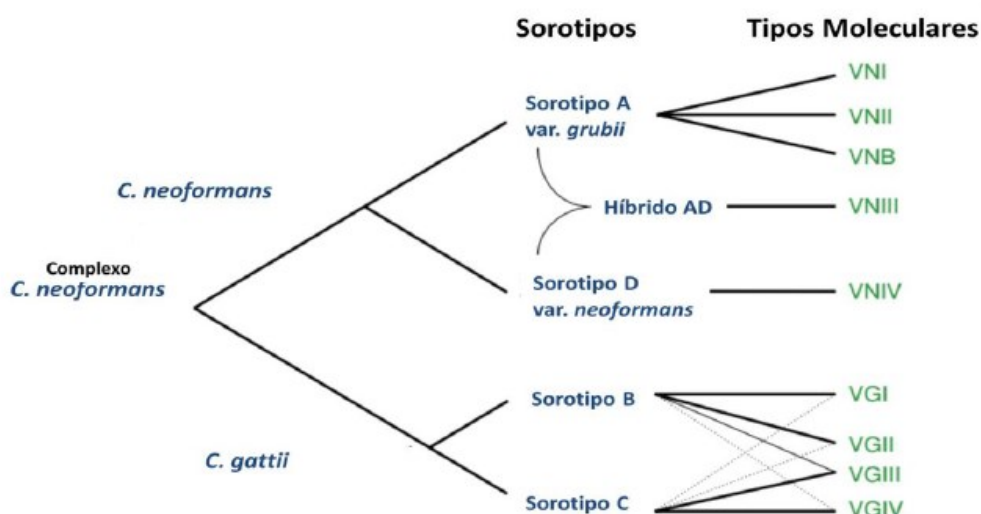
As leveduras de *Cryptococcus* se reproduzem assexuadamente por brotamento e sexuadamente, por um sistema de acasalamento monopolar ou bipolar, denominado *mating type* ( $\alpha$  e  $\alpha$ , a e a ou  $\alpha$  e a). Assim, a fusão entre duas

células resulta na formação de uma hifa que, após diferenciação e formação dos basídios, constituem as cadeias de basidiósporos ( $a$  e  $\alpha$ ) que serão dispersas no ambiente, atuando como possíveis propágulos infectantes (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; MAY *et al.*, 2016). Por isso, a reprodução sexuada é fundamental para o processo evolutivo, para a propagação do microrganismo e para a variabilidade existente dentro do gênero (COGLIATI *et al.*, 2016).

Embora aproximadamente 80 espécies pertençam a esse gênero, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* compreendem as espécies mais comuns, sendo responsáveis por causar criptococose em humanos, além de acometer animais domésticos e selvagens (MA; MAY, 2009; VOELZ *et al.*, 2010; BYRNES; MARR, 2011; NGAMSKULRUNGROL *et al.*, 2012; COGLIATI, 2013; MORTENSON *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; COGLIATI *et al.*, 2016).

Anteriormente, *C. gattii* era considerado uma variante de *C. neoformans* (*C. neoformans* var. *gattii*). Entretanto, com base em estudos filogenéticos, moleculares, na ausência de evidências de recombinação com *C. neoformans* e diante da observação de diferenças antigênicas da cápsula polissacarídica, *C. gattii* passou a ser reconhecida como uma espécie distinta (KWON-CHUNG *et al.* 2002; LIN, 2009; SHARP, 2009; VOELZ *et al.*, 2010; BYRNES; MARR, 2011; KRONSTAD *et al.*, 2011; COGLIATI, 2013; CHEN *et al.*, 2014; ENGELTHALER *et al.*, 2014).

A classificação anteriormente estabelecida subdivide a espécie *C. neoformans* em três sorotipos: A (*C. neoformans* var. *grubii*), D (*C. neoformans* var. *neoformans*) e o híbrido A/D. A espécie *C. gattii*, por sua vez, é subdividida em sorotipos B e C (VOELZ *et al.*, 2010; KRONSTAD *et al.*, 2011; COGLIATI, 2013). Além dessa classificação, é possível dividir o complexo *C. neoformans/C. gattii* de acordo com os genótipos moleculares. Desta forma, *C. neoformans* é dividido nos genótipos VNI a VNIV; enquanto *C. gattii* em VGI a VGIV, totalizando, assim, nove genótipos. O genótipo VGII, por sua vez, ainda contempla três subtipos: VGIIa, VGIIb e VGIIc (LIN; HEITMAN, 2006; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; SILVA *et al.*, 2012; ENGELTHALER *et al.*, 2014) (Figura 1).



**Figura 1.** Classificação das espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*: sorotipos e subtipos moleculares.

FONTE: adaptado de Lin e Heitman, 2006.

Em 2015, houve uma tentativa de estabelecer uma nova classificação para o gênero *Cryptococcus*. A classificação propôs a divisão dos genótipos em sete espécies. Desta forma, *C. neoformans* var. *grubii* (genótipos VNI, VNII e VNIII) seria classificado como *Cryptococcus neoformans*; *C. neoformans* var. *neoformans* genótipo VNIV como *Cryptococcus deneoformans*; *C. gattii* genótipo VGI como *Cryptococcus gattii*; *C. gattii* genótipo VGII como *Cryptococcus deuterogattii*; *C. gattii* genótipo VGIII como *Cryptococcus bacillisporus*; *C. gattii* genótipo VIG como *Cryptococcus tetragattii* e *C. gattii* genótipos VGIV e VGIII sorotipo C como *Cryptococcus decagattii* (HAGEN *et al.*, 2015). A classificação leva em consideração a heterogeneidade presente na virulência e as análises filogenéticas, mas desconsidera outras características relevantes para o microrganismo.

Mais recentemente, Farrer *et al.* (2019) caracterizaram o genótipo VGV, além de confirmarem molecularmente *C. decagattii* como pertencente a um genótipo VGV. Como ainda não há consenso sobre esta nova nomenclatura na comunidade científica, devido a sua aplicabilidade e utilização (MAY *et al.*, 2016; KWON-CHUNG *et al.*, 2017), nesse documento, será considerada a nomenclatura anterior.

*Cryptococcus* está ubiqüamente distribuído no ambiente, entretanto os sorotipos diferem em relação a epidemiologia, distribuição geográfica, manifestação

clínica e sensibilidade aos antifúngicos (ITO-KUWA, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os sorotipos A, D e AD de *C. neoformans* estão mundialmente distribuídos, com maior frequência na Europa e América do Sul. O sorotipo A é predominante dentre as amostras clínicas, responsável por causar a maior parcela das infecções criptocócicas ao redor do mundo, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (LIN; HEITMAN, 2006; VIVIANI *et al.* 2006; LIN, 2009; PERFECT *et al.*, 2010; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Na Ásia e em algumas regiões dos Estados Unidos, como na Califórnia e Nova Iorque, é comum o isolamento do sorotipo C de *C. neoformans* (CASADEVALL; PERFECT, 1998; MEYER *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003). Na Colômbia, os sorotipos frequentemente isolados de pacientes e do meio ambiente são os A e B (ESCADÓN *et al.*, 2006).

No Brasil foi observada uma prevalência do sorotipo A, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, tanto em isolados clínicos como em ambientais; enquanto nas regiões Norte e Nordeste, houve prevalência do sorotipo B (NISHIKAWA *et al.*, 2003; ABEGG *et al.*, 2006; SOUZA, 2006). Na avaliação dos sorotipos distribuídos na América Latina, Firacative *et al.* (2018) observaram uma maior prevalência de *C. neoformans* VNI no Brasil.

Em relação a *C. gattii*, acreditava-se que este era uma espécie endêmica de regiões de clima tropicais e subtropicais, como a América do Sul e Austrália (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984). Entretanto, em 1999, *C. gattii* foi responsável por um surto iniciado na ilha de Vancouver (Canadá) que se disseminou para o nordeste do Canadá e noroeste dos Estados Unidos, regiões de clima temperado (LI; MODY, 2010; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; MORTENSON *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014). Estima-se que esse surto foi responsável por acometer 218 indivíduos, levando 19 pessoas a óbito entre os anos de 1999 e 2007 (BIELSKA; MAY, 2016). Além disso, o surto afetou cerca de 100 pessoas nos Estados Unidos entre os anos de 2004 e 2011, apresentando um índice de mortalidade de 33% (DATTA *et al.*, 2009; GALANIS; MACDOUGALL, 2010; HARRIS *et al.*, 2011). Destes, acredita-se que 97% tenham sido causados pelo tipo molecular VGII, sendo o subtipo VGIIa relacionado à 87% dos casos em Vancouver e 81% dos casos no noroeste dos Estados Unidos (GALANIS; MACDOUGALL, 2010; HARRIS *et al.*, 2011). Esse

subtipo se caracteriza por maior virulência e menor susceptibilidade a terapia antifúngica (TRILLES *et al.*, 2012; LIZARAZO *et al.*, 2014).

O aparecimento deste patógeno nessa região de clima temperado destaca a mudança na distribuição de *C. gattii*. Além do surto ocorrido em Vancouver, há relatos de infecções causadas por *C. gattii* em outros países de clima temperado como, Itália, França e Espanha, além da Grécia (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014; COGLIATI *et al.*, 2016). Por isso, *C. gattii* é considerado o agente de criptococose na Ásia, África, Oceania (Austrália) e América do Sul (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; CHEN *et al.*, 2014), sendo conhecido como um agente patogênico primário, responsável por acometer, principalmente indivíduos imunocompetentes (SILVA *et al.*, 2012; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2014).

Assim como ocorre com *C. neoformans*, os genótipos de *C. gattii* estão mundialmente distribuídos. Os tipos moleculares VGI e VGII de *C. gattii* foram relacionados à maior parcela de casos de criptococose em hospedeiros imunocompetentes provenientes do norte da Austrália, noroeste da América do Norte e América do sul, respectivamente (BYRNES; MARR, 2011; BILLMYRE *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2016). De fato, o tipo VGII tem sido associado a maior virulência em modelo murino de criptococose (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; BYRNES *et al.*, 2010).

O genótipo comumente observado em países asiáticos é o VGI (SILVA *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014). Na Índia e na África, VGIII e VGIV são os tipos mais prevalentes, respectivamente, sendo geralmente associados a casos de criptococose em pacientes imunocomprometidos (BYRNES; MARR, 2011; SILVA *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2016).

Estudos ainda apontaram que todos os sorotipos já descritos na literatura são encontrados em países da América Latina (RAJASINGHAM *et al.*, 2017; FICARATIVE *et al.*, 2018). No Brasil é observada uma prevalência do genótipo VGII (VILAS-BÔAS *et al.*, 2020), seguido do VGI e VGIII (FIRACATIVE *et al.*, 2018). Entretanto, o genótipo VGIV de *C. gattii* não é encontrado no país (NISHIKAWA *et al.*, 2003; TRILLER *et al.*, 2008; FIRACATIVE *et al.*, 2018). Apesar disso, as amostras clínicas e ambientais de *C. gattii* isoladas no Brasil exibem uma alta variabilidade genética (VILAS-BÔAS *et al.*, 2020).

Em Minas Gerais, estudos indicam uma prevalência do genótipo VNI de *C. neoformans*, seguido do genótipo VGII de *C. gattii* na região do triângulo mineiro e em Belo Horizonte (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018; DAMASCENO-ESCOURA *et al.*, 2019).

### 2.3 O nicho de *Cryptococcus* spp.

As espécies do gênero *Cryptococcus* podem sobreviver em uma variedade de nichos ambientais. Essa sobrevivência é influenciada por fatores macroambientais como, umidade, temperatura, sol e vento, de forma que estas condições desempenham um importante papel na propagação e sobrevivência do fungo no ambiente. Uma vez que o esporo consegue sobreviver em material dessecado por anos, é possível encontrar diversos substratos contaminados com o fungo (TRABULSI, 2008; DEL POETA, CASADEVALL, 2011). Entretanto, por mais que apresentem características em comum, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam nichos distintos.

*Cryptococcus neoformans* é uma espécie de distribuição global. É recuperado a partir de excrementos de aves, principalmente de pombos (*Columba livia*), reservas ambientais como amebas, solo e madeira em decomposição de uma grande variedade de árvores como de cacau (*Theobroma cacao*) e espécies de eucalipto (COLOM VALIENTE *et al.*, 1997; BOEKHOUT *et al.*, 2001; MONTAGNA *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003; LAGROU *et al.*, 2005; RADOSA; HILLMANN, 2021).

Como saprófita, *C. neoformans* contamina o solo por meio das excretas do pombo, o que dá o caráter urbano da distribuição global do fungo. Acredita-se que a alta concentração de creatinina, o ambiente alcalino, a alta presença de compostos nitrogenados e a hiperosmolaridade presente nas fezes dos pombos favorecem o crescimento do microrganismo (ROSARIO *et al.*, 2008). Além disso, *C. neoformans* já foi isolado de ocos de árvores como o eucalipto (ERGIN *et al.*, 2004; SERNA-ESPINOSA *et al.*, 2021).

Em contraste, a espécie *C. gattii* é geralmente isolada de ambientes silvestres onde há a decomposição de cascas, folhas e madeira, apresentando uma maior incidência em áreas tropicais e subtropicais, mas podendo ser encontrado também

em climas temperados (EMMONS, 1955; ELLIS; PFEIFFER, 1990; SOUZA *et al.*, 2005; LIN; HEITMAN, 2006; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

*Cryptococcus gattii* foi recuperado a partir de árvores de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) na Austrália e na Califórnia (BYRNES; MARR, 2011; MCMULLAN; SORRELL; CHEN, 2013; ENGELTHALER *et al.*, 2014). A partir de então, ficou-se estabelecido que o eucalipto, que havia sido extensivamente exportado para diversas regiões do mundo, era o habitat natural exclusivo de *C. gattii* (VOELZ *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2014). Contudo, estudos posteriores demonstraram a presença de *C. gattii* em mais de 50 espécies de plantas em diversos países (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010). Por exemplo, na Índia, linhagens de *C. gattii* foram isoladas de árvores dos gêneros *Tamarindus*, *Mangifera indica* e de *Acacia nilotica* (CHOWDHARY; PRAKASH; RANDHAWA, 2012).

Cavidades em decomposição, sejam troncos ou galhos, são o habitat preferível de *C. gattii* (LAZERA *et al.*, 1998) e representam o nicho especializado para as leveduras do gênero *Cryptococcus*, presumivelmente porque oferecem vantagens seletivas na competição em relação a outros microrganismos (BODDY; FRANKLAND; VAN WEST, 2008). Por exemplo, foi observada a presença de basidiósporos do fungo em flores de diferentes espécies de *Eucalyptus*, indicando que a árvore atua como hospedeira para o microrganismo por meio de uma associação biotrófica que permite a dispersão de seus esporos para o ambiente (LEITE *et al.*, 2012).

Pesquisas fornecem evidências experimentais do nicho de *C. gattii* em espécies vegetais. *C. gattii* foi capaz de sobreviver e proliferar em plântulas de amêndoa (*Terminalia catappa*) inoculadas, bem como em diversos substratos derivados da amendoeira como folhas e pedaços de madeira (HUERFANO; CASTAÑEDA; CASTAÑEDA, 2001; REN *et al.*, 2006). Além disso, outro estudo demonstrou que *C. gattii* é capaz de se reproduzir em *Arabidopsis thaliana* experimentalmente inoculadas (XUE *et al.*, 2007; SPRINGER *et al.*, 2010).

A associação de *Cryptococcus* com espécies vegetais tem sido bastante estudada no intuito de compreender o papel dessa relação na ocorrência de surtos de criptococose. A associação do fungo com árvores tem se mantido em todo o mundo, incluindo um recente surto na América do Norte envolvendo espécies locais de abetos (*Pseudotsuga menziesii* e *Tsuga heterophylla*) (MAK *et al.*, 2010;



SPRINGER; CHATURVEDI, 2010). Além de ser encontrado em árvores, *C. gattii* foi encontrado no ar, no solo e em corpos de água (KIDD *et al.*, 2007). Outro resultado importante é que os guanos de pombos analisados em local de surto não indicaram a presença do fungo, reforçando a incapacidade dessa espécie em se reproduzir nesse substrato (NIELSEN; DE OBALDIA; HEITMAN, 2007).

No Brasil, amostras de *C. gattii* foram isoladas a partir de diversas espécies de eucalipto, como *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. gomphocephala*, *C. gattii* também foi isolado de outras espécies vegetais nativas e exóticas de várias regiões como de *Cedrus*, *Guettarda acreana*, *Senna multijuga*, *Cassia grandis*, *Ficus microcarpa*, *Caesalpinia peltophoroides*, *Quercus garryana*, *Terminalia catappa* e *Moquilea tomentosa*, reforçando a capacidade de *C. gattii* de sobreviver em outras espécies de planta que não eucaliptos (LAZERA *et al.*, 1998; FORTES *et al.*, 2001; UEJIO *et al.*, 2004; OKAMOTO *et al.*, 2010; FIRACATIVE *et al.*, 2011; CHOWDHARY *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2012; CATTANA *et al.*, 2014; NOGUERA *et al.*, 2015).

Compreender o nicho do microrganismo é uma ferramenta preditiva importante para viabilizar o reconhecimento dos locais em que *Cryptococcus* tem maior probabilidade de sobreviver no meio ambiente e, portanto, identificar as áreas onde o risco de encontrar esses patógenos é alto (COGLIATI *et al.*, 2017).

#### **2.4 Fatores de virulência de *Cryptococcus* spp.**

*Cryptococcus* apresenta um arsenal de fatores de virulência como, por exemplo, tolerância térmica, presença de cápsula, formação de biofilme, produção de melanina e presença das enzimas peroxidase, catalase, superóxido dismutase, urease, fosfolipase e proteinase (BUCHANAN; MURPHY, 1998; NOSANCHUK *et al.*, 2001; MA; MAY, 2009; CHATUVERDI; CHATUVERDI, 2011; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012; PRATES *et al.*, 2013; GARCÍA-RODAS *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2014; REUWSAAT; DOERING; KMETZSCH, 2021).

A tolerância térmica de *Cryptococcus*, caracterizada pela capacidade de crescer a 37°C, é uma característica essencial para fungos patogênicos. Dentro do gênero, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam bom crescimento a essa temperatura (PERFECT, 2005; BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008), o que permite o

desenvolvimento da infecção em mamíferos (KRONSTAD *et al.*, 2011; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2014).

A cápsula polissacárdica, composta por 90% de glucuronoxilomanana (GXM, formada por ácido glucurônico, xilose e manose), 10% de galactoxilomanana (GalXM, formada por galactose, xilose e manose) e manoproteínas apresenta propriedades e funções importantes para o microrganismo (MA; MAY, 2009; KRONSTAD *et al.*, 2011; BIESLKA; MAY, 2016).

Devido à sua carga negativa, a cápsula protege o patógeno da fagocitose e morte por neutrófilos, monócitos e macrófagos. É também responsável pela depleção do complemento, falta de resposta do anticorpo e desregulação na secreção de citocinas por monócitos e macrófagos, incluindo o fator alfa de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6) (McFADDEN *et al.*, 2006; KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009; LI; MODY, 2010; KRONSTAD *et al.*, 2011; PRATES *et al.*, 2013). Por isso, a cápsula é considerada o principal fator de virulência de *Cryptococcus* spp. (ORSI *et al.*, 2008; FONSECA *et al.* 2010; LI; MODY, 2010; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2014).

O tamanho capsular é dependente do genótipo, das condições de crescimento e de diversas condições ambientais. A síntese da cápsula é modulada por diferentes fatores como, limitação de ferro e níveis fisiológicos de gás carbônico. Em condições padronizadas *in vitro*, a espessura da cápsula é fina, com tamanho médio de 2 microns. *In vivo*, a cápsula é geralmente maior, podendo apresentar uma espessura de 30 microns (IDNURM *et al.*, 2005; McFADDEN *et al.*, 2006; BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; URAI *et al.*, 2016). Essa modulação é fundamental para a sobrevivência de *Cryptococcus*, visto que o crescimento da cápsula confere proteção frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro (GARCÍA-RODAS *et al.*, 2014).

A cápsula pode também inibir a migração de leucócitos da corrente sanguínea para os sítios de inflamação. Além disso, sua presença é essencial para a formação de biofilmes criptocócicos (McFADDEN *et al.*, 2006; KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009), um mecanismo comum utilizado por microrganismos para sobreviver em ambientes hostis, para colonizar novos nichos ecológicos e conferir proteção contra a predação.

A melanina é outro fator de virulência para *Cryptococcus*, sendo importante para garantir a proteção do microrganismo frente ao estresse oxidativo gerado pelo sistema imune do hospedeiro (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008) por estar envolvida em processos de absorção e dissipação de distintas formas de energia (NOSANCHUK *et al.*, 2001). Além disso, células melanizadas de *Cryptococcus* spp. são menos susceptíveis à fagocitose por macrófagos e ao tratamento com antifúngicos como a anfotericina B (DALISAY *et al.*, 2011).

A biossíntese de melanina é catalisada pela enzima lacase e ocorre a partir de compostos fenólicos como as catecolaminas (NOSANCHUK *et al.*, 2001; LI; MODY, 2010; KRONSTAD *et al.*, 2011). Por isso a melanina é geralmente relacionada ao neurotropismo de *C. gattii*: o SNC é um ambiente rico em dopamina, um tipo de catecolamina que pode ser utilizado como substrato para a síntese de melanina (LIN; HEITMAN, 2006; DALISAY *et al.*, 2011; NOSANCHUK *et al.*, 2015). No ambiente, a melanina protege *Cryptococcus* contra a radiação ultravioleta e temperaturas extremas (NOSANCHUK *et al.*, 2001; MA; MAY, 2009).

A produção e secreção de outras enzimas são fundamentais para a virulência, sobrevivência e disseminação do microrganismo. A atividade da urease é importante por catalisar a hidrólise da ureia, convertendo-a em uma fonte utilizável de nitrogênio (COX *et al.*, 2000; OLSZEWSKI *et al.*, 2004; OSTERHOLZER *et al.*, 2009). As proteases e fosfolipases são cruciais na promoção de dano tecidual atuando, respectivamente, na degradação de proteínas e na hidrólise de fosfolipídios (KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009; MA; MAY, 2009; KRONSTAD *et al.*, 2011).

Já as enzimas peroxidase, catalase e superóxido dismutase compõem o sistema antioxidante de *Cryptococcus* que auxilia na detoxificação e na neutralização dos radicais livres. A produção desses radicais livres é resultado do metabolismo das células do sistema imune do hospedeiro e/ou da ação de antifúngicos contra agentes infecciosos. Assim, esse sistema antioxidante é crucial na neutralização desses radicais (CHATUVERDI; CHATUVERDI, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013; ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

Esse conjunto de fatores de virulência possibilitou a sobrevivência e perpetuação de *Cryptococcus* no habitat natural, bem como foi fundamental para que o microrganismo conseguisse infectar diferentes hospedeiros, se reproduzir e

ser capaz de causar doenças (ORSI *et al.*, 2008; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012; REUWSAAT; DOERING; KMETZSCH, 2021).

## 2.5 O potencial patogênico de *Cryptococcus* spp.

A distribuição dos fungos no planeta foi determinada por uma série de fatores que tiveram início com a deriva continental, mas foram influenciadas pela colonização por países europeus, que carregavam os patógenos fúngicos de seus países para as colônias. O deslocamento humano foi outro fator fundamental nesse processo, sendo intensamente acelerado pela globalização (CASADEVALL *et al.*, 2017).

Fungos ambientais patogênicos estão distribuídos em uma diversidade geográfica abrangente. Entretanto, eles são mais comuns em regiões de clima tropical e subtropical, provavelmente devido a temperatura e umidade adequadas para seu crescimento e propagação, como ocorre com *C. gattii* (SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEON; PONCE-DE-LEON, 2012).

Por isso, a ocorrência de eventos naturais, como o aquecimento global e maiores níveis de radiação ultravioleta têm se demonstrado importante por alterar a dinâmica das populações fúngicas em todo o mundo (GREER; NG; FISMAN, 2008; BENEDICT; PARK, 2014). Além disso, esses eventos tem resultado em microrganismos mais adaptados à sobrevivência em condições ambientais adversas por meio da alteração da expressão de seus fatores de virulência (SCHRAG; WIENER, 1995).

A mudança climática modifica a distribuição de espécies tolerantes ao calor ao selecionar as linhagens termotolerantes. O fato de o fungo conseguir crescer e se proliferar em uma temperatura possibilita sua maior interação com os seres humanos, acarretando no surgimento de potenciais patógenos fúngicos. Esse potencial patogênico ocorre porque o fungo, capaz de se desenvolver sob as diversas pressões ambientais, utiliza dos seus fatores de virulência, inicialmente desenvolvidos para sua sobrevivência no nicho ecológico como estratégia para sobreviver no hospedeiro (ARAÚJO; SOUZA; FRASES, 2017).

Estudos realizados com *Cryptococcus* spp., amebas e outros invertebrados demonstraram que a interação entre fungos e outros organismos ambientais

selecionam características que também favorecem sua sobrevivência em mamíferos (LEVITZ, 2001; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003), o que demonstra que a sobrevivência ambiental está intimamente associada à manutenção do potencial patogênico do fungo (MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006; CASADEVALL; PIROFSKI, 2007).

A interação dessas leveduras com amebas tem sido estudada na tentativa de elucidar o papel que *Acanthamoeba castellanii* pode ter na virulência de *Cryptococcus* (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; MAY *et al.*, 2016). *A. castellanii* é uma ameba de vida livre que habita o solo e que pode selecionar linhagens ambientais de *Cryptococcus*. A premissa desses estudos é compreender como o fungo interage com esse predador e qual a estratégia utilizada pelo microrganismo frente a fagocitose realizada por *A. castellanii* (STEENBERGEN *et al.*, 2001; DERENGOWSKI *et al.*, 2013; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; MAY *et al.*, 2016).

A associação ecológica de *C. gattii* com espécies vegetais também pode acontecer e, além de auxiliar na dispersão do fungo, pode influenciar suas características morfo-fisiológicas, bem como sua virulência e a susceptibilidade aos antifúngicos (LEITE *et al.*, 2012). Um estudo em que *A. thaliana* foi infectada com *C. gattii* demonstrou que o microrganismo é capaz de produzir fibrilas extracelulares que são importantes no processo de colonização de plantas e na virulência em modelo animal (XUE *et al.*, 2007), sugerindo que a interação com o ambiente, especificamente, com as espécies vegetais, pode influenciar *C. gattii* (SPRINGER *et al.*, 2010).

Alterações morfológicas, como variações no tamanho e na forma das células, são empregadas por *Cryptococcus* spp. para sobreviver no ambiente. Essas modificações são cruciais para a infectividade em humanos, uma vez que células menores são facilmente internalizadas por macrófagos pulmonares, etapa fundamental para a patogênese do fungo. O aumento do tamanho celular, evento comumente observado em fases posteriores da infecção pulmonar, dificulta a fagocitose por células do sistema imune (SEIDER *et al.*, 2010; ZARAGOZA *et al.*, 2010).

A pressão ambiental também pode induzir mudanças no arsenal enzimático de *Cryptococcus* spp. (COX *et al.*, 2001; COX *et al.*, 2003; RUTHERFORD, 2014). No hospedeiro, essas enzimas podem atuar na degradação tecidual e até na degradação de compostos com ação antifúngica (BOELAERT *et al.*, 1993; KRONSTAD *et al.*, 2012). Modificações na parede celular, na cápsula polissacarídica e na produção de melanina também são observadas (AKSENOV; BABYEVA; GOLUBEV, 1973; ZARAGOZA *et al.*, 2009).

No contexto de mudança climática e aquecimento global, a produção de melanina tem se mostrado um fator de virulência importante na sobrevivência de *Cryptococcus* spp. ao proteger o microrganismo contra a ação de enzimas hidrolíticas, radiação UV e gama, temperaturas extremas e compostos tóxicos (NOSANCHUK *et al.*, 2002; TABORDA *et al.*, 2008)

O desenvolvimento de fatores de virulência no ambiente e o aumento da termotolerância dos microrganismos é um fator que pode ter contribuído significativamente para o aumento de infecções fúngicas oportunistas por espécies ambientais, incluindo àquelas causadas por *Cryptococcus* spp. (ARAÚJO; SOUZA; FRASES, 2017).

Embora *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* sejam os principais agentes da criptococose em humanos, o aumento da ocorrência com espécies consideradas ambientais como *C. liquefaciens*, *C. albidus* e *C. laurentii* tem sido relatado. Provavelmente, estas infecções advêm de reservatórios ambientais como excrementos de aves, árvores, alimentos, solo e água (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007).

A análise de fatores de virulência de *Cryptococcus* utiliza como modelo *C. neoformans*, visto que, anteriormente, as outras linhagens não eram consideradas patogênicas. Entretanto, estudos descreveram semelhanças na composição e estrutura entre os polissacarídeos constituintes da cápsula de *C. liquefaciens* e *C. neoformans*, além de atividades biológicas similares (ARAÚJO *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2017). Sobretudo, casos de fungemia causada por *C. liquefaciens* em pacientes imunocomprometidos (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; CONDE-PEREIRA *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2017) sugerem que esta espécie, reconhecidamente ambiental, pode representar um novo patógeno

humano, o que leva a inferir que esse evento pode ocorrer com outros fungos ambientais, incluindo *Cryptococcus*.

## 2.6 *Cryptococcus* e os modelos vegetais de infecção

Os modelos experimentais são fundamentais para compreender a patogenia do microrganismo, caracterizar a interação patógeno-hospedeiro e auxiliar no entendimento das consequências que essa interação pode acarretar para o microrganismo e, sobretudo, para o hospedeiro.

Modelos vertebrados de infecção por *Cryptococcus* spp. são bem estabelecidos em animais (THOMPSON *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2018) e invertebrados, como *Caenorhabditis elegans* (MYLONAKIS *et al.*, 2002), Zebrafish (DAVIS *et al.*, 2016) e *Galleria mellonella* (MYLONAKIS *et al.*, 2005). No ambiente, modelos vegetais de infecção por *C. gattii* e *C. neoformans* têm sido utilizados para demonstrar a importância que as espécies vegetais, enquanto reservatórios ambientais de *Cryptococcus*, podem ter na reprodução, dispersão do fungo e nos fatores de virulência do microrganismo (SPRINGER *et al.*, 2010; WARPEHA; PARK; WILLIAMSON, 2013; SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017).

O ambiente desempenha um papel essencial para *Cryptococcus* spp. De fato, foi demonstrado que *C. neoformans* e *C. gattii* podem interagir com *Arabidopsis thaliana* e espécies de *Eucalyptus*, como *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* (XUE *et al.*, 2007; SPRINGER *et al.*, 2010). *Cryptococcus* também apresentou capacidade de colonizar abetos (*Pseudotsuga menziesii* e *Tsuga heterophylla*) e mopane (*Colophospermum mopane*). Em muitos casos, a colonização e infecção pelo microrganismo eram associadas a regiões de escurecimento, característica que indica o adoecimento da planta (SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017).

Além de interagir, *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de completar seu ciclo sexual em uma interação parasítica com diversas espécies vegetais, o que pode ter impacto na evolução dos patógenos fúngicos de plantas e animais na natureza (XUE *et al.*, 2007). Xue e colaboradores (2007) demonstraram ainda que as plantas secretam compostos como o mio-inositol e o ácido indolacético, que estimulam o *mating* do fungo e que a interação microrganismo/planta ocorre de

forma dependente do ácido jasmônico, o que induz à uma sinalização que ativa vias de defesa da planta (SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017).

*Cryptococcus* spp. têm se mostrado capaz de colonizar espécies vegetais em vários estágios do ciclo de vida das plantas, incluindo mudas, plantas maduras e matéria vegetal morta. Junto a essa capacidade, foi verificado que diferentes espécies de *Cryptococcus* conseguem filamentar, reproduzir e produzir esporos em plantas mortas, o que acarreta uma associação do microrganismo com plantas de longo prazo (SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017). De fato, Huerfano, Castañeda e Castañeda (2001) demonstraram que *C. gattii* pode sobreviver e ser recuperado de mudas de amêndoa experimentalmente infectadas até 100 dias pós-inoculação, reforçando a capacidade do microrganismo de colonizar e sobreviver em espécies vegetais.

Além da capacidade de filamentar em espécies vegetais, outros fatores têm sido apontados como essenciais para a colonização ou mesmo para a virulência de *Cryptococcus*. Por exemplo, foi demonstrado que a lacase é importante para a virulência de *C. neoformans* em *A. thaliana* (SPRINGER, 2009), apesar de a colonização não ser dependente dessa enzima (SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017).

Outro fator de virulência importante para a colonização do fungo é a produção de melanina. Esse pigmento é importante para garantir a viabilidade fúngica frente a exposição à radiação, fator determinante no processo de colonização e infecção por *Cryptococcus* em plantas. Para *A. thaliana*, é conhecido que a exposição à luz confere efeito protetivo contra uma série de patógenos (JEONG; KACHROO; KACHROO, 2010).

Uma análise comparativa entre a infecção em *A. thaliana* demonstra perfis distintos entre *C. neoformans* e *C. gattii*. Enquanto *C. neoformans* é resistente à radiação ultravioleta, fato que garante maior sobrevivência do microrganismo (FUCHS *et al.*, 2007) e evita o contato com patógenos ambientais, como amebas de vida livre (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001), *C. gattii* leva à maior mortalidade das plantas (WARPEHA; PARK; WILLIAMSON, 2013).

Ren *et al.* (2006) também observaram que espécies de *Cryptococcus* que colonizavam plantas apresentavam um crescimento fortemente melanizado, enquanto linhagens que apresentavam mutação em um fator de transcrição



associado à melanina (Ste12 $\alpha$ ) exibiram menor capacidade de crescimento, perda de pigmentação e menor virulência em modelo murino de criptococose, o que sugere uma ligação entre a aptidão ecológica e a virulência de *C. gattii* (REN *et al.*, 2006).

Ao avaliar aspectos de colonização de espécies vegetais, Springer *et al.* (2010) demonstraram que *C. gattii* foi capaz de colonizar folhas de *A. thaliana*, formando camadas organizadas de células fúngicas e produzindo fibrilas extracelulares. A formação e organização dessas fibrilas foi associada a presença de uma cápsula polissacarídica intacta, uma vez que linhagens de *C. gattii* com mutação em um gene relacionado a produção de cápsula (cap59 $\Delta$ ) não foram capazes de produzi-las ou sequer colonizar as folhas de *A. thaliana* (GARCIA-RIVERA *et al.*, 2004). Estruturalmente, as fibrilas observadas em *C. gattii* eram semelhantes às oxilipinas, moléculas formadas a partir de ácidos graxos, cuja produção já havia sido descrita em *C. neoformans* (SEBOLAI *et al.*, 2007; SEBOLAI *et al.*, 2008a; SEBOLAI *et al.*, 2008b).

Autores acreditam que a formação de fibrilas extracelulares poderia ser uma adaptação para a colonização das folhas das plantas, visto que uma vez colonizado, o ambiente se torna inóspito para a colonização por outros microrganismos, devido a limitação nutricional, a competição interespecífica, a desidratação e a exposição à radiação (BRANDL, 2006; FONSECA; INÁCIO, 2006). Essa hipótese é suportada pelo fato de que a colonização foliar é uma característica amplamente difundida em leveduras basidiomicéticas, a exemplo de *C. gattii* (INÁCIO *et al.*, 2005).

Além de auxiliar na colonização das folhas de *A. thaliana*, a formação de fibrilas extracelulares em *C. gattii* foi associada a um aumento da resistência *in vitro* frente a atividade fungicida de fagócitos polimorfonucleares humanos. Aparentemente, essas células eram hábeis em fagocitar *C. gattii* na presença de fibrilas extracelulares, mas essas estruturas conferiram maior resistência a atividade fungicida do fagócito (SPRINGER *et al.*, 2010).

Outra característica observada foi que a linhagem de *C. gattii* capaz de produzir as fibrilas extracelulares apresentou maior virulência em modelo murino de criptococose. Camundongos infectados com essa linhagem apresentaram maior migração do fungo para o SNC e, conseqüentemente, menor taxa de sobrevivência. O exame histopatológico ainda demonstrou uma taxa elevada de proliferação fúngica

nos pulmões e danos teciduais consideráveis. A resposta do hospedeiro, por sua vez, pareceu bastante limitada (SPRINGER *et al.*, 2010), sugerindo que as fibrilas extracelulares poderiam auxiliar na inibição ou no escape do fungo frente aos fagócitos humanos (URBAN; LOURIDO; ZYCHLINSKY, 2006).

Independente da espécie vegetal utilizada, estudos indicam que a colonização e sobrevivência são influenciadas por uma série de componentes, como a linhagem de *Cryptococcus* utilizada, as condições ambientais e a genética do hospedeiro vegetal (XUE *et al.*, 2007; SPRINGER, 2009; SPRINGER *et al.*, 2010).

A recuperação de *Cryptococcus* de mudas infectadas é outro fator dependente da espécie vegetal e da linhagem do fungo. Por exemplo, Springer, Mohan e Heitman (2017) demonstraram que *C. gattii* foi capaz de colonizar mudas de diversas espécies de plantas, enquanto *C. neoformans* foi a espécie mais recuperada de mudas inoculadas de abetos. Os autores chamam atenção para outro achado do estudo: a recuperação de *Cryptococcus* foi melhorada utilizando linhagens que continham um marcador de resistência a antifúngicos.

Assim, apesar de alguns compostos, como os flavonóides, representarem importantes defesas antimicrobianas para as plantas, a colonização desses organismos por espécies de *Cryptococcus* tem sido largamente observada (XUE *et al.*, 2007; SPRINGER *et al.*, 2010; SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017). Os flavonóides são moléculas encontradas em grandes quantidades em angiospermas, principalmente em espécies que crescem sob condições de alta luminosidade (KLIEBENSTEIN; FIGUTH; MITCHELL-OLDS, 2002; LLOYD *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012).

Nesse sentido, Orozco-Nunnelly e colaboradores (2014) testaram a virulência de *Cryptococcus* contra uma linhagem de *A. thaliana* com uma mutação no gene AtPirin1 (PRN1). Foi observado que os mutantes de *A. thaliana* Atprn1 apresentavam alteração na produção da quercetina, um flavonóide derivado da fenilalanina. Esperava-se que essa alteração levasse a maior susceptibilidade ao reduzir as barreiras à infecção e facilitar a infecção e colonização por *Cryptococcus*. No entanto, o mutante Atprn1 de *A. thaliana* não apresentou suscetibilidade aumentada a *C. gattii*, sugerindo que o acúmulo dos flavonóides pode não ser tão importante nas infecções por *C. gattii* e/ou que outros fatores podem influenciar nesse processo (OROZCO-NUNNELLY *et al.*, 2014).

É importante salientar que, para *Cryptococcus*, os flavonóides podem ser utilizados como substrato para a lacase, resultando na formação de um revestimento defensivo da parede celular semelhante à melanina (FOWLER *et al.*, 2001). Essas células fúngicas, por sua vez, apresentam maior resistência frente a radiação ultravioleta e ao estresse oxidativo gerado por diversos organismos (DADACHOVA; CASADEVALL, 2008).

Por isso, a influência de diversos fatores tem sido relacionada ao surgimento dos patógenos infecciosos. Keesing e colaboradores (2010) demonstraram experimentalmente as habilidades de *C. neoformans* e *C. gattii* em infectar plântulas germinativas intactas, fornecendo insights sobre os fatores de virulência fúngicos e a relação desses microrganismos com plantas, relacionando-os a patogênese dos mamíferos.

Essas evidências sugerem que diferentes espécies de *Cryptococcus* utilizaram estratégias distintas frente às pressões evolutivas encontradas no nicho ecológico das plantas, o que indica que o fungo é capaz de se adaptar, atuando como parasita, saprófito e/ou patógeno (WARPEHA; PARK; WILLIAMSON, 2013). De fato, supõe-se que os diversos ambientes conduzam a plasticidade fenotípica do microrganismo (SCHULZ; BOYLE, 2005). Nesse contexto, as espécies vegetais têm um papel fundamental na manutenção, otimização e na expressão dos fatores de virulência durante o ciclo de vida ambiental de *Cryptococcus*, o que suporta a ideia de que *C. gattii* está bem estabelecido na microbiota de árvores nativas em diversas partes do mundo (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010).

Sobretudo, essa plasticidade fenotípica observada com relativa facilidade em *Cryptococcus* indica que a ocorrência desses eventos pode se tornar cada vez mais recorrente. Bastos *et al.* (2018) e Carneiro *et al.* (2019) demonstraram que o uso de agroquímicos pode influenciar na fisiologia, virulência e no perfil de resistência de *Cryptococcus* frente a antifúngicos clínicos, indicando que a utilização extensiva desses compostos pode influenciar as características de fungos ambientais, como *C. gattii* e *C. neoformans*.

Levando em consideração o contexto mundial, mas principalmente no Brasil, onde o consumo de agroquímicos aumentou em 190% nos últimos anos, compreender essa interação se faz ainda mais relevante e necessária do ponto de vista ecológico e clínico (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

### 3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo vegetal para estudar a interação entre *Cryptococcus*-planta e verificar a influência de resistência a agroquímicos nesta interação.

## CAPÍTULO I – DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO VEGETAL PARA ESTUDAR INTERAÇÃO ENTRE *Cryptococcus*-PLANTA

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método de infecção de *Cryptococcus gattii* em diferentes modelos vegetais;
- Infectar plantas das espécies *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum* com *Cryptococcus gattii* e avaliar o nível da severidade fisiopatológica;
- Realizar cinética de eliminação de *C. gattii* dos modelos vegetais;
- Avaliar alterações teciduais nos modelos vegetais infectados com *C. gattii*;
- Quantificar a peroxidação lipídica, a produção de peróxido de hidrogênio e das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase nos modelos vegetais infectados com *C. gattii*;
- Estudar alterações morfológicas (diâmetro do corpo celular, espessura da cápsula, razão superfície/volume) em *C. gattii* recuperados dos diferentes modelos vegetais;
- Determinar conteúdo do fitohormônio ácido indol-3-acético (IAA) em *N. benthamiana* infectados e não infectados com *C. gattii*;
- Verificar taxa de crescimento em *C. gattii* antes e após a passagem por *N. benthamiana*;
- Avaliar a atividade enzimática de fosfolipase, proteinase, urease e lacase em *C. gattii* antes e após a passagem por *N. benthamiana*;
- Quantificar o ergosterol de *C. gattii* antes e após a passagem por *N. benthamiana*;
- Avaliar perfil de sensibilidade a antifúngicos em *C. gattii* antes e após a passagem por *N. benthamiana*;
- Avaliar o índice fagocítico, a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade fungicida de macrófagos derivados de medula óssea desafiados com *C. gattii* antes e após a passagem por *N. benthamiana*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MANUTENÇÃO E CULTIVO DE *Cryptococcus gattii*

Foi utilizada a linhagem clínica de *Cryptococcus gattii* L27/01 (Cg) pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Para manutenção e cultivo da linhagem, a amostra foi mantida em freezer a -80 °C e repicada em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco), seguida de incubação por 48 horas a 37 °C.

### 4.2 MODELOS VEGETAIS

Para este estudo foram utilizadas plantas das espécies *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia-0 (At), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana (Nt). Inicialmente, as plantas foram cultivadas em copo plástico descartável de 50 mL contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças (Vida Verde, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) à 25 °C por 4 semanas e fotoperíodo de 12 horas em câmara de crescimento. O substrato foi enriquecido antes da semeadura com 2 g/L de NPK 10-10-10 (Mato Verde Jardinagem, Bady Bassitt, São Paulo, Brasil).

### 4.3 PREPARO DO INÓCULO

A amostra fúngica (Cg) foi cultivada em meio ASD e incubada por 48 horas a 37 °C. Após a incubação, as colônias foram suspensas em 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS), homogeneizadas e a contagem de células viáveis foi realizada em Câmara de Neubauer (New Optics) após coloração com azul de Trypan (Sigma Aldrich). Em seguida, a concentração do inóculo foi ajustada para  $10^8$  células/mL (BASTOS *et al.*, 2018).

### 4.4 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

Os modelos vegetais foram inoculados com a suspensão de Cg na concentração de  $10^2$  unidades formadoras de colônia (UFC) por meio dos métodos

de escarificação, infiltração e abrasão (MICHEREFF, 2001), conforme descrito a seguir.

- a) Escarificação: microferimentos foram provocados na superfície da folha por uma agulha estéril e, posteriormente, foi aplicada a suspensão do inóculo.
- b) Infiltração: foi realizada a inoculação por pressão onde a suspensão do inóculo foi infiltrada na folha por meio do uso de seringa estéril;
- c) Abrasão: microferimentos provocados na superfície da folha por *swab* contendo abrasivo (carborundum) minissimamente granulado e, em seguida, foi aplicada a suspensão do inóculo.

#### 4.5 DESCONTAMINAÇÃO DOS MODELOS VEGETAIS

Para descontaminação das plantas, foi utilizada a metodologia proposta por Bulgari *et al.* (2009) com modificações. O método de descontaminação consiste em adicionar inicialmente à amostra vegetal 30 mL de solução de etanol 70% (v/v) por 3 minutos, seguido da lavagem da amostra com PBS para remoção do excesso de etanol. Posteriormente, foram adicionados 30 mL de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 5 minutos, seguido de nova lavagem em PBS. Novamente foram adicionados 30 mL da solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos e realizada nova lavagem com PBS.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA CARGA FÚNGICA

A recuperação de células fúngicas das plantas ocorreu nos períodos de 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. Inicialmente, as plantas foram ou não descontaminadas e, posteriormente, fragmentadas com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica estéril em caule, folha inoculada e folha não inoculada. Cada fragmento da planta foi pesado e macerado em 100 µL de PBS. O conteúdo foi semeado em ASD suplementado com cloranfenicol 0,001% (INLAB) e cicloheximida 0,001% (Sigma-Aldrich), seguido de incubação a 37 °C por 48 horas. Após incubação, foi determinado o número de UFC em relação ao peso do fragmento de cada planta (UFC/g).

#### 4.7 HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA VEGETAL

Os modelos vegetais inoculados e não inoculados com Cg foram fixados em solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído e 4,5% de formaldeído) em 0,1 mol/L de tampão fosfato, pH 7,2, por 48 horas à temperatura ambiente (KARNOVSKY, 1965). Em seguida foram desidratados em etanol e incorporados em Leica Histoiresin<sup>®</sup>, seccionados (4-8  $\mu\text{m}$ ) em micrótomo rotativo Leica BIOCUT 2035 (Leica<sup>®</sup>, Alemanha).

Para a análise histológica, os cortes foram corados com 0,05% de azul de toluidina em 1mol/L de PBS, pH 4,7 (O'BRIEN AND MCCULLY 1981) durante 5 minutos. Após a coloração, as lâminas foram montadas em água e os cortes observados em um microscópio óptico (Leica<sup>®</sup> DM500) e fotografados com câmera digital Leica<sup>®</sup> ICC50 HD.

A avaliação histoquímica ocorreu imediatamente após o corte. As seções foram imersas em água e submetidos aos reagentes histoquímicos (Tabela 1). Os fragmentos vegetais das plantas não infectadas foram utilizados como controle. Depois disso, as foram montadas em água e os cortes observados em um microscópio óptico (Leica<sup>®</sup> DM500) e fotografados com câmera digital Leica<sup>®</sup> ICC50 HD.

**Tabela 1.** Análises histoquímicas empregadas.

<b>Metabólito</b>	<b>Testes histoquímicos</b>	<b>Referência</b>
Amido	Lugol	Johansen (1940)
Lipídios	Sudan Red B	Brundett (1991)
Compostos fenólicos	Cloreto férrico 2%	Johansen (1940)
Lignina	Azul de astra e safranina	Kraus & Arduin (1997)
Fungos	Azul de algodão em lactofenol	Marques et al. (2013 adaptado)
Polissacarídeos	Periodic acid Schiff (PAS)	Figueiredo, Darvalho; Diniz, (2013)

#### 4.8 QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Para quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio, 100 mg de folhas de cada modelo vegetal não infectadas e previamente infectadas com o fungo ou apenas com PBS foram trituradas com nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizados em 1 mL de solução 0,1% ácido tricloroacético (TCA). Após



centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4 °C, foram adicionados 75 µL de tampão fosfato de potássio (10 mM; pH 7,0) e 150 µL de solução 1M de iodeto de potássio a uma alíquota de 75 µL do sobrenadante. A absorbância foi lida a 390 nm e o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi construído com base em uma curva padrão (VELIKOVA *et al.*, 2000). O ensaio foi realizado em quintuplicata biológica.

#### 4.9 ENSAIOS ENZIMÁTICOS VEGETAIS

Para a determinação da atividade enzimática, 100 mg de folhas de cada modelo vegetal não infectadas e previamente infectadas com o fungo ou apenas com PBS foram trituradas com nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,8) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; 1 mM) e polivinilpirrolidona (PVP; 5%). O extrato resultante foi centrifugado a 15.000 g por 15 minutos a 4 °C e 50 µL do sobrenadante foram coletados para dosagem de proteína e o restante do extrato foi acondicionado em gelo para determinação das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathiona redutase. O ensaio foi realizado em quintuplicata biológica.

##### 4.9.1 Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão proteico. Foram adicionados 150 µL de água e 40 µL de solução Bradford a uma alíquota de 30 µL do extrato e, em seguida, a amostra foi agitada por 1 minuto. A absorbância foi lida a 595 nm e o conteúdo de proteína foi baseado na uma curva padrão.

##### 4.9.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A mistura de reação continha 20 µL do extrato enzimático, 50 µL de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,8), 17 µL de metionina (13 mM), 10 µL de azul p-nitrotetrazolio (NBT; 75 µM), 1 µL de EDTA (100 µM) e 2 µL de riboflavina (2 µM). Foram preparados dois conjuntos de reações idênticas, sendo que uma delas foi

aconditionada na presença de luz fluorescente (15 W) e a outra na ausência de luz por 10 minutos. A absorbância de ambas as reações foi medida a 575 nm e a atividade da SOD foi determinada medindo-se a capacidade do extrato enzimático de inibir a redução fotoquímica do NBT. Uma unidade da SOD foi definida como a atividade da enzima que inibiu a fotorredução do NBT para o formazano azul em 50%, sendo a atividade da SOD expressa como unidades de SOD (mg proteína) (BEYER; FRIDOVICH, 1987).

#### **4.9.3 Determinação da atividade da catalase (CAT)**

A mistura da reação continha 50 µL do extrato vegetal, 150 µL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,0) e 85 µL de água ultrapura. A reação foi incubada por 3 minutos a 28 °C e, posteriormente, foram adicionados 15 µL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM). A absorbância foi lida a 240 nm imediatamente após a adição da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2 minutos com intervalos de 15 segundos. A atividade da enzima foi expressa como mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto, ou seja, mgproteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (AEBI, 1984).

#### **4.9.4 Determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX)**

A reação foi formada por 50 µL do extrato vegetal e 150 µL de tampão fosfato de potássio (200 mM; pH 7,0). A reação foi incubada por 3 minutos a 28 °C e, posteriormente, foram adicionados 85 µL de solução de ascorbato (10 mM) e 15 µL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM). A atividade da enzima foi medida como a diminuição da absorbância a 290 nm durante 3 minutos com intervalos de 15 segundos e expressa como resultado da oxidação do ascorbato (NAKANO; ASADA, 1981).

#### **4.9.5 Determinação da atividade da glutathiona redutase (GR)**

A mistura da reação continha 50 µL do extrato enzimático, 150 µL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,8), 50 µL de glutathiona oxidada (10 mM) e 40 µL de água ultrapura. A reação foi incubada por 3 minutos a 28 °C e, posteriormente, foram adicionados 10 µL de NADPH (5 mM). A taxa de oxidação do NADPH foi

monitorada a 340 nm por 3 minutos com intervalos de 15 segundos. A atividade da enzima foi expressa como  $\mu\text{MNADPHoxidado}$ , ou seja,  $\text{mg.proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$  (CAKMAK; HORST, 1991).

#### 4.10 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi avaliada medindo-se a quantidade de malondialdeído (MDA) nas folhas, de acordo com Hodges *et al.* (1999), que consideram os possíveis efeitos de compostos interferentes no ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Para a extração, 100 mg de folhas de cada modelo vegetal não infectadas e previamente infectadas com o fungo ou apenas com PBS foram trituradas com nitrogênio líquido e, posteriormente, homogeneizados em 1 mL de etanol 80%, seguida de 15 minutos em banho ultrassônico (frio). O processo de homogeneização foi realizado duas vezes e, em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em vidro âmbar. No total, foram realizadas três extrações, e ao final de cada uma, o sobrenadante foi retirado e acondicionado junto ao anterior. Após este processo, foi adicionado o volume de 1 mL do extrato resultante em dois tubos distintos, sendo um tubo para reação de TBARS+ [contendo TCA, hidroxitolueno butilado (BHT) e ácido tiobarbitúrico (TBA)] e o outro para a reação de TBARS- (contendo apenas TCA e BHT). Os tubos foram fechados e mantidos a 95 °C por 25 minutos. Após resfriamento por 10 minutos, a absorbância foi lida nos comprimentos de onda de 440, 532 e 600 nm. Os resultados foram expressos como  $\text{nmol.g}^{-1}$ . O ensaio foi realizado em quintuplicata biológica.

#### 4.11 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a análise morfométrica de *Cryptococcus* sp., células foram previamente cultivadas em ASD (controle), inoculadas nos modelos vegetais e recuperadas após 7 dias de inoculação. Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão obtida diretamente do triturado da planta contendo as células fúngicas foi adicionada em uma lâmina com tinta nanquim para posterior visualização em microscópio óptico Nikon Eclipse e200

(Nikon, Japão) e captura da imagem. Os tamanhos das células e cápsulas de, no mínimo, 50 espécimes de cada amostra foram mensurados com o auxílio do programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; National Institute of Health, NHI, Bethesda, MD) (ARAÚJO *et al.*, 2012). Posteriormente, a razão superfície/volume foi determinada usando a fórmula  $3/r$  em que  $r$  = raio (FERREIRA *et al.*, 2015; BASTOS *et al.*, 2018).

#### 4.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MeV)

As células de Cg também foram observadas pela microscopia eletrônica de varredura (MeV). Foram utilizadas linhagens cultivadas em meio ASD incubadas à 30 °C por 48 horas e linhagens obtidas de Nt após 7 dias de inoculação no modelo vegetal. Posteriormente, colônias fúngicas foram suspensas em solução salina estéril e a concentração do inóculo ajustada por meio de leitura da transmitância da suspensão em espectrofotômetro, com o comprimento de 530 nm e transmitância entre 75 e 77%, o que corresponde a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL.

Em seguida, 10 µL desse inóculo foi aplicado sobre uma lamínula com poli-L-lisina deixando-se secar em temperatura ambiente e, subsequentemente, as lamínulas foram tratadas com o fixador (2,5% glutaraldeído e 0,1 M de cacodilato de sódio) por no mínimo 1 hora a temperatura ambiente. O fixador foi então removido com a lavagem das amostras com tampão contendo 0,1 M de cacodilato, 0,2 M de sacarose e 2 mM de cloreto de magnésio. As amostras foram então enviadas ao Centro de Microscopia da UFMG, onde as preparações foram processadas com a desidratação crescente de etanol (35%, 50% a 95% por 10 minutos e 100% por 3 vezes de 10 minutos cada), com a secagem em ponto crítico e, finalmente, a metalização com ouro. O material foi então visualizado no microscópio eletrônico de varredura FEG - Quanta 200 FEI operado a 15 Kv (VAN DUIN *et al.*, 2004).

#### 4.13 DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIO VEGETAL

A determinação do fitohormônio ácido indol-3-acético (IAA) foi realizada por meio de sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e detecção de fluorescência conforme proposto por Nakurte *et al.* (2012).

#### 4.13.1 Reagentes

Foram usados metanol (grau gradiente), ácido acético ( $\geq 99\%$ ) e padrão de ácido indol-3-acético ( $> 99\%$ ) (Sigma-Aldrich, Alemanha). A água utilizada neste ensaio foi purificada com um sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Bedford, EUA). Soluções estoque do padrão a uma concentração de  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  e  $10^1$  ng/mL foram preparadas dissolvendo o composto em metanol e armazenadas a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.13.2 Instrumentação

A análise cromatográfica foi realizada em um CLAE Alliance Waters 2695, injetor automático, detectores de UV-visível e fluorescência (Waters, Milford, MA, EUA). As separações de HPLC foram obtidas usando uma coluna de fase reversa Supelcosil LC-18 (Supelco, Bellefonte, PA)  $4,6 \times 150$  mm,  $5\ \mu\text{m}$ . A temperatura da coluna foi controlada a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . A fase móvel foi composta de metanol e 1% de ácido acético (40: 60 v/v) no modo isocrático a uma vazão de 1 mL/min. A detecção foi monitorada a 282 nm para IAA. O volume de injeção foi de  $50\ \mu\text{L}$ . Os resultados foram avaliados pelo software Waters Empower.

#### 4.13.3 Material vegetal e preparação da amostra

Foram triturados, em nitrogênio líquido, 300 mg de amostras de tecido foliar retiradas de plantas com a presença ou ausência do fungo e, posteriormente, para extração foram homogeneizados em  $600\ \mu\text{L}$  de solução contendo metanol e ácido acético (99:1 v/v). Em seguida, a amostra foi levada a banho ultrassônico por 30 minutos seguido de centrifugação a  $10\ 000\ \text{g}$  por 10 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi acondicionado em gelo. O processo foi repetido com o precipitado duas vezes, havendo recolhimento do sobrenadante para posterior determinação de IAA. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo e evaporado até que o volume reduzisse para menos de um décimo do inicial.

#### 4.13.4 Extração usando C18 SPE

O resíduo evaporado foi dissolvido em 5 mL de uma solução de metanol e ácido acético (99:1 v/v). A solução foi filtrada com filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Filtrilo, Colombo, PR, Brasil), para remover partículas e outros sólidos em suspensão. As amostras filtradas foram imediatamente pré-concentradas por SPE usando SampliQ C18 ODS 500 mg 6 mL SPE (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A coluna C18 SPE foi pré-tratada com solução de lavagem contendo 4,5 mL de água e 0,5 mL de solução de metanol e ácido acético (99:1 v/v). Em seguida, as amostras foram carregadas no cartucho e coletadas e procedeu-se a limpeza da coluna utilizando 5 mL da solução de lavagem. Para eluir os analitos da coluna de extração foram utilizados 2 mL de metanol e ácido acético (99:1 v/v) e 3 mL de água ultra pura. O extrato foi evaporado até o volume de 1 mL.

#### 4.13.5 Detecção de IAA

A detecção de IAA no extrato evaporado foi obtida em termos de linearidade. A linearidade da medição foi avaliada através da análise de diferentes concentrações da solução padrão do IAA. O padrão de calibração foi preparado diluindo a solução estoque para obter as concentrações de 40, 50 100, 150 e 200 ng/mL.

### 4.14 TAXA DE CRESCIMENTO

A taxa de crescimento foi determinada para Cg previamente cultivadas em meio ASD incubadas à 30 °C por 48 horas e linhagens obtidas de Nb após 7 dias de inoculação no modelo vegetal. Um inóculo de  $10^3$  UFC foi dispensado em 300  $\mu\text{L}$  de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) a 30 °C sob agitação de 100 rpm no Ratek Orbital Mixer Incubator (Ratek Instruments Pty. Ltd., Victoria, Australia). Durante 48 horas de cultivo, alíquotas foram tomadas nos tempos de 0, 2, 6, 24 e 48 horas e plaqueadas em ASD. Após 48 horas de incubação a 30 °C, determinou o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) para cada linhagem. O ensaio foi realizado em triplicata técnica.

#### 4.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Cryptococcus gattii*

A quantificação de enzima foi realizada em amostras de Cg previamente cultivadas em meio ASD incubadas à 37 °C por 48 horas e amostras obtidas de Nb após 7 dias de inoculação no modelo vegetal.

##### 4.15.1 Fosfolipase

Uma massa de células foi recolhida assepticamente das duas linhagens, antes e após a passagem em Nb, e suspensa em solução salina estéril. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro e ajustada para uma concentração entre  $1 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, 10 µl da suspensão fúngica foi dispensada em placas com meio ágar fosfolipase (20 g/L de glicose, 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 58,5 g/L de cloreto de sódio, 20 g/L de ágar e 160 mL de uma emulsão de gema de ovo, composta por 50% de gema e 50% de salina estéril). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 96 horas.

A presença da enzima fosfolipase foi observada pela formação de um halo amarelo ao redor da colônia da levedura. A atividade enzimática (Pz) foi calculada dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia acrescido da zona de degradação do substrato (halo), sendo utilizada uma régua milimétrica para auxiliar nessa medida. De acordo com esse sistema, quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática da amostra. Para tanto,  $Pz = 1$  caracteriza ausência de atividade enzimática; Pz entre 0,64 e 0,99 caracteriza atividade média; e  $Pz \leq 0,63$  caracteriza atividade elevada (PRICE *et al.*, 1982).

##### 4.15.2 Proteinase

Uma massa de células foi recolhida assepticamente das duas linhagens, antes e após a passagem em Nb, e suspensa em solução salina estéril. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro e ajustada para uma concentração entre  $1 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, 10 µl da suspensão fúngica de cada amostra foi dispensada em placas com meio

indutor de proteinase (solução 1 - 0,08 g de sulfato de magnésio, 1 g de fosfato de potássio, 0,04 g de extrato de malte, 8 g de glicose, 2 g de cloreto de sódio, 120 mL de água destilada, pH 3,5; solução 2 - 1 g de peptona, 11,2 g de maltose, 4,2 g de ágar e 280 mL de água destilada e 1 g de BSA). Em seguida, as placas foram incubadas por 96 horas a 37 °C.

A presença da enzima proteinase foi observada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia da levedura e a Pz foi calculada dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro do halo de degradação. Para tanto, Pz = 1 caracteriza ausência de atividade enzimática; Pz entre 0,64 e 0,99 caracteriza atividade média; e Pz  $\leq$  0,63 caracteriza atividade elevada (PRICE *et al.*, 1982).

#### 4.15.3 Urease

O inóculo fúngico, previamente cultivado em meio YEPG (*Yeast Extract-Glucose-Peptone agar*) (3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 5 g/L de glicose e 18 g/L de ágar), foi suspenso em 2 mL de água destilada estéril e mensurado em espectrofotômetro a 600 nm e ajustado a uma absorvância entre 0,8 a 1,0, que equivale a  $1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^8$  células/mL. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada em vórtex e, posteriormente, 1 mL dessa suspensão foi adicionada a 1 mL de caldo RUH (*Rapid Urea Broth*) (2,0 g/L Ureia, 0,01 g/L de extrato de levedura, 1,0 mg/L de vermelho de fenol, 0,1365 g/L de fosfato monopotássico e 0,1425 g/L de fosfato de sódio dibásico anidro). Após a combinação da suspensão fúngica com o caldo RUH, a mistura foi incubada à 37 °C sob agitação de 40 rpm no Ratek Orbital Mixer Incubator. Após 4 horas de incubação, a solução foi centrifugada a 1.500 g por 10 minutos e o sobrenadante removido para posterior leitura em espectrofotômetro com absorvância a 560 nm. Utilizou-se como controle negativo uma suspensão contendo caldo RUH sem inóculo fúngico (KWON-CHUNG *et al.*, 1978; ROBERTS *et al.*, 1978).

#### 4.15.4 Lacase

Amostras de Cg previamente cultivadas em meio ASD incubadas à 37 °C por 48 horas e amostras obtidas de Nb após 7 dias de inoculação no modelo vegetal



foram cultivadas em meio mínimo (MM) sólido (15 mM glicose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 29.4 mM KHPO<sub>4</sub>, 13 mM glicina e 18 g/L de ágar bacteriológico, pH 5.5). A massa de células fúngicas obtida foi recolhida, suspensa em solução salina estéril e ajustada em espectrofotômetro para obter a concentração de 1x10<sup>8</sup> células/mL. Posteriormente, 100 µL de 2.2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS; 10mM) foram adicionados a 900 µL da suspensão fúngica e incubados *overnight*. Após incubação, as células foram centrifugadas e a absorvância do sobrenadante foi mensurada em espectrofotômetro a 420 nm. Foi utilizada uma suspensão de células sem ABTS como controle negativo. A absorvância detectada corresponde à oxidação do ABTS pela enzima lacase, de modo que valor obtido é indiretamente proporcional à atividade da enzima (MARTINEZ *et al.*, 2007).

#### 4.16 QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL

A quantificação de ergosterol das amostras foi realizada de acordo com Santos *et al.* (2012). As amostras de Cg antes e após a passagem em Nb foram cultivadas em meio ASD por 72 horas a 37 °C. Após cultivo, 20 mg de massa fúngica foram transferidos para tubos de polipropeno. Foram 3 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio (25%) a cada tubo, seguido por 1 minuto de agitação e incubação em banho maria a 85 C° por 1 hora. Após esse período, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 3 mL de n-heptano (Sigma-Aldrich), 1 mL de água destilada esterilizada e os tubos foram agitados vigorosamente por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e sua absorvância foi mensurada em espectrofotômetro a 282 nm. Uma curva de calibração como padrão de ergosterol (Sigma-Aldrich) foi produzida e utilizada para quantificação de ergosterol. Os resultados foram expressos como concentração de ergosterol (µg/mL).

#### 4.17 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A susceptibilidade das linhagens de Cg antes e após a passagem em Nb foi realizada segundo o documento M27-A3 do método de microdiluição em caldo proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2017).

#### **4.17.1 Antifúngicos e preparo das soluções estoque**

Foram determinadas as CIMs para os antifúngicos fluconazol (FCZ; Sigma-Aldrich) e anfotericina B (AMB; Sigma-Aldrich). Soluções estoque foram preparadas na concentração de 5000 µg/ml, de modo que FCZ foi solubilizado em água destilada estéril e AMB em dimetilsulfóxido (DMSO) (CLSI, 2017). As soluções estoque foram, posteriormente, diluída sem meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para atingir as concentrações estabelecidas para o ensaio de determinação da CIM.

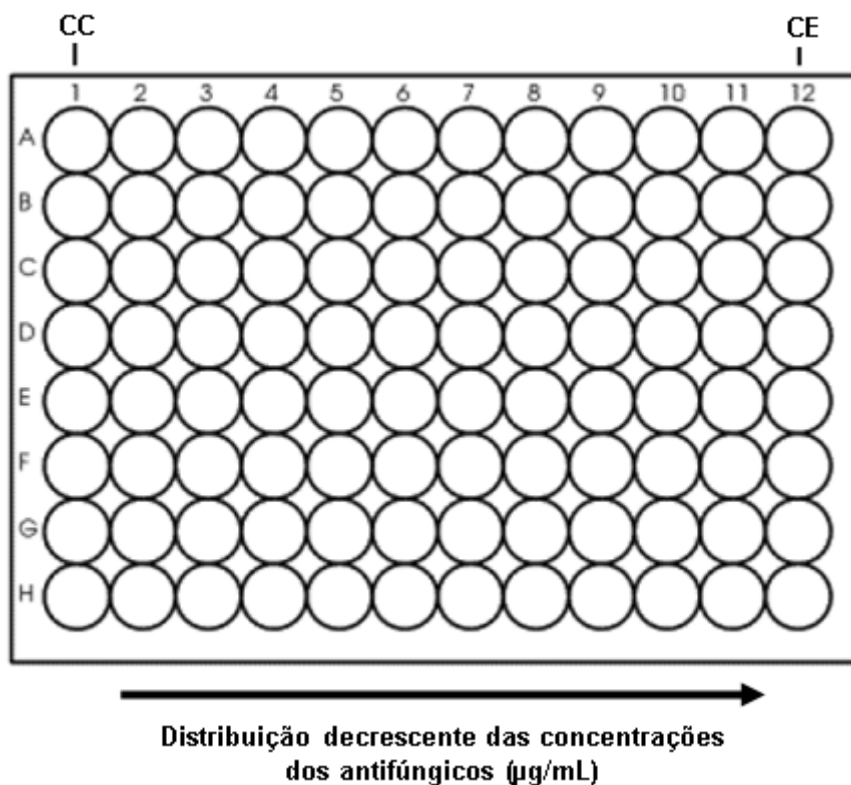
#### **4.17.2 Preparo das placas**

Os testes de susceptibilidade foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços de fundo chato. Foram testadas concentrações dos antifúngicos que variaram entre 256,00 a 0,50 µg/mL para FCZ e 8,00 a 0,01 µg/mL para AMB. Em seguida, alíquotas de 100µL de cada concentração foram distribuídas nos poços da placa de microdiluição.

#### **4.17.3 Preparo dos inóculos**

Amostras de Cg antes e após a passagem em Nb foram previamente cultivadas por 48 horas a 37 °C. Após este período, colônias fúngicas foram suspensas solução salina estéril e o inóculo fúngico foi ajustado para a concentração de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL em espectofotômetro. Diluições de 1:50 seguida de diluições de 1:20 do inóculo inicial em RPMI 1640 foram realizadas, de maneira a atingir uma concentração final de  $1 \times 10^3$  células/mL (CLSI, 2017).

A distribuição dos inóculos estabeleceu a seguinte disposição: uma coluna foi reservada para a inoculação de um controle de crescimento (CC) (RPMI + inóculo) e outra coluna para o controle de esterilidade (CE) (RPMI) (Figura 2). Nas demais colunas foram adicionadas as suspensões dos inóculos com a solução do composto associado ao RPMI 1640.



**Figura 2.** Esquema de um teste de concentração inibitória mínima dos compostos antifúngicos e agroquímicos em placa de microdiluição de 96 poços. A numeração de 2 a 11 indicam as concentrações, que podem variar de acordo com o agente antifúngico. Os números 1 e 12 representam, respectivamente, o controle de crescimento (CC) e o controle de esterilidade (CE).

Alíquotas de 100µL do inóculo foram distribuídas em cada poço da placa de microdiluição (CLSI, 2017). Por fim, as placas foram incubadas à 35 °C por 72 horas para posterior leitura e análise. O ensaio foi realizado em duplicata técnica.

#### 4.17.4 Leitura e interpretação da concentração inibitória mínima (CIM)

A leitura da CIM foi realizada pela observação visual, após 72 horas de incubação a 37 °C, comparando o controle de crescimento da levedura com o crescimento observado nos outros poços com as diferentes concentrações de antifúngicos (CLSI, 2017). Nesse contexto, a CIM foi determinada considerando-se as menores concentrações que inibiram 80% do crescimento fúngico para FCZ e 100% para AMB (CLSI, 2017).

## 4.18 ENSAIOS COM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMDMs)

### 4.18.1 Questões éticas

O protocolo de experimentação animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob o protocolo 306/2015 (Anexo 1).

### 4.18.2 Obtenção de BMDMs

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6. Os animais foram anestesiados e eutanasiados e os fêmures e tíbias cuidadosamente extraídos e adicionados a um tubo de 15 mL de polipropileno contendo PBS estéril e, posteriormente, deixados em etanol 70% por 1 minuto. Utilizando-se meio RPMI 1640 e uma seringa com agulha 0,70 x 25 mm, as células foram removidas e transferidas para um tubo de polipropileno estéril.

Para a diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e também com 30% de sobrenadante de cultura de células L-929. O sobrenadante de células L-929 contém quantidade significativa de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage-Colony Stimulating Factor*) que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras a macrófagos.

A suspensão de células foi colocada em placas de Petri e incubadas em estufas com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 7 dias, sendo o meio renovado a cada 48 horas. Ao sétimo dia em cultura, o sobrenadante foi descartado e a cultura de células na placa lavada com 5 mL de PBS estéril para eliminar as células não aderentes. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de PBS/EDTA 10mM à cultura na placa, seguido de incubação no gelo por 10 minutos.

As células aderidas à placa, já diferenciadas como macrófagos, foram ressuspensas e transferidas para um tubo de polipropileno estéril. Os BMDMs foram centrifugados a 200xg/5 min a 4°C e ressuspensos em 5 mL de meio RPMI 1640

contendo 10% SBF, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e 5% de sobrenadante de cultura de células L-929. As células viáveis foram contadas, usando Azul de Trypan, ajustadas ( $1 \times 10^5$  macrófagos/mL) plaqueadas em placas de 24 e 96 poços, de acordo com os objetivos propostos, seguido de incubação em estufa a 37 °C e atmosfera a 5% CO<sub>2</sub>. Após vinte e quatro horas, as células foram utilizadas para os ensaios (WEISCHENFELDT; PORSE, 2008).

#### **4.18.3 Ensaio de fagocitose**

O índice fagocítico foi determinado com base no número de células fagocitadas por 100 macrófagos (Cg/100Φ). Para tanto, na base das placas de 24 poços foram colocadas lamínulas circulares de 13mm (Perfecta) previamente a adesão dos macrófagos (PERFECT *et al.*, 2010).

Os macrófagos foram desafiados com Cg antes e após a passagem em Nb previamente cultivados em meio ASD por 48 horas a 37 °C. O inóculo fúngico foi preparado e ajustado para a concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL (1:1 de leveduras para macrófagos) e adicionadas à cultura de macrófagos. As culturas foram incubadas a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub> e, 3 e 24 horas após o desafio com a levedura, o sobrenadante da cultura foi removido e as células aderidas às lamínulas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin), conforme sugerido pelo fabricante, para visualização da fagocitose (RIBEIRO *et al.*, 2017).

#### **4.18.4 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

A quantidade endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi mensurada por um ensaio fluorimétrico, utilizando uma sonda específica (SOARES *et al.*, 2011). Após o desafio com as leveduras e nos tempos de 3 e 24 horas pós-desafio, a cultura foi incubada por 30 minutos a 37 °C com 20 nM de dihydrorhodamine 123 (DHR 123; Invitrogen, Life Technologies) para quantificação de ROS. Deste modo a fluorescência foi mensurada em um fluorômetro (Varioskan Flash, Thermo), usando comprimentos de onda de excitação de 485nm e emissão

de 530nm. Os ensaios foram realizados em sextuplicada. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência.

#### **4.18.5 Atividade fungicida**

Para investigar a capacidade fungicida de BMDM, os macrófagos foram desafiados com Cg antes e após a passagem em Nb e as leveduras internalizadas por BMDM foram quantificadas nos tempos de 3 e 24 horas após o desafio (MA *et al.*, 2009). Para tanto, leveduras não internalizadas, presentes no sobrenadante, foram removidas a partir da lavagem dos poços com 500  $\mu$ L de PBS estéril. Em seguida, os macrófagos foram lisados nos tempos pré-estabelecidos com 200  $\mu$ L de água destilada esterilizada, seguido de incubação por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, 50  $\mu$ L do lisado foi coletado e plaqueado em meio ASD para determinação do número de UFC.

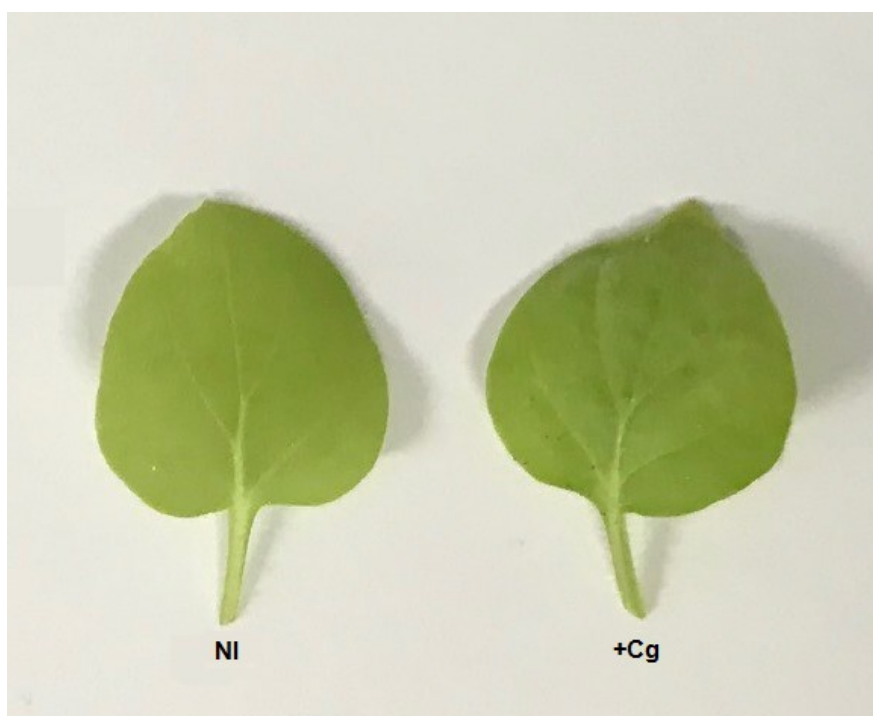
#### **4.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados foram analisados por meio do software Prism 5 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA) utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Para a análise do ergosterol e das enzimas urease e lacase foi utilizado o teste T. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITOS PATOLÓGICOS DA INOCULAÇÃO DE Cg NOS MODELOS VEGETAIS

Os três modelos vegetais testados não apresentaram alterações macroscópicas visíveis indicativas de patologia até o vigésimo oitavo dia após a inoculação da levedura: clorose, murcha, queda foliar, necrose, alteração na velocidade de crescimento (Figura 3). Mesmo após a injúria foliar gerada pelo método de inoculação, até o vigésimo oitavo dia a planta apresenta completa recuperação da membrana foliar.



**Figura 3.** Macroscopia foliar de folha de Nb infectada com  $10^5$  células de Cg L27/01 pelo método de escarificação e folha não infectada (NI).

### 5.2 SUSCEPTIBILIDADE DOS MODELOS VEGETAIS À INOCULAÇÃO DE Cg

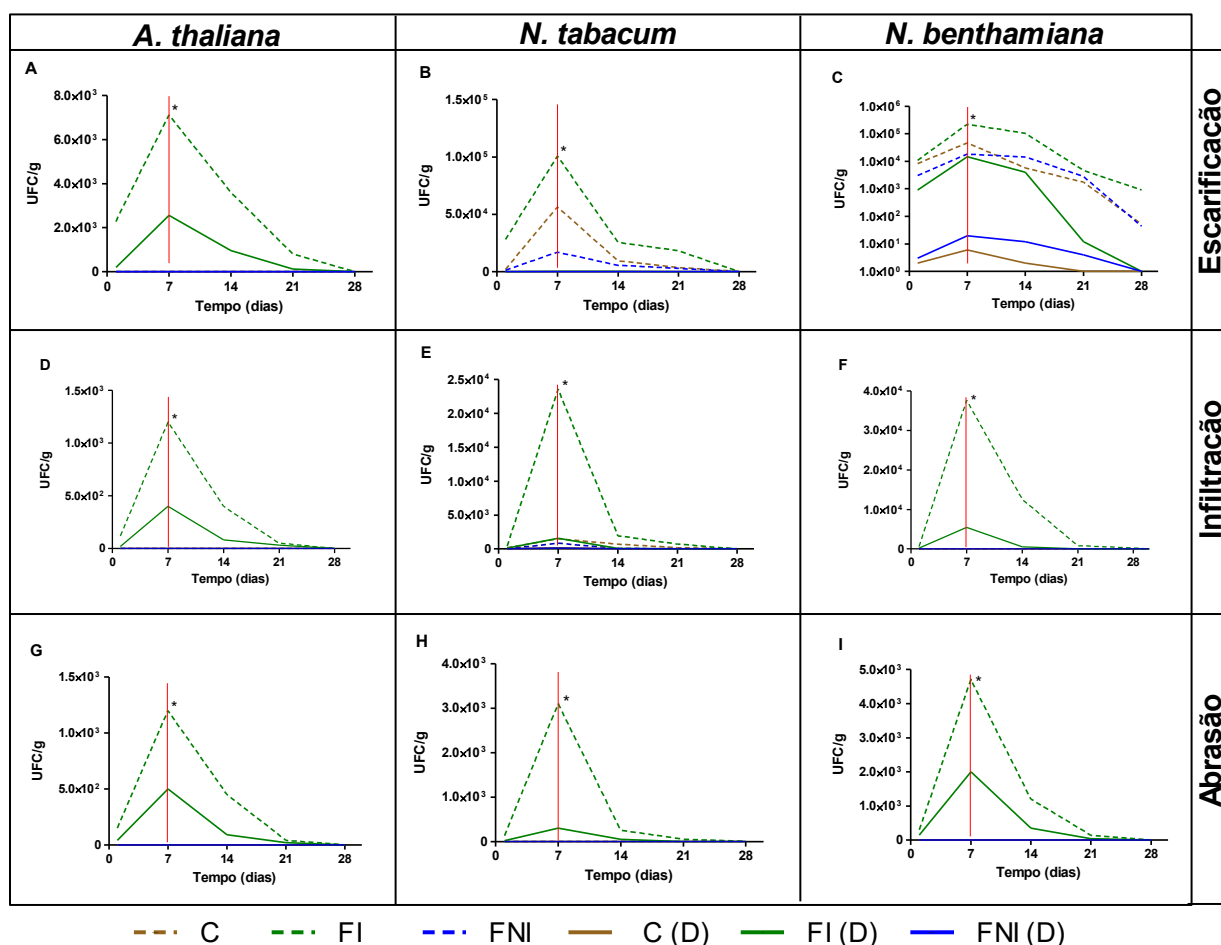
Para o sítio inicial da infecção, a carga fúngica recuperada na folha infectada foi significativamente maior em relação às demais partes da planta em todos os modelos vegetais utilizados (Figura 4), sugerindo que as células de Cg colonizam principalmente o local inicial da inoculação.

Com relação aos métodos de inoculação do fungo no tecido vegetal, nota-se elevada carga fúngica quando empregado a escarificação (Figuras 4.A-C). Além disso, foi verificada transmigração do fungo para o caule e folha não infectada em Nt e Nb (Figuras 4.B, 4.C e 4.E). Nos métodos de infiltração e abrasão, houve recuperação de carga fúngica apenas na folha infectada (Figura 4.D, 4.G e 4.H).

A carga fúngica recuperada no 7º dia após a infecção foi significativamente maior em todos os métodos empregados nos diferentes modelos vegetais (Figura 4). Após esse período, a carga fúngica decresce até 28 dias em todos os modelos de infecção testados.

A análise da recuperação de células leveduriformes de plantas descontaminadas e não descontaminadas demonstra o crescimento de colônias de leveduras na superfície de plantas não descontaminadas, sugerindo que Cg coloniza e prolifera internamente e externamente no tecido vegetal (Figura 4). A suplementação do meio ASD com cloranfenicol e cicloheximida reduziu o crescimento de contaminantes ambientais e/ou de outros microrganismos da microbiota do vegetal.

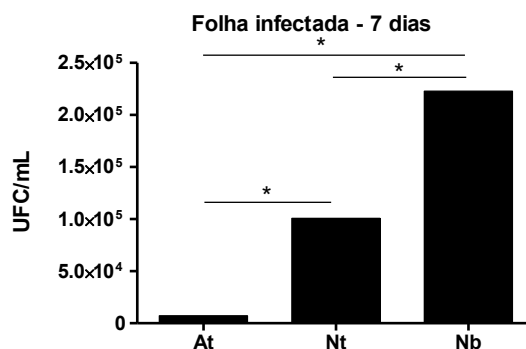




**Figura 4.** Cinética de eliminação de Cg L27/01 em folha infectada com  $10^5$  células pelos métodos de (A, B, C) escarificação, (D, E, F) infiltração e (G, H, I) abrasão para as espécies *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* (Nt). Após 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias foi realizada a recuperação da carga fúngica em folha infectada, folha não infectada e caule. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

C: caule; FI: folha infectada; FNI: folha não infectada; C (D): caule descontaminado; FI (D): folha infectada descontaminada; FNI (D): folha não infectada descontaminada.

A obtenção de células fúngicas em folhas infectadas de Nb não descontaminadas pelo método de escarificação apresentou-se significativamente maior quando comparado às diversas variáveis utilizadas neste ensaio (Figura 5). Por isso, optou-se por utilizar a escarificação como método de infecção vegetal e a recuperação de carga fúngica 7 dias pós-infecção para avaliar os parâmetros subsequentes.

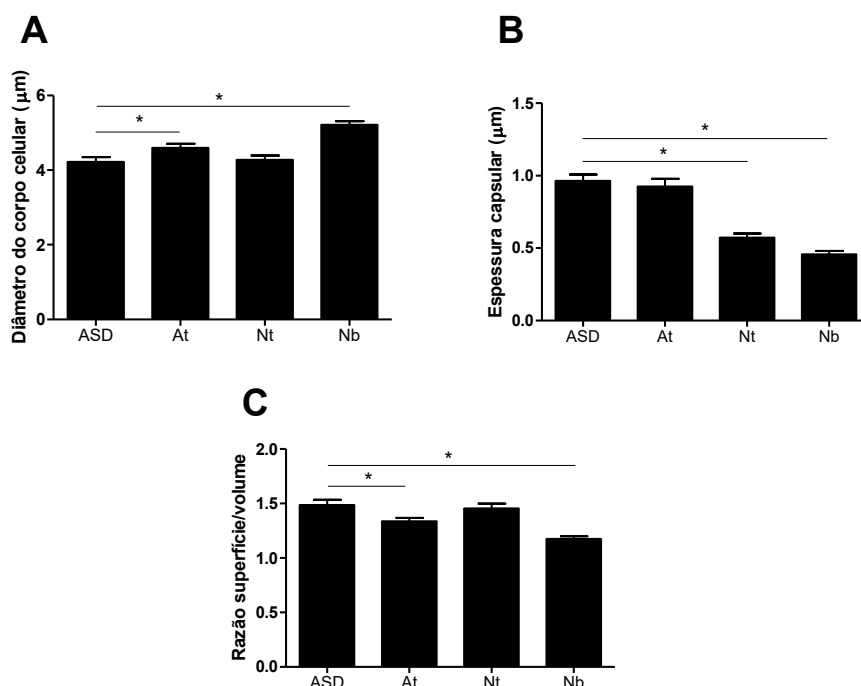


**Figura 5.** Carga fúngica recuperada após 7 dias de infecção em folha infectada com  $10^5$  células pelo método de escarificação para as espécies *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana benthamiana* (Nb) e *Nicotiana tabacum* (Nt). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 EFEITO DA INTERAÇÃO COM OS MODELOS VEGETAIS NA MORFOLOGIA E NO CONTEÚDO CAPSULAR DE Cg

Determinados os aspectos que foram modificados nos diferentes modelos vegetais após o contato com o fungo, buscou-se avaliar se a interação planta-fungo ocasionou em modificações no microrganismo.

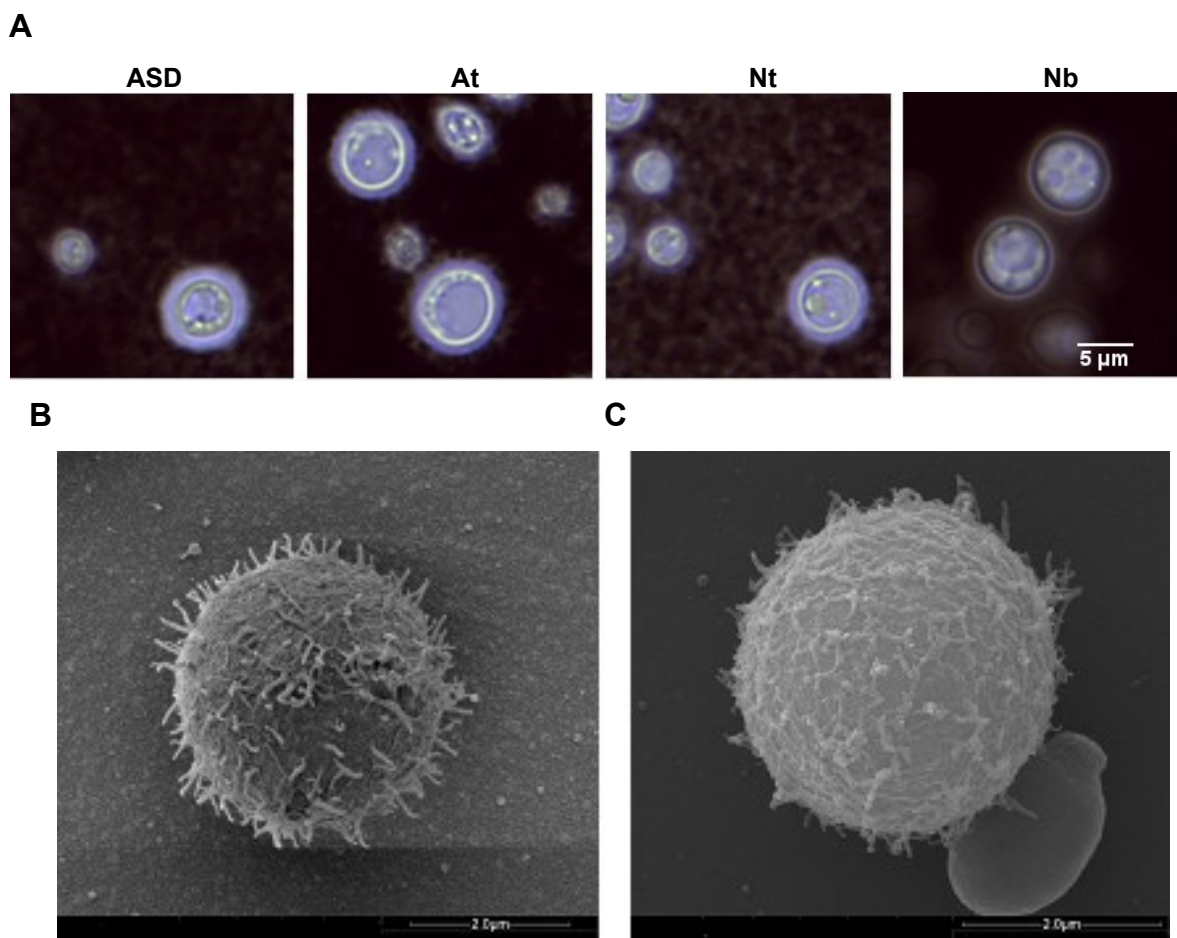
Em relação às alterações morfológicas, foi verificado aumento no diâmetro do corpo celular após passagem de Cg em At e Nb (Figura 6.A). A espessura capsular foi menor após passagem em Nt e Nb (Figura 6.B). Em contrapartida, houve diminuição da razão superfície/volume após passagem em At e Nb (Figura 6.C).



**Figura 6.** (A) Diâmetro do corpo celular, (B) espessura capsular e (C) razão superfície/volume da linhagem de Cg L27/01 antes (ASD) e após passagem em *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana tabacum* (Nt) e *Nicotiana benthamiana* (Nb). Os dados correspondem à média de cinquenta repetições  $\pm$  desvio padrão. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Além disso, as imagens de preparações das culturas fúngicas em tinta Nanquim demonstram a morfologia das células de Cg antes e após passagem em *A. thaliana*, *N. tabacum* e *N. benthamiana* (Figura 7). Por meio das imagens, é possível observar um aumento no diâmetro do corpo celular após interação com At e Nb. Além disso, houve uma redução da espessura da cápsula, sendo mais acentuada para Cg após passagem em Nt e Nb (Figura 7).

Conforme observado nos parâmetros analisados para morfometria, as linhagens Cg antes e após passagem em Nb foram selecionadas para observação ao microscópio eletrônico de varredura. As micrografias demonstram modificações associadas ao polissacarídeo capsular que, visualmente, apresenta-se em quantidade e tamanho reduzido quando comparado a Cg antes da passagem em Nb (Figuras 7.B-C).



**Figura 7.** Preparação de nanquim da linhagem Cg L27/01 (ASD) (A) antes e após passagem em *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana tabacum* (Nt) e *Nicotiana benthamiana* (Nb). Microscopia eletrônica de varredura para a linhagem de Cg L27/01 (B) antes e (C) após passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb).

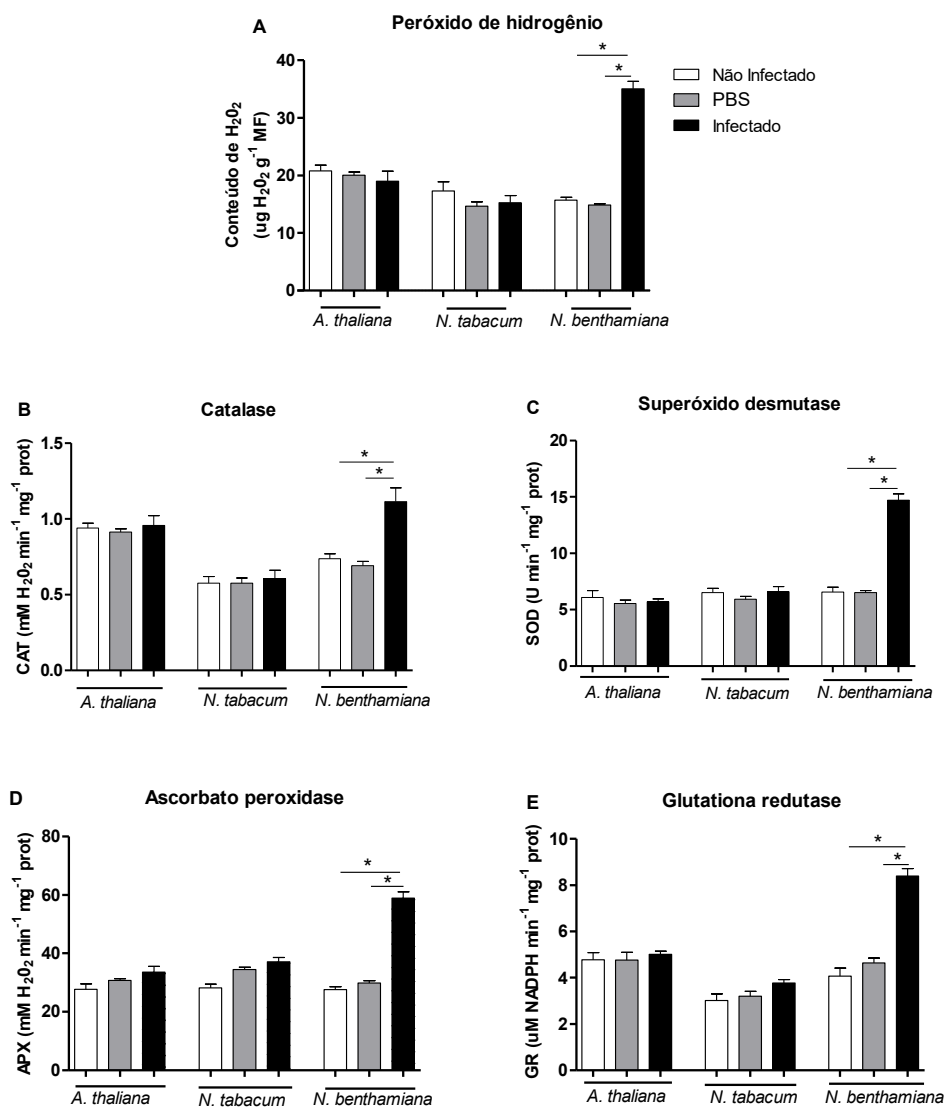
#### 5.4 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE Cg NO METABOLISMO ANTIOXIDANTE DOS MODELOS VEGETAIS

O metabolismo oxidante foi determinado por meio da avaliação do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da atividade das enzimas CAT, SOD, APX, GR e da peroxidação lipídica de folhas de At, Nb e Nt não inoculadas, inoculadas com Cg e com PBS.

Para At e Nt, não houve diferença no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e na atividade das enzimas CAT, SOD, APX e GR (Figura 8). Em contrapartida, houve maior conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em Nb infectada com Cg por 7 dias (Figura 8.A). Além disso, a produção de enzimas do sistema antioxidante (CAT, SOD, APX e GR) de Nb foi elevada após 7 dias de infecção com Cg (Figuras 4.B-E). Em relação a peroxidação lipídica, as diferentes linhagens exibiram um baixo nível de peroxidação, de forma que não

havia diferença entre a peroxidação antes e após a passagem nos modelos vegetais (dados não apresentados).

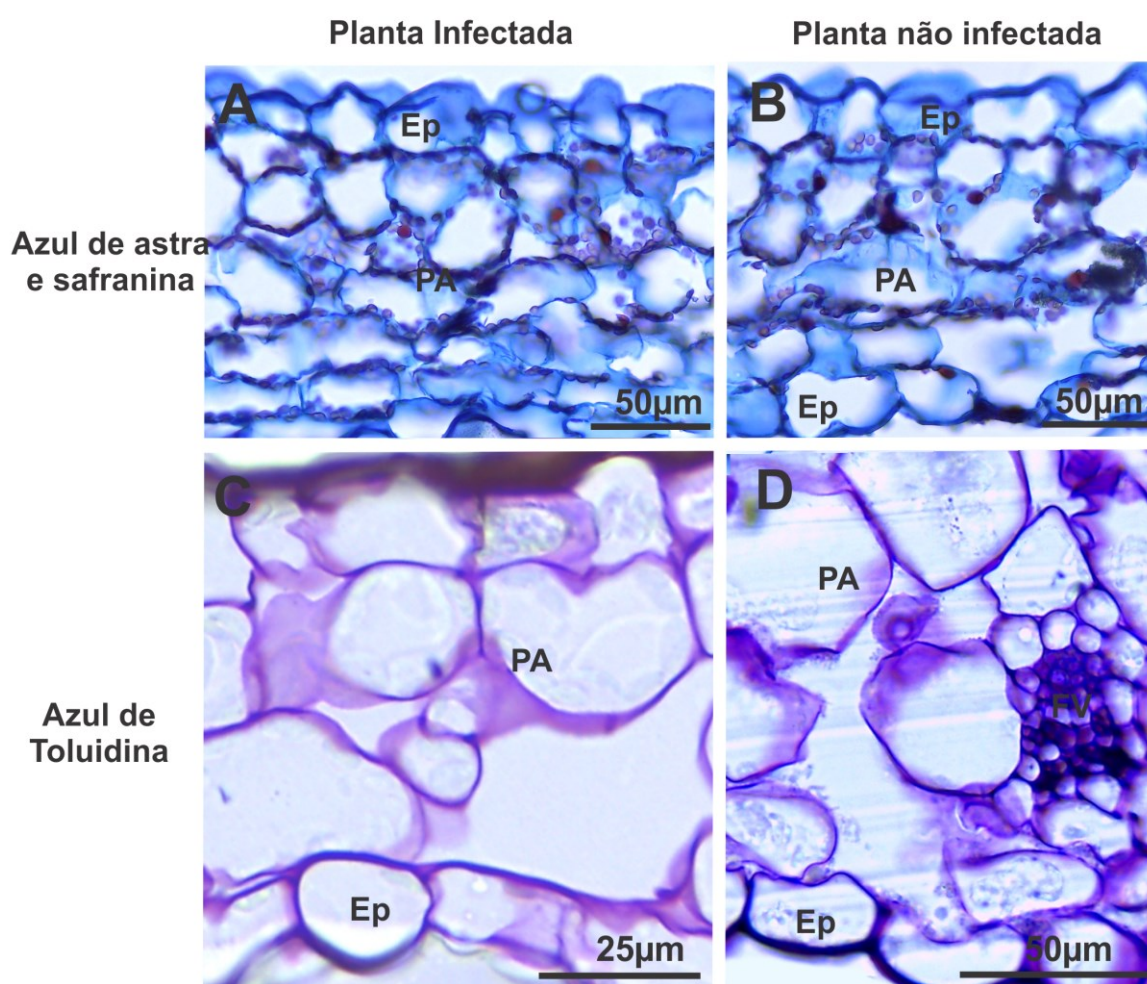
A partir destes resultados, optou-se por conzudir os ensaios subsequentes avaliando a infecção de Cg apenas em Nb e realizando a recuperação de carga fúngica 7 dias pós-infecção.



**Figura 8.** Conteúdo de (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e atividade das enzimas (B) catalase (CAT), (C) superóxido dismutase (SOD), (D) ascorbato peroxidase (APX) e (E) glutaciona redutase (GR) nas folhas das espécies *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum* não infectadas, infectadas com PBS ou com 10<sup>5</sup> células de Cg L27/01 após 7 dias. Dados correspondem à média de cinco repetições ± desvio padrão. \* indica diferença significativa (p < 0,05).

## 5.5 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE Cg NA ESTRUTURA E NO METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO DE Nb

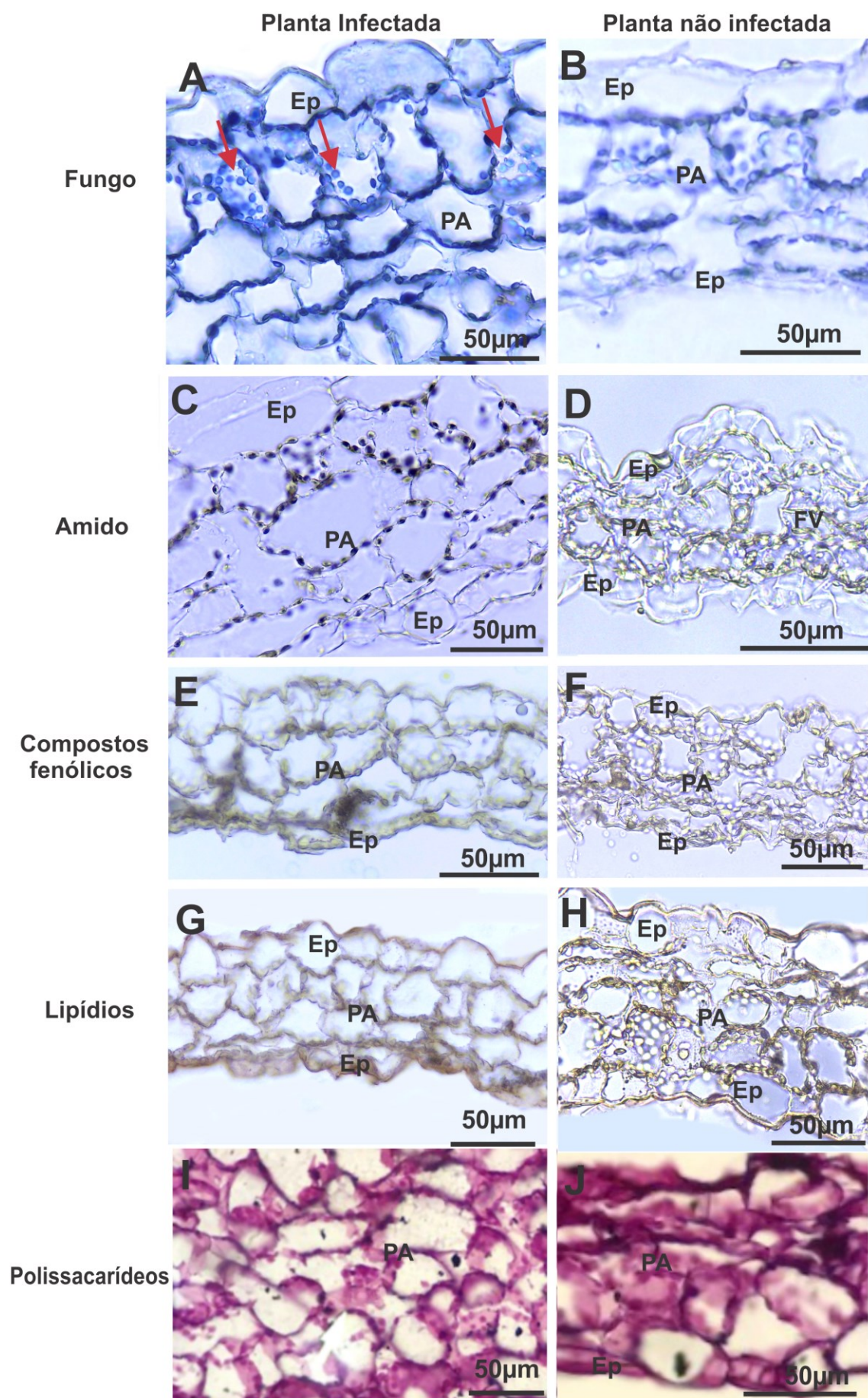
A avaliação da ocorrência de alterações microscópicas no sítio de inoculação indica que a coloração com azul de toluidina e Azul de astra e Safranina foram as melhores para observação da estrutura anatômica da folha (Figura 9); As imagens demonstram que a presença de Cg 7 dias pós inoculação não altera a arquitetura celular do tecido quando comparada a estrutura microscópica da folha não infectada.



**Figura 9.** Análise histológica de cortes de folhas de *Nicotiana benthamiana* (A,C) infectadas com  $10^5$  células de Cg L27/01 pelo método de escarificação por 7 dias e (B,D) folhas não infectadas para avaliação da estrutura vegetal. Ep. Epiderme, PA: parênquima, FV: feixe vascular.

Através da coloração com azul de algodão foi possível identificar a localização intracelular do microrganismo no parênquima foliar (Figura 10A-B). Ainda, utilizando testes histoquímicos específicos para detecção de amido (Figura 10.A-B), compostos fenólicos (Figura 10.C-D), lipídeos (Figura 10.G-H) e polissacarídeos, não foi possível observar alteração qualitativa visível no conteúdo destes componentes da célula vegetal do grupo infectado com Cg, quando comparado ao grupo não infectado.







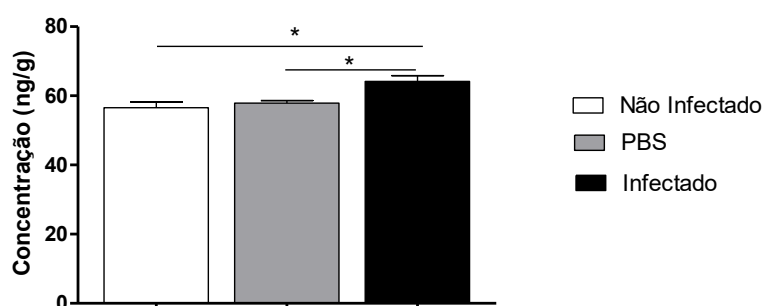
**Figura 10.** Análises histoquímicas em cortes de folhas de *Nicotiana benthamiana* infectadas com  $10^5$  células de Cg L27/01 pelo método de escarificação por 7 dias (A,C,E,G,I) e folhas não infectadas (B,D,FH,J). Os fungos estão apontados pelas setas vermelhas. Colorações: (A-B) Azul de algodão, (C-D) Lugol; (E-F) Compostos fenólicos; (G-H) Sudan RedB, (I,J) PAS. Ep. Epiderme, PA: parênquima, FV: feixe vascular.

## 5.6 EFEITO DA INTERAÇÃO DE Cg NA PRODUÇÃO DE IAA POR Nb

Estabelecidos os parâmetros de validação por meio da diluição da amostra padrão (Tabela 2), foi possível detectar a produção do hormônio vegetal ácido 3-indolacético (IAA) em Nb inoculadas com PBS e com Cg (Figura 11.A). Além disso, a inoculação de Cg por Nb resultou na maior produção de IAA quando comparada ao grupo de plantas não infectadas com Cg ou inoculadas com PBS (Figura 11.B).

**Tabela 2.** Parâmetros de validação.

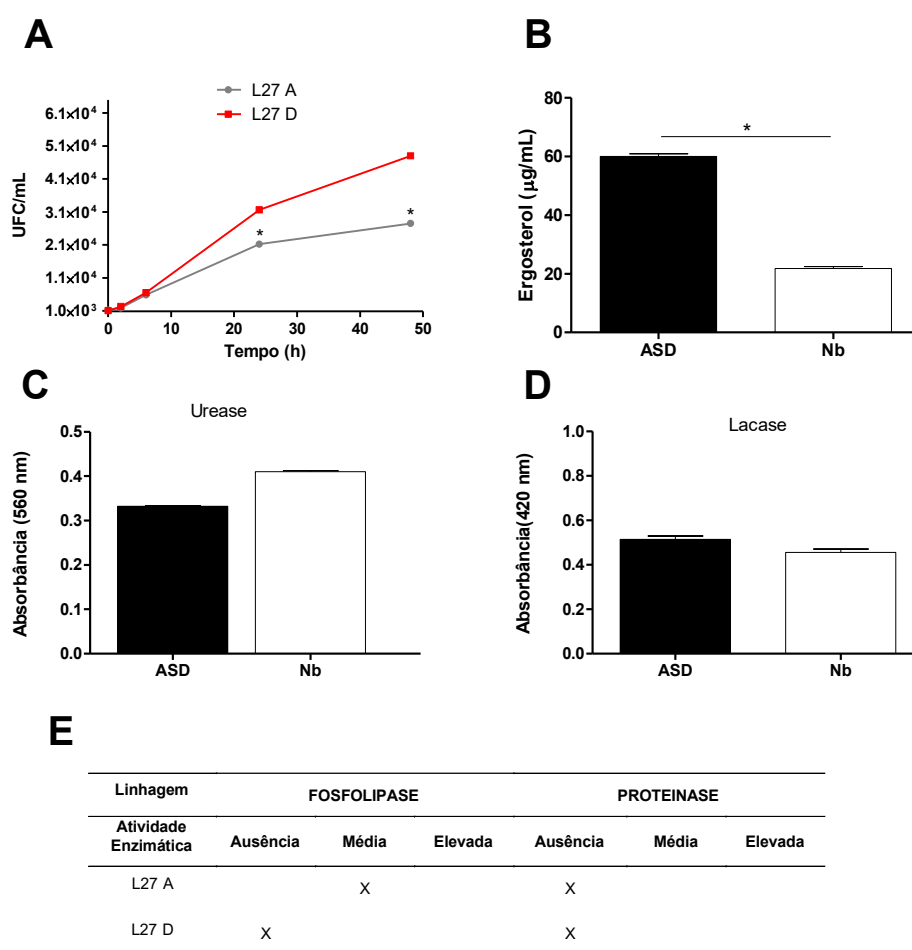
Parâmetro	Resultado
	<b>IAA</b>
Faixa de linearidade, ng/mL	40-200
Coeficiente de correlação	0,9991
Equação	$y = 184073 x + 130286$
Recuperação, %	$98,0 \pm 1,5$



**Figura 11.** (A) Detecção e (B) quantificação da concentração de ácido indolilacético (IAA) em folhas de *Nicotiana benthamiana* (Nb) não infectadas, infectadas com PBS ou  $10^5$  células de Cg L27/01 após 7 dias de infecção. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

## 5.7 EFEITO DA INTERAÇÃO COM Nb NA TAXA DE CRESCIMENTO, CONTEÚDO DE ERGOSTEROL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE Cg

A levedura, após passagem em Nb, apresenta maior crescimento quando comparado ao controle (Figura 12.A). Em contrapartida, houve redução no conteúdo de ergosterol de Cg (Figura 12.B). No que diz respeito ao perfil enzimático de Cg após passagem em Nb, houve redução da atividade enzimática da fosfolipase fúngica (Figura 12.E).



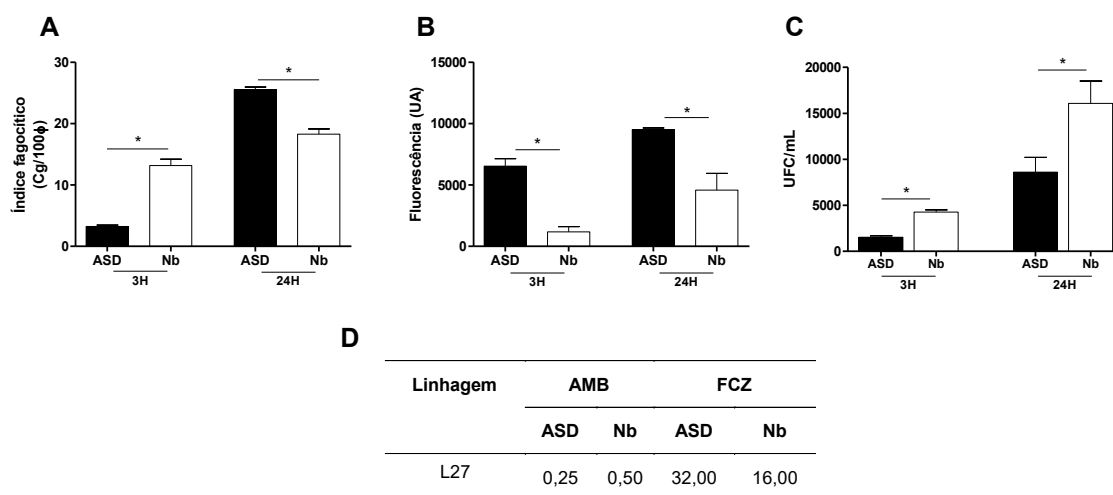
**Figura 12.** (A) Taxa de crescimento, (B) conteúdo de ergosterol e atividade enzimática das enzimas (C) urease, (D) lacase, (E) fosfolipase e proteinase antes (L27 A) e após (L27 D) a passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

## 5.8 EFEITO DA INTERAÇÃO COM Nb NO PERFIL DE SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR, NA PRODUÇÃO DE ROS POR BMDM E NA SUSCEPTIBILIDADE DE Cg A ANTIFÚNGICOS

No intuito de avaliar se as alterações sofridas por Cg após a passagem em Nb modificam sua interação com fagócitos murinos e sua susceptibilidade a antifúngicos clínicos, realizou-se um ensaio de fagocitose e um teste de susceptibilidade frente a AMB e FCZ.

O índice fagocítico de Cg após passagem em Nb é elevado no tempo de 3 horas, mas há uma diminuição neste índice no tempo de 24 horas após o desafio com BMDM (Figura 13.A). A produção de ROS é diminuída para a Cg após passagem em Nb em ambos os tempos (Figura 13.B). Em contrapartida, há uma maior recuperação de Cg após passagem em Nb em ambos os tempos (Figura 13.C).

A CIM, por sua vez, foi aumentada para AMB e reduzida para FCZ, indicando uma alteração discreta no perfil de susceptibilidade de Cg após passagem em Nb (Figura 13.D).



**Figura 13.** (A) Índice fagocítico de Cg antes (ASD) e após passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb) por BMDM 3 e 24 horas após o desafio. (B) Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e (C) recuperação de carga fúngica de BMDM nos tempos de 3 e 24 horas pós-desafio. (D) Valores de concentração inibitória mínima (CIM; µg/mL) dos antifúngicos anfotericina B (AMB) e fluconazol (FCZ). A taxa de proliferação intracelular é a razão do número de células intracelulares do tempo de 24 horas sobre o tempo de 3 horas. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

*Cryptococcus* pode ser encontrado em uma variedade de nichos ambientais como o solo, protozoários de vida livre, matéria vegetal em decomposição, excremento de aves e dezenas de espécies vegetais (XUE *et al.*, 2007; SPRINGER *et al.*, 2010; SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017).

Diante da ocorrência ambiental de *Cryptococcus* em diversas espécies de plantas e da relevância que a criptococose assume no panorama de saúde pública mundial, buscou-se desenvolver um modelo vegetal para estudar a interação *Cryptococcus*-planta a fim de auxiliar no entendimento dos resultados que essa interação pode acarretar para o hospedeiro vegetal e, sobretudo, para o microrganismo.

É bem estabelecido que *C. neoformans* e *C. gattii* podem interagir com espécies vegetais como *Arabidopsis thaliana*, *Eucalyptus* sp., *Pseudotsuga menziesii*, *Tsuga heterophylla*, *Colophospermum mopane* (XUE *et al.*, 2007; SPRINGER *et al.*, 2010; SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017). No presente estudo, foi avaliada a ocorrência da interação de *Cryptococcus gatti* L27/01 (Cg) e as espécies de planta *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana benthamiana*.

A interação entre Cg e *A. thaliana*, *N. tabacum* e *N. benthamiana* ocorre, de modo que a presença do fungo nos diferentes modelos, independentemente do método de inoculação utilizado, não acarretou alterações patológicas nas plantas. Ao contrário do que foi observado, estudos anteriores demonstraram que *Cryptococcus* é capaz de causar alterações patológicas em *Arabidopsis thaliana*, *Pseudotsuga menziesii*, *Tsuga heterophylla* e *Colophospermum mopane* (WARPEHA; PARK; WILLIAMSON, 2013; SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017). É provável que as alterações sejam decorrentes da concentração do inóculo fúngico utilizado ( $10^5$  UFC), visto que as alterações foram observadas em estudos que utilizaram inóculos com elevadas concentrações (acima de  $10^6$  UFC/sítio de inoculação). A opção por um inóculo menor se justifica diante do fato de que *Cryptococcus* está presente no ambiente em menores concentrações (FIRACATIVE *et al.*, 2011; COGLIATI *et al.*, 2016).

Cg foi capaz de colonizar e se replicar nos diferentes modelos vegetais. Estudos anteriores demonstraram que *Cryptococcus* é capaz de colonizar e

sobreviver em algumas espécies vegetais (SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017) por até 100 dias pós-inoculação (CASTAÑEDA; CASTAÑEDA, 2001). Entretanto, em ambos os casos, as plantas foram inoculadas com  $10^7$  ou  $10^6$  UFC. Neste caso, é possível que a concentração do inóculo também esteja associada a redução da carga fúngica com o decorrer do tempo e a incapacidade de Cg em sobreviver nos três modelos vegetais por um período prolongado.

No que diz respeito a planta, a interação Cg-planta não resultou em mudanças qualitativas no padrão histológico com a infecção do fungo nos dois tipos de coloração usuais em anatomia vegetal. O mesmo ocorreu para as análises de histoquímica nas detecções de amido, lipídios e compostos fenólicos para *A. thaliana*, *N. tabacum* e *N. benthamiana*. Além disso, a infecção com Cg também não acarretou alterações no conteúdo das enzimas do sistema antioxidante de *A. thaliana*, *N. tabacum*. Em contrapartida, a infecção de Cg em *N. benthamiana* ocasionou em aumento da produção de diferentes enzimas do sistema antioxidante vegetal.

A infecção de plantas por fungos patogênicos induz a resposta vegetal cujo principal objetivo é controlar a multiplicação e proliferação do microrganismo (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; CHUNG, 2012). O estresse oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes da planta estão envolvidos na eliminação direta de potenciais patógenos e na sinalização de vias de transdução de sinal de resposta a patógenos (NEIL; DESIKAN; HANCOCK, 2002; VEAL; DAY; MORGAN, 2007). Além disso, linhagens com maior capacidade de proliferação induzem a uma resposta mais exacerbada em modelo murino de criptococose (SANTOS et al., 2014). Portanto, é provável que o aumento do conteúdo de ROS e da atividade das enzimas do sistema antioxidante em Nb esteja associado a maior capacidade de proliferação de Cg neste modelo vegetal.

A observação de que Cg não causou alterações patológicas nos três modelos vegetais e o fato de que o fungo é capaz de se replicar nas plantas, reforçam a ideia de que as plantas podem fornecer um nicho ambiental único para que o fungo complete seu ciclo replicativo na natureza. Entretanto, a elevada carga fúngica recuperada no modelo de *N. benthamiana* pelo método de escarificação e as alterações observadas no sistema antioxidante da planta justificam a escolha pelo método de inoculação por escarificação em *N. benthamiana* como modelo adequado para avaliação de outros fatores envolvidos na interação *C. gattii*-planta.

A inoculação de Cg em *N. benthamiana* resultou em uma maior produção do ácido indolilacético (IAA). Na planta, o principal efeito da auxina é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas (FERRARI; SABINO; SHIOMI, 2018). Para o fungo, este fitohormônio é responsável por estimular a filamentação de *C. neoformans* e o *mating type* de *C. gattii*, o que reforça o papel que as espécies vegetais assumem no ciclo replicativo de *Cryptococcus*. Além disso, o envolvimento de IAA no *mating type* de *C. gattii* pode justificar a sua elevada frequência de isolamento de espécies vegetais quando comparado a *C. neoformans* (XUE *et al.*, 2007).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a interação de *C. gattii*s com hormônios vegetais como IAA e giberelina podem alterar a morfologia e susceptibilidade da levedura a antifúngicos clínicos. Além disso, diferentes linhagens de *C. gattii* crescidas na presença dos hormônios demonstraram modificações na interação com amebas de vida livre e em modelo invertebrado (*Caenorhabditis elegans*) (CARVALHO, 2016). Para *C. gattii* L27/01, Carvalho (2016) observou que o crescimento na presença de IAA influencia na morfologia da levedura, resultando em aumento da razão superfície/volume e diminuição da espessura capsular.

A interação de Cg com *N. benthamiana* acarretou alterações morfológicas da levedura. Sobretudo, após a passagem em *N. benthamiana*, Cg exibiu uma redução da cápsula em termos de quantidade e espessura. Considerada um importante fator de virulência de *Cryptococcus*, a cápsula polissacarídica é passível de modificações em suas dimensões que variam de acordo com as condições ambientais (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2014). Entretanto, é reconhecido que o aumento da cápsula está relacionado ao aumento da virulência da levedura (ZARAGOZA *et al.*, 2008) e mudanças na sua interação com células fagocíticas (OKAGAKI *et al.*, 2010).

A produção de fibrilas extracelulares é um fator determinante para a colonização de folhas de *A. thaliana* por *C. gattii* (GARCIA-RIVERA *et al.*, 2004). Este fato ocorre não somente para *A. thaliana*, uma vez diversidade leveduras basidiomicéticas, como *C. gattii*, tem capacidade de colonizar folhas de diferentes espécies vegetais (INÁCIO *et al.*, 2005).

No presente estudo, a redução da cápsula de Cg após passagem em *N. benthamiana* pode justificar, pelo menos em parte, a diminuição da carga fúngica

observada no modelo vegetal com o decorrer do tempo, reforçando a dificuldade do fungo em sobreviver na planta por períodos prolongados.

Comparações entre Cg antes e após interação com *N. benthamiana* demonstraram outras modificações no fungo. Além de haver redução no conteúdo de ergosterol após passagem pelo modelo vegetal, a linhagem de Cg que passou por *N. benthamiana* exibiu maior taxa de crescimento. A maior taxa de crescimento pode estar associada a redução da cápsula polissacarídica da linhagem, visto que a síntese da cápsula tem um alto custo energético para a célula, o que pode retardar o crescimento fúngico (MAXSON *et al.*, 2007). Em contrapartida, a redução da razão superfície/volume em Cg observada após interação com Nb pode ter influenciado na sobrevivência do fungo em modelo vegetal, uma vez que células com baixa razão superfície/volume apresentam menor taxa de troca de nutrientes, o que dificulta seu processo de adaptação em condições ambientais (MAXSON *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao perfil enzimático de Cg após interação com *N. benthamiana*, não houve alteração no conteúdo de enzimas como urease, proteinase e lacase. A produção da enzima lacase é um importante fator de virulência para *Cryptococcus* (SPRINGER, 2009), pois está associada a maior capacidade de melanização do fungo que, por sua vez, aumenta a viabilidade do microrganismo frente a exposição à radiação, resultando em maior possibilidade de colonização e infecção do modelo vegetal. Além disso, a melanização está associada a maior resistência frente ao estresse oxidativo gerado por diversos organismos (DADACHOVA; CASADEVALL, 2008).

Um dos mecanismos protetivos de *A. thaliana* frente a diversos uma variedade de patógenos é a exposição à radiação solar (JEONG; KACHROO; KACHROO, 2010). Portanto, apesar da produção de lacase não ser fator determinante para a colonização de *A. thaliana* por *C. neoformans* (SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017), o aumento do conteúdo desta enzima está relacionado a maior sobrevivência do fungo em *A. thaliana*.

Macrófagos derivados de medula óssea também foram desafiados com as linhagens de Cg antes e após interação com *N. benthamiana* no intuito de compreender se a inoculação em modelo vegetal acarreta alterações na interação do fungo com fagócitos murinos. A menor taxa de fagocitose e menor atividade fungicida dos macrófagos frente a linhagem que passou por *N. benthamiana* pode

estar associada a redução das fibrilas extracelulares da cápsula polissacarídica (SPRINGER *et al.*, 2010).

Em conjunto, estes dados demonstram a ocorrência da interação de Cg com *A. thaliana*, *N. tabacum* e *N. benthamiana*. Sobretudo, fica estabelecido que a interação Cg com *N. benthamiana* pode resultar em alterações no modelo vegetal e no microrganismo, reforçando o papel que o ambiente e os modelos vegetais têm na plasticidade fenotípica de *Cryptococcus* (SCHULZ; BOYLE, 2005; WARPEHA; PARK; WILLIAMSON, 2013).

Além disso, foi observado que, independentemente da espécie vegetal utilizada, a colonização e sobrevivência do fungo são influenciadas por uma série de componentes, como o modelo vegetal, a linhagem de *Cryptococcus* utilizada e o método de inoculação do fungo (XUE *et al.*, 2007; SPRINGER, 2009; SPRINGER *et al.*, 2010). Soma-se a esse cenário o fato de que as espécies vegetais, por si só, já estão submetidas a sazonalidade de outros fatores como temperatura, índice pluviométrico, regime de ventos e fauna local (COGLIATI *et al.*, 2016).

De fato, diversos autores relatam a variação fenotípica observada entre diferentes linhagens de *Cryptococcus* (BEALE *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015). Em muitos casos, linhagens diferentes estão associadas a distintos perfis de virulência e alta diversidade patogênica, mesmo entre isolados de *C. gattii* que pertencem ao mesmo sorotipo. Sobretudo, essa plasticidade fenotípica reforça a necessidade de compreender como ocorre a interação entre *Cryptococcus* e as espécies vegetais, enquanto nicho ambiental do fungo.



## 7 CONCLUSÃO

*Cryptococcus gattii* L27/01 interage com os modelos vegetais de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum*, sendo capaz de colonizar e se replicar nas folhas infectadas por até 28 dias. A inoculação de Cg não acarreta alterações patológicas e mudanças no metabolismo primário e secundário dos modelos vegetais. Em contrapartida, a interação com os modelos acarretam modificações no fungo relacionadas a morfofisiologia, ao perfil enzimático, a susceptibilidade a antifúngicos e a interação com fagócitos murinos.

## **CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE LINHAGENS DE *Cryptococcus* RESISTENTES A AGROQUÍMICOS NA INTERAÇÃO EM MODELO VEGETAL DE *Nicotiana benthamiana***

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a cinética de eliminação, em *N. benthamiana*, de linhagens de *Cryptococcus* adaptadas em agroquímicos;
- Verificar alterações morfológicas em linhagens de *Cryptococcus* adaptadas e recuperadas de *N. benthamiana*;
- Verificar taxa de crescimento em linhagens de *Cryptococcus* adaptadas e recuperadas de *N. benthamiana*;
- Avaliar a atividade enzimática de fosfolipase, proteinase, urease e lacase em linhagens de *Cryptococcus* adaptadas e recuperadas de *N. benthamiana*;
- Avaliar a susceptibilidade a antifúngicos de linhagens de *Cryptococcus* adaptadas a agroquímicos recuperadas de *N. benthamiana*;
- Quantificar o ergosterol em linhagens de *Cryptococcus* adaptadas e recuperadas de *N. benthamiana*;
- Avaliar o efeito da passagem por *N. benthamiana* na sobrevivência de *Tenebrio molitor* infectados com *C. neoformans* ou *C. gattii*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.20 MANUTENÇÃO E CULTIVO DE *Cryptococcus* spp.

Foram utilizadas linhagens fúngicas de *Cryptococcus gattii* (Cg) e *C. neoformans* (Cn) clínicas (NA), expostas a agroquímicos ambientais (A) e expostas a agroquímicos ambientais e subcultivadas por 10 passagens na ausência destes agroquímicos (10p) (Tabela 3). Todas as linhagens utilizadas pertencem à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia do ICB/UFMG. O processo de seleção de linhagens com perfil de menor susceptibilidade aos agroquímicos (A) e após 10 passagens na ausência destes compostos (10p) foi realizado por Bastos *et al.* (2018).

A proposta de utilizar as linhagens expostas a agroquímicos ambientais e comparar os resultados com as respectivas linhagens que não foram expostas a estes compostos, é avaliar o papel que o contato prévio com o agroquímico tem no perfil de interação *Cryptococcus*-planta. Sobretudo, a perspectiva é mimetizar com maior fidelidade um evento que aconteceria na natureza: a exposição de *Cryptococcus* aos agroquímicos e sua concomitante interação com uma espécie vegetal.

**Tabela 3.** Relação das linhagens de *Cryptococcus gattii* e de *C. neoformans* que foram utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Origem	Cultivo	Agroquímico
<b>Cg</b>			
R265	Clínica	30°C	-
R265 10p PCT	Lab.Mic.	30°C	PCT (BASTOS <i>et al.</i> , 2018)
<b>Cn</b>			
H99	Clínica	30°C	-
H99 10p TBZ	Lab.Mic.	30°C	TBZ (BASTOS <i>et al.</i> , 2018)
H99 A TBZ	Lab.Mic.	30°C	TBZ (BASTOS <i>et al.</i> , 2018)
H99 10p PCT	Lab.Mic.	30°C	PCT (BASTOS <i>et al.</i> , 2018)
H99 A PCT	Lab.Mic.	30°C	PCT (BASTOS <i>et al.</i> , 2018)

Cg: *Cryptococcus gattii*, Cn: *Cryptococcus neoformans*; PCT: Piraclostrobina; TBZ: Tebuconazol; Lab. Mic.: Laboratório de Micologia.

Para manutenção e cultivo das linhagens, as amostras foram mantidas em freezer -80 °C. As linhagens NA e 10p foram repicadas em meio ASD; enquanto as linhagens A foram repicadas em ASD suplementado com os agroquímicos PCT (COMET; 256 µg/ml) ou TBZ (Alterne; 2 µg/ml), seguido de incubação por 48 horas a 30 °C (BASTOS *et al.*, 2018). Previamente a todos os ensaios, as diferentes linhagens foram subcultivadas em suas respectivas condições.

#### 4.21 MODELO VEGETAL, PREPARO DO INÓCULO E MÉTODO DE INOCULAÇÃO

Nesta etapa, foram utilizadas apenas plantas da espécie *Nicotiana benthamiana* (Nb), previamente cultivadas conforme descrito no item 4.2. O inóculo das diferentes linhagens foi preparado e ajustado a concentração de 10<sup>5</sup> células/mL (item 4.3). Em seguida, o modelo vegetal foi inoculado com 1 µL da suspensão de Cg ou Cn por meio do método de escarificação (MICHEREFF, 2001).

#### 4.22 DETERMINAÇÃO DA CARGA FÚNGICA

Para determinação da cinética de eliminação fúngica, as plantas foram apenas lavadas em PBS (BULGARI *et al.*, 2009) e as folhas infectadas foram trituradas em PBS após 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias de infecção. O conteúdo triturado foi semeado em ASD suplementado com cloranfenicol 0,001% e cicloheximida 0,001%, seguido de incubação a 30 °C por 48 horas. Após incubação, foi determinado o número de UFC/g para cada linhagem.

#### 4.23 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MeV)

Para entender como a adaptação interfere na morfologia fúngica durante a interação com a planta, as diferentes linhagens (NA, A e 10p) foram avaliadas antes e após a passagem em Nb para mensuração de corpo celular e cápsula (FERREIRA *et al.*, 2015). Conforme metodologia descrita no item 4.11, foram determinados os parâmetros diâmetro do corpo celular, espessura da cápsula e razão superfície/volume. Além disso, as diferentes linhagens foram preparadas (item 4.12) e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (VAN DUIN *et al.*, 2004).

#### 4.24 TAXA DE CRESCIMENTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONTEÚDO DE ERGOSTEROL

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações ocasionadas na interação planta-fungo, a taxa de crescimento das diferentes linhagens antes e após a passagem em Nb foi determinada conforme descrito no item 4.14. Além disso, foi quantificada a atividade enzimática de fosfolipase, proteinase (PRICE *et al.*, 1982), urease (KWON-CHUNG *et al.*, 1978; ROBERTS *et al.*, 1978) e lacase (MARTINEZ *et al.*, 2007) segundo metodologia estabelecida no item 4.15.

O conteúdo de ergosterol das linhagens antes e após a passagem em Nb foi quantificado por meio método descrito por Santos *et al.* (2012) (item 4.16).

#### 4.25 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

No intuito de compreender se a passagem pelo modelo vegetal interfere no perfil de susceptibilidade de *Cryptococcus* frente aos antifúngicos clínicos AMB e FCZ e aos agroquímicos PCT e TBZ, a susceptibilidade das diferentes linhagens antes e após a passagem em Nb foi avaliada por meio da determinação da CIM, conforme documento M27-A3 do método de microdiluição em caldo proposto pelo CLSI (CLSI, 2017).

Soluções estoque foram preparadas na concentração de 5000 µg/ml. FCZ, TBZ e PCT foram solubilizados em água (CLSI, 2017; BASTOS *et al.*, 2018) e AMB em DMSO (CLSI, 2017). Em seguida, as soluções estoque foram diluídas em RPMI 1640 até alcançar concentrações que variaram entre antifúngicos que variaram entre 256,00 a 0,50 µg/mL para FCZ; entre 8,00 a 0,01 µg/mL para AMB; e entre 32,00 a 0,06 µg/mL para TBZ e PCT. Em seguida, alíquotas de 100µL de cada concentração foram distribuídas nos poços da placa de microdiluição.

Os inóculos das diferentes linhagens antes e após a passagem em Nb foram preparados, ajustados e alíquotas de 100µL do inóculo foram distribuídas em cada poço da placa de microdiluição. Cada placa continha ainda, um controle de esterilidade (CE) e de crescimento (CC) (item 4.17).

A leitura da CIM foi realizada pela observação visual, após 72 horas de incubação a 30 °C, comparando o controle de crescimento da levedura com o

crescimento observado nos outros poços com as diferentes concentrações de antifúngicos. Nesse contexto, a CIM foi determinada considerando-se as menores concentrações que inibiram 80% do crescimento fúngico para FCZ; PCT e TBZ (CLSI, 2017; BASTOS *et al.*, 2018); e 100% para AMB (CLSI, 2017).

#### 4.26 ENSAIO DE SOBREVIDA EM MODELO INVERTEBRADO

A virulência das diferentes linhagens de *Cryptococcus* antes e após a interação em Nb foi testada em modelo invertebrado *Tenebrio molitor* conforme descrito por Lima (2019). As larvas de *Tenebrio molitor* foram adquiridas comercialmente, sendo utilizadas larvas de um mesmo lote para a realização dos testes. Para o ensaio foram selecionadas larvas pesando entre 100 e 200 mg com a cor uniforme e clara.

O inóculo das diferentes linhagens foi preparado a partir de culturas crescidas em ASD por 48 horas a 30 °C ou a partir das células obtidas de *N. benthamiana*. O inóculo foi ajustado e a injeção com o inóculo ( $10^4$  UFC) foi realizada na hemocele, no segundo ou terceiro esternito acima das pernas, na porção ventral. Foram utilizados quatro grupos: (i) larvas não infectadas (controle), (ii) larvas inoculadas com 10 µL de PBS (PBS), (iii) larvas infectadas com a linhagem antes da interação com Nb e (iv) após a interação com a planta. Após infecção, as larvas foram incubadas a 30 °C em placas de Petri contendo dieta de cria e o número de larvas mortas foi registrado em intervalos de 24 horas durante 10 dias. Para estabelecer a morte das larvas foi observada visualmente a melanização, bem como, a resposta a estímulos físicos quando essas larvas eram tocadas levemente por uma pinça. Os experimentos foram realizados em duplicada com grupos de 10 larvas por placa.

#### 4.27 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados por meio do software Prism 5 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA) utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Para a análise do ergosterol e das enzimas urease e lacase foi utilizado o teste T. Para a sobrevivência de *T. molitor*, a curva de sobrevivência foi analisada utilizando o método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

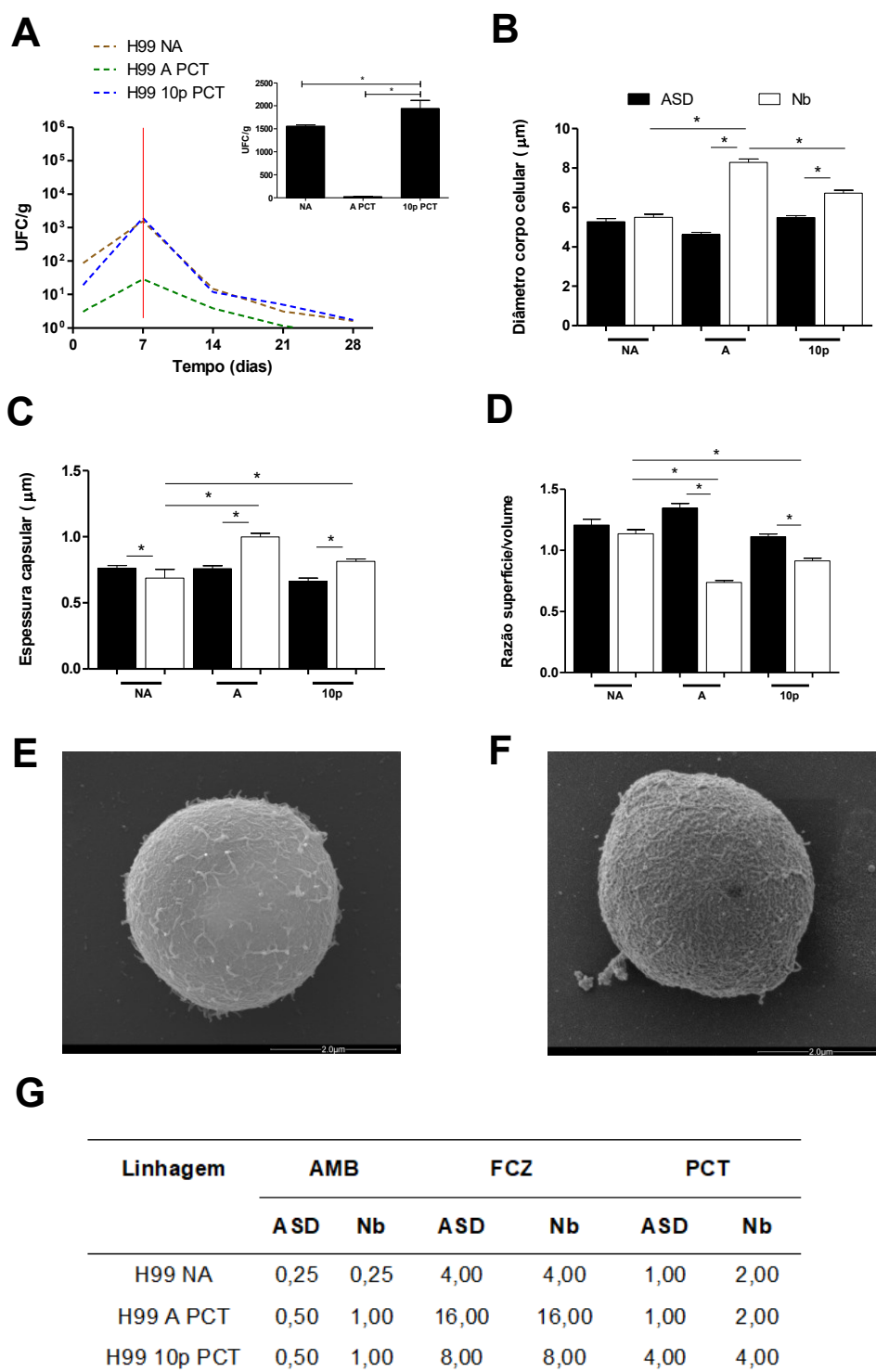
### 5.10 CINÉTICA DE ELIMINAÇÃO E EFEITO DA INTERAÇÃO COM Nb NA MORFOLOGIA E NA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE Cn H99

O perfil de cinética de eliminação de Nb, bem como as características morfológicas e o perfil de susceptibilidade das diferentes linhagens é alterado após passagem em Nb. No intuito de facilitar a compressão dos parâmetros alterados, os dados referentes a um grupo de linhagens antes e após passagem em Nb foram agrupados.

Foi verificada menor eliminação de H99 A PCT quando comparados às linhagens H99 NA e H99 10p PCT (Figura 14.A). H99 NA e H99 10p PCT apresentaram maior diâmetro do corpo celular e aumento da espessura da cápsula (Figuras 14.B-C). Em contrapartida, houve redução da razão superfície/volume para estas linhagens (Figura 14.D). Para a linhagem H99 NA, houve redução da espessura capsular após passagem em Nb, enquanto houve aumento para H99 A PCT e 10p PCT (Figura 14.C).

Micrografias eletrônicas de H99 NA antes e após passagem em Nb sugerem que, após a interação com Nb por 7 dias, a linhagem apresenta alterações morfológicas associadas as fibrilas extracelulares que, visualmente apresentam-se em quantidade e tamanho reduzidos (Figura 14.F) quando comparadas ao aspecto do fungo anterior a interação com o modelo vegetal (Figura 14.E).

O perfil de susceptibilidade das linhagens também foi alterado após passagem em Nb. H99 NA e H99 A PCT tiveram aumento da CIM para PCT, e H99 A PCT e H99 10p PCT tiveram aumento da CIM para AMB (Figura 14.G).



**Figura 14.** (A) Cinética de eliminação de Cn H99 NA, H99 A PCT, H99 10p PCT em folha infectada com  $10^5$  células pelo método de escarificação para a espécie *Nicotiana benthamiana* (Nb), após 24h, 7, 14, 21 e 30 dias. (B) Diâmetro do corpo celular, (C) espessura capsular e (D) razão superfície/volume de Cn H99 NA, H99 A PCT, H99 10p PCT antes e após a passagem em Nb. Microscopia eletrônica de varredura para (E) H99 NA e (F) H99 NA após passagem em Nb. (G)

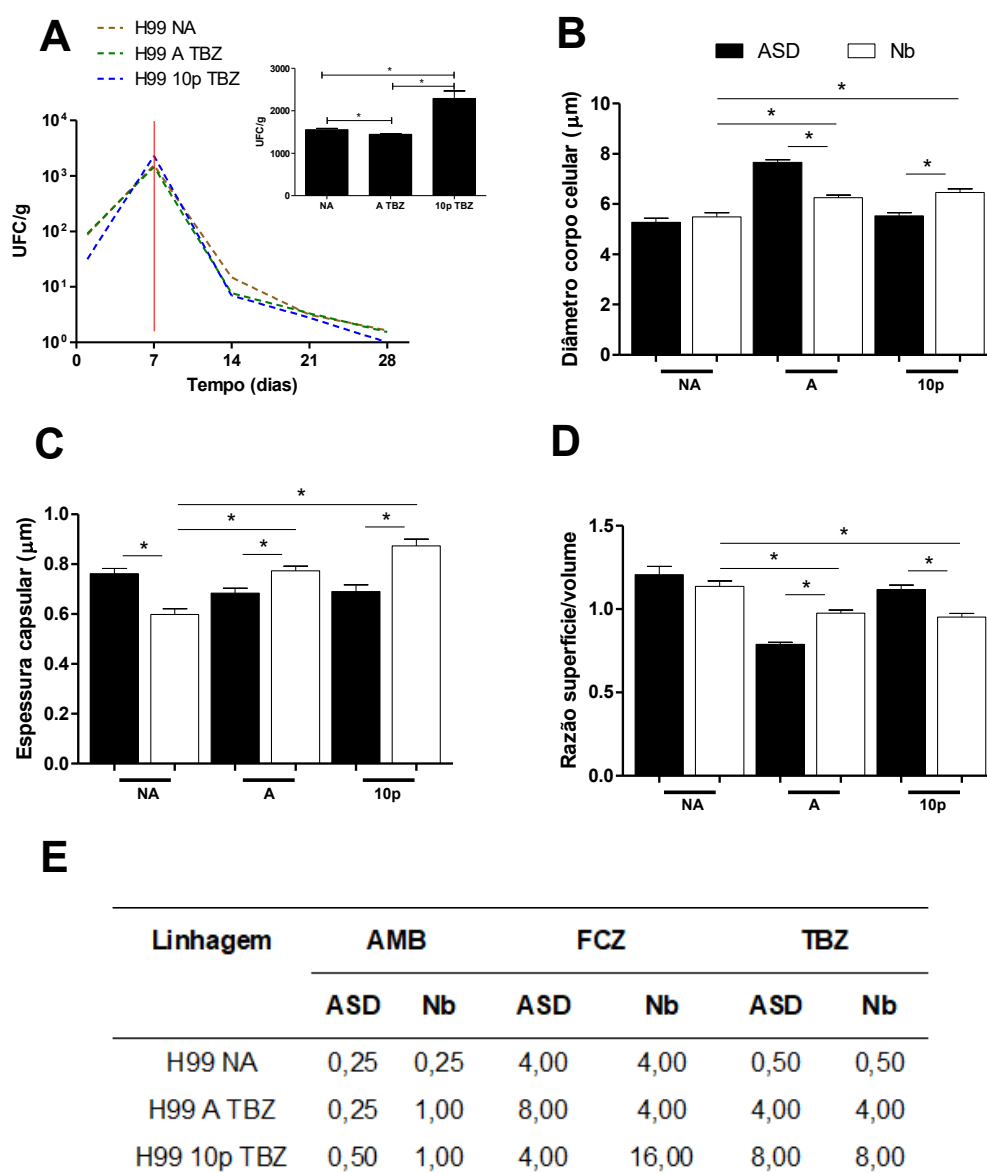


Valores de concentração inibitória mínima (CIM;  $\mu\text{g/mL}$ ) para os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FCZ) e o agroquímico piraclostrobina (PCT). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Assim como observado anteriormente, houve uma maior eliminação das linhagens Cn H99 A TBZ e 10p TBZ aos 7 dias após a inoculação em Nb, quando comparado a H99 NA (Figura 15.A).

Foi verificada redução do diâmetro celular para H99 A TBZ e aumento neste parâmetro para H99 10p TBZ (Figura 15.B). Em relação a espessura da cápsula, houve redução H99 NA e aumento para H99 A TBZ e H99 10p TBZ após passagem em Nb (Figura 15.C). A razão superfície/volume foi aumentada após a passagem em modelo vegetal para H99 A TBZ e diminuída para H99 10p TBZ (Figura 15.D).

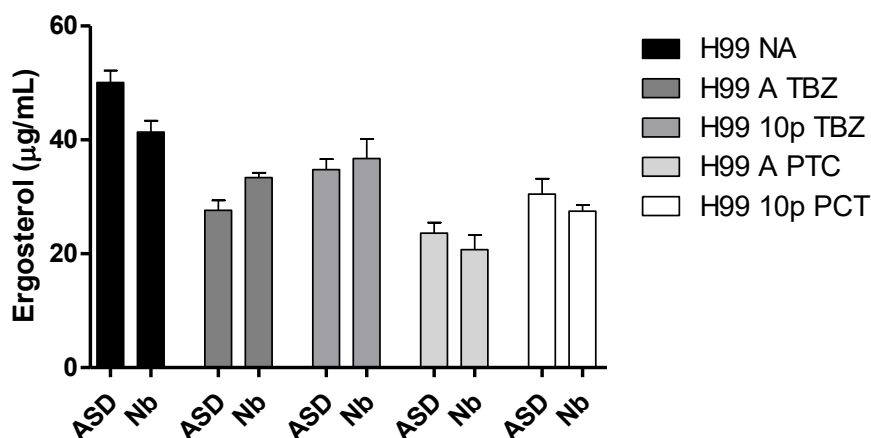
No que diz respeito ao perfil de susceptibilidade, H99 A TBZ exibiu aumento da CIM para AMB e redução para FCZ após a passagem em NB. Já H99 10p TBZ apresentou aumento da CIM para AMB e FCZ (Figura 15.E).



**Figura 15.** (A) Cinética de eliminação de Cn H99 NA, H99 A TBZ, H99 10p TBZ em folha infectada com  $10^5$  células pelo método de escarificação para a espécie *Nicotiana benthamiana* (Nb), após 24h, 7, 14, 21 e 30 dias. (B) Diâmetro do corpo celular, (C) espessura capsular e (D) razão superfície/volume de Cn H99 NA, H99 A TBZ, H99 10p TBZ antes e após a passagem em Nb. (E) Valores de concentração inibitória mínima (CIM;  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FCZ) e o agroquímico tebuconazol (TBZ). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.11 EFEITO DA INTERAÇÃO COM Nb NO CONTÉUDO DE ERGOSTEROL, TAXA DE CRESCIMENTO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE Cn H99

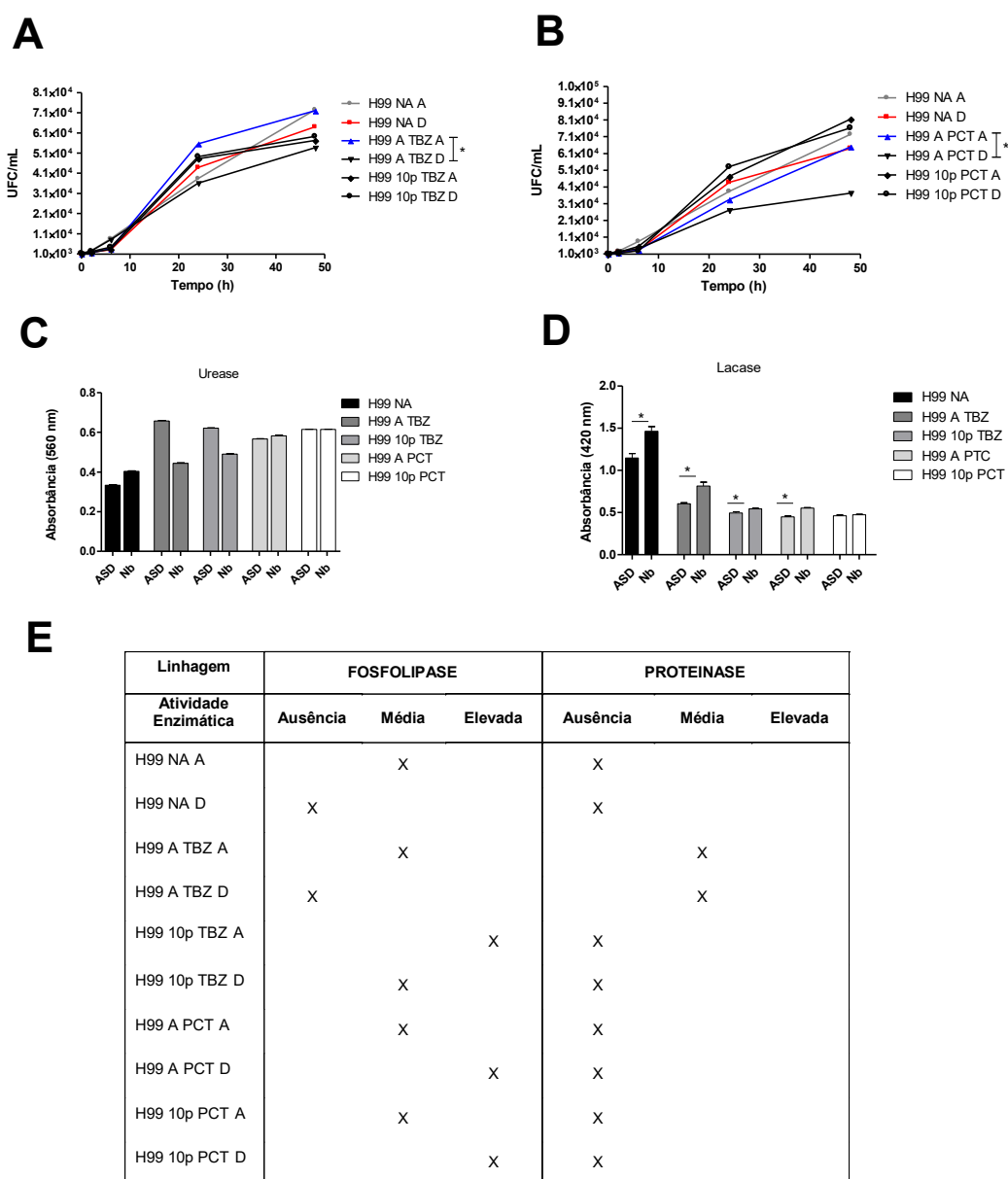
O conteúdo de ergosterol foi avaliado e não houve alteração neste parâmetro quando se comparam os resultados antes e após a passagem em Nb (Figura 16).



**Figura 16.** Conteúdo de ergosterol das linhagens H99 NA, H99 A TBZ, H99 10p TBZ, H99 A PCT, H99 10p PCT antes e após passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb). Os dados correspondem à média de cinco repetições  $\pm$  desvio padrão. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A curva de crescimento das diferentes linhagens indica que o crescimento das linhagens H99 A TBZ e H99 A PCT é menor nos tempos de 24 e 48 horas após a passagem em Nb (Figura 17.A), quando comparado as respectivas linhagens antes da passagem no modelo vegetal.

Em relação a atividade enzimática, houve aumento da produção de lacase após a passagem em Nb para as seguintes linhagens: H99 NA, H99 A TBZ, H99 10p TBZ, H99 A PCT (Figura 17.D). A atividade de fosfolipase foi reduzida após passagem em modelo vegetal para H99 NA, H99 A TBZ e H99 10p TBZ. Em contrapartida, houve aumento deste parâmetro para H99 A PCT e H99 10p PCT (Figura 17.E).

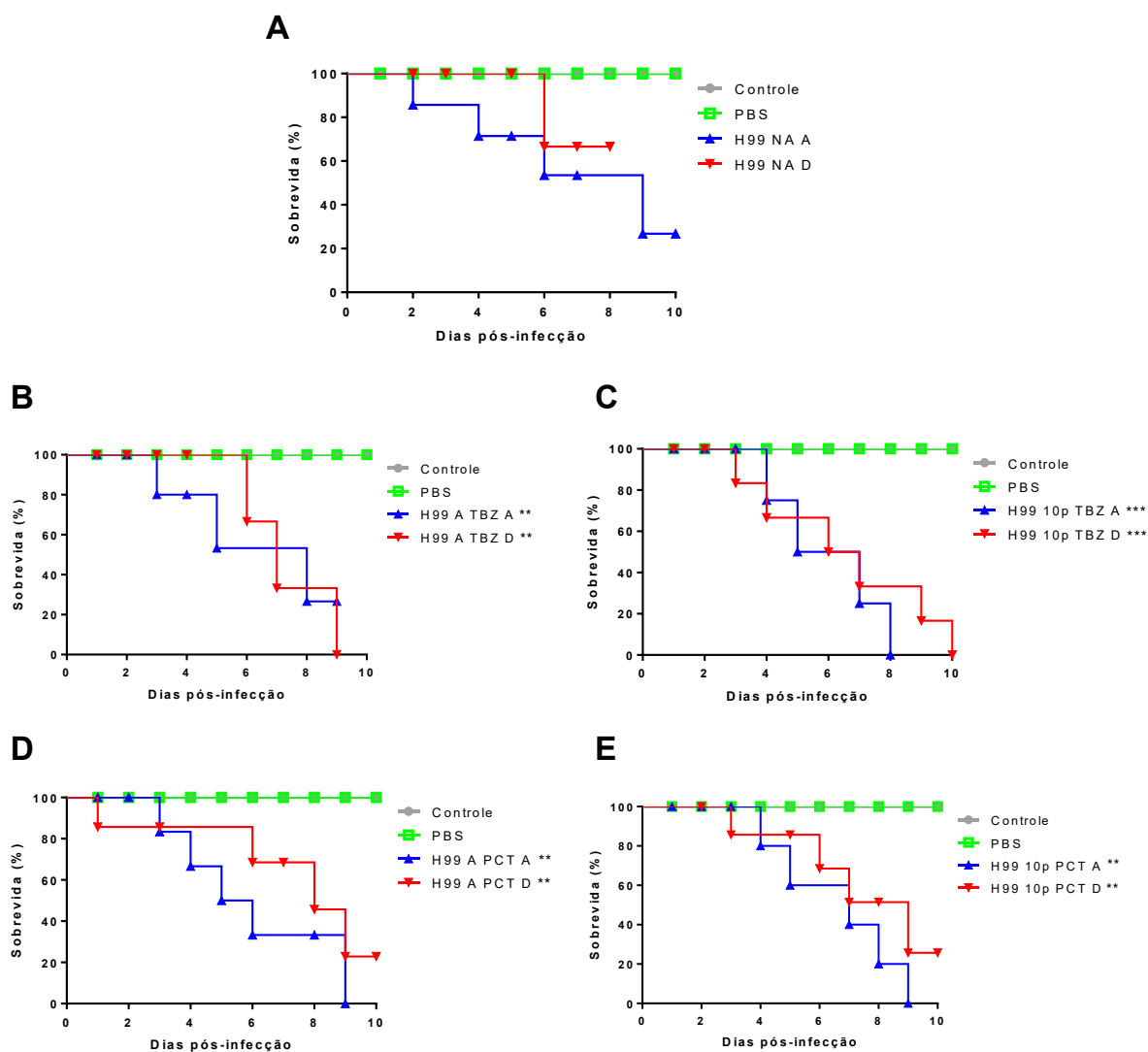


**Figura 17.** (A e B) Taxa de crescimento e atividade das enzimas (C) urease, (D) lacase, (E) fosfolipase e proteinase das linhagens Cn H99 NA, H99 A PCT, H99 10p PCT, H99 A TBZ e H99 10p TBZ antes e após passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

## 5.12 EFEITO DA INTERAÇÃO COM Nb NA INFECÇÃO DE Cn H99 EM *Tenebrio molitor*

A infecção de todas as linhagens utilizadas de *C. neoformans* em *Tenebrio molitor*, independente de antes ou após a passagem em Nb, resultou em menor sobrevivência de *T. molitor* (Figura 18) quando comparado ao grupo não infectado e

inoculado com PBS. Entretanto, a morte de 50% dos invertebrados ocorreu antes para as linhagens H99 NA, A TBZ, 10p TBZ e A PCT que não tiveram contato com a planta. Entretanto, não houve diferença significativa entre a infecção com as linhagens antes e após a passagem por Nb (Figuras 18.A-D).



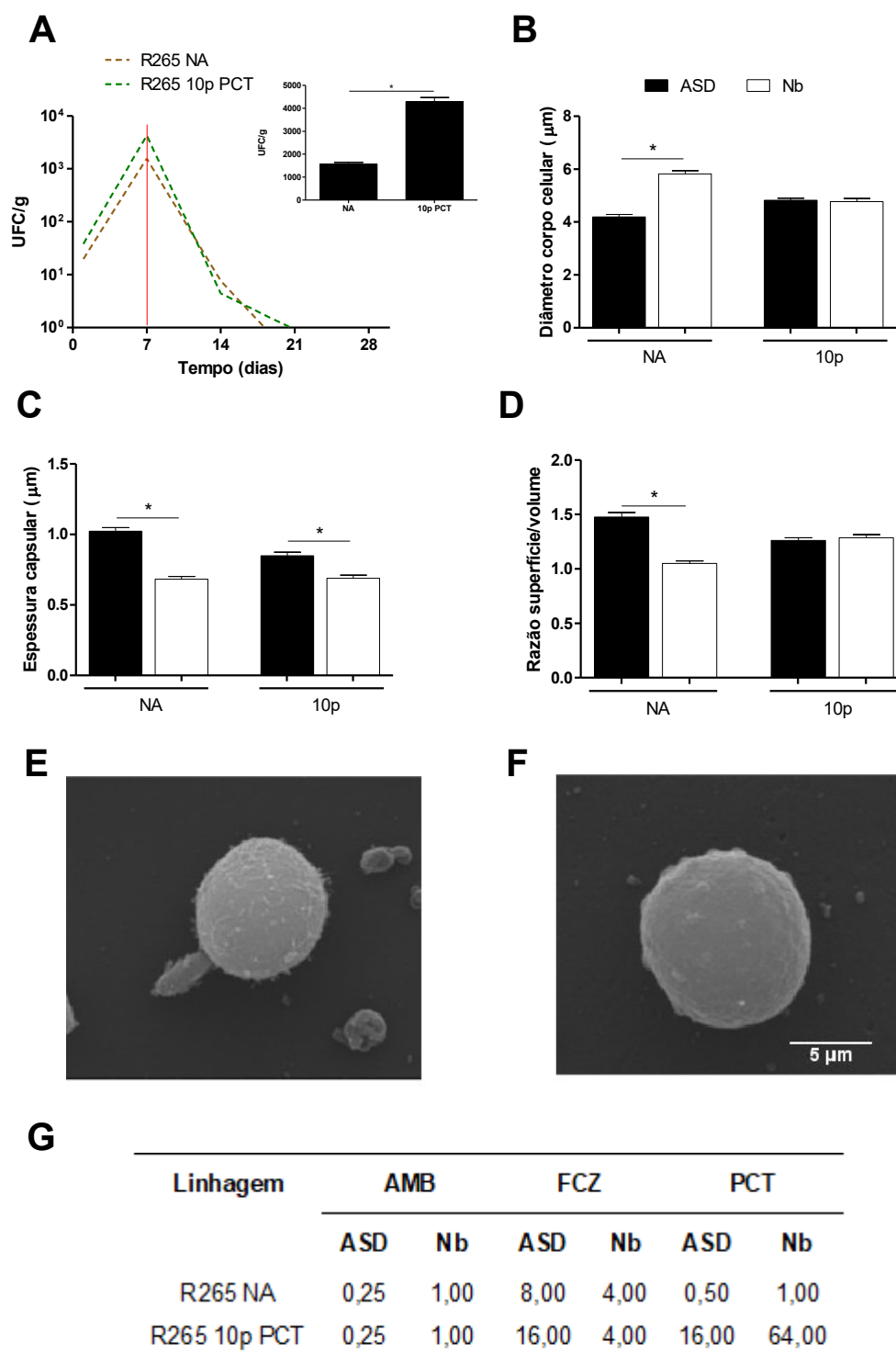
**Figura 18.** Sobrevida de *Tenebrio molitor* infectado com  $10^4$  UFC de *C. neoformans* H99 (A) NA, (B) A TBZ, (C) 10p TBZ, (D) A PCT e (E) 10p PCT antes (A) e a após (D) interação com *Nicotiana benthamiana* (Nb). \* indica diferença significativa em relação a PBS ( $p < 0,05$ ).

### 5.13 CINÉTICA DE ELIMINAÇÃO E EFEITO DA INTERAÇÃO COM Nb NA MORFOLOGIA E NA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE Cg R265

A cinética de eliminação demonstra que há maior recuperação de R265 10p PCT de Nb no período de 7 dias após a infecção quando comparado a R265 NA (Figura 19.A).

No que diz respeito as alterações morfológicas, foi verificado aumento do diâmetro celular para R265 NA após passagem em Nb (Figura 19.B). A espessura da cápsula foi reduzida em ambas as linhagens (Figura 19.C), assim como a razão superfície/volume foi menor após passagem em modelo vegetal (Figura 19.D). Sobretudo, as micrografias eletrônicas de R265 NA antes (Figura 19.E) e após passagem em Nb (Figura 19.F) sugerem uma redução das fibrilas extracelulares em termos de quantidade e tamanho após a interação em modelo vegetal.

No que diz respeito ao perfil de susceptibilidade, ambas linhagens exibiram aumento da CIM para AMB e PCT após passagem em Nb. Já em relação ao FCZ, houve redução da CIM para R265 NA e R265 10p PCT (Figura 19.G).



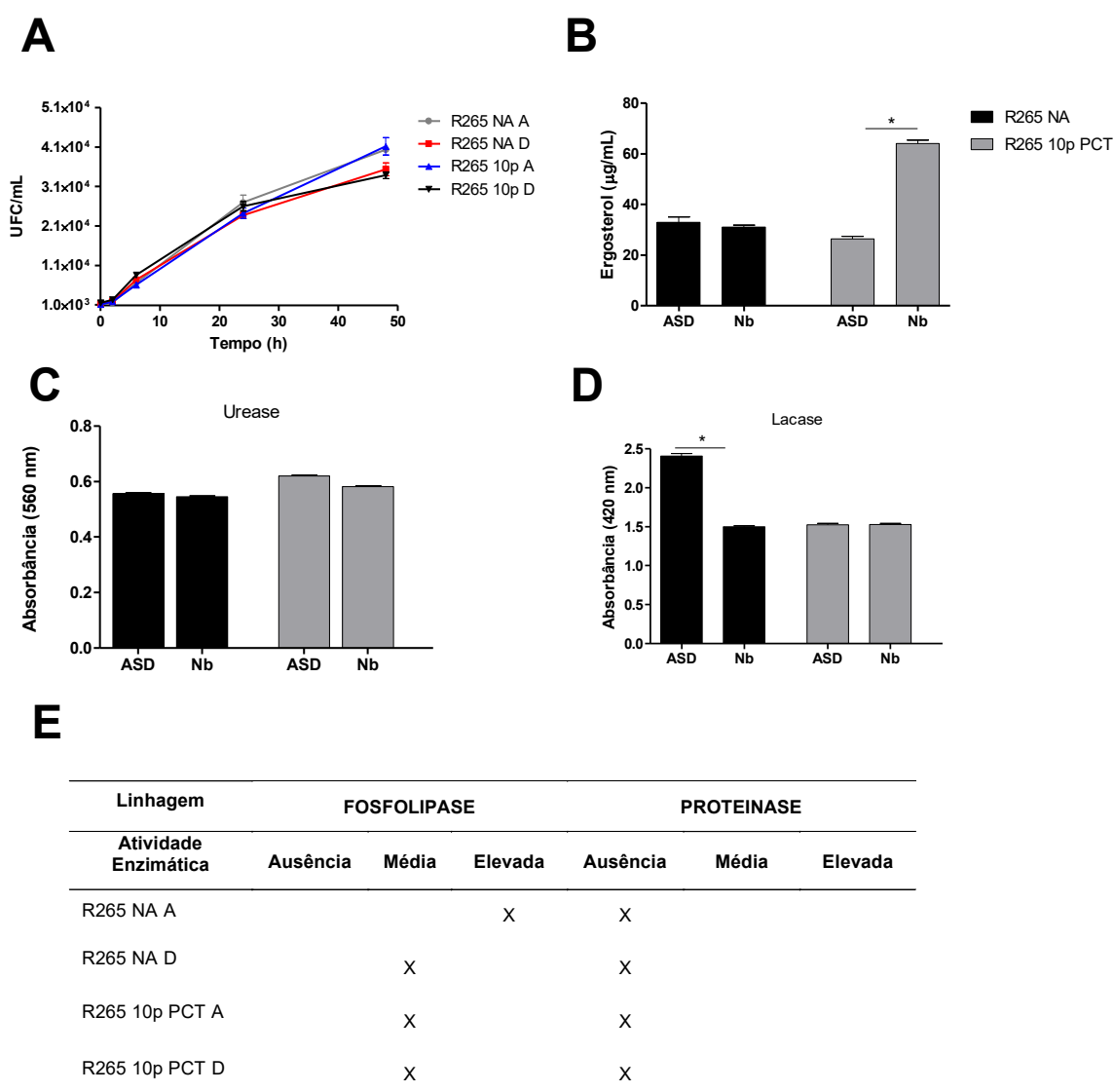
**Figura 19.** (A) Cinética de eliminação de Cg R265 NA e R265 10p PCT em folha infectada com  $10^5$  células pelo método de escarificação para a espécie *Nicotiana benthamiana* (Nb), após 24h, 7, 14, 21 e 30 dias. (B) Diâmetro do corpo celular, (C) espessura capsular e (D) razão superfície/volume de Cg R265 NA e R265 10p PCT antes e após a passagem em Nb. Microscopia eletrônica de varredura para (E) R265 NA e (F) R265 NA após passagem em Nb. (G) Valores de concentração inibitória mínima (CIM;  $\mu\text{g/mL}$ ) para os antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FCZ) e o agroquímico piraclostrobina (PCT). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 5.14 EFEITO DA INTERAÇÃO COM Nb NA TAXA DE CRESCIMENTO, CONTEÚDO DE ERGOSTEROL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE Cg R265

A passagem pelo modelo vegetal não influenciou na taxa de crescimento das linhagens R265 NA e R265 10p PCT (Figura 20.A). Entretanto, a interação com Nb resultou em aumento do conteúdo de ergosterol para R265 10p PCT (Figura 20.B).

Em relação a atividade enzimática, foi observada uma redução para as enzimas lacase e fosfolipase para a linhagem R265 NA após passagem em Nb (Figura 20.D-E).



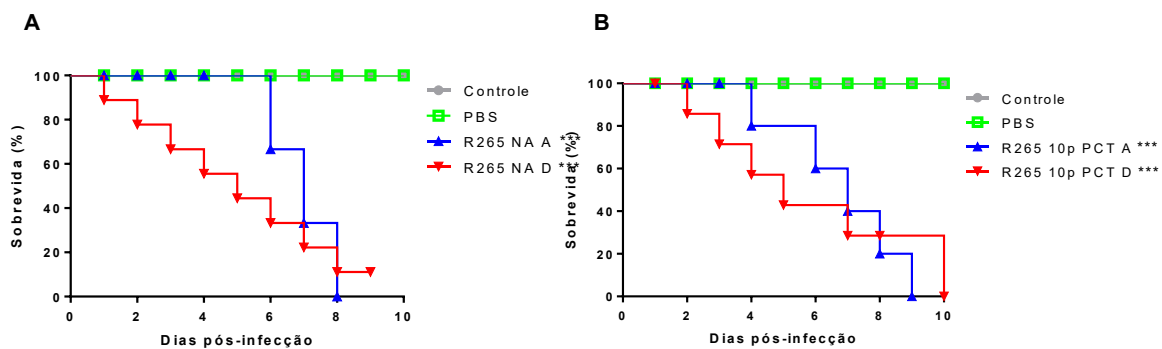


**Figura 20.** (A) Taxa de crescimento, (B) conteúdo de ergosterol e atividade das enzimas (C) urease, (D) lacase, (E) fosfolipase e proteinase das linhagens Cg R265 NA e Cg R265 10p PCT antes e após passagem em *Nicotiana benthamiana* (Nb). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.15 EFEITO DA INTERAÇÃO COM Nb NA INFECÇÃO DE Cg R265 EM *Tenebrio molitor*

A infecção de todas as linhagens utilizadas de *C. gattii* em *Tenebrio molitor*, independente de antes ou após a passagem em Nb, resultou em menor sobrevivência de *T. molitor* (Figura 21) quando comparado ao grupo não infectado e inoculado com PBS. Entretanto, a morte de 50% de *T. molitor* ocorreu antes para ambas linhagens

que tiveram contato com a planta. No entanto, não houve diferença significativa na infecção com as linhagens antes e após a passagem por Nb (Figuras 21.A-B).



**Figura 21.** Sobrevida de *Tenebrio molitor* infectado com  $10^4$  UFC de *C. gattii* R265 (A) NA e (B) 10p PCT antes (A) e a após (D) interação com *Nicotiana benthamiana* (Nb). \* indica diferença significativa em relação a PBS ( $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O emprego de modelos que mimetizem interações entre o patógeno e seus hospedeiros é fundamental para compreender os mecanismos envolvidos nesse processo e entender as possíveis consequências que esse contato pode trazer tanto para o hospedeiro quanto para o microrganismo.

Estabelecida a inoculação de *Cryptococcus gattii* L27/01 pelo método de escarificação no modelo vegetal *Nicotiana benthamiana*, buscou-se compreender como ocorreria a interação de outras linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* com o modelo proposto. Sobretudo, fez-se a opção por linhagens de *Cryptococcus* que foram expostas a agroquímicos utilizados na prática agrícola, cujo contato resultou em uma série de modificações na morfofisiologia e nos fatores de virulência do microrganismo, bem como mudanças na sua interação com macrófagos, em modelo murino de criptococose e no perfil de resistência frente a antifúngicos clínicos (BASTOS *et al.*, 2018; BASTOS *et al.*, 2019).

Em primeiro lugar, as linhagens de *C. neoformans* H99 NA, A TBZ e 10p TBZ foram inoculadas em *N. benthamiana* conforme previamente descrito. O agroquímico a que as linhagens A e 10p foram expostas é o tebuconazol (TBZ), um triazólico de amplo espectro empregado na prevenção e tratamento de doenças em frutas, cereais e vegetais. O mecanismo de ação do TBZ envolve a inibição de uma enzima envolvida na biossíntese do ergosterol do fungo, a lanosterol-14- $\alpha$ -demetilase (KWOK; LOEFFLER. 1993). Em muitos casos, o TBZ é empregado em plantações de eucalipto, onde *Cryptococcus* pode ser encontrado (CHATUVERDI; CHATUVERDI, 2011).

A interação entre H99 A TBZ e *N. benthamiana* acarretou em mudanças morfológicas, como aumento da espessura capsular, que pode estar associado a menor taxa de crescimento exibida pela linhagem após interação com *N. benthamiana*. Esse fato também pode estar associado a baixa recuperação de H99 A TBZ do modelo vegetal após 7 dias de inoculação. É bem estabelecido que o aumento da síntese da cápsula acarreta em um alto custo energético para a célula, podendo influenciar diretamente na taxa de crescimento do microrganismo (FERREIRA *et al.*, 2015).

Em estudo anterior, Bastos *et al.* (2018) verificaram que as alterações morfológicas observadas em H99 A TBZ e H99 10p TBZ após exposição ao

agroquímico não alteraram o crescimento das linhagens. No presente estudo, houveram modificações na taxa de crescimento de ambas linhagens após passagem por *N. benthamiana*, sugerindo que estas alterações são resultado da interação com o modelo vegetal e não com a prévia exposição a TBZ.

O contato com *N. benthamiana* também resultou em mudanças no perfil enzimático do fungo, como um aumento da síntese de lacase em H99 NA, H99 A TBZ e H99 10p TBZ. O aumento da lacase pode estar associada aos compostos fenólicos presentes em *N. benthamiana*, como os flavonoides (ARLOTTA *et al.*, 2020). Os flavonoides podem ser utilizados como substrato para a lacase, resultando em um revestimento da parede celular capaz de conferir maior resistência ao fungo frente a radiação ultravioleta e ao estresse oxidativo (FOWLER *et al.*, 2001; DADACHOVA; CASADEVALL, 2008).

Além disso, linhagens de *C. gattii* produtoras de lacase e que apresentam um crescimento fortemente melanizado exibiram maior virulência em modelo murino de criptococose, demonstrando que há uma relação entre a aptidão ecológica e a virulência (REN *et al.*, 2006).

De modo similar, as linhagens de *C. neoformans* H99 NA, A PCT e 10p PCT foram inoculadas em *N. benthamiana*. O mesmo procedimento foi realizado para as linhagens de *C. gattii* R265 NA e R265 10p PCT. As linhagens de H99 e R265 foram previamente expostas ao agroquímico piraclostrobina (PCT) (BASTOS *et al.*, 2019). O PCT é fungicida da classe das estrobilurinas cujo mecanismo de ação envolve alterações na respiração mitocondrial e, conseqüentemente, na obtenção de energia (BARTLETT *et al.*, 2002). O PCT é um antifúngico de amplo espectro e alta eficiência contra fungos fitopatogênicos, o que justifica o aumento do seu consumo em diversos países como China, Estados Unidos e Reino Unido (BARTLETT *et al.*, 2002; OLIVER; HEWITT, 2014; GUO *et al.*, 2017).

A interação de H99 A PCT e 10p PCT com *N. benthamiana* acarretou em modificações morfológicas no fungo e em menor taxa de crescimento. Assim como observado para H99 A TBZ, o aumento da espessura capsular em H99 A PCT pode estar relacionado a menor taxa de crescimento do fungo após interação com o modelo vegetal (FERREIRA *et al.*, 2015).

Para *C. gattii*, a interação de R265 NA e R265 10p com *N. benthamiana* resultou em diminuição da espessura capsular para ambas as linhagens. Assim como observada para *C. neoformans* H99 NA, após a passagem por *N.*

*benthamiana*, houve redução das fibrilas extracelulares de *C. gattii*. Entretanto, essa redução não influenciou na taxa de crescimento.

Em relação ao conteúdo de ergosterol, Bastos *et al.* (2019) não observaram nenhuma alteração no perfil de expressão de *ERG11* após o subcultivo de R265 na ausência de PCT (linhagem R265 10p PCT). No presente estudo, a passagem de R265 10p PCT por *N. benthamiana* acarretou em maior conteúdo de ergosterol, indicando que as alterações em relação a este esterol podem estar associadas a passagem pelo modelo vegetal e não a exposição a PCT.

É válido reiterar que as linhagens adaptadas aos agroquímicos (R265 A e H99 A PCT) exibiram menor virulência em modelo murino, indicando que nem todas as alterações morfofisiológicas no fungo acarretam, necessariamente, em aumento da sua virulência (BASTOS *et al.*, 2018; BASTOS *et al.*, 2019). Na infecção em *T. molitor*, foi verificado que *Cryptococcus* reduz a sobrevivência das larvas. Entretanto, não foi observada diferença na virulência das linhagens antes e depois da interação com *N. benthamiana* para o modelo utilizado.

Outro aspecto importante a se considerar é o fato de que as linhagens H99 10p TBZ, H99 10p PCT e R265 10p PCT apresentaram maior recuperação em modelo vegetal quando comparados as respectivas linhagens NA e A. De fato, Springer, Mohan e Heitman (2017) observaram uma maior recuperação de *Cryptococcus* de modelos vegetais quando estas exibiam perfil de resistência a antifúngicos.

As linhagens R265 10p PCT e H99 10p PCT exibiram perfil de heteroresistência e resistência cruzada a 30 e 35 °C. Sobretudo, houve maior tolerância nas linhagens de *Cryptococcus* crescidas a 30 °C, sugerindo que a resistência *in vivo* pode ser limitada devido à temperatura corporal dos animais endotérmicos (BASTOS *et al.*, 2019). Em conjunto, estas informações reforçam o papel que as pressões ambientais têm na virulência de *Cryptococcus* e em sua susceptibilidade aos antifúngicos clínicos (DEL POETA; CASADEVALL, 2012).

Além disso, o perfil observado para na interação das diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* com o modelo vegetal é dependente da linhagem utilizada. Isso ocorre porque a interação *Cryptococcus-N. benthamiana* é influenciada por fatores de virulência do próprio fungo e por sua plasticidade fenotípica frente as distintas pressões evolutivas encontradas no ambiente, como variações na temperatura, radiação, fonte de obtenção de energia e na exposição a agroquímicos

(XUE *et al.*, 2007; SPRINGER *et al.*, 2010). Em um cenário mundial em que a população mundial cresce e, conseqüentemente, aumenta o consumo de agroquímicos, o papel dos agroquímicos na interação microrganismo-planta demanda maior necessidade de compreensão (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

## 7 CONCLUSÃO

A passagem das linhagens Cn H99 e Cg R265 expostas aos agroquímicos tebuconazol e/ou piraclostrobina por *N. benthamiana* resultou em alterações morfofisiológicas e no perfil enzimático do fungo. Além disso, após interação com modelo vegetal, o microrganismo teve modificações em sua taxa de crescimento, no conteúdo de ergosterol e no perfil de susceptibilidade a antifúngicos clínicos. Em contrapartida, a passagem por *N. benthamiana* não resultou em mudanças na virulência de *Cryptococcus* em modelo de *T. molitor*.

## REFERÊNCIAS

- ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, 161: 83-91, 2006.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AKSENOV, S. I., BABYEVA, I. P., GOLUBEV, V. I. On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. **Life Sci. Space Res**, v. 11, p. 55–61, 1973.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J.M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-85. 2015.
- ANDRADE-SILVA, L. E.; FERREIRA-PAIM, K.; FERREIRA, T. B.; VILAS-BOAS, A.; MORA, D. J.; MANZATO, V. M. et al. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0193237, 2018.
- ARAUJO, G. R. S., FONSECA, F. L., PONTES, B., TORRES, A., CORDERO, R. J. B., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. et al. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS One**, v. 7, p.1–11, 2012
- ARAUJO, G. R. S., FREITAS, G. J. C., FONSECA, F. L., LEITE, P. E. C., ROCHA, G. M., DE SOUZA, W. et al. The environmental yeast *Cryptococcus liquefaciens* produces capsular and secreted polysaccharides with similar pathogenic properties to those of *C. neoformans*. **Sci. Rep**, v. 7, p. 46768, 2017.
- ARAÚJO, G. R. S., SOUZA, W., FRASES, S. The hidden pathogenic potential of environmental fungi. **Fut Microb**, 0.2217/fmb-2017-0124, 2017.
- ARLOTTA, C.; PUGLIA, G. D.; GENOVESE, C.; TOSCANO, V.; KARLOVA, R.; BEEKWILDER, J. et al. MYB5-like and bHLH influence flavonoid composition in pomegranate. **Plant Science**, v. 298, 2020.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBZANSKI, B. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Manag. Sci.** v. 58, n. 7: p. 649–662, 2002.
- BASTOS, R. W., CARNEIRO, H. C. S., OLIVEIRA, L. V. N., ROCHA, K. M., FREITAS, G. J. C., COSTA, M. C. et al. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimic Agents and Chemot**, v. 62, n. 1: 2018.



BASTOS, R. W.; FREITAS, G. J. C.; CARNEIRO, H. C. S.; OLIVEIRA, L. V. N.; GOUVEIA-EUFRÁSIO, L.; SANTOS, A. P. N. 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. 516-23, 2019.

BEALE, M. A.; SABIITI, W.; ROBERTSON, E. J.; FUENTES-CABREJO, K. M.; O'HANLON, S. J.; JARVIS, J. N. et al. Genotypic Diversity Is Associated with Clinical Outcome and Phenotype in Cryptococcal Meningitis across Southern Africa. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 6, 2015.

BENEDICT, K., PARK, B. J. Invasive fungal infections after natural disasters. **Emerg. Infect. Dis.** v. 20, n. 3, p. 349–355, 2014.

BEYER, W. F. & FRIDOVICH, I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. **Analytical biochemistry**, v. 161, p. 559-566, 1987.

BHATT, M., PORTERFIELD, J. Z., RIBES, J. A., ARORA, V., MYINT, T. Changing Demographics and Risk Factors for Cryptococcosis: A 12 Year Review at a Tertiary Care Center. **Mycoses**, 2021.

BICANIC, T., HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin** V. 72, p. 99-118, 2004.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Res**, v. 16, n. 1, p. fov106, Feb 2016.

BILLMYRE, R. B., CROLL, D., LI, W., MIECZKOWSKI, P., CARTER, D. A., CUOMO, C. A. et al. Highly recombinant VGII *Cryptococcus gattii* population develops clonal outbreak clusters through both sexual macroevolution and asexual microevolution. **mBio**, v. 5, p. 4, p. e01494-14, 2014.

BODDY, L., FRANKLAND, J., VAN WEST, P. **Ecology of saprotrophic basidiomycetes**. Elsevier Academic Press; 2008.

BOEKHOUT, T., THEELAN, B., DIAS, M., FELL, J. W., HOP, W. C., ABELN, E. C. F. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, p.891-907, 2001.

BOELAERT, J. R., DE LOCHT, M., VAN CUTSEM, J., KERRELS, V., CANTINIEUAX, B., VERDONCK, A. et al. Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. *In vitro* and *in vivo* animal studies. **J. Clin. Invest.** v. 91, n. 5, p. 1979–1986, 1993.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p. S4-S12. 2008.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDL, M. T. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. **Annu Rev Phytopathol**, v. 44, p. 367-392, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica da Criptococose**. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2012.

BRATTON, E. W., EL HUSSEINI, N., CHASTAIN, C. A., LEE, M. S., POOLE, C., STURMER, T. et al. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/nontransplant. **PLoS One**; v. 7, p. e43582, 2012.

BUCHANAN, K. L., MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerg Infect Dis**, v. 4, p. 71-83, 1998.

BULGARI, D.; CASATI, P.; BRUSETTI, L.; QUAGLINO, F.; BRASCA, M.; DAFFONCHIO, D. et al. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneityPCR. **The Journal of Microbiology**, v. 47, p. 393- 401, 2009.

BUTTS, A., DIDONE, L., KOSELYN, K., B. A., BAXTER, B. K., CHABRIER-ROSELLO, Y., WELLINGTON, M. et al. Treatment of Cryptococcosis Pharmacological Properties Relevant to the Structural Chemotype, and Cryptococcal Activity, a Common Off-Patent Drugs with Fungicidal A Repurposing Approach Identifies. **Eukaryotic Cell**. v. 12, n. 2, p. 278, 2013.

BYRNES, E. J. 3<sup>rd</sup>; LI, W.; LEWIT, Y.; MA, H.; VOELZ, K.; REN, P. et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, 2010.

BYRNES, E. J. 3<sup>rd</sup>; MARR, K. A. The Outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North America: epidemiology and clinical issues. **Curr Infect Dis Rep**, v. 13, p. 256–261, 2011.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities io root tips of soybean {*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 463-468, 1991.

CARNEIRO, H. C. S. **Influência do agroquímico benomil na morfo-fisiologia, virulência e susceptibilidade de *Cryptococcus gattii* aos antifúngicos clínicos *in vitro* e em modelo murinho**. Tese (Doutora em Microbiologia: Ênfase em Micologia). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

CARNEIRO, H. C. S., RIBEIRO, N. Q., BASTOS, R. W., SANTOS, D. A. Effect of non-antifungal agrochemicals on the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 0, p. 1-7, 2019.

CARVALHO, V. S. D. **Influência de hormônios vegetais sobre a morfo-fisiologia e virulência de *Cryptococcus gattii***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2016.

CASADEVALL, A., FREIJ, J. B., HANN-SODEN, C., TAYLOR, J. Continental drift and speciation of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes. **mSphere**, v. 2, n. 2, p. e00103-17, 2017.

CASADEVALL, A., PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans***. ASM Press, 1998.

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

CATTANA, M. E., SOSA, M. L., FERNANDEZ, M., ROJAS, F., MANGIATERRA, M., GIUSIANO, G. Native trees of the Northeast Argentina: natural hosts of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Rev Iberoam Micol**, v.31, p. 188-192, 2014.

CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, M. J.; MILLER, G. F.; PARE, D. R.; DAM, T. et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infect Immun**, v. 72, p. 4985-4995, 2004.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F., DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, p. 120-127, 2009.

CHATURVEDI, V., CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends in Microbiology**. v. 19, n.11. 2011.

CHAYAKULKEEREE, M., PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**. v. 20, p. 507-44, 2006.

CHEN, S. C. A., MEYER, W., SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 27 p. 980-1024. 2014.

CHEN, S. H., STINS, M. F., HUANG, S. H., CHEN, Y. H., KWON-CHUNG, K. J., CHANG, Y. et al. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. **J Med Microbiol**. v. 52, p. 961-70, 2003.

CHEN, Y., TOFFALETTI, D. L., TENOR, J. L., LITVINTSEVA, A. P., FANG, C., MITCHELL, T. G. et al. The *Cryptococcus neoformans* transcriptome at the site of human meningitis. **MBio**. v. 5, n.1, p. 1-10, 2014.

CHOWDHARY, A., PRAKASN, A., RANDHAWA, H. S., KATHURIA, S., HAGEN, F., KLAASSEN, C. H. et al. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. **Mycoses**, v. 56, p.222-228. 2013.

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; PRAKASH, A.; MEIS, J. F. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 1-6, 2012.

CHUNG, K. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*, **Scientifica**, vol. 2012, 2012.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 219-38, 2014.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**. 2013.

COGLIATI, M. PUCCIANTI, E.; MONTAGNA, M. T. Fundamental niche prediction of the pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Europe. **Environmental Microbiology**, v.19, n. 10, p. 4318-4325, 2017.

COGLIATI, M., D'AMICIS, R., ZANI, A., MONTAGNA, M. T., CAGGIANO, G., DE GIGLIO, O. et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 0, 2016.

COLOM VALIENTE, M. F., ALBERDI, M., MESEGUER, I., TORRES RODRIGUEZ, J. M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples in Alicante. **Rev Iberoam Micol**, v. 14, p. 63-64, 1997.

CONDE-PEREIRA, C., RODAS-RODRIGUEZ, L., DIAZ-PAZ, M., PALACIOS-RIVERA, H., FIRACATIVE, C., MEYER, W. et al. Fatal case of polymicrobial meningitis caused by *Cryptococcus liquefaciens* and *Mycobacterium tuberculosis* complex in a human immunodeficiency virus-infected patient. **J. Clin. Microbiol.** v. 53, n. 8, p. 2753-2755, 2015.

COSTA, M. C., MATA, L. M., RIBEIRO, N. Q., SANTOS, A. P. N., OLIVEIRA, L. V. N., VILELA, R. V. R. et al. A new method for studying cryptococcosis in a murine model using <sup>99m</sup>Tc-*Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 56, 4, 2018, 479–484.

COX, G. M., HARRISON, T. S., MCDADE, H. C., TABORDA, C. P., HEINRICH, G., CASADEVALL, A. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun.** v. 71, p. 173-80, 2003.

COX, G. M., MCDADE, H. C., CHEN, S. C., TUCKER, S. C., GOTTFREDSSON, M., WRIGHT, L. C. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 39, p. 166-175, 2001.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

DADACHOVA, E., CASADEVALL, A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. **Curr. Opin. Microbiol.** v.11, p. 525-531, 2008.

DALISAY, D. S.; JONEL, P.S.; MOLINSKI, T. F. Ptilomycalin A inhibits laccase and melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 1-4, 2011.

DAMASCENO-ESCOURA, A. H.; SOUZA, M. L.; NUNES, F. O.; PARDI, T. C.; GAZOTTO, F. C.; FLORENTINO, D. H. et al. Epidemiological, Clinical and Outcome Aspects of Patients with Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* from a Non-endemic Area of Brazil. **Mycopathologia**, v. 184, n. 1, p. 65-71, 2019.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; BAER, R.; BYRNES, E.; GALANIS, E.; HEITMAN, J. et al. Spread of *cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 1185-1191. 2009.

DAVIS, J. M., HUANG, M., BOTTS, M. R., HULL, C. M., HUTTENLOCHER, A. A Zebrafish Model of Cryptococcal Infection Reveals Roles for Macrophages, Endothelial Cells, and Neutrophils in the Establishment and Control of Sustained Fungemia. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 10, 2016.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 303-310, 2011.

DERENGOWSKI, L. DA S., PAES, H. C., ALBUQUERQUE, P., TAVARES, A. H., FERNANDES, L., SILVA-PEREIRA, I. et al. The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. **Eukaryot Cell**. v. 12, n. 5, p. 761-774. 2013.

DROMER, F., MATHOULIN-PELISSIER, S., FONTANET, A., RONIN, O., DUPONT, B., LORTHOLARY, O. et al. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985–2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. **AIDS**, v. 18, p. 555–562, 2004.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, 1990.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **Am J Hyg**, v. 62, n. 3, p. 227-32, 1955.

ENGELTHALER, D. M., HICKS, N. D., GILLECE, J. D., ROE, C. C., SCHUPP, J. M., DRIEBE, E. M. et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: Whole-Population Genome Analysis Provides Insights into Species Evolution and Dispersal. **mbio.asm.org**. v. 5, 2014.

ERGIN, C., ILKIT, M., HILMIOGLU, S., KALELI, I., GULBABA, A. G., DEMIRCI, M. et al. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in South Aegean and Mediterranean regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. **Mycopathologia**, v. 158, p. 43-47. 2004.

ESCANDÓN, P., SÁNCHEZ, A., MARTÍNEZ, M., MEYER, W., CASTAÑEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* species complex reveals as high genetic diversity and presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 625-635, 2006.

FARRER, R. A.; CHANG, M.; DAVIS, M. J.; VAN DORP, L.; YANG, D-H.; SHEA, T. et al. A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambezi Miombo Woodlands. **mBio**. v. 10, p. e02306-19, 2019.

FAY, V. S.; GREGIANINI, T. S.; VEIGA, A. B. G.; GONÇALVES, S. M. B.; RODRIGUES, D. M.; BONAMIGO, R. R. A 12-year study of fungal infections in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2019.

FERNANDES, K. E., DWYER, C., CAMPBELL, L.T., CARTER, D.A. Species in the *Cryptococcus gattii* Complex Differ in Capsule and Cell Size following Growth under Capsule Inducing Conditions. **mSphere**, v.1, n.e 6, p. e00350-16, 2016.

FERRARI, E.; ANDRADE, S. M.; SABINO, D. C. C.; SHIOMI, H. F. Potential of auxinary production bacterium in promoting the growth of micropropagate banana plant. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 4, 2018.

FERREIRA, B. G., TEIXEIRA, C. T., ISAIAS, R. M. S. Efficiency of the Polyethylene-Glycol (PEG) Embedding Medium for Plant Histochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 8, p. 577–583, 2014.

FERREIRA, G. F., BALTAZAR, L. M., SANTOS, J. R., MONTEIRO, A. S., FRAGA, L. A., RESENDE-STOIANOFF, M. A. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J Antimicrob Chemother**. 2013.

FERREIRA, G. F., SANTOS, J. R., COSTA, M. C., HOLANDA, R. A., DENADAI, Â. M., FREITAS, G. J. et al. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, p. 4600-9, 2015.

FICARATIVE, C., LIZARAZO, J., ILLNAIT-LIZARAZO, M. T., CASTAÑEDA, E., LACSG. The status of cryptococcosis in Latin America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 7, p. e170554, 2018.

FIGUEIREDO, C. R. L. V., CARVALHO, L. P. B., ROSA, M. R. D. Análisis histopatológico y histoquímico de células claras en lesiones quísticas odontogénicas. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 49, n. 2, p. 183-191, 2013.

FIRACATIVE, C., TORRES, G., RODRÍGUEZ, M. C., ESCANDÓN, P. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. **Biomedica**, v. 31, p. 118-123, 2011.

FONSECA, A., INÁCIO, J. **Phylloplane yeasts**. In: PETER, G., ROSA, C. (Eds). Biodiversity and ecophysiology of yeasts: Springer Berlin Heidelberg. p 263-301, 2006.

FONSECA, F. L., NOHARA, L. L., RADAMES, J. B., FRASES, S.; CASADEVALL, A., ALMEIDA, I. C. et al. Diameter *C. gattii* Correlate with Polysaccharide Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus* Immunomodulatory Effects of Serotype B Infection and Immunity. **Infect. Immunity**. v. 78, n. 9, p. 3861, 2010.

FORTES, S. T.; LAZERA, M.S.; NISHIKAWA, M. M.; MACEDO, R. C. L.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, v. 44, p. 137-140. jan. 2001.

FOWLER, Z. L., BARON, C. M., PANEPINTO, J. C., KOFFAS, M. A. Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases. **Yeast**, v. 28, p. 181-188, 2011.

FRANCO-PAREDES, C., WORMACK, T., BOHLMAYER, B. S., SELLERS, B., HAYS, A., PATEL, K. et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **Lancet Infect Dis**, v. 15, p. 348-355, 2014.

FUCHS, B. B., TEGOS, G. P., HAMBLIN, M. R., MYLONAKIS, E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 51, p. 2929-2936, 2007.

GALANIS, E., MACDOUGALL, L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 251-257, 2010.

GARCIA-RIVERA, J., CHANG, Y. C., KWON-CHUNG, K. J., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cap59 (or cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronoxylomannan. **Eukaryot cell**, v. 3, p. 385-392, 2004.

GARCÍA-RODAS, R., CORDERO, R.J., TREVIJANO-CONTADOR, N., JANBON, G., MOYRAND, F., CASADEVALL, A. et al. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. **MBio**. v. 17, n.3, p. e00945-14, 2014.

GOUVEIRA, V. A.; FERNANDES, B. F. S.; FROTA, E. R. C.; CUNNINGHAM, M. C. Q. S.; CHRISTO, P. R., GOMEZ, R. S. et al. Características Clínicas laboratoriais da Criptococose em Pacientes Admitidos em Pronto Socorro Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Referência Terciária do Sistema Único de Saúde: Análise Retrospectiva desde 2000 a 2013. **Rev Med Minas Gerais**, 28: 2018.

GOVENDER, N. P.; PATEL, J.; WYK, M. V.; CHILLER, T. M.; LOCKHART, S. R. GREER, A. et al. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. **CMAJ**, v. 178, n. 6, p. 715-722, 2008.

GUO, X.; WU, W.; SONG, N.; LI, J.; KONG, D.; KONG, X.; HE, J. et al. Residue dynamics and risk assessment of pyraclostrobin in rice, plants, hulls, field soil, and paddy water. Human and Ecological Risk Assessment: **An International Journal**, v. 23, n. 1, p. 67–81, 2017.

GUSHIKEN, A. C., SAHARIA, K. K., BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 35, n. 2: p. 493-514, 2021.

HAGEN, F.; KHAYKAN, K.; THEELEN, B., KOLECKA, A., POLACHECK, I., SIONOV, E. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 16-48, 2015.

HAMMOND-KOSACK, K., Jones, J. D. G. Responses to plant pathogens. **Biochem. Mol. Biol. Plants** 1, 1102–1156, 2000.

HARRIS, J. R., LOCKHART, S. R., DEBESS, E., MARSDEN-HAUG, N., GOLDOFT, M., WOHRLE, R. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 12, p. 1188-95, Dec 2011.

HENAO-MARTINEZ, A. F., BECKHAM, J. D. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients. **Curr Opin Infect Dis**, v. 28, p. 300-307. 2015.

HOANG, L. M.N.; PHILIPS, P.; GALANIS, E. *Cryptococcus gattii*: a review of the epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and management of this endemic yeast in the Pacific Northwest. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 33, p. 187-195. dez. 2011.

HODGES, D. M., DELONG, J. M., FORNEY, C. F., PRANGE, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604-611, 1999.

HUERFANO, S., CASTAÑEDA, A., CASTAÑEDA, E. Experimental infection of almond trees seedlings (*Terminalia catappa*) with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, p. 131–132. 2001

IDNURM, A.; BAHN, Y. S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A., HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 753-764, 2005.

INACIO, J., PORTUGAL, L., SPENCER-MARTINS, I., FONSECA, A. Phylloplane yeasts from Portugal: seven novel anamorphic species in the tremellales lineage of the Hymenomycetes (basidiomycota) producing orange-coloured colonies. **Fems Yeast Res**, v. 5, p. 1167-1183, 2005.



ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; VALDERRAMA, B.; AOKI, S.; VIDOTTO, V.; OSAFUNE, T. Diversity of laccase among *Cryptococcus neoformans* serotypes. **Microbiology and Immunology**, v. 52, n. 10, p. 492-498, 2008.

JARVIS, J. N.; MEINTJES, G.; WILLIAMS, A. Y.; BROWN, Y.; CREDE, T.; HARRISON, T. S. Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. **Bmc Infectious Diseases**, v. 10, p. 1-6. 2010.

JENKS, M., EIGENBRODE, S., LEMIEUX, B. **Cuticular waxes of Arabidopsis**. Arabidopsis Book 1: e0016, 2002.

JENSEN, W. A. **Botanical Histochemistry**. San Francisco: W.H. Freeman and Company. 1962.

JEONG, R. D., KACHROO, A., KACHROO, P. Blue light photoreceptors are required for the stability and function of a resistance protein mediating viral defense in *Arabidopsis*. **Plant Signal Behav**, v. 5, p. 1504-1509, 2010.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book. 1940.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v. 27, p.137-138, 1965.  
KEESING, F., BELDEN, L. K., DASZAK, P., DOBSON, A., HARVELL, C. D., HOLT, R. D. et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, n. 468, p. 647-652, 2010.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v. 35, p. 51-58, 2007.

KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia Canada and the Pacific Northwest of the United States 2007. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p.1433-1443, 2007.

KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, p. 225e1-225e10. 2011.

KLIEBENSTEIN, D. J., FIGUTH, A., MITCHELL-OLDS, T. Genetic architecture of plastic methyl jasmonate responses in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 161, p. 1685-1696, 2002.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, Edur - Editora Universidade Rural. 1997.

- KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C. A.; GRIFFITHS, E. J. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193-203, 2011.
- KRONSTAD, J., SAIKIA, S., NIELSON, E. D., KRETSCHMER, M., JUNG, W., HU, G. et al. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. **Eukaryot Cell**, v. 11, p. 109-118, 2012.
- KWOK, IM-Y.; LOEFFLER, R. T. The biochemical mode of action of some newer azole fungicides. **Pest Manag Sci**, v. 39, p. 1-11, 1993.
- KWON-CHUNG, K. J., BOEKHOUT, T., FELL, J. W., DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, p. 804-806, 2002.
- KWON-CHUNG, K. J., BENNETT, J. E. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.** v. 257, p. 213-218, 1984.
- KWON-CHUNG, K. J., BENNETT, J. E., WICKES, B. L., MEYER, W., CUOMO, C. A., WOLLENBURG, K. R. et al. The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**. v. 11, n. 1, 2017.
- KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L., BOOTH, J. L.; VISHNIAC, H. S.; BENNETT, J. E. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 55, p. 1751-1754, 1987.
- LAGROU, K., VAN ELDERE, J., KEULEER, S., HAGEN, F., MERCKX, R., VERHAEGEN, J. et al. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. **J Intern Med**, v. 257, p. 385-388, 2005.
- LAZÉRA, M. S., CAVALCANTI, M. A., TRILLES, L., NISHIKAWA, M. M., WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*--evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med Mycol**, v. 36, n. 2, p. 119-122, 1998.
- LEIMANN, B. C., KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro state, Brazil, 1994-2004. **Cad Saude Publica**. v. 24, p. 2582-2592, 2008.
- LEITE JR, D. P., AMADIO, J. V. R. S., MARTINS, E. R., SIMÕES, S. A. A., YAMAMOTO, A. C. A., LEAL-SANTOS, F. A. et al. *Cryptococcus spp* isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Jour Occup Med and Toxic**, v. 7, p.11, 2012.
- LEVITZ, S. M. Does amoeboid reasoning explain the evolution and maintenance of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*? **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 98, n. 26, p. 14760-14762, 2001.
- LI, S., MODY, C. H. **Cryptococcus**. Proceedings of the American Thoracic Society, v. 10, p.186-196, 2010.

- LIMA, C. M. **Caracterização molecular e perfil de susceptibilidade e virulência de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.
- LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p.401-416, 2009.
- LIN, X., HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIU, X. H., LU, J. P., ZHANG, L., DONG, B., MIN, H., LIN, F. C. Involvement of a *Magnaporthe grisea* serine/threonine kinase gene, MgATG1, in appressorium turgor and pathogenesis. **Eukaryot. Cell**, v. 6, p. 997-1005, 2007.
- LIZARAZO, J., ESCANDÓN, P., AGUDELO, C. I., FIRACATIVE, C., MEYER, W., CASTAÑEDA, E. Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997-2011. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3272, 2014.
- LLOYD, A. J., WILLIAM ALLWOOD, J., WINDER, C. L., DUNN, W. B., HEALD, J. K., CRISTESCU, S. M. et al. Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. **Plant J.** v. 67, p. 852– 868, 2011.
- MA, H., HAGEN, F., STEKEL, D. J., JOHNSTON, S. A., SIONOV, E., FALK, R. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 106, n. 31, p. 12980-5, 2009.
- MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in Applied Microbiology**, v.67, p.131-190, 2009.
- MAK, S., KLINKENBERG, B., BARTLETT, K., FYFE, M. Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. **Environ Health Perspect**, v. 118, p. 653–658, 2010.
- MARQUES, J. P. R., SOARES, M. K. M., APPEZZATO-DA-GLORIA, B. New staining technique for fungal-infected plant tissues. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 784-787, 2013.
- MAXSON, M. E.; COOK, E.; CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Fungal Genet Biol**, v. 44, n. 3, p. 180-6, 2007.
- MAY, R. C., STONE, N. R., WIESNER, D. L., BICANIC, T., NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 106-17, 2016.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MCCLELLAND, E. E., BERNHARDT, P., CASADEVALL, A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. **Infect. Immun.** v. 74, n. 3, p. 1500-1504, 2006.

MCFADDEN, D., ZARAGOZA, O., CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 11, p.497-505, 2006.

MCMULLAN, B. J., SORRELL, T. C., CHEN, S. C. A. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. **Future Microbiol.** v. 8, p. 1613-1631, 2013.

MEYER, A. C. L., KENDI, C. K., PENNER, J. A., ODHIAMBO, N., OTIENO, B., OMONDI, E. et al. The impact of routine cryptococcal antigen screening on survival among HIV-infected individuals with advanced immunosuppression in Kenya. **Tropical Medicine and International Health.** v. 18, n.4, p. 495-503, 2013.

MEYER, W., CASTAÑEDA, A., JACKSON, S., HUYNH, M., CASTAÑEDA, E., IBEROAMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, p. 189-195, 2003.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia**. Recife: UFRPE, 2001.

MISHKIN, A. Emerging fungal pathogens in solid organ transplantation. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 4, 2021.

MYLONAKIS, E., AUSUBEL, F. M., PERFECT, J. R., HEITMAN, J., CALDERWOOD, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15675-15680, 2002.

MYLONAKIS, E., MORENO, R., EL KHOURY, J. B., IDNURM, A., HEITMAN, J., CALDERWOOD, S. B., et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

MONTAGNA, M. T., SANTACROCE, M. P., CAGGIANO, G., TATO, D., AJELLO, L. Cavernicolous habitats harbouring *Cryptococcus neoformans*: results of a speleological survey in Apulia, Italy, 1999–2000. **Med Mycol**, v. 41, p. 451–455, 2003.

MORA, D. J.; COLOMBO, E. R. C.; FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L. E.; NASCENTES, G. A. N.; SILVA-VERGARA, M. L. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, p. 1-7, 2011.

MORTENSON, J. A., BARTLETT, K. H., WILSON, R. W., LOCKHART, S. R. Detection of *Cryptococcus gattii* in Selected Urban Parks of the Willamette Valley, Oregon. **Mycopathologia**, v. 175, p.351-355, 2013.

MWABA, P., MWANSA, J., CHINTU, C., POBEE, J., SCARBOROUGH, M., PORTSMOUTH, S. et al. Clinical presentation, natural history and cumulative death rates of 230 adults with primary cryptococcal meningitis in Zambian AIDS patients treated under local conditions. **J Postgrad. Med**, v. 77, p. 769-773, 2001.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NEILL, S., DESIKAN, R., HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 5, no. 5, pp. 388–395, 2002.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG Y.; SIONOV, E.; KWON-CHUNG, K. J. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **mBio**. 2012.

NIELSEN, K., DE OBALDIA, A. L., HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. **Eukaryot Cell**. v. 6, p. 949-592, 2007.

NISHIKAWA, M. M., LAZERA, M. S., BARBOSA, G. G., TRILLES, L., BALASSIANO, B. R., MACEDO, R. C. et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J Clin Microbiol**. v.41, n. 1, p. 73-7. 2003.

NOGUERA, M. C., ESCANDÓN, P., CASTAÑEDA, E. Cryptococcosis in Atlântico, Colombia: an approximation of the prevalence of this mycosis and the distribution of the etiological agent in the environment. **Rev Soc Bras Med Tro**, v. 48, p. 580–586, 2015.

NOSANCHUK, J. D., GOMEZ, B. L., YOUNGCHIM, S., DIEZ, S., AISEN, P., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments *in vitro* and during mammalian infection. **Infect. Immun**. v. 70, p. 9, n. 5124–5131, 2002.

NOSANCHUK, J. D., OVALLE, R. CASADEVALL, A. Glyphosate Inhibits Melanization of *Cryptococcus neoformans* and Prolongs Survival of Mice after Systemic Infection. **The Journal of Infectious Diseases**; 2001.

NOSANCHUK, J. D., STARK, R. E., CASADEVALL, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? **Front Microbiol**. v. 6, p. 1463. 2015.

OKAGAKI, L. H.; STRAIN, A. K.; NIELSEN, J. N.; CHARLIER, C.; BALTES, N. J.; CHRÉTIEN, F. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, 2010.

OKAMOTO, K., HATAKEYAMA, S., ITOYAMA, S., NUKUI, Y., YOSHINO, Y., KITAZAWA, T. et al. *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection in man, Japan, 2007. **Emerg. Infect. Dis**. v. 16, n. 7, p. 1155–1157, 2010.

OLIVER, R.P.; HEWITT, H. G. **Fungicides in Crop Protection**. 2. CABI. 2014.

OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.

OROZCO-NUNNELLY, D. A., MUHAMMAD, D., MEZZICH, R., LEE, B.-S., JAYATHILAKA, L., KAUFMAN, L. S. et al. Pirin1 (*PRN1*) Is a Multifunctional Protein that Regulates Quercetin, and Impacts Specific Light and UV Responses in the Seed-to-Seedling Transition of *Arabidopsis thaliana*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

ORSI, C. F., COLOMBARI, B., ARDIZZONI, A., PEPPOLONI, S., NEGLIA, R., POSTERARO, B. et al. The ABC transporter-encoding gene AFR1 affects the resistance of *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal maturation. **Federation of European Microbiological Societies**. 2008.

OSTERHOLZER, J. J.; SURANA, R.; MILAM, J. E.; MONTANO, G. T.; CHEN, G.; SONSTEIN, J. et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 932-943, 2009.

PARK, B. J., WANNEMUEHLER, K. A., MARSTON, B. J., GOVENDER, N., PAPPAS, P. G., CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PASQUALOTTO A. C.; DENNING, D. W. Diagnosis of invasive fungal infections - current limitations of classical and new diagnostic methods. **Eur Oncol Rev**. p. 1-5, 2005

PEMÁN, J., SALAVERT, M. General epidemiology of invasive fungal disease. **Enferm Infec Microbiol Clin**, v. 30, n. 2, p. 90-98, 2012.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, p. 395-404. jul. 2005.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 1, p. 291-322, 2010.

PERKIN, A. G. The yellow colouring principles of various Tannin Matters. **J Chem Soc London**, v. 71, p. 1131-1138, 1897.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R., TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513-521, 2009.

PRATES, A. R., FUCHS, B. B., MIZUNO, K., NAVQI, Q., KATO, I. T., RIBEIRO, M. S., et al. Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **Plos One**, v. 8. 2013.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

RADOSA, S., HILLMANN, F. Host-pathogen interactions: lessons from phagocytic predation on fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 26, n. 62: p. 38-44, 2021.

RAJASINGHAM, R., SMITH, R. S., PARK, B. J., NARVIS, J. N., GOVENDER, N. P., CHILLER, T. M., et al., 2017. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infect. Dis**, v. 3099, 1–9.

REN, P., SPRINGER, D. J., BEHR, M. J., SAMSONOFF, W. A., CHATURVEDI, S., CHATURVEDI, V. Transcription factor STE12alpha has distinct roles in morphogenesis, virulence, and ecological fitness of the primary pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 1065-1080, 2006.

REUWSAAT, J. C. V., DOERING, T. L., KMETZSCH, L. Too much of a good thing: Overproduction of virulence factors impairs cryptococcal pathogenicity. **Microb Cell**, v. 20, n. 5: p. 108-110, 2021.

RIBEIRO, N. Q.; COSTA, M. C.; MAGALHÃES, T. F. F.; CARNEIRO, H. C. S.; OLIVEIRA, L. V.; FONTES, A. C. L. et al. Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 49, p. 695-702, 2017.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p.i5-i11, 2005.

RIGOTTO, R. M., VASCONCELOS, D. P., ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cad Saude Publica**. v. 30, p. 1360-1362, 2014.

ROBERTS, G.; HORSTMEIER, C. D.; LAND, G. A.; FOXWORTH, J. H. Rapid urea broth test for yeast. **J. Clin. Microbiol**. v. 7: p. 584-588, 1978.

RODRIGUES, J.; FONSECA, F. L.; SCHNEIDER, R. O.; GODINHO, R. M. C.; FIRACATIVE, C.; MASZEWSKA, K. et al. Pathogenic diversity amongst serotype C VGIII and VGIV *Cryptococcus gattii* isolates. **Sci Rep**, v. 5, p. 117 17, 2015.

ROSARIO, I.; ACOSTA, B.; COLOM, F. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p.S13-S18, mar. 2008.

RUTHERFORD, J. C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **PLoS Pathog**. v. 10, n. 5, p. e1004062, 2014.

SANTOS, D. A., BARROS, M. E. S., HAMDAN, J. S. Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal Clinical Microbiology**. vol. 44, p. 98-101, 2006.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, L. F.; TAYLOR, E. L. S.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; et al. Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, V. 56, n.5, p.2553. 2012.

SANTOS, J. R. A., HOLANDA, R. A., FRASES, S., BRAVIM, M., ARAUJO, G. S., SANTOS, P. C., COSTA, M. C. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. **Plos One**, v. 9, p. p. e112669, 2014.

SAUL, N., KROCKENBERGER, M., CARTER, D. Evidence of recombination in mixed-mating-type and alphaonly populations of *Cryptococcus gattii* sourced from single *Eucalyptus* tree hollows. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 4, p. 727-734, 2008.

SCHRAG, S. J., WIENER, P. Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution? **Trends Ecol. Evol.** v. 10, n. 8, p. 319-324, 1995.

SCHULZ, B., BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol. Res.** v. 109, p. 661-686, 2005.

SEBOLAI, O. M., POHL, C. H., BOTES, P. J., STRAUSS, C. J., VAN WYK, P. W., BOTHA, A. et al. 3-hydroxy fatty acids found in capsules of *Cryptococcus neoformans*. **Can J Microbiol**, v. 53, p. 809-812, 2007.

SEBOLAI, O. M., POHL, C. H., BOTES, P. J., VAN WYK, P. W., KOCK, J. L. The influence of acetylsalicylic acid on oxylipin migration in *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* UOFS Y-1378. **Can J Microbiol**, v. 54, p. 91-96, 2008a.

SEBOLAI, O. M., POHL, C. H., BOTES, P. J., VAN WYK, P. W., MZIZI, R., SWART, C. W. et al. Distribution of 3-hydroxy oxylipins and acetylsalicylic acid sensitivity in *Cryptococcus* species. **Can J Microbiol**, v. 54, p. 111-118, 2008b.

SEIDER, K., HEYKEN, A., LUTTICH, A., MIRAMÓN, P., HUBE, B. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 13, p. 392-400, 2010.

SERNA-ESPINOSA, B., GUZMÁN-SANABRIA, D., FORERO-CASTRO, M., ESCANDÓN, P., SÁNCHEZ-QUITIAN, Z. A. Environmental Status of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia. **J Fungi**, v. 7, n. 6: 410, 2021.

SEVERO, C.B.; XAVIER, M. O.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Cryptococcosis in children **Pediatric Respiratory Reviews**, v. 10, p. 166-171, 2009.

SHARP, S. E. *Cryptococcus gattii*. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 31, n. 11, p.84-86, 2009.



SIFUENTES-OSORNIO, J., CORZO-LEON, D. E., PONCE-DE-LEON, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Curr. Fungal Infect. Rep.** v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.

SILVA, D. C., MARTINS, M. A., SXESXS, M. W., BONFIETTI, L. X., MATOS, D., MELHEM, M. S. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 72, p.332-339, 2012.

SILVA, D. L. **Atividade antifúngica de extratos de plantas medicinais em amostras de *Candida albicans* isoladas de mucosa bucal.** Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas: Ênfase em Microbiologia). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

SOARES, E. A. **Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012).** Dissertação. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. BR526.1 – Biblioteca de Saúde Pública. Base de dados LILACS. 2015.

SORRELL, T. C., JUILLARD, P., DJORDJEVIC, J. T., KAUFMAN-FRANCIS, K., DIETMANN, A., MILONIG, A. et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes Infect.** v.18, n. 1, p.57-67, 2016.

SOUZA, A. C. M. **Propriedades antifúngicas de *Aspidosperma ramiflorum* sobre dermatófitos e *Cryptococcus neoformans*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Microbiologia), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, 2006.

SOUZA, L. K. H, FERNANDES, O. F. L., KOBAYASHI, C. C. B. A., PASSOS, X. S., COSTA, C. R., LEMOS, J. A. et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. **Rev Inst Med Trop S. Paulo**, v. 47, p. 253-256, 2005.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Anal. Chim. Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

SPRINGER, D. J. **The unique impact of environment on virulence of the pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*, in Biomendical Sciences.** 2009, State University of New York at Albany. p. 317.

SPRINGER, D.J., CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p.14-20, 2010.

SPRINGER, D. J., MOHAN, R., HEITMAN, J. Plants promote mating and dispersal of the human pathogenic fungus *Cryptococcus*. **PLOS ONE**, Feb. 17, 2017.

SPRINGER, D. J., REN, P., RAINA, R., DONG, Y., BEHR, M. J., MCEWEN, B. F. et al. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for

ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e10978, 2010.

STEENBERGEN, J. N., CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes Infec**, v. 5, p. 667-675, 2003.

STEENBERGEN, J. N., SHUMAN, H. A., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Vol. v. 18, n. 26, p.15245-15250. 2001

TABORDA, C. P., DA SILVA, M. B., NOSANCHUK, J. D., TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165n. 4-5, p. 331-339, 2008.

THOMAS, C. J.; LEE, J. Y.; CONN, L. A.; BRADLEY M. E., GILLESPIE R. W., DILL S. R. et al. Surveillance of cryptococcosis in Alabama, 1992-1994. **Annals of Epidemiology**, v. 8, n. 4, p.212-216, 1998.

THOMPSON, G. R.; WIEDERHOLD, N. P.; NAJVAR, L. K.; BOCANEGRA, R.; KIRKPATRICK, W. R.; GRAYBILL, J. R. et al. A murine model of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **Journal of Antimicrob Chemother**; v.67, p.1432-1438. 2012.

TOIVONEN, A., ERIKSSON, M., FRIBERG, N., HAUTALA, T., KÄÄRIÄINEN, S., LEPPÄÄHO-LAKKA, J. et al. Clinical characteristics and evaluation of the incidence of cryptococcosis in Finland 2004-2018. **Infect Dis (Lond)**, v. 11: p. 1-7, 2021.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* obtained through population-based surveillance, South Africa, 2002-2003 and 2007-2008. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, p. 1-34. mar. 2011.

TRILLES, L., TURNIDGES, J., *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: An International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B and Flucytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. vl.56, n. 6. p. 3107-3113. 2012.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 455-462. 2008.

UEJIO, C., MAK, S., MANANGAN, A., LUBER, G., BARLETT, K. H. Climatic influences on *Cryptococcus gattii* populations, Vancouver Island, Canada, 2002–2004. **Emerg Infect Dis**. v. 21, p. 1989-1996, 2015.

URAI, M., KANEKO, Y., UENO, K., OKUBO, Y., AIZAWA, T., FUKAZAWA, H. et al. Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by

Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 6, n. 5, p. 101. 2016.

URBAN, C. F., LOURIDO, S., ZYCHLINSKY, A. How do microbes evade neutrophil killing? **Cell Microbiol**, v. 8, p. 1687-1696, 2006.

VAN DUIN, D. et al. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 6, p. 2014-20, 2004.

VEAL, E. A., DAY, A. M., MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular Cell**, vol. 26, no. 1, pp. 1–14, 2007.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59-66, 2000.

VIDAL, J. E., OLIVEIRA, A. C. P., FINK, M. C., PANNUTI, C. S., TRUJILLO, J. R. AIDS related progressive multifocal leukoencephalopathy: A retrospective study in a referral center in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 50, p. 209-212, 2008.

VILAS-BÔAS, A. M., ANDRADE-SILVA, L. E., FERREIRA-PAIM, K., MORA, D. J., FERREIRA, T. B., SANTOS, D. A. et al. High genetic variability of clinical and environmental *Cryptococcus gattii* isolates from Brazil. **Med Mycol**, v. 58, n. 8: p. 1126-1137, 2020.

VIVIANI, M. A., COGLIATI, M. ESPOSTO, M. C., LEMMER, K., TINTELNOT, K., COLOM VALIENTE, M. F. et al. Cryptococcosis working group. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 614-619, 2006.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. **Eukaryotic Cell**, v.9, p.835-846, 2010.

WANG, J., LOU, J., LUO, C., ZHOU, L., WANG, M., WANG, L. Phenolic compounds from *Halimodendron halodendron* (Pall.) Voss and their antimicrobial and antioxidant activities. **Int. J. Mol. Sci.** v. 13, p. 11349-11364, 2012.

WARPEHA, K. M., PARK, Y., WILLIAMSON, P. R. Susceptibility of Intact Germinating *Arabidopsis thaliana* to Human Fungal Pathogens *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 2979-2988, 2013.

WEISCHENFELDT, J.; PORSE, B. **Bone marrow-derived macrophages (BMM):** isolation and applications. CSH Protoc, 2008.

WILLIAMSON, P. R., JARVIS, J. N., PANACKAL, A. A., FISHER, M. C., MOLLOY, S. F., LOYSE, A. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nat Rev Neurol**, v. 13, n. 1: p. 13-24, 2017.

XUE, C.; TADA, Y.; DONG, X.; HEITMAN, J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell Host & Microbe**, v.1, n. 4, p. 263-273, 2007.

ZARAGOZA, O.; CHRISMAN, C. J.; CASTELLI, M. V.; FRASES, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol*, v. 10, n. 10, p. 2043-57, 2008.

ZARAGOZA, O.; GARCÍA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J. D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CASADEVALL, A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathog.** v. 6, n. 6, 2010.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHU, S., LI, Y., GAO, H., HOU, G., CUI, X., CHEN, S. et al. Identification and assessment of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection by blood serum surface-enhanced Raman spectroscopy. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 20, n. 260, 2021.

## ANEXOS

### Anexo 1. Certificado do Comitê de Ética No Uso de Animais



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

### CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 306 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Efeito de agroquímicos na virulência e resistência cruzada de *Cryptococcus gattii* em modelo murino”, que tem como responsável Daniel de Assis Santos, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/10/2015. Este certificado espira-se em 05/10/2020.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 306 / 2015, related to the Project entitled “Agrochemicals effect in the virulence and cross resistance of *Cryptococcus gattii* in mice.”, under the supervision of Daniel de Assis Santos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/10/2015. This certificates expires in 05/10/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 05/10/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)