



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS* DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS - CCMF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - PCF

**AÇÃO DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* SOBRE  
ISOLADOS de *Cryptococcus neoformans* AMBIENTAIS**

**MARILU CHAVES GOMES DRESCH CAMARGO**

**CASCAVEL - PR**

**2022**

**MARILU CHAVES GOMES DRESCH CAMARGO**

**AÇÃO DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* SOBRE  
ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans* AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

**CASCADEL - PR**

**2022**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Chaves Gomes Dresch Camargo, marilu  
Ação de micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*  
sobre isolados de *Cryptococcus neoformans* ambientais /  
marilu Chaves Gomes Dresch Camargo; orientador Rinaldo  
Ferreira Gandra. -- Cascavel, 2022.  
36 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências  
Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, 2022.

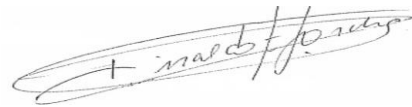
1. Atividade antifúngica. 2. *Cryptococcus neoformans*. 3.  
Levedura killer. 4. Toxina killer. I. Ferreira Gandra,  
Rinaldo, orient. II. Título.

**MARILU CHAVES GOMES DRESCH CAMARGO**

**AÇÃO DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* SOBRE  
ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans* AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.  
Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

**BANCA EXAMINADORA:**




---

Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
UNIOESTE  
Orientador

---

Prof. Dr. Tarcísio Vítor Augusto Lordani  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
UNIOESTE



---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Andréia Sanches Conegero  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
UNIOESTE

**Cascavel - PR  
2022**

## BIOGRAFIA RESUMIDA

Marilu Chaves Gomes Dresch Camargo, natural de Cruz Alta- Rio Grande do Sul, Brasil, nascida no dia 15 de abril de 1983, graduada em Enfermagem pela Faculdade Assis Gurgacz – FAG em dezembro de 2009. Especialista em Enfermagem do Trabalho pela FAMIPAR. Trabalha no Pronto Socorro do Hospital Universitário do Oeste do Paraná, de outubro de 2006 até o momento. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2020. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Dr. Rinaldo Ferreira Gandra.

## **AÇÃO DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* SOBRE ISOLADOS de *Cryptococcus neoformans* AMBIENTAIS**

### **RESUMO**

O *Cryptococcus neoformans* é uma levedura oportunista que pode se alojar no sistema nervoso central causando meningite, meningoencefalite e encefalite, principalmente em indivíduos com algum comprometimento do sistema imune; sendo responsável por 4,5 % das infecções oportunistas que acometem pacientes imunodeprimidos. O uso de antifúngicos pode levar a resistência e toxicidade. As micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* são capazes de inibir o crescimento de microrganismos eucariotos e procariotos. O objetivo deste trabalho é avaliar a susceptibilidade das cepas de *Cryptococcus neoformans*, frente às micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*. Os resultados mostraram, pelo teste de microdiluição em caldo, que 100% das cepas de *Cryptococcus neoformans* testadas foram inibidas quando utilizado o sobrenadante de cultura contendo micocinas. No teste de produção de proteinases, 50% das cepas testadas foram fortemente produtoras de proteinases. Todas as cepas que tiveram a sua atividade enzimática fortemente positivas foram inibidas quando testadas em meio de cultura contendo uma concentração subinibitória de  $\beta$ -glucanases. Diante disso, podemos afirmar que as micocinas possuem um potencial farmacológico vasto.

### **PALAVRAS-CHAVE:**

Atividade antifúngica; *Cryptococcus neoformans*; levedura *killer*; toxina *killer*.

## **ACTION OF MYCOKINES PRODUCED BY *Wickerhamomyces anomalus* ON ENVIRONMENTAL ISOLATES OF *Cryptococcus neoformans***

### **Abstract**

*Cryptococcus neoformans* is an opportunistic yeast that can lodge in the central nervous system causing meningitis, meningoencephalitis and encephalitis, mainly in individuals with some compromised immune system; being responsible for 4.5% of opportunistic infections that affect immunosuppressed patients. The use of antifungals can lead to resistance and toxicity. The mycocins produced by *Wickerhamomyces anomalus* capable of inhibiting the growth of eukaryotic and prokaryotic microorganisms. The objective of this work is to evaluate the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* strains against mycocins produced by *Wickerhamomyces anomalus*. The results showed, by the broth microdilution test, that 100% of the *Cryptococcus neoformans* strains tested were inhibited when the culture supernatant containing mycocins was used. In the proteinase production test, 50% of the strains tested were strongly proteinase producers. All strains that had their enzymatic activity strongly positive were inhibited when tested in culture medium containing a sub-inhibitory concentration of  $\beta$ -glucanases. Therefore, we can say that mycocins have a vast pharmacological potential.

### **Keywords**

Antifungal activity; *Cryptococcus neoformans*; killer yeast; killer toxin.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Leveduras <i>killer</i>	9
1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Recuperação de cepas ambientais de <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
3.2 <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	18
3.3 Produção de micocinas de <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	18
3.4 Determinação da atividade de $\beta$ -glucanases	18
3.5 Atividade antimicrobiana em meio sólido	19
3.6 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição	19
3.7 Pesquisa de proteinases e inibição de proteinases por micocinas	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.2 Determinação da atividade de $\beta$ -glucanases	22
4.3 Atividade antimicrobiana em meio sólido	22
4.4 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição	23
4.5 Pesquisa de proteinases e inibição de proteinases por micocinas	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
6. REFERÊNCIAS	30



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Leveduras *killer*

Poucas leveduras são capazes de produzir micocinas, que também são conhecidas como toxinas *killer*. Elas possuem grande biodiversidade quanto as suas características bioquímicas, genéticas e do seu modo de ação. Apesar dessa diversidade, todas as micocinas conhecidas são proteínas de baixo peso molecular ou glicoproteínas tóxicas a micro-organismos eucariotos ou procariotos sensíveis (BUZDAR et al., 2011).

A sua ação ocorre por meio de efeitos letais, após a ligação da micocina a receptores específicos na parede celular e na membrana plasmática (PUCHKOV et al., 2001; GOLUBEV,2006). Em seguida, ocorre a translocação para o citoplasma, onde causam aumento da permeabilidade da membrana plasmática, levando ao extravasamento de íons potássio, ATP e metabólitos; inibição da síntese de DNA, quitina, manoses e de  $\beta$ -1,3-glucano; interrupção da fase G1 do ciclo celular (SANTOS et al., 2002; SANTOS; MARQUINA, 2004; GOLUBEV, 2006; LIMA et al.,2013).

No passado a identificação de espécie e a classificação do gênero de microrganismos eram realizadas de acordo com o fenótipo, ou seja, com as características morfológicas, assimilação de açúcares e capacidade de crescimento em determinados meios. Isso gerava uma série de incertezas e erros na classificação dos microrganismos. Assim, com o surgimento do sequenciamento do DNA, a determinação taxonômica passou a ser feita por comparação genética e, desde então, vários microrganismos vêm sendo reclassificados. É o exemplo de *Wickerhamomyces anomalus*, antigamente conhecida como *Pichia anomala* e *Hansenula anomala*, que posteriormente foram inseridos no gênero *Wickerhamomyces* (KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008; KURTZMAN, 2011; RUYTERS et al., 2015).

*Wickerhamomyces anomalus* foi a primeira produtora de micocinas descoberta a ser capaz de inibir o crescimento, tanto de organismos eucariotos, quanto de procariotos patogênicos (POLONELLI et al., 1986; POLONELLI et al., 2011). Pesquisas comprovam que algumas cepas de *Wickerhamomyces anomalus* são capazes de produzir altos níveis de micocinas (CRAY et al., 2013).

Trata-se de uma levedura heterotática, que pode reproduzir-se das duas formas: assexuada (por brotamento) e sexuada (formando ascósporos em forma de chapéu). Está amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em frutas, plantas, cereais, vegetais, produtos ricos em açúcar, solo, intestino de insetos, água e no meio marinho (WALKER, 2011; SATORA et al., 2014).

Há muitos anos as leveduras desempenham um papel chave em processos industriais, como por exemplo, na otimização da fermentação de massas e inibição de fungos contaminantes de frutas e grãos de cereais como *Aspergillus flavus* (produtor de aflotoxina) (GORETTI et al., 2009; CODA et al., 2011; LIMA et al., 2014; HUA et al., 2015).

A maioria das leveduras não são patogênicas e não produzem micotoxinas e/ou esporos alergênicos, além de se adaptarem facilmente às diversas condições ambientais. Diante dessas vantagens, as leveduras com potencial *killer* vem sendo utilizadas para o controle biológico de alimentos, como alternativa aos fungicidas químicos para fungos contaminantes pós-colheita (FREDLUND et al., 2002; OLSTORPE; PASSOTH, 2011).

Também podem ser aplicadas nos mais diversos processos biotecnológicos como: rações, fermentação de produtos lácteos e na otimização da produção de bebidas (SCHNEIDER et al., 2012). Na produção de cervejas e vinhos, as condições de produção são favoráveis à contaminação microbiana (rico em nutrientes, temperatura e umidade adequada). Deste modo, o uso de micocinas auxilia no combate a microrganismos contaminantes e contribui na qualidade sensorial do produto, conferindo melhor cor, sabor e aroma à bebida (LAILILA et al., 2011; SWANGKEAW et al., 2011; SATORA et al., 2014; SCHWENTKE et al., 2014).

Kagiyama et al., (1988) isolaram *W. anomalus* de shoyu, importante ingrediente na culinária oriental, o qual revelou ser capaz de produzir micocinas na presença de proteases e alta concentração de cloreto de sódio, características deste produto. Este resultado mostra que micocinas de *W. anomalus* podem auxiliar no controle de microrganismos contaminantes do shoyu, os quais degradam o produto, como bactérias produtoras de ácido lático e fermentadoras alcólicas.

Estudos mostraram a atividade inibitória de *W. anomalus* sobre as espécies de leveduras *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, as quais possuem importância clínica devido à sua capacidade de provocar infecções. Desta forma, foi evidenciado o potencial de *W. anomalus* para aplicação na medicina através do desenvolvimento de produtos antibióticos a base de micocinas (GUO et al., 2013; TAY; LIM; TAN, 2014).

Micocina semi-purificada de *W. anomalus* mostrou atividade inibitória quando testada por via tópica sobre lesões em animais, provocadas por *Malassezia furfur* e *Malassezia pachydermatis*. Este estudo *in vivo* fundamenta o potencial inibitório de micocinas, via tópica, no tratamento de microrganismos sensíveis (POLONELLI et al., 1986).

Para o tratamento de micoses por via sistêmica, é necessário um longo tratamento com antifúngicos, os quais causam efeitos colaterais como problemas gastrointestinais e hepatotoxicidade, além de serem passíveis de interação com outros medicamentos. Portanto, o uso de micocinas no tratamento tópico dessas infecções poderia otimizar o tratamento destes pacientes, reduzindo a dose do tratamento via oral (IZGU; ALTINBAY; TURELI, 2007a).

*W. anomalus* está naturalmente presente na microbiota intestinal e nas gônadas de mosquitos *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, tendo uma relação simbiótica com os insetos, ou seja, o inseto proporciona à levedura um local para a sobrevivência, enquanto ela o oferece nutrientes e proteção contra microrganismos patogênicos. Como já é conhecido, estes insetos são os vetores de várias doenças como dengue, febre amarela e malária. Estudos feitos por Ricci et al., (2011) abordam o interesse sobre *W. anomalus* no biocontrole de doenças transmitidas pelos mosquitos citados acima.

Outros estudos mostram que as micocinas produzidas por *W. anomalus* são capazes de inibir o desenvolvimento de outros microrganismos competidores presentes no meio ambiente e pode ser utilizada em diversos processos ligados à área da saúde.

Faz-se necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos devido ao aumento de microrganismos patogênicos resistentes às drogas antimicrobianas. As

micocinas apresentam um grande potencial e são consideradas fontes naturais de propriedades antimicrobianas contra agentes patogênicos, devido a sua ampla ação inibitória contra fungos e bactérias, os quais são causadores de infecções em animais e humanos (MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015).

Na busca pelo desenvolvimento de alternativas antimicrobianas para patógenos resistentes, faz-se necessário o estudo para a descoberta de substâncias minimamente agressivas e de baixa toxicidade ao organismo humano e que apresentem níveis de segurança ideais (PARIS et al., 2016; YU et al., 2021). Os antibióticos disponíveis atualmente podem ter efeitos críticos no organismo do paciente, como fotossensibilidade, ototoxicidade, condrotoxicidade, retinopatia e neuropatias. Ainda, algumas evidências mostram que a exposição crônica aos antibióticos desde o início da vida ocasiona efeitos negativos na homeostase intestinal e na barreira epitelial da pele (YU et al., 2021).

A avaliação da toxicidade aguda é a primeira etapa de triagem para ponderação de suas propriedades tóxicas para um composto bioativo. Os ensaios de toxicidade aguda simulam e buscam determinar os efeitos adversos de uma substância em uma única ou múltiplas exposições durante um curto período de tempo. Uma vez que a citotoxicidade de células de mamíferos a agentes antimicrobianos é uma das limitações para a sua aplicação é importante avaliar a potencial toxicidade das micocinas. As micocinas são classificadas tendo nula toxicidade ou quase nula em células humanas (SONG et al., 2017; SOLTANI et al., 2021).

Paris et al. (2016) avaliaram a toxicidade das micocinas produzidas por *W. anomalus* em eritrócitos humanos, concluindo que as micocinas não foram tóxicas para as células testadas, apresentando hemólise de apenas 5,2%, constatando também que os efeitos tóxicos das micocinas foram mínimos quando comparados aos efeitos da Anfotericina B. Junges et al. (2020), evidenciaram a baixa toxicidade em teste de hemólise. Em ensaio com *Artemia Salina* constataram mais uma vez que as micocinas produzidas por *W. anomalus* não são tóxicas, uma vez que não apresentaram toxicidade nos microcrustáceos. Dessa forma, as micocinas são consideradas substâncias naturais de baixa toxicidade em células humanas, sendo fortes candidatas ao desenvolvimento

de novos antimicrobianos com grande potencial de aplicação e interesse para a indústria farmacêutica (JUNGES et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2020; PARIS et al., 2016).

Levando em consideração a resistência antimicrobiana, o impacto negativo dos antifúngicos como por exemplo a nefro toxicidade dos mesmos e o pequeno e ineficaz arsenal farmacológico disponível, é relevante propor uma alternativa para o tratamento.

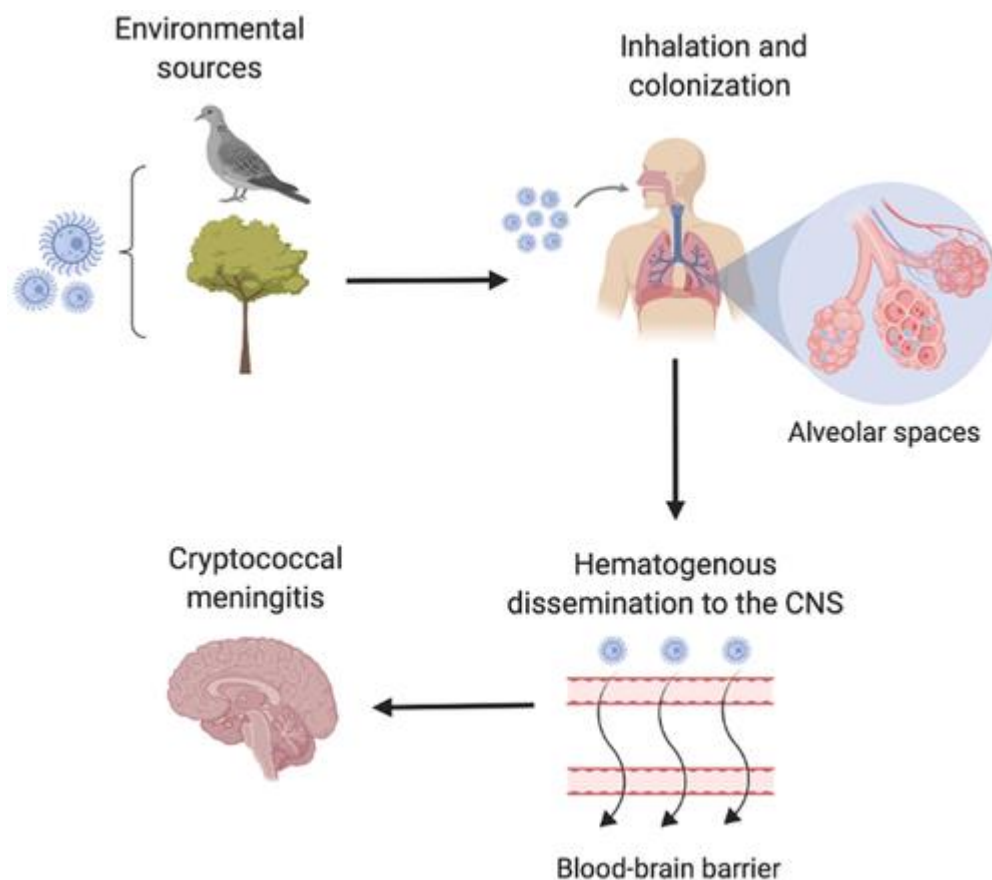
## **1.2 *Cryptococcus neoformans***

*Cryptococcus neoformans* é um fungo dimórfico que causa meningoencefalite letal principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Diferentes morfotipos permitem que esse fungo ambiental e patógeno oportunista se adapte a diferentes nichos naturais e exiba diferentes níveis de patogenicidade em vários hospedeiros (ZHAO Y, LIN X, 2021).

*Cryptococcus neoformans* tem sido reconhecido como um fungo ambiental e um patógeno oportunista desde sua descrição em 1894 e 1895, quando *C. neoformans* foi isolado de uma infecção óssea e suco de frutas fermentado ( OTTO, 1894 ; SANFELICE, 1895 ). Este basidiomiceto é onipresente no ambiente e é comumente isolado de excretas de aves, solo e árvores. Conseqüentemente, a exposição assintomática por inalação de esporos ou células de leveduras dessecadas é comum na população em geral, mas pode levar à criptococose pulmonar e sistêmica em indivíduos com sistema imunológico comprometido. A criptococose sistêmica, cuja manifestação clínica mais comum é a meningoencefalite criptocócica, causa 15% das mortes relacionadas à AIDS em todo o mundo (DROMER ET AL., 2011 ; PERFEITO, 2015 ). No complexo de espécies patogênicas, *C. neoformans* geralmente causa criptococose sistêmica em pacientes imunocomprometidos.

Dentro do ambiente, *C. neoformans* é encontrado de forma ubíqua, geralmente associado a excrementos de pombos e várias espécies de árvores (por exemplo, eucalipto) (MAY et al., 2016 ). Os hospedeiros são infectados quando esporos ou células fúngicas dessecadas são inaladas, que posteriormente colonizam os espaços alveolares e proliferam no pulmão. Os fungos inalados passam a se disseminar por todo o corpo e passam hematogenicamente pela barreira hematoencefálica para invadir o sistema nervoso central (SNC). Para indivíduos imunocomprometidos, a incapacidade

de eliminar a infecção promove a disseminação de células fúngicas para o SNC, enquanto que em indivíduos imunocompetentes, a formação de granuloma nos pulmões previne infecção adicional (SHOURIAN e QURESHI, 2019).



Fonte: Bermas,2020.

Figura 1: Ciclo de infecção de *Cryptococcus neoformans*. Inalação de células dessecadas criptocócicas ou “esporos” de fontes ambientais, incluindo solo, plantas e excrementos de aves. Os fungos inalados colonizam os espaços alveolares e atravessam hematogenicamente a barreira hematoencefálica, disseminando-se para o sistema nervoso central (SNC), onde a meningite criptocócica pode se desenvolver.

Para cumprir a tarefa de infecção, *C. neoformans* produz fatores de virulência, incluindo uma cápsula polissacarídica, melanina e enzimas extracelulares, além de termotolerância a 37°C. A regulação desses fatores de virulência é comumente associada à ativação da cascata de sinalização AMPc/Proteína Quinase A, que desempenha um papel na modulação direta da virulência em *C. neoformans*. A cápsula polissacarídica envolve o corpo celular de *Cryptococcus* spp., protegendo a célula da

dessecação e estresse oxidativo e interrompendo as respostas imunes do hospedeiro; CASADEVALL *et al.*, 2019).

A produção de melanina fornece proteção contra estressores, como estresse oxidativo, radiação ultravioleta e drogas. As células criptocócicas também secretam enzimas extracelulares para promover a sobrevivência dentro de um hospedeiro, incluindo fosfolipases, proteinases e urease com funções importantes no suporte da integridade da parede celular, desestabilizando as membranas celulares do hospedeiro e aumentando a capacidade invasiva de fungos após a infecção de um hospedeiro (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Por fim, *C. neoformans* sofre um aumento de temperatura ao entrar no hospedeiro mamífero, tornando a termotolerância a 37°C um fator de virulência essencial. Vários genes associados à termotolerância são suspeitos de desempenhar um papel na manutenção da integridade da parede celular e no enfrentamento do estresse (BLOOM *et al.*, 2019).

As características incomuns do envelope da célula criptocócica atraíram atenção considerável. A cápsula polissacarídica está aderida à parede celular, mas muitas vezes se desprende copiosamente para o meio extracelular. A cápsula aumenta a evasão de *Cryptococcus* da detecção do hospedeiro, inibe a fagocitose e suprime as funções imunológicas do hospedeiro. A parede celular criptocócica é enriquecida com quitosana, a forma desacetilada do componente fúngico universal quitina. A quitosana também contribui para a evasão do hospedeiro criptocócico. A melanina ancorada na camada de quitina da parede celular protege o fungo de ataques bióticos e abióticos, incluindo radiação e espécies reativas de oxigênio. *Cryptococcus* sintetiza melanina a partir de vários substratos fenólicos, incluindo o neurotransmissor dopamina. Esses recursos contribuem coletivamente para *Cryptococcus* como um patógeno furtivo (BAHN YS *et al.*, 2020).

Entre os principais artifícios para a instalação da infecção do fungo estão a presença de cápsula polissacarídica, que é considerada um fator antifagocítico, possuindo também um efeito deletério sobre o sistema imune, provocando uma diminuição da liberação de citocinas por macrófagos ou monócitos, além de reduzirem a migração de leucócitos para o sítio de inflamação (Bose *et al.*, 2003); a capacidade de sobreviver e se replicar a 37°C, com essa capacidade a temperatura corporal não acaba

sendo um fator limitante para seu crescimento; a capacidade de síntese da melanina, que protege o fungo contra o ataque oxidativo; a produção de fosfolipases, que pode resultar em desestabilização de membranas, lise celular e liberação de lipídeos; a produção de proteinases, que são enzimas que degradam o colágeno, digerem proteínas de importância imunológica e facilitam a adesão e sobrevivência do patógeno em superfícies mucosas (PEDROSO, 2008).

O neurotropismo é em parte explicado devido às propriedades singulares do cérebro e barreira hematoencefálica (BHE), tornando esta localização privilegiada ao escape imunológico, comparativamente aos outros órgãos. O *C. neoformans* atravessa a BHE e entra no Sistema Nervoso Central e, como não está sob uma resposta imunológica tão vigorosa, vai se proliferando e crescendo (PINCER, 2012).

No imunocompetente, a criptococose pode ser assintomática em 1/3 dos casos, e o achado radiológico mais comum é o nódulo pulmonar, resultado de granuloma pulmonar periférico ou de pneumonia granulomatosa. Os nódulos são tipicamente de localização subpleural podendo ser solitários ou múltiplos, variando em diâmetro de 0,5 a 4,0cm (KON. *et al*, 2008).

Considerando que o *Cryptococcus neoformans* é uma levedura oportunista que pode se alojar no sistema nervoso central causando meningite, meningoencefalite e encefalite, principalmente em indivíduos com algum comprometimento do sistema imune; o uso de antifúngicos pode levar a resistência e toxicidade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a susceptibilidade das cepas de *Cryptococcus neoformans*, frente às micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obter sobrenadante contendo micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* (WA92);



- Avaliar a atividade das micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *Wickerhamomyces anomalus* (WA92) e a inibição de *Cryptococcus neoformans* em meio sólido;
- Avaliar, pela metodologia de microdiluição em caldo, se as cepas de *Cryptococcus neoformans* são susceptíveis à ação do sobrenadante contendo micocinas *Wickerhamomyces anomalus* (WA92);
- Avaliar a produção de proteinases por *Cryptococcus neoformans* e, posteriormente, a inibição de sua atividade por micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* (WA92).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Recuperação de cepas ambientais de *Cryptococcus neoformans*

Cepas de isolados de *Cryptococcus neoformans* ambientais encontram-se congeladas no Laboratório de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE), e para recuperação das mesmas foi utilizado um meio contendo 1,2% de ágar ágar, 1% de peptona, 1% de glicose, 1% de BHI (Brain Heart Infusion) e 1% de extrato de malte. Esse meio foi esterilizado na autoclave e disposto em placas de Petri estéreis. Após foi semeado cada uma das 23 cepas, e armazenado em estufa a 32° C por sete dias. Desses ao final, depois de cinco tentativas de recuperação das cepas, foi recuperado um total de 16 cepas.



### 3.2 *Wickerhamomyces anomalus*

A levedura de *W. anomalus* (WA92) produtora de micocinas molecularmente identificada (depositada no GenBank número de acesso: KT580792 - Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) foi coletada do solo, às margens do Lago de Itaipu, na cidade de Foz do Iguaçu, localizado no estado do Paraná, Brasil. Atualmente, essa levedura faz parte da micoteca do LACEPE.

### 3.3 Produção de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*

Para a produção das micocinas, a cepa WA92 foi semeada em *Ágar Sabouraud Modificado* (2% ágar, 1% de peptona, 2% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico), pH  $4,7 \pm 2$ , incubado a 32 °C por 48 horas. Após 48 horas, essa cepa foi inoculada em garrafas de Roux contendo 200 mL de caldo *Sabouraud Modificado* (1% de peptona, 2% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico), pH  $4,7 \pm 2$ , incubado a 25 °C por 5 dias. Após, o caldo foi centrifugado a 6000 rpm/10 minutos, obtendo o sobrenadante, que então foi esterilizado por membrana filtrante 0,22 µm e armazenado a 4 °C.

### 3.4 Determinação da atividade de β-glucanases

Para a determinação da atividade de β-glucanases presente no sobrenadante contendo as micocinas de *W. anomalus* WA92 foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959), com adaptações, utilizando a laminarina 1% (*Laminaria digitata*), tampão acetato 50 mM, em pH 5,0. Foi preparada uma solução contendo 62,5 µL do sobrenadante com as micocinas de *W. anomalus* WA92 e 125 µL de laminarina 1%; em seguida, a solução foi incubada a 37 °C durante 10 minutos. Após a incubação, foram retirados 100 µL da solução e adicionados 100 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, as soluções foram incubadas em água fervente por 5 minutos, e, após esse período, foram adicionados 500 µL de água destilada estéril, e realizada a leitura do produto da reação (açúcar reduzido) em 550 nm. A leitura do branco foi realizada utilizando a mesma solução do teste, porém, sem a adição de laminarina. Ao final, foi definido que uma unidade de enzima (U) foi determinada como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto (U/min/ml). Esse

teste foi realizado em duplicata. Foi realizada a quantificação de proteínas presentes no sobrenadante de WA92 contendo as micocinas. Utilizou-se a metodologia de Bradford (1976), empregando a Albumina Bovina como curva padrão, e a equação da reta foi aplicada para o cálculo da concentração total de proteínas em mg/ml. Essa atividade específica de  $\beta$ -glucanases foi calculada por meio da razão da concentração de atividade enzimática pela concentração de proteínas.

### **3.5 Atividade antimicrobiana em meio sólido**

Foi utilizado dois meios de culturas em ágar *Sabouraud* modificado (peptona bacteriana 1%, glicose 1%, extrato de malte 1%, extrato de levedura 1%, ágar 1,2%) pH  $4,7 \pm 2$ , um teste e outro controle. O meio de cultura teste foi constituído de ágar *Sabouraud* modificado diluído com o sobrenadante contendo micocinas de *W. anomalus* WA92, e o controle é constituído de ágar *Sabouraud* modificado, sem a adição de micocinas. Ambos os meios, controle e teste, foram vertidos em placa de *Petri* dividida ao meio, homogeneizados e, após a solidificação, foi semeada uma cepa de *Cryptococcus neoformans* no lado teste e no lado controle; posteriormente, incubou-se a 35 °C por 48 horas

### **3.6 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição**

Para os testes de microdiluição, utilizou-se o método M27-A3 - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com algumas modificações, conforme relatado nos trabalhos de Einchenberg et al. (2018) e Nascente et al. (2003). Utilizaram-se microplacas contendo 96 poços, dispostos em colunas (enumeradas de 1 a 12) e linhas (com letras alfabéticas, de A a H). As suspensões de células de *Cryptococcus neoformans* foram ajustadas a  $10^6$  UFC/mL em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm com leitura de absorbância que variava de 0,420 a 0,430 (PIETSCHMANN et al., 2009). Essas suspensões foram preparadas em 5 mL de caldo *Sabouraud* 1% e distribuídas (100  $\mu$ L) nas colunas. Cada coluna correspondeu a uma cepa teste de *Cryptococcus neoformans*. O sobrenadante contendo micocinas foi diluído em água destilada, obtendo as seguintes concentrações de  $\beta$ -glucanases: 3,8; 1,9; 0,95; 0,48; 0,24 U/mg. Em seguida, 100  $\mu$ L de cada diluição foi adicionada nos respectivos poços adicionados na linha A a F. Nas linhas G e H, foram realizados os controles,

positivo (contendo caldo *Sabouraud* 1% e *Cryptococcus neoformans*) e negativo (contendo somente caldo *Sabouraud* 1% estéril e sobrenadante de micocinas), respectivamente. Após o término do procedimento, a placa foi incubada a 35 °C durante 48 horas. A leitura foi realizada visualmente na placa, observando a menor concentração de  $\beta$ -glucanases que foi capaz de impedir o crescimento de *Cryptococcus*, a qual foi definida como a concentração inibitória mínima. Realizou-se o teste com 16 cepas de *Cryptococcus neoformans*.

### 3.7 Pesquisa de proteinases e inibição de proteinases por micocinas

Na pesquisa da produção das enzimas proteinases, foram utilizadas 16 cepas de *Cryptococcus neoformans*, por meio da técnica descrita por Price et al. (1982). O meio de cultura utilizado para a pesquisa de proteinases foi constituído por um meio base contendo ágar 1,8%, previamente esterilizado por autoclavação, e outro meio de cultura contendo albumina (albumina bovina fração V 2% e Yeast Carbon Base 1,17%). Esse meio foi previamente esterilizado por filtração em membrana 0,22  $\mu$ m; em seguida, os meios de cultura foram misturados e distribuídos em placa de Petri. Após a solidificação, cepas de *Cryptococcus* foram semeadas em pontos equidistantes no meio de cultura e incubadas por 6 dias, com leitura diária da atividade enzimática (Pz). A presença da enzima foi observada pela formação do halo translúcido de degradação da albumina presente no meio de cultura, ao redor da colônia da levedura. A leitura do Pz foi realizada utilizando a razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia, somado à zona de degradação.

$$Pz=dc/ddc$$

Sendo:

Pz: atividade enzimática

dc: diâmetro da colônia

ddc: diâmetro da colônia +zona de degradação

Os resultados obtidos foram classificados em três índices:

Índice 1	Índice 2	Índice 3
----------	----------	----------

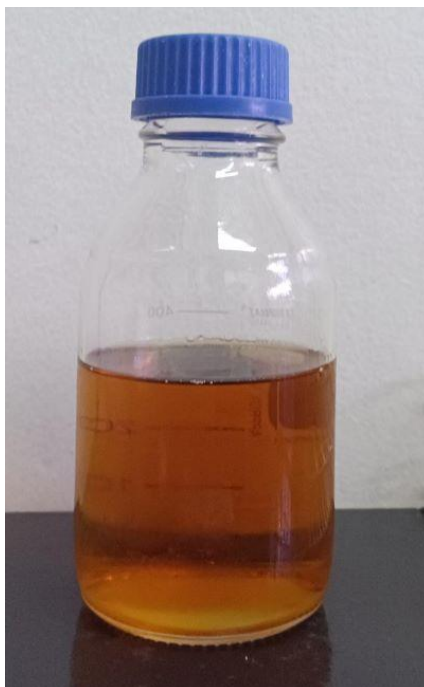
Pz=1	$1,0 < Pz \leq 0,64$	$Pz < 0,64$
Sem atividade enzimática	Moderadamente positiva para atividade enzimática	Fortemente positiva para atividade enzimática

As cepas com produção fortemente positivas para proteinases (índice 3) foram testadas quanto à inibição de sua atividade. Sendo assim, uma concentração subinibitória (0,48 U/mg) de  $\beta$ -glucanases presente no sobrenadante de WA92 foi adicionada ao meio base ágar, juntamente com o meio de cultura contendo albumina. Em seguida, as placas foram homogêneas e, após sua solidificação, as leveduras de *Cryptococcus* foram semeadas em pontos equidistantes. As placas foram incubadas a 32 °C, por um período de 6 dias, com leitura diária do Pz. Foi considerado teste positivo, ou seja, inibição da atividade enzimática, quando não houve a formação do halo de degradação da albumina.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 Produção de Micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*

Após a produção da micocina, o sobrenadante foi armazenado em garrafa e mantido em geladeira a 4 °C.



#### **4.2 Determinação da atividade de $\beta$ -glucanases**

A parede celular dos microrganismos é constituída por polissacarídeos, como os  $\beta$ -glucanos. As  $\beta$ -glucanases podem ativar um sistema de lise celular, degradando a parede do microrganismo, causando a sua morte (BIELECKI; GALAS, 1991). Um estudo de Tay et al. (2014) confirmou a presença de  $\beta$ -glucanases em micocinas produzidas por *W. anomalus*, por isso, a determinação da sua atividade confere na sua capacidade em destruir as células de microrganismos patogênicos.

Neste estudo, foi encontrada, no sobrenadante de cultura de *W. anomalus*, a atividade específica de 3,8 U/mg de  $\beta$ -glucanases. Lima et al. (2013) obtiveram, com o mesmo estudo, a quantidade de 0,071 U/mg. Calazans et al. (2021) relataram 0,40 U/mg de atividade específica em micocinas produzidas por *W. anomalus*. Essa diferença na produção de  $\beta$ -glucanases pode estar relacionada a algumas variações do meio de cultura, temperatura e pH.

#### **4.3 Atividade antimicrobiana em meio sólido**

O teste do meio sólido foi realizado para avaliar a atividade antifúngica das micocinas produzidas por *W. anomalus*. No lado controle, foram semeadas cepas da levedura *Cryptococcus neoformans* no meio de cultura sem a adição de micocinas, havendo o crescimento da levedura (lado A); no lado teste (lado B), houve a adição do sobrenadante contendo micocinas de WA92 no meio de cultura, verificando, dessa forma, a inibição total de *Cryptococcus neoformans*.



Lado A

Lado B

Figura 4: Atividade antimicrobiana de micocinas em meio sólido. Lado A: Controle, crescimento de *Cryptococcus neoformans* em meio de cultura. Lado B: Teste, sem crescimento de *Cryptococcus neoformans* em meio de cultura contendo adição de micocinas.

O teste de atividade antimicrobiana em meio sólido é um método muito efetivo, onde oferece uma leitura visual da atividade das micocinas sobre o microrganismo que está sendo testado, que é o que mostra o trabalho de Junges et al. (2020), que verificaram a inibição total de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* isoladas de amostras biológicas humanas. Na pesquisa de Calazans et al. (2021), demonstrou a inibição de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de carnes. Essas respostas se deram por causa da presença de micocinas de *W. anomalous* no meio de cultura.

#### 4.4 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

O teste de microdiluição foi realizado para determinar a concentração inibitória mínima de  $\beta$ -glucanases presente no sobrenadante de *W. anomalous* WA92, que é capaz de impedir o crescimento de *Cryptococcus neoformans*. A inibição se deu quando usada a concentração de 0,95 U/mg de  $\beta$ -glucanase, concentração que inibiu 100% das cepas.

Paris et al. (2016) relatam que as micocinas apresentaram atividade antifúngica, por meio do teste em microdiluição em caldo, quando testadas sobre leveduras de *Candida albicans*.

MICOCINAS (diluições sobrenadantes)

Micro-organismo	WA92					
	P	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>Cryptococcus neoformans</i> 133	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 129	+	+	+	+	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 139	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i> 91	+	+	+	+	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 157	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i> 65	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 99	+	+	+	+	+	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 01	+	+	+	+	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 66	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 164	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 158	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 678	+	+	+	+	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 167	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 169	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 122	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 02	+	+	+	-	-	-



Legenda: P(pura) + (não crescimento) - (crescimento). WA 92: micocinas do sobrenadante da cepa de *W. anomalus* 92

Tabela 1: Ação inibitória pelo método de microdiluição da micocina do sobrenadante da cepa WA92 frente às cepas de *Cryptococcus neoformans*.

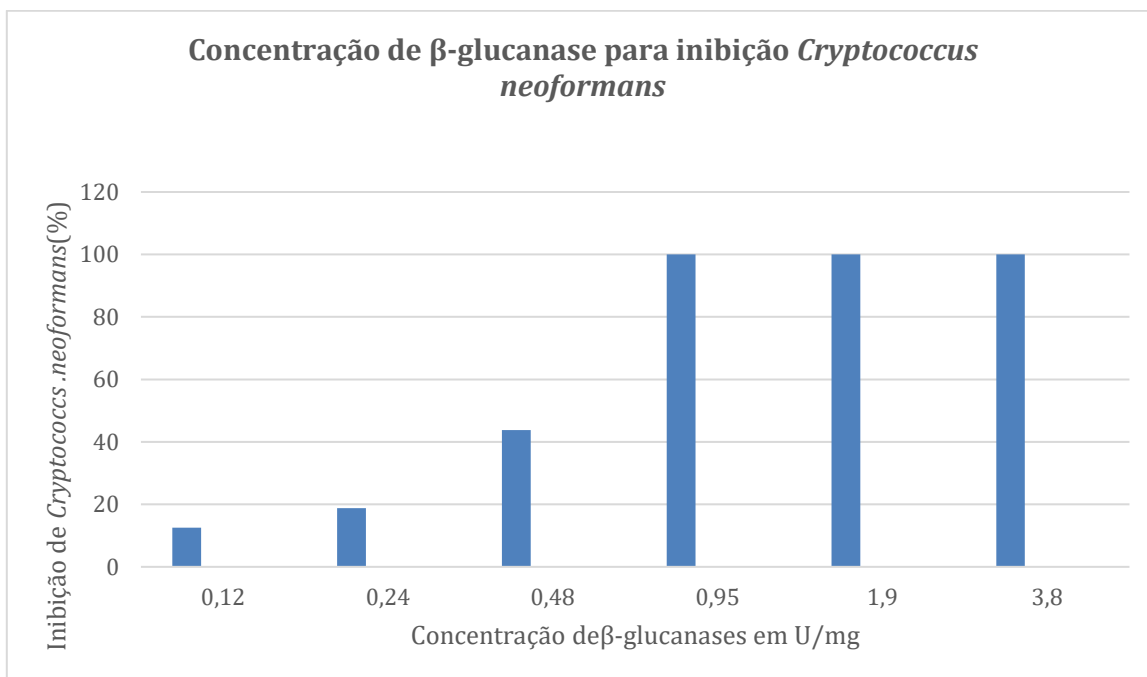


Gráfico 1: Teste de susceptibilidade de *Cryptococcus neoformans* frente às micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* presentes no sobrenadante de WA92, em diferentes concentrações de  $\beta$ -glicanases.

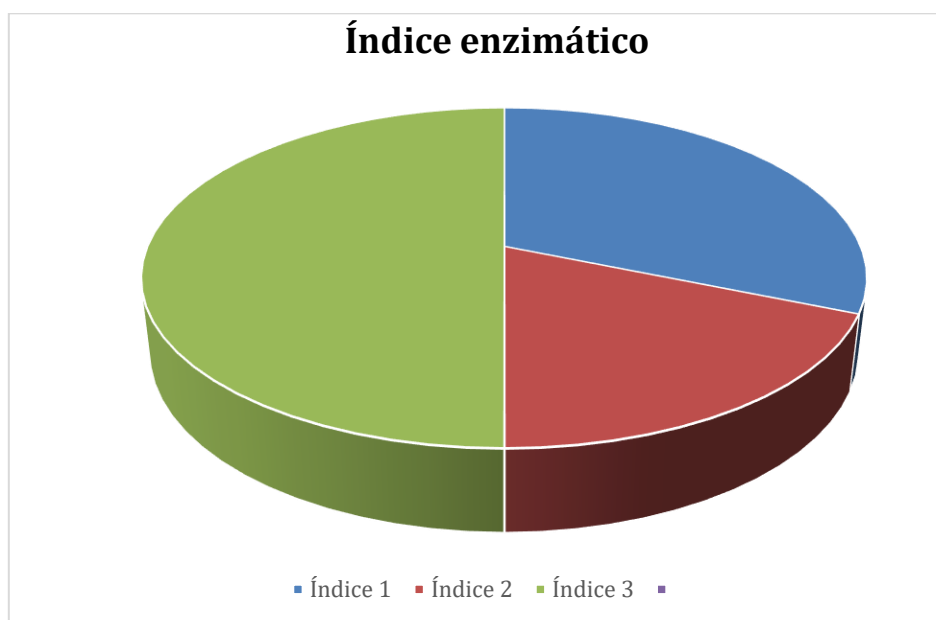
#### 4.5 Pesquisa de proteinases e inibição de proteinases por micocinas

Para a realização desse teste, foram selecionadas 16 cepas de *Cryptococcus neoformans*. Os resultados demonstram a formação de um halo translúcido representando positividade para a produção de proteinases, e a ausência do halo descreve as cepas sem atividade. Em relação à produção de proteinases, verificou-se que 8(50%) das 16 cepas apresentaram atividade fortemente positiva para a produção da enzima, apresentando o índice 3. No índice 2 mostrou que 3(18,75%) das cepas encontram-se nesse nível, possuindo atividade moderadamente positiva, enquanto que as outras 5(31,25%) cepas foram classificadas como índice 1, sem atividade enzimática, como mostra tabela e gráfico abaixo:

### Classificação Índice enzimático

Micro-organismo	Índice 1	Índice 2	Índice 3
<i>Cryptococcus neoformans</i> 133			x
<i>Cryptococcus neoformans</i> 129			x
<i>Cryptococcus neoformans</i> 139		x	
<i>Cryptococcus neoformans</i> 91			x
<i>Cryptococcus neoformans</i> 157		x	
<i>Cryptococcus neoformans</i> 65		x	
<i>Cryptococcus neoformans</i> 99			x
<i>Cryptococcus neoformans</i> 01			x
<i>Cryptococcus neoformans</i> 66	x		
<i>Cryptococcus neoformans</i> 164	x		
<i>Cryptococcus neoformans</i> 158			x
<i>Cryptococcus neoformans</i> 678	x		
<i>Cryptococcus neoformans</i> 167			x
<i>Cryptococcus neoformans</i> 169	x		
<i>Cryptococcus neoformans</i> 122	x		
<i>Cryptococcus neoformans</i> 02			x

Tabela 2: Classificação quanto ao índice enzimático das cepas de *Cryptococcus neoformans*.



Índice 1	Índice 2	Índice 3
Sem atividade enzimática	Moderadamente positiva para atividade enzimática	Fortemente positiva para atividade enzimática

Gráfico 2: ~~Frequência~~ Frequência de índice enzimático de proteinase em amostras de *Cryptococcus neoformans*.

Todas as cepas de *Cryptococcus neoformans* que apresentaram atividade fortemente positiva para proteinases, ou seja, apresentaram o índice 3, tiveram sua atividade enzimática reduzida ao índice 1 (sem atividade), quando foram semeadas em meio de cultura para pesquisa de proteinases, com a adição de uma concentração subinibitória (0,48 U/mg de  $\beta$ -glucanases) do sobrenadante de cultura de *W. anomalus*.

Sendo assim, o uso de substâncias que promovam a inibição das proteinases pode reduzir o seu potencial de virulência e ser uma alternativa terapêutica para microrganismos produtores dessa enzima (ASENCIO et al., 2005; MUNRO; HUBE, 2002).

Vidotto et al (2005) avaliaram 151 cepas de *C. neoformans* de portadores de HIV, em São Paulo - Brasil. Todas apresentaram produção de proteinase, sendo a maioria fortemente produtora no 8º dia de incubação a 37°C, com valores de Pz entre 0,399 e 0,00 (80,79%).

No estudo de Pereira, 2006; todas as 56 amostras de *Cryptococcus* analisadas demonstraram-se produtoras de proteinases. Deste total evidenciaram-se que 96% foram classificadas como fortemente produtoras de proteinase.

Dessa forma, o uso de substâncias que promovam a inibição das proteinases pode reduzir o seu potencial de virulência e ser uma alternativa terapêutica para microrganismos produtores dessa enzima (ASENCIO et al., 2005; MUNRO; HUBE, 2002).

Assim sendo, acredita-se que as micocinas são uma alternativa na redução da patogenicidade causada por *Cryptococcus neoformans*.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cepas de *Cryptococcus neoformans* foram susceptíveis à ação das micocinas produzidas por *W. anomalus* (WA92). Os resultados mostraram, pelo teste de microdiluição em caldo, que 100% das cepas de *Cryptococcus neoformans* testadas foram inibidas quando utilizado o sobrenadante de cultura contendo micocinas. No teste de produção de proteinases, 50% das cepas testadas foram fortemente produtoras de proteinases. Todas essas cepas que tiveram a sua atividade enzimática fortemente positivas foram inibidas quando testadas em meio de cultura contendo uma concentração subinibitória de  $\beta$ -glucanases.

Diante disso, podemos afirmar que as micocinas possuem um potencial farmacológico, podendo ser um promissor agente no controle e tratamento de infecções causadas por *Cryptococcus neoformans*.

## 6. REFERÊNCIAS

BERBEGAL, Carmen; SPANO, Giuseppe; FRAGASSO, Mariagiovanna; GRIECO, Francesco; RUSSO, Pasquale; CAPOZZI, Vittorio. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 569–576, 2018. DOI: 10.1007/s00253-017-8666-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8666-x>.

BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceedings of the 11th International Congress on Genetics**, [S. l.], v. 1, p. 202–203, 1963.

BIELECKI, Stanislaw; GALAS, Edward. Microbial  $\beta$ -Glucanases Different from Cellulases. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 275–304, 1991. DOI: 10.3109/07388559109038212. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388559109038212>.

BOYNTON, Primrose J. The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. **Yeast**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 473–485, 2019. DOI: 10.1002/yea.3398. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.3398>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>.

CALAZANS, G. F.; SILVA, J. C.; DELABENETA, M. F.; PARIS, A. P.; YASSUDA FILHO, P.; AULER, M. E.; MENOLLI, R. A.; PAULA, C. R.; SIMAO, R. C. G.; GANDRA, R. F. Antimicrobial activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from meats. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 388–394, 2021. DOI: 10.1590/fst.39319. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612021000200388&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612021000200388&tlng=en).

CALICH, Vera Lucia G.; PURCHIO, Adhemar; PAULA, Claudete R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 66, n. 3, p. 175–177, 1979. DOI: 10.1007/BF00683967. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00683967>.

CAPPELLI, A.; ULISSI, U.; VALZANO, M.; DAMIANI, C.; EPIS, S.; GABRIELLI, M. G.; CONTI, S.; POLONELLI, L.; BANDI, C.; FAVIA, G.; RICCI, I. A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. **PloS one**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. e95988, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0095988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788884>.

CAPPELLI, Alessia; VALZANO, Matteo; CECARINI, Valentina; BOZIC, Jovana; ROSSI, Paolo; MENSAH, Priscilla; AMANTINI, Consuelo; FAVIA, Guido; RICCI, Irene. Killer yeasts exert anti-plasmodial activities against the malaria parasite *Plasmodium berghei* in the vector mosquito *Anopheles stephensi* and in mice. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 329, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3587-4. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3587-4>.

CASOLARI, C.; ROSSI, T.; BAGGIO, G.; COPPI, A.; ZANDOMENEHI, G.; RUBERTO, A. I.; FARINA, C.; FABIO, G.; ZANCA, A.; CASTELLI, M. Interaction between saquinavir and antimycotic drugs on *Candida albicans* and *Candida neoformans* strains. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 605–610, 2004. DOI: 10.1016/j.phrs.2004.06.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661804001732>.

CASSONE, A.; BERNARDIS, F. D.; MONDELLO, F.; CEDDIA, T.; AGATENSI, L. Evidence for a Correlation Between Proteinase Secretion and Vulvovaginal Candidosis. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 156, n. 5, p. 777–783, 1987. DOI: 10.1093/infdis/156.5.777. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/156.5.777>.

CECARINI, V.; CUCCIOLONI, M.; BONFILI, L.; RICCIUTELLI, M.; VALZANO, M.; CAPPELLI, A.; AMANTINI, C.; FAVIA, G.; ELEUTERI, A. M.; ANGELETTI, M.; RICCI, I. Identification of a Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* with  $\beta$ -Glucanase Activity. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 568, 2019. DOI: 10.3390/toxins11100568. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/10/568>.

CHEN, Yinhuai; BAKER, Richard E.; KEITH, Kevin C.; HARRIS, Kendra; STOLER, Sam; FITZGERALD-HAYES, Molly. The N Terminus of the Centromere H3-Like Protein Cse4p Performs an Essential Function Distinct from That of the Histone Fold Domain. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 20, n. 18, p. 7037–7048, 2000. DOI: 10.1128/MCB.20.18.7037-7048.2000. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.20.18.7037-7048.2000>.

CIANI, Maurizio; COMITINI, Francesca. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 25–32, 2011. DOI: 10.1007/s13213-010-0069-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-010-0069-5>.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approves Standard - Third Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, [S. l.], v. 28, 2008.

COMITINI, Francesca; INGENIIS DE, Jessica; PEPE, Laura; MANNAZZU, Ilaria; CIANI, Maurizio. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces spoilage* yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 238, n. 1, p. 235–240, 2004. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09761.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09761.x>.

CORREA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R.; GAMBALE, W. Evaluation of a fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide solution) in the study of the viability *Cryptococcus neoformans* strains. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 91–96, 1986. DOI: 10.1007/BF00436666. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00436666>.

DE ULLIVARRI, Miguel Fernández; MENDOZA, Lucía M.; RAYA, Raúl R. Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S. l.], v. 106, n. 5, p. 865–878, 2014. DOI: 10.1007/s10482-014-0256-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-014-0256-7>.

EDIDIN, M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 1303–6, 1970. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5444341>.

EPIS, S.; CAPONE, A.; MARTIN, E.; PAOLUCCI, M.; BAZZOCCHI, C.; VALZANO, M.; BOZIC, J.; NOVATI, S.; FAVIA, G; RICCI, I. A rapid qPCR method to investigate the circulation of the yeast *Wickerhamomyces anomalus* in humans. **The new microbiologica**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 577–81, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26485017>.

FAERGEMANN, Jan. Atopic Dermatitis and Fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 545–563, 2002. DOI: 10.1128/CMR.15.4.545-563.2002. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.15.4.545-563.2002>.

GANDRA, R. F.; MELO, T. A.; MATSUMOTO, F. E.; PIRES, M. F. C.; CROCE, J.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Allergenic evaluation of *Malassezia furfur* crude extracts. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 155, n. 4, p. 183–9, 2002. DOI: 10.1023/a:1021181711225. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12650593>.

GANTER, Philip F.; STARMER, William T. Killer Factor as a Mechanism of Interference Competition in Yeasts Associated with Cacti. **Ecology**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 54–67, 1992. DOI: 10.2307/1938720. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2307/1938720>.

HUA, Sui Sheng T.; HERNLEM, Bradley J.; YOKOYAMA, Wallace; SARREAL, Sioy Bouy L. Intracellular trehalose and sorbitol synergistically promoting cell viability of a biocontrol yeast, *Pichia anomala*, for aflatoxin reduction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 729–734, 2015. DOI: 10.1007/s11274-015-1824-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-015-1824-3>.

IZGÜ, Fatih; ALTINBAY, Demet; TÜRELI, Akif Emre. In vitro activity of panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. **Mycoses**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 31–4, 2007. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2006.01303.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17302745>.

JUNGES, Daniele S. B.; DELABENETA, M. F.; ROSSETO, L. R. B.; NASCIMENTO, B.



L.; PARIS, A. P.; PERSEL, C.; LOTH, E. A.; SIMAO, R. C. G.; MENOLLI, R. A.; PAULA, C. R.; GANDRA, R. F. Antibiotic Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Mycocins on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Ecology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1007/s00248-020-01495-9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-020-01495-9>.

LI, Mi; MORRIS, Garrett M.; LEE, Taekyu; LACO, Gary S.; WONG, Chi-Huey; OLSON, Arthur J.; ELDER, John H.; WLODAWER, Alexander; GUSTCHINA, Alla. Structural studies of FIV and HIV-1 proteases complexed with an efficient inhibitor of FIV protease. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 29–40, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(20000101)38:1<29::AID-PROT4>3.0.CO;2-N. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)10970134\(20000101\)38:1%3C29::AID-PROT4%3E3.0.CO;2-N](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)10970134(20000101)38:1%3C29::AID-PROT4%3E3.0.CO;2-N).

LIMA, J. R.; GONDIM, D. M. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, F. S. A.; GONÇALVES, L. R. B.; VIANA, F. M. P. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, [S. l.], v. 83, p. 58–64, 2013. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.03.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521413000884>.

LIU, Guang-Lei; CHI, Zhe; WANG, Guang-Yuan; WANG, Zhi-Peng; LI, Yang; CHI, Zhen-Ming. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 222–234, 2015. DOI: 10.3109/07388551.2013.833582. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2013.833582>.

MACDONALD, F.; ODDS, F. C. Virulence For Mice Of A Proteinase-Secreting Strain Of *Candida albicans* And A Proteinase-Deficient Mutant. **Microbiology**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 431–438, 1983. DOI: 10.1099/00221287-129-2-431. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-129-2-431>.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical microbiology reviews**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 369–400, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227858>.

MAGNANI, Marciane; CASTRO-GÓMEZ, Raul Jorge Hernan.  $\beta$ -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 29, p. 631–650, 2008.

MANNAZZU, Ilaria; DOMIZIO, Paola; CARBONI, Gavino; ZARA, Severino; ZARA, Giacomo; COMITINI, Francesca; BUDRONI, Marilena; CIANI, Maurizio. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 603–617, 2019. DOI: 10.1080/07388551.2019.1601679. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2019.1601679>.

MARTINS, Suzana Cláudia Silveira; VAZ, Fernanda Leitão; MARTINS, Claudia Miranda. Isolamento, caracterização e identificação de leveduras killer de caldo de cana de açúcar.

**Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 3123, 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n5p3123. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/18768>.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>.

MUCCILLI, Serena; RESTUCCIA, Cristina. Bioprotective Role of Yeasts. **Microorganisms**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 588–611, 2015. DOI: 10.3390/microorganisms3040588. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-2607/3/4/588>.

MUCCILLI, Serena; WEMHOFF, Sabrina; RESTUCCIA, Cristina; MEINHARDT, Friedhelm. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. **Yeast (Chichester, England)**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 33–43, 2013. DOI: 10.1002/yea.2935. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23148020>.

MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOON, A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, [S. l.], v. 40, n. 11–12, p. 465–469, 1997. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1997.tb00186.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.1997.tb00186.x>.

MUNRO, Carol A.; HUBE, Bernhard. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 173–177, 2002. DOI: 10.1016/S0966-842X(02)02330-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X02023302>.

NASCIMENTO, Bruna L.; DELABENETA, Mateus F.; ROSSETO, Lana Rubia B.; JUNGES, Daniele S. B.; PARIS, Ana Paula; PERSEL, Cristiane; GANDRA, Rinaldo F. Yeast Mycocins: a great potential for application in health. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 20, n. 3, 2020. DOI: 10.1093/femsyr/foaa016. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/doi/10.1093/femsyr/foaa016/5818766>.

PARIS, Ana Paula; PERSEL, Cristiane; SERAFIN, Cleber Fernando; DE CÁSSIA GARCIA SIMÃO, Rita; GANDRA, Rinaldo Ferreira. Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalous* Mycocins. **Current microbiology**, [S. l.], v. 73, n. 6, p. 878–884, 2016. DOI: 10.1007/s00284-016-1135-4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27638312>.

PENG, Ying; CHI, Zhen-Ming; WANG, Xiang-Hong; LI, Jing. Purification and molecular characterization of exo- $\beta$ -1,3-glucanases from the marine yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 85–94, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-2061-1. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2061-1>.

POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. **Journal of**

**clinical microbiology**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 866–9, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3771773>.

PRICE, Margaret F.; WILKINSON, Ian D.; GENTRY, Layne O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982. DOI: 10.1080/00362178285380031. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/00362178285380031>.

ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 134–141, 1966. DOI: 10.1073/pnas.55.1.134. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.55.1.134>.

SCHMITT, MANFRED J.; BREINIG, Frank. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS microbiology reviews**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 257–76, 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165427>.

SCHNEIDER, Jessica; RUPP, Oliver; TROST, Eva; JAENICKE, Sebastian; PASSOTH, Volkmar; GOESMANN, Alexander; TAUCH, Andreas; BRINKROLF, Karina. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 382–386, 2012. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00791.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2012.00791.x>.

SHIFRINE, M.; MARR, A. G. The Requirement of Fatty Acids by *Pityrosporum ovale*. **Journal of General Microbiology**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 263–270, 1963. DOI: 10.1099/00221287-32-2-263. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-32-2-263>.

STEWART, Graham G. Killer (Zymocidal) Yeasts. In: **Brewing and Distilling Yeasts**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 189–198. DOI: 10.1007/978-3-319-69126-8\_10. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-69126-8\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-69126-8_10).

SUNDH, Ingvar; MELIN, Petter. **Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain**. Antonie van Leeuwenhoek, [S. l.], v. 99, n. 1, p. 113–9, 2011. DOI: 10.1007/s10482-010-9528-z. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21086043>.

TAY, Sun-Tee; LIM, Su-Lin; TAN, Hui-Wee. Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. **BMC complementary and alternative medicine**, [S. l.], v. 14, p. 439, 2014. DOI: 10.1186/1472-6882-14-439. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25380692>.

LIMA, C.T.; Klafke, G.B.; Xavier, M.O. (2015) **Cryptococcus spp. em excretas de Columbia livia (pombos domésticos) provenientes de um hospital universitário no Sul do Brasil.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.82, 1-4. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v82/1808-1657-aib-001072013.pdf>>

PINCER, V.M. (2012) **Estudo dos casos de pacientes com neurocriptococose atendidos no hospital eduardo de menezes no período de 2007 à 2012.** p. 74 Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Medicina e Biomedicina. Disponível em: <<http://www.santacasabh.org.br/app/webroot/files/uploads/MA%20-%20VALERIA%20PINCER.pdf>>

ZHAO Y, Lin X. **Cryptococcus neoformans: Sex, morphogenesis, and virulence.** *Infect Genet Evol.* 2021 Apr;89:104731. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104731. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33497839; PMCID: PMC8092418.

SANFELICE F, 1895. **Sull'azione patogena dei blastomiceti.** *Annali d'Igiene Sperimentale* 5 , 239-262.

OTTO B, 1894. **Ueber parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung.** *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* 16 , 175–180.

DROMER F, CASADEVALL A, PERFECT J, SORRELL T, 2011. **Cryptococcus neoformans: Latência e doença.** ASM Press, Washington, DC..

BENNETT, John E.; DOLIN, Rafael; BLASER, Martin J. **Mandell, Douglas, and Bennett's princípios e prática de doenças infecciosas E-book.** Elsevier Ciências da Saúde, 2019.

DROME, Françoise et al. **Cryptococcus neoformans: latência e doença.** *Cryptococcus: de patógeno humano a levedura modelo* , p. 429-439, 2010.  
SANFELICE, Francesco. **Sull'azione patogena dei blastomiceti.** *Annali d'Igiene Sperimentale*, v. 5, p. 239-262, 1895.

BUSSE, Otto. **Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung.** *Zentralbl Bakteriol*, v. 16, p. 175-180, 1894.

CASADEVALL, Arturo; ROSAS, Angel L.; NOSANCHUK, Joshua D. **Melanin and virulence in Cryptococcus neoformans.** *Current opinion in microbiology*, v. 3, n. 4, p. 354-358, 2000.

ZHAO, Youbao et al. **Life cycle of Cryptococcus neoformans.** *Annual review of microbiology*, v. 73, p. 17-42, 2019.

Bahn YS, Sun S, Heitman J, Lin X. **Microbe Profile: Cryptococcus neoformans species complex.** *Microbiology* (Reading). 2020 Sep;166(9):797-799. doi: 10.1099/mic.0.000973. Erratum in: *Microbiology* (Reading). 2020 Dec;166(12):1191. PMID: 32956032; PMCID: PMC7717486.

ALANIO, Alexandre et al. Dormancy in *Cryptococcus neoformans*: 60 years of accumulating evidence. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 7, p. 3353-3360, 2020.

LOYSE A, THANGARAJ H, EASTERBROOK P, Ford N, Roy M, CHILLER T, GOVENDER N, HARRISON TS, BICANIC T. **Meningite criptocócica**: melhorando o acesso a medicamentos antifúngicos essenciais em países com poucos recursos. *The Lancet doenças infecciosas*. 1º de julho de 2013;13(7):629-37.

WILLIAMSON PR, JARVIS JN, PANACKAL AA, FISHER MC, MOLLOY SF, LOYSE A, HARRISON TS. **Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy**. *Nature Reviews Neurology*. 2017 Jan;13(1):13-24.

SHOURIAN M, QURESHI ST. **Resistance and tolerance to cryptococcal infection: an intricate balance that controls the development of disease**. *Frontiers in Immunology*. 2019 Jan 29;10:66.

BLOOM AL, JIN RM, LEIPHEIMER J, BARD JE, YERGEAU D, WOHLFERT EA, PANEPINTO JC. **Thermotolerance in the pathogen *Cryptococcus neoformans* is linked to antigen masking via mRNA decay-dependent reprogramming**. *Nature communications*. 2019 Oct 30;10(1):1-3.