



Universidade de Brasília – UnB  
Faculdade de Ceilândia – FCE  
Curso de Farmácia

**ANNA CATARINA FERREIRA MUNIZ**

**Caracterização do mutante do gene OPI3 de *Cryptococcus neoformans***

Brasília – DF,  
2015



Universidade de Brasília – UnB  
Faculdade de Ceilândia – FCE  
Curso de Farmácia

**ANNA CATARINA FERREIRA MUNIZ**

**Caracterização do mutante do gene OPI3 de *Cryptococcus neoformans***

---

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola**

Brasília – DF,  
2015



Universidade de Brasília – UnB

**ANNA CATARINA FERREIRA MUNIZ**

**Caracterização do mutante do gene *OPI3* de *Cryptococcus neoformans***

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola**

Brasília – DF,  
2015

Nome: MUNIZ, Anna Catarina Ferreira

Título: Caracterização do mutante do gene OPI3 de *Cryptococcus neoformans*

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Banca examinadora:

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola

Instituição: Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia

M<sup>a</sup>. Fernanda Guilhelmelli Costa

Instituição: Universidade de Brasília - Darcy Ribeiro

M<sup>a</sup>. Rayssa Karla de Medeiros Oliveira

Instituição: Universidade de Brasília – Darcy Ribeiro

## **DEDICATÓRIA**

A Deus por ser tudo em minha vida, por me sustentar em cada passo, por ser o meu socorro em momentos de angústia, por ter me guiado e pelos incontáveis milagres realizados durante esta jornada. Ao meu pai Valério e minha mãe Selma por serem as razões da minha vida, por me inspirarem a ser melhor, por me fazerem sentir segura em seus abraços e por poder repousar em seus corações de amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por Sua presença junto a mim, pois não teria chegado até aqui se não fosse o Seu infinito amor.

Aos meus pais, Valério e Selma, pelas orações, por me educarem com amor, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Por se dedicarem a minha formação profissional e humana. Agradeço por estarem caminhando ao meu lado e vivenciando comigo todas as preocupações, alegrias e dificuldades, sendo, portanto, protagonistas dessa conquista.

Aos meus irmãos, Davi Otoniel e principalmente, ao Paulo Henrique pelos momentos de descontração, pelas conversas, pelo carinho e por estarem sempre torcendo por mim.

Ao meu noivo Thiago Dallagnol pelo apoio, compreensão, companheirismo, paciência, por me acalmar, pelas palavras sábias ditas nos momentos mais apropriados e por sempre está disposto a me ajudar no que for preciso.

A minha querida orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola por ter me acolhido, pela disposição e disponibilidade para me fornecer auxílio e sugestões, principalmente nos momentos mais críticos, pela ajuda no planejamento, execução e interpretação dos dados. Agradeço pela contribuição majestosa não apenas na construção deste trabalho, mas por ter auxiliado de maneira geral na minha formação acadêmica me incentivando e me inspirando.

A professora Dr<sup>a</sup>. Larissa Fernandes Matos e ao Hugo Costa Paes pela ajuda e assistência com os experimentos de transformação de *C. neoformans* por biobalística.

A banca de avaliadores composta pela Fernanda Guilhelmelli Costa e Rayssa Karla de Medeiros Oliveira que prontamente aceitaram o convite.

Aos meus amigos e companheiros da FCE e da vida. Pelas trocas de conhecimentos e experiências durante esses anos de graduação.

A Universidade de Brasília e Faculdade de Ceilândia, pela estrutura e ensino de excelência.

Aos professores por contribuírem para o meu desenvolvimento acadêmico, manifestando a importância do caráter e da conduta do profissional farmacêutico.

E a todos que de alguma forma auxiliaram na minha formação e acreditaram em mim.

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada da classe basidiomiceto com distribuição mundial, considerado um patógeno intracelular facultativo provido de uma estratégia patogênica diferenciada. Esta levedura possui a característica distintiva entre outros fungos patogênicos humanos de ter uma cápsula de polissacarídeo, que é essencial para a sua virulência. Outros fatores de virulência incluem a produção de melanina pela enzima lacase, a produção de urease e fosfolipases, a habilidade de crescimento a 37°C e do parasitismo de macrófagos. Sabe-se que o fenômeno de QS, um mecanismo de comunicação microbiana em resposta a densidade populacional, pode interferir na expressão de fatores de virulência em bactérias e fungos patogênicos. Resultados preliminares sugerem que o gene OPI3 estaria envolvido em um fenótipo de baixa resposta à atividade de QS do tipo selvagem em *C. neoformans*. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar fenotipicamente o mutante OPI3 a fim de começarmos a estabelecer o seu possível papel no QS e na regulação da expressão de fatores de virulência em *C. neoformans*. Para a avaliação da função gênica de OPI3 por meio da deleção gênica no modelo *C. neoformans* foram preparados mutantes através da deleção do gene OPI3 e inserção do gene de resistência à higromicina utilizando o método de PCR Dupla-Junta e transformação biobalística. Realizaram-se vários testes para caracterização fenotípica desse mutante, que incluem testes de crescimento em meios estressores, em meios para a produção de melanina, fosfolipase, crescimento em meio condicionado e teste de curva de crescimento. Nesse trabalho é apresentada uma caracterização preliminar desse mutante em comparação com uma linhagem selvagem desse fungo e abre portas para a sua melhor caracterização e para o estabelecimento da sua função no quórum sensing de *C. neoformans*.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus neoformans*, quórum sensing, gene OPI3, caracterização.



## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is a basidiomycete-encapsulated yeast of worldwide distribution, considered a facultative intracellular pathogen provided with a unique pathogenic strategy. This yeast has a polysaccharide capsule, which is a distinctive feature among other human pathogenic fungi and essential for its virulence. Other virulence factors includes melanin production by laccase enzyme, production of urease and phospholipases, the growth ability at 37 °C and the macrophage parasitism. It was already know, that the quorum sensing regulation, a mechanism of microbial communication in response to cell density, could control different virulence factors in *C. neoformans* as in other pathogenic bacteria and fungal species. Preliminary results suggested that the OPI3 gene could be involved in a low response to QS activity of wild-type *C. neoformans* cells. The objective of this study was to characterize the OPI3mutant phenotype, and evaluated its possible role in *C. neoformans* QS and in the regulation of the expression of virulence factors in this fungus. The evaluation of OPI3 gene function involved the construction of knockout mutant strain of *C. neoformans* where the OPI3 gene was replaced by a hygromycin resistance gene using the method of Double-joint PCR and biolistic transformation. After that, we conducted the phenotypic characterization of this mutation growing the cells on various growth media stressors, means for melanin production, phospholipase, growing in conditioned medium and growth curve test. The different responses between wild type and mutant strain were compared, however more research will be required to have a satisfactory knowledge of OPI3 of gene role in *C. neoformans* QS phenomenon.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, quórum sensing, OPI3 gene, phenotypic characterization.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius  
µm – Micrometros  
µM – Micromol  
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina  
CAP - Proteína Ativadora Catabólica  
CD – Grupamento de Diferenciação  
CHO2 – Colina 2  
cm - centímetros  
CM – Meio Condicionado  
CNA – Calcineurina Catalítica  
CsA - Ciclosporina A  
*DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO – Dimetil Sulfóxido  
DNA – Ácido Desoxirribonucléico  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EUA – Estados Unidos da América  
*F - Forward*  
GalXM – Galactoxilomanana  
GXM – Glucuroxilomanana  
TARV - Terapia Antirretroviral  
h - Hora  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
*HPH – HigromicinaFosfotransferase*  
IL - Interleucina  
Ig– Imunoglobulina  
IFN – Interferon  
IV - Intravenosa  
Kb – Kilobases  
kg - Quilogramas

M – Molar  
MAN1 –Fosfomanose isomerase 1  
*MAT - Mating types*  
mg – Miligramas  
MM – Meio mínimo  
mmHg – milímetros por mercúrio  
MP - Manoproteína  
*NK – Natural Killer*  
*OPI – Over Producer of Inositol*  
*ORF - Open Reading Frame*  
pb – Pares de Bases  
PBS – Tampão Fosfo-Salino  
PCR – Reação de polimerização em cadeia  
PLB – Fosfolipase B  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
*PSI - Pound force per square inch*  
*Qsp1 - Quorum sensing-like peptide 1*  
*R - Reverse*  
RPM – Rotações por minuto  
SAB - Sabouraud  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
SIH - Sistema de Internação Hospitalar  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SOD - Superóxido-Dismutase  
SUS - Sistema Único de Saúde  
*TAP – Tandem affinity purification*  
TNF – Fator de Necrose Tumoral  
U - Unidade  
UTI - Unidade de Terapia Intensiva  
UV – Ultravioleta  
var. – Variedade  
*YPD – Yeast Peptone Dextrose*

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Condições da PCR para a reação com os fragmentos (1+2) e (7+8).....   | 55 |
| <b>Figura 2:</b> Condições da PCR para a reação com os fragmentos (3+4) e (5+6).....   | 56 |
| <b>Figura 3:</b> Condições da PCR para a reação de segunda etapa. ....   | 57 |
| <b>Figura 4:</b> Representação da técnica de PCR Dupla-Junta. ....   | 57 |
| <b>Figura 5:</b> Condição da PCR para todas as reações de confirmação da deleção de OPI3. ....   | 61 |
| <b>Figura 6:</b> Teste de estresse térmico em meio YPD em diferentes temperaturas. ....  | 64 |
| <b>Figura 7:</b> Teste de estresse térmico em meio YPD em diferentes temperaturas. ....  | 65 |
| <b>Figura 8:</b> Teste de produção de melanina. ....   | 66 |
| <b>Figura 9:</b> Ensaio de fosfolipase em meio emulsão de gema de ovo. ....  | 67 |
| <b>Figura 10:</b> Teste de estresse de parede na temperatura de 30° C utilizando meios de estresse observados nos intervalos de 24, 48, 72 horas (A) Estresse de parede em meio Congo Red 0,5 e 1% a 30 °C após 24 horas. .... | 68 |
| <b>Figura 11:</b> Teste de estresse osmótico das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3. ....   | 70 |
| <b>Figura 12:</b> Teste de crescimento em meio condicionado das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3. ....  | 72 |

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 30 °C...73

**Gráfico 2:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 30 °C...75

**Gráfico 3:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 37 °C...76

**Gráfico 4:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 37 °C...78

**Gráfico 5:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 37 °C...79

## LISTA DE TABELAS

|   |          |
|---|----------|
| <b>Tabela 1:</b> Oligonucleotídeos utilizados no estudo de OPI3 em <i>C. Neoformans</i> ..... | 52/53/54 |
|---|----------|

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | 17 |
| 1.1. <b>FUNGOS: ASPECTOS GERAIS</b>                         | 17 |
| 1.2. <b>INFECÇÕES FÚNGICAS</b>                              | 19 |
| 1.3. <b>CRÍPTOCOCOSE</b>                                    | 20 |
| 1.4. <b>MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E SINTOMAS</b>               | 23 |
| 1.5. <b>TRATAMENTO</b>                                      | 24 |
| 1.6. <b>EPIDEMIOLOGIA</b>                                   | 27 |
| 1.7. <b><i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>: BREVE HISTÓRICO</b> | 29 |
| 1.8. <b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS</b>             | 31 |
| 1.9. <b>FATORES DE VIRULÊNCIA</b>                           | 33 |
| 1.9.1. <b>Cápsula</b>                                       | 33 |
| 1.9.2. <b>Crescimento a 37°C</b>                            | 36 |
| 1.9.3. <b>Melanina</b>                                      | 37 |
| 1.9.4. <b><i>Mating types</i></b>                           | 39 |
| 1.9.5. <b>Manitol</b>                                       | 40 |
| 1.9.6. <b>Fosfolipases</b>                                  | 40 |
| 1.9.7. <b>Superóxido-dismutase</b>                          | 41 |
| 1.9.8. <b>Protease</b>                                      | 42 |
| 1.9.9. <b>Urease</b>  | 42 |
| 1.10. <b>INTERAÇÕES PATÓGENO-HOSPEDEIRO</b>                 | 43 |
| 1.11. <b>QUORUM SENSING</b>                                 | 45 |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>                                     | 47 |
| <b>3. OBJETIVOS</b>   | 48 |
| 3.1. <b>Objetivos gerais</b>                                | 48 |
| 3.2. <b>Objetivos específicos</b>                           | 48 |
| <b>4. METODOLOGIA</b>                                       | 49 |
| 4.1. <b>Linhagens e meios de cultura utilizados</b>         | 49 |
| 4.1.1. <b>Linhagem celular</b>                              | 49 |
| 4.1.2. <b>Meios de cultura</b>                              | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2. Avaliação da função gênica de OPI3 através da deleção gênica no modelo <i>C. neoformans</i> ..... | 51 |
| 4.2.1. Construção dos cassetes de deleção do gene OPI3 de <i>C. neoformans</i> .....                   | 51 |
| 4.2.2. Transformação de <i>C. neoformans</i> por biobalística para obtenção do mutante OPI3.....       | 58 |
| 4.2.3. Extração do DNA genômico de <i>C. neoformans</i> .....  | 60 |
| 4.2.4. Confirmação da deleção de OPI3 por PCR.....   | 60 |
| 4.3. Avaliação fenotípica <i>in vitro</i> dos mutantes OPI3 .....                                      | 61 |
| 4.3.1. Crescimento em meio condicionado .....  | 62 |
| 4.3.2. Teste de curva de crescimento .....   | 62 |
| 4.3.3. Estresse térmico.....   | 62 |
| 4.3.4. Síntese de melanina .....   | 63 |
| 4.3.5. Produção de fosfolipase.....  | 63 |
| 4.3.6. Integridade da parede celular .....   | 63 |
| 4.3.7. Estresse osmótico.....  | 63 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 63 |
| 5.1. Avaliação da função gênica de OPI3 através de deleção gênica no modelo <i>C. neoformans</i> ..... | 63 |
| 5.2. Avaliação fenotípica <i>in vitro</i> do mutante do gene de OPI3 de <i>C. neoformans</i> .....     | 64 |
| 5.2.1. Estresse térmico.....   | 64 |
| 5.2.2. Síntese de melanina .....   | 66 |
| 5.2.3. Produção de fosfolipase.....  | 67 |
| 5.2.4. Integridade da parede celular .....   | 68 |
| 5.2.5. Estresse osmótico.....  | 70 |
| 5.2.6. Crescimento em meio condicionado .....  | 71 |
| 5.2.7. Teste de curva de crescimento .....   | 73 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 81 |
| 7. PERSPECTIVAS .....  | 83 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 84 |



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. FUNGOS: ASPECTOS GERAIS

Os fungos e as leveduras relacionam-se com os seres humanos desde a antiguidade coexistindo na natureza nos mais diversos tipos de ambientes. Estes organismos multicelulares e unicelulares podem desencadear uma série de benefícios e malefícios para a sociedade, desde inovações tecnológicas em indústrias envolvendo produtos químicos, farmacêuticos, comestíveis, laticínios e bebidas alcoólicas como na medicina humana e veterinária acometendo as populações com enfermidades. Neste sentido, a micologia médica, um ramo da microbiologia que está inter-relacionada com todas as especialidades da medicina, caracteriza-se pelo estudo das doenças causadas pelos fungos e dos fungos que produzem as doenças (GOW, BROWN & ODDS, 2002; CHEN & SEVIOUR, 2007; ARENAS, 2008; GUIMARÃES, MOMESSO & PUPO, 2010; MEYER *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2014).

A estrutura celular fúngica possui características comumente observadas em células eucarióticas, integrando a existência de um núcleo com um nucléolo, membrana nuclear e cromossomos lineares. O citoplasma possui um citoesqueleto com microfilamentos de actina e microtúbulos de tubulina, além de organelas, tais como ribossomos, mitocôndrias, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi. As células fúngicas têm uma parede celular externa rígida, bem diferente das observadas em plantas e bactérias, devido à presença de quitina, um polímero insolúvel de *N*-acetilglicosamina, um derivado de glicose que se apresenta disposta como feixes microfibrilares. A parede celular é composta em cerca de 80-90% de polissacarídeos com proteínas, lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação da parede. Observa-se também a presença de ergosterol em sua membrana citoplasmática, enquanto nos mamíferos têm-se a dominante presença de colesterol (COCHRANE, 1958; PARKS, SMITH & CROWLEY, 1995; BOWMAN & FREE, 2006; MADIGAN, 2010; RYAN & RAY, 2010; CARRIS, LITTLE & STILES, 2012).

Para manter a eficiência na sua adaptação, os fungos desenvolveram formas morfológicas complexas, que, entretantofacilitam a sua capacidade de reprodução. Os fungos podem se reproduzir tanto por processos assexuados (anamórfico) quanto sexuados (teleomórfico) e alguns são capazes de se reproduzir por ambas

as formas, e são chamados holomórficos. A reprodução assexuada é caracterizada pela divisão mitótica do núcleo haplóide concomitante com a produção de conídios em forma de esporos por gemulação ou separação de elementos das hifas. Na reprodução sexuada, os núcleos haplóides de fundem formando um núcleo diplóide que, então se divide por meiose (LILLY & BARNETT, 1951; MOORE-LANDECKER, 1972; TAYLOR, JACOBSON & FISHER, 1999; ARENAS, 2008; RYAN & RAY, 2010).

Com grande diversidade metabólica, os fungos são heterotróficos, deste modo degradam substratos orgânicos exógenos para obter carbono, produzindo metabólitos primários como o ácido cítrico, o etanol e o glicerol; e também secundários, por exemplo, antibióticos como a penicilina. Os fungos podem se comportar de duas formas para obter nutrientes: como saprófitos, quando adquirem seus nutrientes de matérias orgânicas mortas ou em decomposição e como parasitas, quando consomem os nutrientes a partir de matéria viva. A maioria dos fungos são aeróbicos, contudo existem alguns que são anaeróbicos facultativos, isto é, fermentativos, enquanto outros são estritamente aeróbicos (YU & KELLER, 2005; MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; RYAN & RAY, 2010; CARRIS, LITTLE & STILES, 2012; BONIFAZ, 2012).

É notável a habilidade que os fungos têm de sobreviver nos mais diferentes substratos presentes na natureza, sendo encontrados no: solo seco, pântanos, troncos apodrecidos ou nas frutas, leite, água e poeira. Neste sentido, são denominados geofílicos, aqueles que têm preferência para o solo; zoofílicos, os que têm propensão para animais e antropofílicos - os que só têm sido isolados do homem. (BUTINAR *et al.*, 2005; SHEARER *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2014). Os fungos encontram-se divididos em cinco importantes filos: Zigomiceto, Euascomiceto, Basiomiceto, Arquiascomiceto e Hemiascomiceto (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009).

Estas classes abrigam cerca de 100.000 espécies, porém existem ainda milhares de espécies que não foram descobertas ou classificadas, no entanto, apenas cerca 200 espécies podem ser consideradas como patógenos humanos, embora este número esteja crescendo lentamente, principalmente devido ao potencial de alguns de se tornarem patógenos do tipo oportunista (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; BONIFAZ, 2012; BADIEE, 2013; BEN-AMI *et al.*,

2013;) e isso vem refletindo, também no aumento da incidência de micoses oportunistas invasivas, devido ao crescimento da população de pacientes imunodeprimidos (MODY & WARREN, 1999; NUCCI *et al.*, 2010).

## 1.2. INFECÇÕES FÚNGICAS

Os fungos não tiveram grande significado clínico durante muito tempo, devido a escassez de infecções fúngicas, mas recentemente tem observado um crescente aumento da incidência de infecções fúngicas invasivas (BADIEE, 2013; BEN-AMI *et al.*, 2013; LEROUX & ULLMANN, 2013). Essas infecções fúngicas representam um problema crescente nos cuidados de saúde, devido à expansão de populações de risco e uso de tratamentos que permitem maior sobrevida destes pacientes.

A medicina moderna tem avançado com o objetivo de prolongar a vida não apenas dos pacientes gravemente doentes como àqueles infectados pelo HIV, com câncer, os transplantados, os pacientes cirúrgicos e em UTI, mas também recém-nascidos e idosos (MODY & WARREN, 1999; DUIN *et al.*, 2004; PIERCE *et al.*, 2008; NUCCI *et al.*, 2010; GUARNER & BRANDT, 2011; LANTERNIER *et al.*, 2013). Com essa expansão, foi notável a mudança relacionada às micoses encontradas no ambiente de cuidados de saúde (GUARNER & BRANDT, 2011).

Milhares de pessoas são infectadas todos os anos por fungos saprófitas e comensais. As infecções fúngicas sistêmicas mais prevalentes no século passado incluíram as infecções por *Candida* spp., já as infecções pulmonares invasivas incluíram principalmente micoses endêmicas e causadas por *Aspergillus* spp. (GUARNER & BRANDT, 2011). Recentemente, os clínicos têm dado maior relevância para as espécies de *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis carinii*, fungos dimórficos como o *Coccidioides*, *Paracoccidioides* e *Histoplasmosma* spp., fungos dermatófitos, por exemplo, *Trichophyton* spp. e a levedura encapsulada *Cryptococcus* spp. (LANTERNIER *et al.*, 2013).

As portas de entrada para as infecções podem variar de acordo com o agente infeccioso podendo ocorrer através da inalação de esporos (aspergilose, criptococose, histoplasmose), da inoculação percutânea e cutânea em infecções subcutâneas (dermatofitose), da penetração na mucosa por organismos comensais, como a *Candida albicans*, e pela ingestão de uma toxina obtida através de alimentos

contaminados ou bebidas (doença gastrointestinal) (BADIEE & HASHEMIZADEH, 2014).

Atualmente a terapia medicamentosa convencional é realizada com antifúngicos de eficácia limitada, dessa forma novos tratamentos são necessários, incluindo a imunoterapia que pode potencializar a terapia antifúngica convencional (MODY & WARREN, 1999). Apesar dos avanços no tratamento, as taxas de mortalidade para as infecções fúngicas invasivas permanecem elevadas, em 30 a 50%. Doenças fúngicas superficiais, embora menos graves, também podem levar a significativa morbidade e mortalidade (LANTERNIER *et al.*, 2013).

Neste contexto, é fundamental iniciar o tratamento precocemente fazendo uso de drogas altamente eficazes e de baixa toxicidade. Entretanto observa-se que alguns organismos já são resistentes ao tratamento e que os agentes antifúngicos disponíveis têm vários efeitos adversos (BADIEE & HASHEMIZADEH, 2014). Esta situação apresenta-se como um desafio importante para o aprimoramento do uso de agentes antifúngicos, a seleção de fungos resistentes aos medicamentos, a necessidade do monitoramento fármaco-terapêutico, vigilância de eventos adversos, interações medicamentosas e os custos associados aos medicamentos, sendo fundamental a parceria da equipe multidisciplinar com um farmacologista clínico (BEN-AMI *et al.*, 2013).

### **1.3. CRIPTOCOCOSE**

A criptococose é uma infecção causada pelo *Cryptococcus* spp. principalmente pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. É um fungo patógeno predominantemente oportunista que possui importância mundial. Essa doença tem maior prevalência em pacientes com a imunidade comprometida pelo vírus HIV (ALANIO, DESNOS-OLLIVIER & DROMERA, 2011).

Dessa forma, a AIDS é o principal fator de risco compreendendo 95% dos casos em países de média e baixa renda e 80% nos países de alta renda. Os pacientes que fazem uso de medicamentos imunossupressores compreendem a maior parte do número de casos restantes, entretanto observou-se que há indivíduos imunocompetentes que podem desenvolver a doença (SLOAN & PARRIS, 2014), com destaque para a espécie *C. gattii* que recentemente causou uma epidemia

localizada de criptococose em humanos e animais aparentemente imunocompetentes na ilha de Vancouver, no Canadá (SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009), e continua se espalhando chegando no noroeste do Pacífico dos Estados Unidos, causando a doença quase que exclusivamente em pessoas imunocompetentes (DEL POETA & CASADEVALL, 2012).

Na maioria dos casos, a infecção pelo *Cryptococcus* spp. é auto-limitada com raros sintomas. A disseminação do patógeno ocorre quando há alterações no sistema imunológico do hospedeiro principalmente em doenças imunológicas ou debilitantes como neoplasias hematológicas, linfomas, leucemias, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus, pacientes em tratamento com corticóides e especialmente em pacientes com AIDS (TSUJI, BARBABOSA & RIVERA, 2005).

Este fungo pode ser observado nos tecidos do hospedeiro como levedura encapsulada (forma assexuada), fato que o diferencia entre os fungos patogênicos. E também pode ser encontrado com ou sem brotamento, além de sua forma multibrotante, pobremente encapsulado, sem cápsula ou como pseudo-hifa (SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009).

Segundo estudo feito por Neilson *et al* em 1978, foi visto que estirpes de *C. neoformans* recolhidas do meio ambiente na forma de pseudo-hifas não apresentaram virulência em modelo murino de infecção, enquanto que células de levedura derivadas da mesma estirpe foram patogênicas. Dessa forma, verifica-se que a formação de hifas em *C. neoformans* durante a infecção é rara e não vantajosa para patogenicidade (NEILSON, IVEY & BULMER, 1978; SKOZUBOWSKI & HEITMAN, 2012).

As formas mais comuns de apresentação da criptococose em humanos são: meningite e meningoencefalite criptocócica, criptococose pulmonar, criptococose visceral, criptococose óssea, criptococose cutânea e mucocutânea (BABU, GOPALAKRISHNAN, & SUNDARARAJAN, 2013).

A infecção primária é adquirida por meio da inalação de células dessecadas e/ou basidiósporos de nichos ambientais contaminados com fezes de pombos ou excrementos de outras aves, geralmente para *C. neoformans* ou pela decomposição de madeira e outros materiais vegetais, principalmente *C. gattii* (DEL POETA & CASADEVALL, 2012). A transmissão entre humanos é incomum, mas pode ocorrer através de transplantes de órgãos, sendo a criptococose a terceira mais frequente

infecção fúngica entre pacientes transplantados (BADDLEY *et al.*,2011). Também não se tem relatos de transmissão direta entre os animais e o homem (TSUJI, BARBABOSA & RIVERA, 2005).

A criptococose pulmonar é causada pela inalação de partículas criptocócicas para os pulmões. Em indivíduos imunocompetentes a criptococose pulmonar, geralmente permanece assintomática, porém é possível a ocorrência de sintomas devido a infecção na área subpleural dos pulmões, dessa forma a infecção pode ser erradicada ou, ainda, o *Cryptococcus* spp. pode permanecer dentro de um granuloma em estado latente colonizando a árvore traqueobrônquica (MITCHELL & PERFECT, 1995; BABU, GOPALAKRISHNAN, & SUNDARARAJAN, 2013).

Entretanto, em indivíduos com algum comprometimento do sistema imune o fungo tende a produzir uma infecção sistêmica espalhando-se através da corrente sanguínea para a pele e órgãos internos, tendo maior afinidade pelo sistema nervoso central (SNC) (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ *et al.*,2013).

Esse tropismo pelo SNC dar-se à associação de nutrientes que se encontram no liquor em concentração adequada para a absorção pelo fungo. Essa associação é composta principalmente por tiamina, ácido glutâmico, glutamina, dopamina, carboidratos e minerais. A afinidade do *Cryptococcus* spp pelo SNC também é atribuída a ausência da ação do sistema complemento no líquido e a fraca atividade de resposta inflamatória no tecido cerebral (SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009).

Isolados de *Cryptococcus neoformans*, a partir de doentes com AIDS não apresentaram mudanças significativas no genótipo, apontando que a criptococose persistente é causada pela recidiva da infecção e, não por uma nova infecção (BRANDT *et al.*, 1996; IGREJA *et al.*, 2004). Outra evidencia associada com a infecção a partir de *C. neoformans* em estado de latência origina-se de um estudo realizado na França com pacientes que adquiriram o fungo originalmente na África, onde viviam por volta de 10 anos antes de se mudarem para a Europa. Todas as cepas isoladas desses pacientes tinham um padrão depolimorfismo no comprimento defragmentos de Restrição de DNA (análise de RFLP) diferentes daqueles dos isolados de pacientes europeus, americanos ou asiáticos. A infecção aguda também pode ocorrer quando indivíduos imunodeprimidos são sujeitos a um grande número de células de *C. neoformans* (LIN & HEITMAN, 2006).

#### 1.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E SINTOMAS

Alguns fatores podem influenciar na apresentação da criptococose, esses fatores incluem as variáveis epidemiológicas, a origem dos fatores de risco que causam imunossupressão e as espécies de agentes patogênicos. Dessa forma, infecções por *C. neoformans* e *C. gattii* causam manifestações clínicas diferentes (DEL POETA & CASADEVALL, 2012; ASLOAN & PARRIS, 2014).

No entanto, mesmo com algumas diferenças clínicas entre as doenças causadas por *C. neoformans* e *C. gattii*, ambas as espécies podem afetar qualquer órgão. Isso irá depender do conceito fundamental da patogênese da criptococose, que tem como base o conhecimento sobre a integridade das defesas do hospedeiro. Este conceito é apoiado pela hipótese de que, devido à ubiquidade de *Cryptococcus* spp. na natureza e a prevalência relativamente baixa de infecção sintomática, mesmo com a doença em estágio avançado, a incidência de exposição é muito mais elevada do que a incidência da doença.

Com isso, pode-se aferir que a maior parte da população é, provavelmente, resistente, e apenas indivíduos com comprometimento do sistema imunológico são propensos a desenvolver criptococose. No entanto, esta conclusão não leva em conta a ocorrência de doença em indivíduos aparentemente saudáveis (MITCHELL & PERFECT, 1995).

A apresentação clínica de infecções causadas por *C. gattii* incluem significativas massas inflamatórias (criptococomas) que geralmente produzem sequelas neurológicas requerendo cirurgias e terapias antifúngicas prolongadas (SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009).

Já o *C. neoformans* prolifera dentro das células fagocíticas do hospedeiro, podendo garantir vantagens em termos de disseminação e proteção imunológica (SRIKANTA, SANTIAGO-TIRADO & DOERING, 2014). Esta espécie acomete principalmente pacientes imunodeprimidos, causando pequenas lesões radiológicas pulmonares associadas à meningite e, devido a sua atividade proteolítica, apresenta criptococcemia e criptococúria, manifestações raramente encontradas em infecções por *C. gattii* (SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009).

A meningite criptocócica é a apresentação líder global mais presente em indivíduos com AIDS, já outras manifestações são proporcionalmente mais

freqüentes em indivíduos que não são infectados pelo HIV (SLOAN & PARRIS, 2014). Neste sentido o agente infeccioso não está limitado apenas ao sistema respiratório e SNC, mas também pode disseminar-se para outros órgãos como, pele, linfonodos, ossos/articulações, olhos, coração, fígado, baço, rins, tireóide, supra-renais e a próstata, a qual pode ser considerada como um reservatório para a recidiva da doença (BIVANCO, MACHADO, & MARTINS, 2006).

As características mais comuns da meningite criptocócica são dor de cabeça subaguda e confusão. A pressão intracraniana, pode se encontrar aumentada causando paralisia do nervo craniano ou convulsões. E outros sintomas clássicos de meningites como rigidez de nuca (LACAZ, ASSIS & BITTENCOURT, 1947; SLOAN & PARRIS, 2014).

Na criptococose pulmonar a sintomatologia vai desde manifestações de infecção aguda como tosse, febre, dor torácica, pneumonia, insuficiência respiratória grave, principalmente em indivíduos com AIDS; até infecções crônicas com presença de nódulos pulmonares solitários ou múltiplos, derrame pleural em pacientes imunocompetentes, entretanto com raros casos de comprometimento dos linfonodos e linfadenopatia mediastinal maciça. Já em radiografia de hospedeiros imunocomprometidos observa-se a manifestação de linfadenopatia e infiltrados pulmonares (BIVANCO, MACHADO, & MARTINS, 2006; OKACHI *et al.*, 2015).

## **1.5. TRATAMENTO**

Pode-se classificar um antifúngico de acordo com seus diferentes alvos de ação, sendo assim, o mecanismo de ação do fármaco está relacionado com sua estrutura química, que irá determinar o espectro de ação e a via de administração. Nos últimos anos, têm sido sintetizados novos antifúngicos, entretanto estes novos medicamentos não demonstraram características que representassem um verdadeiro avanço terapêutico (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2015).

A escolha do antifúngico depende do sítio de infecção e da imunidade do paciente, dessa forma o tratamento para a meningite e outras formas de doença invasiva criptocócica é dividido em uma fase de indução de duas semanas, seguido por uma fase de consolidação de 8 semanas, e, em seguida, uma fase de



manutenção prolongada (SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009; WARKENTIEN & CRUM-CIANFLONE, 2010).

Os principais antifúngicos utilizados no tratamento de criptococose são anfotericina B (0,5-1,0 mg/kg/dia) e seus derivados lipídicos, fluconazol (400 mg/dia) e 5-flucitosina (100 mg/kg/dia, em combinação com anfotericina B, devido ao aumento da frequência de resistência em monoterapia). Apesar de ser um medicamento barato, nota-se que a 5-flucitosina ainda não se encontra disponível no Brasil, bem como em outros países em desenvolvimento (SUBRAMANIAN & MATHAI, 2005; BIVANCO, MACHADO & MARTINS, 2006; SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009; PERFECT *et al.*, 2010).

Antes da epidemia da AIDS, o tratamento padrão para a meningite criptocócica era Anfotericina B (0,3 mg/kg/dia) e flucitosina (150 mg/kg/dia) durante quatro ou seis semanas, entretanto houve dúvidas sobre, a utilização de flucitosina em pacientes com AIDS, pois poderia levar a associação de uma alta toxicidade sem dispor de vantagens terapêuticas sobre a anfotericina sozinha (HORST *et al.*, 1997).

No entanto, estudos recentes têm recomendado um rápido manejo fungicida para o tratamento inicial de meningite criptocócica em pacientes com HIV consistindo em doses de anfotericina B (0,7 a 1 mg/kg/dia) mais flucitosina (100 mg/kg/dia). Resultados destes estudos apontaram que essa combinação pode ser mais eficaz e ter menor risco de falha micológica em duas semanas do que a anfotericina B sozinha ou em combinação com fluconazol (WARKENTIEN & CRUM-CIANFLONE, 2010)

É evidente o sucesso terapêutico na administração de desoxicolato de anfotericina B em casos de meningite criptocócica. Esse medicamento possui a vantagem de apresentar rápida depuração do *Cryptococcus* spp., mas, por outro lado, tem a desvantagem de ocasionar nefrotoxicidade. Deste modo, o uso de anfotericina B lipossomal irá reduzir essa desvantagem, sendo também utilizada no tratamento de receptores de transplante de órgãos sólidos, pois além de ter baixa nefrotoxicidade também pode melhorar a sobrevida destes pacientes (SAAG *et al.*, 2000; SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009; DESALERMOS, KOURKOUMPETIS & MYLONAKIS, 2012).

Atualmente, devido a terapia anti-retroviral altamente ativa (TARV), o manejo da criptococose tornou-se uma combinação já estabelecida de procedimentos para a

terapia antifúngica juntamente com o tratamento agressivo da doença subjacente. O gerenciamento de medicamentos antifúngicos para o tratamento da criptococose é um dos mais bem definidos dentre as infecções fúngicas invasivas. Entretanto, há questões e fatores que geram algumas dúvidas, devido à falta de estudos na área, principalmente envolvendo o hospedeiro (PERFECT *et al.*, 2010).

Uma importante distinção é feita nas orientações para diferenciar o tratamento do SNC daqueles que não engloba o SNC, portanto, uma punção lombar deve ser realizada entre pacientes imunocomprometidos com doença criptocócica para descartar meningite (WARKENTIEN & CRUM-CIANFLONE, 2010).

A avaliação específica de resultados entre pacientes HIV-negativos portadores de doença pulmonar ou doenças que não tenham o envolvimento do SNC, ainda são insuficientes para se estabelecer um manejo terapêutico mais adequado. Devido isso, o tratamento específico de escolha e a duração ótima do tratamento não foram completamente elucidados para estes pacientes (SAAG *et al.*, 2000). Contudo, para formas clinicamente graves recomenda-se o tratamento com Anfotericina B (0,7-1,0 mg / kg por dia por via intravenosa - IV) mais flucitosina (100 mg / kg por dia por via oral em doses divididas) durante pelo menos 4 semanas para a terapia de indução. Tratamento muito parecido com o da meningite criptocócica (PERFECT *et al.*, 2010).

Já em pacientes imunocompetentes que se apresentam com sintomas leves a moderados devem ser tratados com fluconazol (200-400 mg / dia) por 6-12 meses. Nos casos em que o fluconazol não é uma opção, um tratamento alternativo aceitável é itraconazol (200-400 mg / dia), por 6-12 meses. A toxicidade da anfotericina B limita a sua utilidade como um agente desejado para o tratamento da doença pulmonar leve-moderada entre hospedeiros imunocompetentes (SUBRAMANIAN & MATHAI, 2005; SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009).

Já nos pacientes imunodeprimidos com criptococose pulmonar sem envolvimento do SNC e doença extra-pulmonar o tratamento deve ser realizado da mesma forma daqueles pacientes com doença instalada no SNC (SAAG *et al.*, 2000). Diante disso, uso apropriado dos agentes antifúngicos diminui a mortalidade significativamente, mas requer terapia continuada e prolongada para prevenir recidivas (SEVERO, GAZZONI & SEVERO, 2009).

## 1.6. EPIDEMIOLOGIA

Vários estudos sobre a ecologia do *C. neoformans* e *C. gattii* revelam que não há um nicho específico para estas espécies; elas podem ser encontradas em diversos nichos ambientais e substratos (SLOAN & PARRIS, 2014). Neste sentido, o impacto da doença causada por esses agentes é um assunto importante e deve ser discutido pelos funcionários de saúde pública com o objetivo de planejar e priorizar de forma correta os recursos fundamentais para a prevenção e controle da doença (PARK *et al.*, 2009).

Antes da epidemia da AIDS, na década de 1950, obtiveram-se relatos de menos de 500 pacientes com infecção criptocócica em todo o mundo. Já em 1976, somente nos Estados Unidos da América (EUA), foram observados 338 casos confirmados (PYRGOS *et al.*, 2013).

Entre os anos de 1990 e 2000 cerca de 5% a 10% das pessoas com AIDS nos Estados Unidos e na Europa desenvolveram a criptococose, sendo esta doença associada com alta mortalidade (MIRZA *et al.*, 2003). A frequência mundial de casos de criptococose relacionados com a AIDS pode chegar a aproximadamente 1 milhão por ano com mais de 600.000 mortes associadas, principalmente nos países em desenvolvimento onde a terapia anti-retroviral é menos disponível (PYRGOS *et al.*, 2013).

O curso natural da infecção causada pelo HIV tem mudado tragicamente na era da TARV. Nas regiões do mundo que são capazes de sustentar essas terapias a incidência de infecções oportunistas associadas ao HIV tem diminuído, assim como internações, custos de internação e mortes associadas à AIDS (KAPLAN *et al.*, 2000). Entretanto as taxas de mortalidade elevadas ainda se apresentam elevadas com 30-60% de casos relatados, sendo que a maioria ocorre em países onde o acesso a TARV é limitado (MORA *et al.*, 2012).

Essa queda na incidência de infecções fúngicas oportunistas associadas a pacientes infectados pelo HIV, provavelmente teve início em 1997, devido a ampla disponibilidade de medicamentos TARV, além do impacto da profilaxia antifúngica. Porém, observou-se que as hospitalizações em pacientes não infectados pelo HIV foram mais persistentes, evidenciando o aumento de pacientes não infectados pelo

HIV entre as internações de meningite criptocócica ao longo do tempo (PYRGOS *et al.*, 2013).

De acordo com pesquisa feita por Park *et al.* (2009), foi estimado que cerca de 957.900 casos de meningite criptocócica ocorreram em 2006. O maior número de casos estimados foi na África Subsaariana com 720.000 casos, seguido pelo sul e sudeste da Ásia (120.000 casos). Enquanto, as regiões que tiveram menores estimativos foram Oceania, Europa Ocidental e Central, Norte da África e Oriente Médio seguidos pela América do Norte (PARK *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado nos EUA constatou-se que o uso da TARV mudou drasticamente a epidemiologia da criptococose no país e em outros países desenvolvidos, e que tem provado ser a estratégia mais eficaz para prevenir todas as infecções fúngicas oportunistas (MIRZA *et al.*, 2003). A maioria dos casos de meningite criptocócica em pacientes com AIDS é causada por *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, sendo este responsável por 82% da doença em todo o mundo (SLOAN & PARRIS, 2014). No entanto, *C. gattii* tem se demonstrado como agente infeccioso em países subsaarianos com uma prevalência de 30%.

Na América Latina observa-se que a meningoencefalite é a forma clínica mais comum da criptococose, com 85% dos casos causadas por *C. neoformans*; 80% estão associados com a infecção por HIV. Nesta região, entre os anos de 1980 e 2002 houve mais de 215.000 pacientes com AIDS e criptococose, e em 60% dos casos o diagnóstico dessas infecções foram feitas concomitantemente. No México a prevalência de meningite tem sido em torno de 7% a 11% em pacientes com HIV, com uma tendência decrescente nos últimos anos.

A incidência de meningite criptocócica pode variar de acordo com a população em estudo. No Rio de Janeiro, a incidência foi de 0,3 / 100.000 habitantes em 2002, aumentando para 0,68 em 2003. Na Colômbia, esta taxa foi determinada como sendo de 0,24 / 100.000 habitantes na população geral, mas 3 / 1.000 em pacientes com HIV (SIFUENTES-OSORNIO, PONCE-DE-LEÓN & CORZO-LEÓN, 2012). Apesar da TARV e drogas antifúngicas que se encontram à disposição de forma gratuita nos serviços de saúde pública no Brasil, a meningite criptocócica ainda representa a terceira ou quarta mais comum doença definidora de AIDS e a segunda infecção mais prevalente do SNC nestes pacientes (MORA *et al.*, 2012).

Segundo dados do Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde–SIH-SUS, a criptococose apresentou o maior número de internações entre as micoses sistêmicas no período de 2000 a 2007.

A criptococose associada a AIDS tem maior frequência nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, particularmente em homens, causada pela espécie *C. neoformans*, com uma mortalidade de 35 a 40%. Já os casos envolvendo *C. gattii* ocorrem esporadicamente também nas regiões Sul e Sudeste.

No Brasil, pacientes com a AIDS, desenvolvem a criptococose como primeira manifestação de infecção oportunista em cerca de 4,4 % dos casos e estima-se a prevalência da criptococose associada a AIDS entre 8 e 12% em centros de referência da região sudeste. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

### **1.7. CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS: BREVE HISTÓRICO**

Em 1894, na Alemanha, o *Cryptococcus neoformans* foi identificado pela primeira vez como um agente patogênico humano, pelo patologista Otto Busse e pelo cirurgião Abrham Buschke. Eles isolaram o agente infeccioso de uma mulher de 31 anos de idade. No entanto Busse isolou o agente de lesões da tíbia, enquanto Buschke de lesões cutâneas. O microrganismo foi cultivado de forma independente para estudos comparativos e, então denominado de *Saccharomyces hominis*, por Busse e descrito como um coccídeo por Buschke (KNOKE & SCHWESINGER, 1994; MITCHELL & PERFECT, 1995; COELHO, BOCCA & CASADEVALL, 2014).

Neste mesmo ano, na Itália, Francesco Sanfelice isolou o *Cryptococcus neoformans*, a partir de suco de pêssego fermentado, que a princípio foi denominado de *Saccharomyces neoformans*, devido à singular forma de suas colônias. Foram realizadas experiências em animais com este microrganismo, e estes animais apresentaram lesões tumorais, as quais foram chamadas de blastomas. Dando início a uma teoria micótica dos tumores (DEFENDORF, 1897; MITCHELL & PERFECT, 1995; KUMAR *et al*, 2011; SLOAN & PARRIS, 2014).

Na França, em 1895 novas observações em lesões cutâneas, foram feitas por Curtis, e foi possível isolar novas leveduras que foram denominadas de *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* ou *Megalococcus myxoides*. (BIVANCO,

MACHADO & MARTINS, 2006). Em 1901, Jean-Paul Vuillemin classificou as leveduras isoladas como sendo do gênero *Cryptococcus* para substituir o *Saccharomyces*, pois as amostras isoladas e analisadas, não apresentavam ascósporos, característica definidora para o gênero (KWON-CHUNG, 1976; KNOKE & SCHWESINGER, 1994; BIVANCO, MACHADO & MARTINS, 2006; SRIKANTA, SANTIAGO-TIRADO & DOERING, 2014).

Von Hansemann, em 1905 observou um paciente que morreu de meningite criptocócica e, em 1914 a doença foi reconhecida *in vivo*, por Verse (BALLOU, ALSPAUGH & NICHOLS, 2011). Dois anos depois, nos EUA, Stoddard e Cutler, passou a chamar esta levedura de *Torula histolytica* e *Torula neoformans* e a doença passou-se a ser chamada de torulose (BIVANCO, MACHADO & MARTINS, 2006).

Em 1940, já haviam sido descritos cerca de 80 casos de criptococose, principalmente de sistema nervoso central. No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram entre os anos de 1941 e 1944, descritos pelos professores, Dr. Carlos da Silva Lacaz e Dr. Floriano de Almeida (LACAZ, ASSIS & BITTENCOURT, 1947; PAPPALARDO & MELHEM, 2003), desde então, vários estudos epidemiológicos foram e estão sendo realizados no país (FRANZOT *et al.*, 1997; IGREJA *et al.*, 2004, LINDENBERG *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2014). O número de casos manteve-se crescente, e em 1948, foi possível esclarecer aspectos epidemiológicos, etiológicos e patogênicos da criptococose; havendo relatos de infecção em animais, principalmente nos pulmões, e em granulomas nasais de cavalos (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

Os estudos de sorotipagem iniciaram-se no final da década de 40 e eram baseados na reação imunológica com anti-soro produzido contra diferentes epítomos do polissacarídeo capsular, Evans (1949) identificou os sorotipos A, B e C e mais tarde em 1966, Vogel descreveu o sorotipo D. (IKEDA *et al.*, 1982; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Até 1950 muitos relatos de casos foram publicados sobre infecções clínicas com *C. neoformans*, bem como experimentos utilizando os microrganismos isolados, a partir desses pacientes, em animais. Foram relatados também infecções no cérebro, pulmões, rins e em muitos outros órgãos. (SPEED & DUNT, 1995)

Por volta de 1951, Emmons fez o primeiro isolamento de *C. neoformans* a partir de fontes ambientais, principalmente de excrementos de aves, em particular fezes secas de pombos, justificando o conceito de que a infecção é adquirida a partir de ambiente contaminado (EMMONS, 1951; HENRICKSON, 1972). Então, em 1952 a espécie foi classificada como *Cryptococcus neoformans* por Lodder et Kreger-Van Rij; tornando-se, um conceito amplamente aceito (BAKER et al., 1971).

Em 1954, através dos estudos feitos por Baker e Haugen foi possível elucidar grande parte da patologia e das características da criptococose pulmonar primária (MITCHELL & PERFECT, 1995). Neste mesmo ano, Zimmerman e Rappaport observaram a associação frequente de criptococose com doenças debilitantes, especialmente perturbações malignas do sistema linfático (BAKER et al., 1971).

Staib, em 1964 fez uso de extrato de fezes de aves em meios de cultura, e, assim observou que o *C. neoformans* produzia colônias de coloração marrom com produção de melanina que, provavelmente, ocorria devido à presença das sementes de *Guizotia abyssinica* que estes pássaros utilizavam em sua alimentação (SILVA et al., 2015).

A partir dos anos 80, devido ao surgimento da AIDS e de novos fármacos imunossupressores, foi possível observar um significativo aumento na incidência da criptococose, sendo essa, atualmente, uma das principais infecções fúngicas que acomete pacientes portadores de AIDS (MITCHELL & PERFECT, 1995; DUIN et al., 2004; NUCCI et al., 2010; CORDEIRO et al., 2013).

## **1.8. ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada da classe basidiomiceto com distribuição mundial (JUNIOR et al., 2013), podendo apresentar em seu ciclo de vida tanto uma reprodução assexuada por brotamento quanto sexuada com a produção de basidiósporos (SORREL, 2001). Além de ser considerado um patógeno intracelular facultativo provido de uma estratégia patogênica única (CHRISMAN, ALVAREZ & CASADEVALL, 2010) este fungo revela-se com diversas formas morfológicas, integrando levedura, clamidósporos, pseudo-hifas e hifas. Está normalmente presente na forma de levedura durante as infecções, ao contrário, sua forma filamentosa é raramente encontrada nos tecidos

infectados, implicando em menor potencial de virulência (LIN, 2009). As leveduras se apresentam como células redondas de 5-6 µm de diâmetro que crescem rapidamente em cultura líquida e formam colônias brilhantes, mucóides, suaves em meios sólidos (BENHAM, 1935; SRIKANTA, SANTIAGO-TIRADO & DOERING, 2014). A temperatura de crescimento, restrição de nitrogênio e luz, substratos desidratados, a presença de feromônios de acasalamento, concentrações elevadas de dióxido de carbono e o tipo de meio de cultura podem interferir no ciclo celular deste fungo estimulando o crescimento de outros tipos morfológicos.

O *C. neoformans*, historicamente foi categorizado em duas variedades e cinco sorotipos, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). Entretanto, diante evidências moleculares, este complexo de espécies passou a usar a nomenclatura revisada e atualizada por Kwon-Chung *et al.* (2002), sendo reclassificado como espécies distintas; os sorotipos A e D foram separados em duas variedades diferentes: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. gattii* sorotipos B e C. Essas espécies se diferem quanto a epidemiologia, apresentação clínica e terapêutica (KWON-CHUNG *et al.*, 1992; FRANZOT, SALKIN & CASADEVALL, 1999; KWON-CHUNG *et al.*, 2002; LIN & HEITMAN, 2006; LIN, 2009;)

Observa-se que o *C. neoformans* tem a capacidade de produzir uma cápsula de polissacarídeo, tanto quando em sua forma saprófita quanto em sua forma parasita. Conjectura-se que esta cápsula tem a função de proteger o fungo de dessecação ambiental e/ ou predadores naturais, como nematódeos ou amebas. Já no hospedeiro, a cápsula protege o fungo reduzindo a ação do sistema imunológico (LITTMAN & TSUBURA, 1959; O'MEARA & ALSPAUGH, 2012). A cápsula celular de *C. neoformans* é composta por cerca de 88% de glicuronoxilomanana(GXM), integrando polímeros de manose, xilose, ácido glucurônico, e grupamentos laterais de O-acetil. Os demais constituintes da cápsula englobam os hidratos de carbono menores, isto é, a galactoxilomanana(GalXM) e manoproteínas (MP). (LITTMAN & TSUBURA, 1959; CHERNIAK & SUNDSTROM, 1994; BOSE *et al.*, 2003).

A cápsula que envolve o agente, normalmente apresenta-se com um formato espesso e viscoso e pode variar de 2,5 a 14 µm de diâmetro, entretanto algumas cepas podem produzir uma cápsula de até 80 µm. Existem indícios que os diferentes



tamanhos da cápsula são devido a fatores genéticos e da ação exercida pelo ambiente sobre o fungo. Neste sentido, uma mesma cepa, pode “*in vivo*” apresentar tamanhos maiores do que em meios de cultivo “*in vitro*” (CRUISCKSHANK *et al.*, 1975).

## **1.9. FATORES DE VIRULÊNCIA**

Fatores de virulência são características de um microrganismo que o torna capaz de causar dano a um hospedeiro suscetível (CASADEVALL AND PIROFSKI, 2009). *C. neoformans* apresenta vários fatores de virulência que se encontram bem definidos. Geralmente, a virulência de uma cepa não pode ser atribuída a um elemento único, mas sim ao conjunto de elementos que se completam para causar a doença (BUCHANAN & MURPHY, 1998)

As espécies de *Cryptococcus* spp. possuem a característica distintiva entre outros fungos patogênicos humanos de ter uma cápsula de polissacarídeo, que é essencial para a sua virulência (FONSECA *et al.*, 2009; SRIKANTA *et al.*, 2014), outros fatores de virulência dessa espécie incluem a produção de melanina pela enzima lacase, a produção de urease, de fosfolipases e a habilidade de crescimento a 37°C (McCLELLAND *et al.*, 2005), além do parasitismo de macrófagos. Estes fatores permitem que o agente patogênico escape e sobrecarregue o sistema imune do hospedeiro (SABIITI *et al.*, 2014).

Entretanto, como já foi dito, estes elementos não são suficientes para elucidar totalmente a capacidade que *C. neoformans* possui de causar doença. Dessa forma, a base para o neurotropismo, ainda não se encontra completamente esclarecida, mas pode estar ligada a evasão seletiva de defesas do hospedeiro ou a presença de substâncias nutritivas nos tecidos alvos (VU *et al.*, 2014; ZHAI *et al.*, 2013; CASADEVALL, 2010)

### **1.9.1. Cápsula**

*Cryptococcus* spp. é único patógeno eucariótico humano que possui uma cápsula de polissacarídeo (CPS), que é o seu principal determinante de virulência (LITTMAN & TSUBURA, 1959; ZARAGOZA *et al.*, 2009) e no meio ambiente tem a

função de proteger o microrganismo de algumas condições de stress, como a desidratação, pois as células de *Cryptococcus* spp. podem chegar a uma umidade residual de 30% mesmo em baixa umidade relativa (AKSENOV, BABYEVA & GOLUBEV, 1973), além de ser essencial para a formação de biofilmes (MCFADDEN, ZARAGOZA & CASADEVALL, 2006).

A espessura da cápsula de *C. neoformans* é modulada em resposta às condições ambientais. A cápsula pode ser facilmente visualizada com o auxílio de um microscópio, por coloração negativa com tinta da China, muito utilizado em exames diretos. Em condições *in vitro* a cápsula exibe um padrão de 1-2  $\mu\text{m}$  de espessura. Já *in vivo*, o tamanho da cápsula se apresenta com uma espessura bem maior, cerca de 30  $\mu\text{m}$ . Na década de 1980, observou-se que a regulação do tamanho da cápsula por dióxido de carbono estava diretamente relacionada à virulência. Algum tempo depois, descobriu-se que a limitação de ferro também poderia induzir o crescimento da cápsula (ZARAGOZA, FRIES & CASADEVALL, 2003; JANBON, 2004; KUMAR *et al.*, 2011).

Atualmente, têm se descrito outras condições que induzem o crescimento de cápsula, tais como soro ou meio com pouco nutriente, além de várias cascatas de transdução incluindo o AMPc e vias de sinalização mediadas por proteínas-quinase ativadas por mitógenos. Por outro lado, pressão osmótica elevada, alto teor de glicose ou meio de crescimento rico em nutrientes estão associados ao crescimento de células com cápsula menores (DYKSTRA, FRIEDMAN & MURPHY MCFADDEN, 1977; JACOBSON, TINGLE & QUINN, 1989; GATES, THORKILDSON & KOZEL, 2004; ZARAGOZA & CASADEVALL, 2006).

Mutantes na via AMPc que não podem ampliar a cápsula mostram uma menor virulência, ao passo que os mutantes que tem uma maior produção de cápsula são hipervirulentos. Embora estes mutantes possuam fenótipos pleiotrópicos, as suas características de virulência são coerentes com o crescimento da cápsula (MCFADDEN, ZARAGOZA & CASADEVALL, 2006).

As estruturas dos polissacarídeos da cápsula de *C. neoformans* são complexas, e necessitam de vários produtos gênicos para a sua biossíntese. Dessa forma, é indispensável à aplicação de técnicas genéticas e bioquímicas para a compreensão das etapas desta via. Chang *et al.*, sequenciaram quatro genes essenciais para a produção de GXM: CAP10, CAP59, CAP60, CAP64.

Estes genes foram identificados como imprescindíveis para a virulência do fungo em modelos murinos, enfatizando a importância da cápsula como um fator de virulência (CHANG, WICKES & KWON-CHUNG, 1995; CHANG, PENOYER & KWON-CHUNG, 1996; CHANG & KWON-CHUNG, 1998; CHANG & KWON-CHUNG, 1999; BOSE *et al.*, 2003; OKABAYASHI, HASEGAWA & WATANABE, 2007). Além dos genes da CAP, observaram-se também outros genes envolvidos na biossíntese da cápsula como MAN1, CAS (CAS1-CAS6) que têm a função de sintetizar polissacarídeos e o gene UXS1 (BOSE *et al.*, 2003; DOERING, 2009).

A cápsula é composta por dois principais polissacarídeos, galactoxilomanana (GalXM) e glucuronoxilomanana (GXM), além de uma menor proporção de manoproteínas (MP) (FRASES *et al.*, 2009). Esses polissacarídeos complexos são sintetizados dentro do citoplasma da célula e secretados em forma de vesículas para o meio extracelular através do transporte mediado pela parede celular, logo após fazem ligações não covalentes à superfície da célula, onde montam longos polímeros. Assim, a síntese da cápsula parece estar associada com o acúmulo de vesículas na parede celular (DUIN *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008; DOERING, 2009; O'MEARA & ALSPAUGH, 2012)

Os estudos sobre a composição da cápsula do fungo se concentram na GXM, por se apresentar em mais de 90% da massa capsular. Entretanto, a GalXM, também possui importância, devido a suas propriedades imunológicas no aumento de TNF- $\alpha$ , indução de IL-6 em monócitos, envolvimento na expressão de citocinas. Esses polissacarídeos possuem uma estrutura molecular muito complexa e ainda são necessários estudos para se ter resultados mais esclarecedores (ZARAGOZA *et al.*, 2009; SRIKANTA, SANTIAGO-TIRADO & DOERING, 2014).

Durante a infecção a GXM também é secretada e inibida por GXM, que atua impedindo a migração de leucócitos e neutrófilos para o local da inflamação, além de interferir na apresentação de antígenos às células T o que conduz para a redução de citocinas pro-inflamatórias como, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 e 6 (IL-1 e 6) pelos macrófagos e monócitos. Além disso, os componentes capsulares esgotam a cascata do complemento, ajudando assim na sobrevivência do *Cryptococcus neoformans* nos tecidos do hospedeiro (ELLERBROEK *et al.*, 2004; MCFADDEN, ZARAGOZA & CASADEVALL, 2006).

Adicionalmente, a cápsula é antifagocítica, ou seja, gera a inibição do processo de ingestão e destruição de partículas sólidas, impedindo a maturação e ativação das células dendríticas, e do processo de captura e transporte dos antígenos, dificultando a internalização deste microrganismo pelo sistema imune e com isso, o hospedeiro fica desprotegido contra possíveis infecções. A cápsula também induz a apoptose de macrófagos. Apesar destes mecanismos de evasão do sistema imunológico, as manoproteínas, que estão presentes na cápsula do *C. neoformans*, são os principais antígenos de células T que desencadeiam a imunidade do hospedeiro (LI & MODY, 2010).

### 1.9.2. Crescimento a 37°C

Para causar doenças em seres humanos, os fungos patogênicos possuem uma característica em comum que é sobreviver a 37 ° C, e também crescer neste ambiente (SRIKANTA, SANTIAGO-TIRADO & DOERING, 2014). Além disso, algumas cepas de *C. neoformans* podem sobreviver e amplificar bem em condições ambientais de hipóxia (1% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> em 37°C e pH entre 7,3 e 7,4), condições estas, semelhantes às do cérebro e decisiva para causar infecção (BAHN *et al.*, 2005; LIN & HEITMAN, 2006; LIN, 2009).

Em estudo realizado por Odom *et al.* descobriu-se que o crescimento de *Cryptococcus neoformans* é sensível a ciclosporina A (CsA) e FK506, a 37 °C mas não a 24 ° C, sugerindo que a esses imunossupressores, CsA e FK506 além de inibirem os processos de transdução de sinal necessários para a ativação de células T, também podem inibir uma proteína necessária para o crescimento de *C. neoformans* a temperatura elevada. Evidências genéticas apontam para um modelo em que os complexos de fármaco-imunofilina inibem a calcineurina para prevenir o crescimento a 37°C, dessa forma o gene (*CNA1*) que codifica a calcineurina, está envolvido na resposta a diversos estímulos ambientais para adaptação do fungo a diferentes tipos de estresses, também está relacionado diretamente com a capacidade de sobrevivência desse microrganismo a 37°C (ODOM *et al.*, 1997).

Em estudos com coelhos e teste de suscetibilidade *in vitro* a uma temperatura de 30°C, não foi possível observar efeitos de CsA. No entanto, nos estudos com modelo murino e com testes de susceptibilidade *in vitro* a 35°C observaram-se uma

potente inibição do crescimento de *C. neoformans*. Com isto, surgiu a hipótese de que a via da calcineurina poderia ser essencial para o crescimento de *C. neoformans* sob pressão de alta temperatura, e pode, portanto, ser um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas anti-criptocócicas (STEINBACH *et al.* 2007).

### 1.9.3. Melanina

Melanina é um polímero pigmentado que protege a célula do fungo contra o estresse oxidativo, a fagocitose, e antifúngicos, além de modificar a resposta imune do hospedeiro, influenciando nos processos patológicos da criptococose (DUIN, CASADEVALL & NOSANCHUK, 2002; IKEDA *et al.*, 2003; LIN & HEITMAN, 2006). Estes pigmentos são hidrofóbicos, de peso molecular elevado, e carregados negativamente. Sua síntese ocorre através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e / ou compostos indólicos e possui na maioria das vezes cor preta ou marrom, embora melaninas de outras cores também existam (BUTLER *et al.*, 2001; LANGFELDER *et al.*, 2003).

As melaninas se apresentam insolúveis em solventes aquosos e orgânicos e, conseqüentemente, são difíceis de estudar por técnicas bioquímicas e biofísicas convencionais. Dessa forma, ainda há controvérsias sobre a definição de melanina. Os compostos são classificados como melaninas provisoriamente sobre a base da sua cor escura, fraca solubilidade, pelos espectros de ressonância magnética nuclear, em relação à resistência à degradação por ácidos e soluções alcalinas quentes, e de branqueamento por agentes oxidantes. (CASADEVALL, ROSAS & NOSANCHUK, 2000).

Em 1960, Staib descobriu a produção de melanina por *C. neoformans* em meio contento extrato aquoso de *Guizotia abyssinica*. Observou-se que as colônias apresentaram uma cor marrom. Estudos realizados no início da década de 80 mostraram uma correlação entre a capacidade de produzir melanina e a virulência em *C. neoformans*. Usando uma abordagem bioquímica, verificou-se que *C. neoformans* possui um sistema que utiliza eficientemente catecolaminas na produção desses polímeros (KWON-CHUNG, POLACHECK & POPKIN, 1982; KWON-CHUNG & RHODES, 1986; SALAS *et al.*, 1996).

A síntese de melanina envolve uma rede de transporte ligado à membrana, específico da enzima fenol-oxidase, que tem uma elevada afinidade para as catecolaminas como substratos. Isto resulta na produção de melanina a partir destes compostos por meio de uma série de rápidas reações de óxido-redução catalizadas pela enzima lacase. Assim, a melanina permanece aderida à parede celular do fungo (POLACHECK, 1991; CASADEVALL, STEENBERGEN & NOSANCHUK, 2003). A via de síntese de melanina usa neurotransmissores, tais como a dopamina e a epinefrina, que podem ser encontrados no SNC e são substratos preferidos dos fungos. Vários fungos neurotrópicos, incluindo *C. neoformans*, produzem melanina, o que tem sido associada à sua virulência. Essa predileção pelas catecolaminas pode fornecer uma explicação para o neurotropismo (LIN & HEITMAN, 2006).

O *C. neoformans* sintetiza melanina apenas na presença de substratos exógenos como o L-DOPA. Os genes que codificam a lacase são LAC1 e LAC2, com LAC1 sendo o principal produtor de melanina. O papel exato do gene LAC2 ainda não foi determinado. Sabe-se, no entanto, que existem diferenças na localização celular das duas lacases. A lacase codificada por LAC1 é localizada junta a parede celular. Em contraste, estudos de citolocalização mostraram que uma construção de LAC2-GFP, uma proteína de fusão, é encontrada principalmente no citoplasma celular do fungo. (MISSALL *et al.*, 2005; EISENMAN & CASADEVALL, 2012).

Estudos envolvendo a clonagem e deleção do gene LAC1, tem confirmado a associação pigmento-virulência em cepas knock-out (SALAS *et al.*, 1996; WILLIAMSON, 1997). Um mecanismo possível de virulência do fungo através da produção de melanina é baseado na eficácia que este pigmento tem de eliminar radicais livres, sendo assim, atribuídas às propriedades antioxidantes da melanina. A melanina também tem a função de proteger o *C. neoformans* contra a fagocitose (DIAMOND, ROOT. & BENNETT, 1972).

Estudos genéticos demonstraram que a produção de melanina por cepas do tipo selvagem de *C. neoformans* possuem mais virulência do que seus respectivos mutantes albinos. Uma cepa de *C. neoformans* que produz grandes quantidades de melanina *in vitro* foi associada com a redução de TNF- $\alpha$  e produção e proliferação de linfócitos em modelos murinos (CASADEVALL, ROSAS & NOSANCHUK, 2000).

Observa-se que no meio ambiente a melanização é um importante protetor e que auxilia na sobrevivência do fungo, nas mais diversas condições, como temperaturas extremas, radiação ultravioleta, predação por microrganismos e ação de metais pesados (URÁN & CANO 2008).

Nosanchuk e Casadevall demonstraram que a melanina contribui para a carga negativa de *C. neoformans*. *In vitro*, a ressonância paramagnética eletrônica demonstrou que a população de radicais livres no interior de *C. neoformans*, contem pigmentos semelhantes aos encontrados na eumelanina em mamíferos (NOSANCHUK & CASADEVALL, 1997). Forças eletrostáticas estão envolvidas na adesão celular e pode também ser relevante para a interação entre as células fagocitárias e as células criptocócicas. (RODRIGUES, ALVIANO & TRAVASSOS, 1999).

#### **1.9.4. Mating types**

*C. neoformans* tem dois tipos sexuais de acasalamento,  $MAT\alpha$  e  $MATa$ , que são determinados por um sistema de um locus com dois alelos. *C. neoformans* tem um ciclo de vida bem definido, no qual o acasalamento ocorre geralmente apenas entre os tipos sexuais opostos. O papel genético dos genes codificados no locus MAT no controle da célula está relacionado com a sinalização célula-célula, diferenciação levedura-hifas e manutenção do estado filamentoso (MOORE & EDMAN, 1993).

O alelo do tipo sexual  $\alpha$  ( $MAT\alpha$ ) foi definido como um fator de virulência de isolados de *Cryptococcus* spp., pois esse tipo está presentes tanto em isolados clínicos como em isolados ambientais em uma proporção bem maior do que o  $MATa$  (KWON-CHUNG & BENNETT, 1978; BUCHANAN & MURPHY, 1998). Observou-se que  $MAT\alpha$  presentes em alguns isolados de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* são mais virulentos em modelo animal de cepas congênicas, ao passo que,  $MAT\alpha$  isolados de *C. neoformans* var. *grubii* são mais suscetíveis de penetrar no SNC em estudos de co-infecção de cepas congênicas (LIN & HEITMAN, 2006).

Estudo realizado com cepas de *C. neoformans* do tipo  $MAT\alpha$  comparados a cepas com outro tipo sexual se demonstraram claramente mais virulentas. Além do mais, camundongos infectados com cepas do tipo  $\alpha$  tenderam a ter uma menor

sobrevida do que aqueles infectados com outras cepas. Estes dados sugerem fortemente a associação genética de virulência com o tipo sexual do locus MAT neste fungo patogênico humano (KWON-CHUNG, EDMAN & WICKES, 1992).

No entanto, tem sido difícil entender a contribuição para a virulência de genes individuais dentro do *locus MAT*, em parte devido à complexidade do locus e possivelmente também devido às diversas funções pleiotrópicas dos seus produtos codificados. Estudos recentes revelam outras associações potenciais entre fertilidade e virulência. Por exemplo, as cepas de *C. gattii* responsáveis pelo surto na Ilha de Vancouver, que são exclusivamente do tipo sexual  $\alpha$ , e produzem basidiósporos. A fertilidade destas cepas constitui uma exceção, pois cepas de *C. gattii* de diversas fontes são predominantemente estéreis. Curiosamente, as cepas férteis de *C. gattii* deste surto são altamente virulentas em comparação com outras cepas de *C. gattii* (LIN & HEITMAN, 2006).

#### **1.9.5. Manitol**

Várias evidências apontam que a produção do hexitol D-manitol pode contribuir para a sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro (WONG, B. *et al.* 1990). Resultados de um estudo feito por Chaturvedi *et al.* sugeriram que a capacidade de *C. neoformans* de produzir e acumular o manitol pode influenciar a sua tolerância ao calor, tensões osmóticas e sua patogenicidade em modelo murino (CHATURVEDI *et al.*, 1996).

Há duas hipóteses de como o manitol poderia desempenhar um papel na patogênese de *Cryptococcus neoformans*. Primeiramente, concentrações elevadas de manitol no sistema nervoso central poderiam contribuir para o edema cerebral. Em segundo lugar, o manitol pode proteger *C. neoformans* de morte oxidativa pelos fagócitos, por eliminação de radicais livres de hidroxila (RODRIGUES, ALVIANO & TRAVASSOS, 1999).

#### **1.9.6. Fosfolipases**

Chen *et al* detectaram atividade de fosfolipase em várias estirpes de *C. neoformans*. Essas estirpes foram cultivadas em ágar de gema de ovo, sendo que



49 de 50 cepas testadas apresentaram atividade de fosfolipase. Esta atividade enzimática correlacionou-se com a virulência e a patogenicidade da criptococose em um modelo murino. Neste sentido, os autores sugeriram que a atividade da fosfolipase extracelular produzida por *C. neoformans* poderia romper as membranas celulares de mamíferos e permitir que as células de levedura penetrassem os tecidos do hospedeiro. Entretanto os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram totalmente elucidados (CHEN *et al.*, 1997).

Estudo realizado por Cox *et al.* Através da clonagem de um gene que codifica a fosfolipase B (PLB1) de *C. neoformans* e de mutante de *plb1* que foi construído usando a técnica de ruptura do gene alvo, demonstraram atividade enzimática reduzida em comparação com a estirpe selvagem. Os mutantes *plb1* não demonstraram quaisquer defeitos na produção de outros fenótipos de virulência, como, crescimento a 37° C, formação de cápsula, atividade de lacase e atividade de urease. As estirpes *plb1* foram reconstituídas usando o locus de tipo selvagem e isto resultou no restabelecimento de todas as atividades de PLB extracelulares. Já em ensaios *in vivo*, as cepas *plb1* demonstraram uma redução significativa da virulência do que as estirpes de controle, tanto no modelo murino através de infecção respiratória, quanto em modelo de meningite utilizando coelhos. Assim, pode-se dizer que a fosfolipase também é um fator de virulência de *C. neoformans* (COX *et al.*, 2001).

De acordo com Santangelo *et al.* a atividade de PLB é essencial para desencadear uma infecção pulmonar intersticial e para a difusão da infecção através dos vasos linfáticos e do sangue, sendo também os fagócitos mononucleares um veículo para a difusão criptocócica. Entretanto observa-se que PLB não é um fator primordial para o estabelecimento de infecções neurológicas (SANTANGELO *et al.*, 2004).

### **1.9.7. Superóxido-dismutase**

Jacobson *et al.* demonstraram a atividade de superóxido-dismutase (SOD) em *C. neoformans*, que poderia está envolvida na neutralização de radicais livres, de forma semelhante a melanina e manitol (JACOBSON, JENKINS, & TODD, 1994; RODRIGUES, ALVIANO & TRAVASSOS, 1999). Estudos *in vitro*, demonstram que

a superóxido-dismutase contribui para a virulência, de *C. neoformans*, mas não é necessária para a patogenicidade (COX *et al.*, 2003).

Mutantes de SOD1 demonstraram defeitos no crescimento, na síntese da cápsula, no acasalamento, na esporulação e na sobrevivência na fase estacionária. A virulência destes mutantes foi analisada *in vivo* em um modelo murino e também *in vitro* e nos dois casos, os mutantes se mostraram mais suscetíveis a morte por neutrófilos humanos. A supressão de SOD1 também resultou em defeitos na expressão de fatores de virulência, como lacase, urease e fosfolipase. Com isso, sugere-se que a função antioxidante de SOD é importante para a patogênese do fungo, entretanto é dispensável para sua sobrevivência no meio ambiente (NARASIPURA *et al.*, 2003).

#### **1.9.8. Protease**

Muller e Sethi relataram que células de *C. neoformans* crescidas em cultura produzem uma protease que poderia digerir proteínas do plasma humano (MULLER & SETHI, 1972). Brueske relatou que os sobrenadantes de cultura de *C. neoformans* havia uma protease capaz de digerir a caseína. No entanto, estes estudos não tinham o objetivo de determinar se as proteases poderiam ser produzidas *in vivo* (BRUESKE *et al.*, 1986).

Neste sentido, em outros estudos *in vivo*, foi possível observar que as proteinases estão relacionadas com a virulência de *C. neoformans* devido à degradação de proteínas como colágeno, elastina e fibrinogênio, e outras proteínas imunologicamente importantes, como imunoglobulinas e fatores do complemento, levando ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Essa degradação pode causar danos teciduais ou vasodilatação, fazendo com que ocorra a invasão e disseminação dos fungos nos tecidos do hospedeiro (CHEN, BLANK & CASADEVALL, 1996; SANTAGELO *et al.* 2004).

#### **1.9.9. Urease**

A urease catalisa a hidrólise de uréia em amônia e carbamato e foi observada como um fator importante de algumas bactérias patogênicas. Em *Cryptococcus*

*neoformans* a urease é produzida em grandes quantidades e está relacionada com a virulência deste fungo (COX *et al.*, 2000). Observou-se que a urease criptocócica contribui para a invasão do sistema nervoso central, pelo aumento do depósito de leveduras dentro de microcapilares durante a propagação hematogênica, facilitando desse modo a disseminação para o cérebro (OLSZEWSKI *et al.*, 2004).

Em um estudo realizado por Osterholzer *et al.*, foi analisada a resposta imune em camundongos em frente a cepas de *C. neoformans* produtoras de urease. Dessa forma, a urease criptocócica foi associada às células Th2 altamente polarizadas, evidenciadas por um aumento dos eosinófilos pulmonares, dos níveis de IgE no soro, de citocinas T2 e macrófagos ativados. Evidenciando que este fator contribui para imunopatologia associada à doença fúngica invasiva (OSTERHOLZER *et al.*, 2009).

Shi *et al.* usaram uma cepa de knock-out de *C. neoformans* em um modelo murino, para demonstrar que a migração das células fúngicas para o cérebro é urease dependente. Neste sentido, foi utilizado um potente inibidor de urease, o flurofamida e assim, foi possível observar uma melhora na infecção do cérebro de camundongos através da redução da migração. Os resultados deste estudo apontaram para um aprisionamento mecânico nos capilares cerebrais, desfavorecendo a farmacoterapia, entretanto, a migração ativa para o parênquima cerebral está relacionada com a urease, sugerindo uma estratégia terapêutica relacionada com a inibição desta enzima com o objetivo de prevenir a meningite e a encefalite criptocócica (SHI *et al.*, 2010).

## **1.10. INTERAÇÕES PATÓGENO-HOSPEDEIRO**

Uma variedade de fatores inatos pode interferir no estabelecimento da infecção criptocócica. Além de barreiras físicas, tais como a pele e a mucosa nasal, a atividade anti-criptocócica do soro e da saliva de humanos tem sido estudada. No entanto, observa-se que os principais componentes do sistema imune do hospedeiro contra *C. neoformans* está relacionado com o sistema complemento e células fagocíticas (VOELZ & MAY, 2010).

Na infecção primária as células de *Cryptococcus spp.* que não foram expulsas pelo epitélio respiratório podem se disseminar até os alvéolos, onde são inicialmente

confrontadas pelos macrófagos alveolares. O seguimento da infecção irá depender das defesas do hospedeiro, bem como o número e a virulência das células criptocócicas. Normalmente esta resposta inicial do hospedeiro é bem sucedida (MITCHELL & PERFECT, 1995).

*C. neoformans* prolifera dentro das células fagocíticas do hospedeiro, conferindo, assim, vantagens na sua proliferação, além de proteção imunológica. As interações iniciais da levedura com células hospedeiras podem ser mediadas por uma adesina e pode envolver o reconhecimento de componentes da cápsula criptocócica (DEL POETA, 2004; MANSOUR & LEVITZ, 2002). O *C. neoformans* tem a alternativa de continuar se replicando dentro da célula hospedeira ou sair, quer por um processo de lise letal para a célula hospedeira, ou por um processo não-lítico que deixa as duas células intactas (SRIKANTA, SANTIAGO-TIRADO & DOERING, 2014).

No processo infeccioso causado por *C. neoformans*, é principalmente desencadeada a resposta de três tipos celulares do sistema imune, sendo que essas células possuem funções diferentes. As células dendríticas funcionam como uma das primeiras linhas de defesa e estão localizadas no pulmão do hospedeiro, são células de apresentação de antígeno e atuam como sentinelas nos tecidos periféricos. Essas células vão atuar reconhecendo e internalizando o agente infeccioso. Na criptococose elas são responsáveis pela comunicação entre a resposta imune inata e adaptativa, apresentando antígenos estranhos às células T nos tecidos linfóides (WOZNIAK, VYAS & LEVITZ, 2006; VOELZ & MAY, 2010).

Os neutrófilos são fagócitos e causam a lise das células de *C. neoformans in vitro*, além de modular a resposta imune pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Estudos realizados com animais apontaram uma associação entre neutrófilos e as respostas que conferem proteção contra a infecção pulmonar causada por *C. neoformans* (WOZNIAK, VYAS & LEVITZ, 2006), apesar dessas células se encontrarem em pequenas concentrações no tecido pulmonar e não serem consideradas essenciais na ação contra o fungo. No entanto, os neutrófilos podem atacar diretamente o fungo, produzindo espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos (VOELZ & MAY, 2010).

Os macrófagos, células que se apresentam também, como células fagocíticas primárias em todos os momentos da infecção. Dessa forma, os macrófagos

alveolares rapidamente internalizam as células de leveduras após a infecção intra-traqueal (FELDMESSER *et al.*, 2000). Estas células vêm sendo consideradas o tipo celular mais importante na infecção causada por *C. neoformans*, devido às interações patógeno–hospedeiro e foi através destes estudos que foi possível o conhecimento da atuação de *C. neoformans* como um patógeno intracelular facultativo (FELDMESSER, TUCKER & CASADEVALL, 2001).

Sabendo que o *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo, foi possível observar interações importantes entre fungo fagocitado e o macrófago, Destas interações pode-se destacar a ocorrência da fusão do fagossomo com o lisossomo e de sua acidificação; a capacidade de permanência e proliferação do fungo no fagolisossomo ativado; a expulsão do interior do macrófago sem a lise do mesmo, pelo processo de exocitose não-lítica; a transferência do fungo do interior de um macrófago para o interior de outro e a disseminação sistêmica a partir da permanência do fungo no interior do macrófago (LEVITZ, 1993; ALVAREZ & CASADEVALL, 2006; VOELZ & MAY, 2010).

Foi demonstrado que células *natural killer*(NK)melhoraram a função dos macrófagos anti-criptocócicos através da produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em resposta a citocinas de células T CD4 +, tais como a IL-12. É evidente que citocinas geradas por ambas as células TH1 e TH2 são necessárias para a proteção mediada pelo anticorpo contra criptococose. (MANSOUR & LEVITZ, 2002)

### 1.11. QUORUM SENSING

Um dos mecanismos de comunicação intercelular entre microrganismos é chamada de quorum sensing (QS). Através desse processo microrganismos adquirem a capacidade de expressar determinados comportamentos em resposta a sua densidade celular, devido a liberação de moléculas de sinalização que afetam o metabolismo microbiano e a expressão genética de uma forma sincronizada (LEE *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Este fenômeno é bem descrito em diversas espécies de bactérias, e várias bactérias patogênicas regulam a expressão de seus fatores de virulência em resposta a densidade celular de suas populações.

Embora inicialmente acreditava-se que o fenômeno de quórum sensing era restrito a populações bacterianas, observou-se através de várias evidências que o

QS também ocorre em fungos (HORNBY *et al.*, 2001, CHEN *et al.* 2004), e pode afetar algumas funções biológicas importantes, tais como o crescimento, o desenvolvimento morfológico e formação de biofilmes. No *C. neoformans* pode interferir também na produção de cápsula, regulação do crescimento celular planctônico e a síntese de melanina, que são importantes fatores de virulência deste fungo. No entanto, os mecanismos moleculares de regulação do QS em fungos são bem menos conhecidos do que em bactérias (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014), mas sabe-se que a regulação da expressão de genes de virulência é de extrema importância na patogênese e na adaptação do microrganismo aos tecidos do hospedeiro (ALBUQUERQUE & CASADEVALL, 2012).

As moléculas que estão envolvidas no QS em fungos são os alcoóis farnesol e tirosol, produzidos em *Candida albicans*, um patógeno comensal; e em leveduras patogênicas oportunistas humanas, como o *Cryptococcus neoformans* observou-se a presença de um peptídeo (Qsp1) (MADHANI *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE & CASADEVALL, 2012). Nosso grupo vem trabalhando há algum tempo na identificação de outras moléculas de quórum sensing em *C. neoformans*, bem como no esclarecimento dos genes e proteínas envolvidos nesse mecanismo de regulação. Observou-se que a adição de meio condicionado (CM) proveniente de sobrenadantes de culturas desse fungo crescidas até a fase estacionária, a novas culturas do fungo produziram os seguintes fenótipos: aceleração do crescimento do fungo, aceleração da sua melanização em meio suplementado com L-DOPA e um aumento transitório na secreção de polissacarídeos da cápsula. Análises de cromatografia associada a espectrometria de massa revelaram que a molécula de QS produzida por esse fungo e responsável por tais efeitos é provavelmente um derivado do ácido pantotênico. No intuito de elucidar as bases genéticas desses eventos nós fizemos a prospecção de uma biblioteca comercial de mutantes de *C. neoformans* contendo aproximadamente 1200 deleções gênicas para identificar mutantes que fossem defeituosos ou na síntese da molécula ativa ou na resposta a adição dessa molécula proveniente de CM de células do tipo selvagem. Entre os mutantes possivelmente envolvidos nesse processo, observou-se a presença de dois mutantes que tinham um fenótipo de baixa resposta à atividade QS do tipo selvagem. Os genes deletados nesses dois mutantes codificam metiltransferases (OPI3 e CHO2), que estão envolvidas na síntese de fosfatidil-colina a partir de

fosfatidiletanolamina (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).O objetivo do presente projeto é caracterizar fenotipicamente o mutante OPI-3 a fim de começarmos a entender seu possível papel na regulação gênica por QS em *C. neoformans*.

## 2. JUSTIFICATIVA

Desde a sua descoberta em 1894, a levedura encapsulada *C. neoformans*, vem sendo estudada (MITCHELL & PERFECT, 1995; COELHO, BOCCA & CASADEVALL, 2014) e recentemente, após a epidemia da AIDS, tem sido observado um aumento da incidência da criptococose em todo mundo. Essa infecção possui a característica de ser oportunista invasiva com grande potencial de morte, e seu aumento é devido à expansão de populações de risco e pacientes em uso de tratamentos que permitem maior sobrevivência, mas causam imunossupressão, representando assim, um problema crescente nos cuidados de saúde (BADIEE, 2013; BEN-AMI *et al.*, 2013; LEROUX & ULLMANN, 2013).

A criptococose tem maior prevalência em pacientes com a imunidade comprometida pelo vírus HIV (ALANIO, DESNOS-OLLIVIER & DROMERA, 2011), dessa forma, a AIDS é o principal fator de risco (SLOAN & PARRIS, 2014). A infecção primária é adquirida por meio da inalação de células dessecadas e/ou basidiósporos de nichos ambientais contaminados com fezes de pombos ou excrementos de outras aves (DEL POETA & CASADEVALL, 2012), e geralmente permanece assintomática ou resulta em pneumonia em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, em pacientes imunossuprimidos pode ocorrer a difusão para o sistema nervoso central, causando a meningite criptocócica, a qual é considerada uma das doenças mais importantes ocasionada como consequência da ação do HIV (MITCHELL & PERFECT, 1995; BABU, GOPALAKRISHNAN, & SUNDARARAJAN, 2013).

Estima-se que cerca de 1 milhão de casos ocorrem em todo o mundo por ano, em pacientes com AIDS (CORDEIRO *et al.*, 2013), e pode ser considerada a terceira doença neurológica mais freqüente nestes indivíduos (LIN & HEITMAN, 2006).Diante disso, observa-se que vários fatores de virulência expressos no *C. neoformans* são essenciais para o aumento da patogenicidade deste microrganismo e permitem que este agente patogênico escape e sobrecarregue o sistema imune do

hospedeiro, a citar, a sua característica distintiva entre outros fungos patogênicos humanos de ter uma cápsula de polissacarídeo (ZARAGOZA, FRIES & CASADEVALL, 2003; JANBON, 2004; FONSECA *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2011; SRIKANTA *et al.*, 2014), a produção de melanina (DUIN, CASADEVALL & NOSANCHUK, 2002; IKEDA *et al.*, 2003; McCLELLAND *et al.*, 2005; LIN & HEITMAN, 2006; EISENMAN & CASADEVALL, 2012), o crescimento a 37°C (BAHN *et al.*, 2005; LIN & HEITMAN, 2006; LIN, 2009; SRIKANTA, SANTIAGO-TIRADO & DOERING, 2014), a produção de *mating types* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1978; MOORE & EDMAN, 1993; BUCHANAN & MURPHY, 1998), a produção de manitol, urease, fosfolipase, protease e super-óxido dismutase (MULLER & SETHI, 1972; CHEN *et al.*, 1997; RODRIGUES, ALVIANO & TRAVASSOS, 1999; NARASIPURA *et al.*, 2003; OLSZEWSKI *et al.*, 2004), além do parasitismo de macrófagos (SABIITI *et al.*, 2014).

O fenômeno de quorum sensing pode está envolvido na regulação de fatores de virulência em *C. neoformans*, no entanto, os mecanismos moleculares dessa regulação não estão bem elucidados (LEE *et al.*, 2007) e sua pesquisa se mostra como uma possível fonte de novos alvos terapêuticos para infecções bacterianas e fúngicas. Acreditamos que a caracterização fenotípica do mutante do gene OPI3 do fungo *C. neoformans* possa nos ajudar a entender melhor o seu papel no quorum sensing e na regulação da expressão de fatores de virulência desse fungo (ALBUQUERQUE & CASADEVALL, 2012; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Neste sentido, a pesquisa também poderá eventualmente auxiliar em novas abordagens de desenvolvimento de fármacos para o tratamento da criptococose, uma vez que os fármacos antifúngicos hoje disponíveis possuem alta toxicidade e alguns organismos apresentam resistência (BADIEE & HASHEMIZADEH, 2014).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos gerais**

O gene OPI3 foi identificado em uma prospecção gênica para possíveis genes envolvidos na resposta ou produção da molécula de quórum sensing desse fungo. Nesse projeto, o nosso objetivo é caracterizar fenotipicamente esse mutante quanto a expressão de fatores de virulência já bem estabelecidos nesse fungo patogênico.

#### **3.2. Objetivos específicos**



- Construção do mutante OPI3 por deleção utilizando a técnica de PCR por Dupla-Junta (DJ-PCR) (KIM *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012).
- Caracterização da expressão de fatores de virulência de *C. neoformans* nesse mutante (crescimento a 37°C, produção de cápsula, produção de melanina, fosfolipase, uréase, etc).
- Caracterização da resposta desse mutante ao meio condicionado de linhagens selvagens de *C. neoformans*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Linhagens e meios de cultura utilizados

#### 4.1.1. Linhagem celular

A linhagem celular de *C. neoformans* utilizadas na pesquisa foi a linhagem de *C. neoformans* variedade *grubii* H99 (sorotipo A).

#### 4.1.2. Meios de cultura

##### *Caldo Sabouraud Dextrose*

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| Sabouraud Dextrose (Comercial) | 30%  |
| Água purificada – qsp          | 100% |

Para meio sólido acrescentou-se 15% de ágar. Autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

##### *Meio YPD (Yeast Peptone Dextrose)*

|                     |    |
|---------------------|----|
| Extrato de Levedura | 1% |
| Peptona             | 2% |
| D-Glicose           | 2% |

O potencial hidrogeniônico (pH) utilizado foi 5,6 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

*Meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) ágar*

|                     |      |
|---------------------|------|
| Extrato de Levedura | 1%   |
| Peptona             | 2%   |
| D-Glicose           | 2%   |
| Ágar                | 1,8% |

O potencial hidrogeniônico (pH) utilizado foi 5,6 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

*Meio Mínimo*

|  |        |
|--|--------|
| D-Glicose                              | 3%     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Anidro | 4%     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O   | 2,5%   |
| Glicina                                | 0,975% |
| Água purificada – qsp                  | 100%   |

O potencial hidrogeniônico (pH) utilizado foi 5,5. Após a autoclavagem adicionou-se 51 µL de tiamina.

*Meios de cultura para testes fenotípicos*

Utilizou se o meio YPD ágar para a realização de meios contendo os reagentes *Congo Red*, Cloreto de sódio (NaCl), Sorbitol, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Estes reagentes foram acrescentados ao meio sólido YPD para a realização dos testes fenotípicos nas seguintes concentrações 1% e 0,5% de *Congo Red*, 1,5 M de NaCl, 2 M de Sorbitol, 0,05% de SDS.

*Meio L-DOPA ágar*

|  |         |
|--|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Anidro | 29,4 mM |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O   | 10 mM   |
| Glicina                                | 13 mM   |
| D-Glicose                              | 15 mM   |
| Tiamina                                | 3 µM    |
| L-DOPA                                 | 2 mM    |
| Ágar                                   | 1,5%    |

O pH utilizado foi 5,5 (Ajustado com KOH e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Adicionou-se ágar após a esterelização da solução por filtração em filtro 0,22 µm.

*Meio emulsão gema de ovo – Meio para teste fosfolipase*

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Peptona           | 1%      |
| D-Glicose         | 2%      |
| Cloreto de Sódio  | 1 M     |
| Cloreto de Cálcio | 0,005 M |
| Ágar              | 2%      |

Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos. Em seguida, resfriado a 55 °C para adição da emulsão gema de ovo (50 % gema de ovo, 50 % solução salina)

## **4.2. Avaliação da função gênica de OPI3 através da deleção gênica no modelo *C. neoformans***

### **4.2.1. Construção dos cassetes de deleção do gene OPI3 de *C. neoformans***

Para a construção dos cassetes de deleção gênica e obtenção de mutantes *Knock out* utilizou-se a técnica de PCR Dupla-Junta, descrita por KIM *et al.*, 2009.

Inicialmente, realizou-se a seleção do gene OPI3 através do banco de dados no *Broad Institute*, para assim, construir o cassete de deleção. Os códons de iniciação e de terminação do gene foram definidos para que fosse delimitada a região a ser deletada e com isso foram selecionados 1Kb acima e abaixo da ORF para o desenho de oligonucleotídeos a serem usados na deleção.

Neste sentido, foram desenhados os oligonucleotídeos descritos na tabela 1 a partir da sequência do gene OPI3, a fim de isolar os fragmentos de interesse e construir o cassete de deleção pela técnica de PCR Dupla-Junta. O gene deletado foi substituído por um gene de resistência à Higromicina e depois realizou-se a transformação dos fragmentos do cassete de deleção por biobalística em leveduras de *C. neoformans* variedade *grubii* H99 (sorotipo A).

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados no estudo de OPI3 em *C. neoformans*.

| Primer | Descrição          | Seqüência              | TM<br>°C | Uso  |
|--------|--------------------|------------------------|----------|--|
| 1      | 5'OPI3F            | ACTGAGCAGTGAGGATGGGA   | 59       | Amplificação do fragmento 5' do cassete de deleção                         |
| 2      | M13REC+<br>5'OPI3R | AGATAGGGTTGAAAGCGGTC   | 61       | Amplificação do fragmento 5' do cassete de deleção                         |
| 3      | M13Re              | CAGGAAACAGCTATGACATGAT | 62       | Amplificação da região 5' da marca de seleção de resistência a higromicina |
| 4      | NSL_hph            | GCGGGAGATGCAATAGGTCAG  | 68       | Amplificação da região 5' da marca de seleção de resistência a higromicina |

|    |                 |                         |      |  |
|----|-----------------|-------------------------|------|--|
| 5  | NSR_hph         | AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT   | 66   | Amplificação da região 3' da marca de seleção de resistência a higromicina |
| 6  | M14F            | GAGCTCGGATCCACTAGTAACG  | 60   | Amplificação da região 3' da marca de seleção de resistência a higromicina |
| 7  | M14FC + 3'opi3F | AAACTGCCAGGAAGAGCGTT    | 57   | Amplificação do fragmento da região 3' do cassete de deleção               |
| 8  | 3'OPI3R         | TCCGACGGTCTTGGAATGAA    | 58   | Amplificação do fragmento da região 3' do cassete de deleção               |
| 9  | OPI3-9          | GCTCGAGAAGGGAGGAAATC    | 61,7 | Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus OPI3                        |
| 10 | OPI3-10         | CATGAAGAGGCATAGCTTGAATG | 61,6 | Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus OPI3                        |
| 11 | OPI3-11         | CCAAAAGGTAGCAGCCGATC    | 62,8 | Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus OPI3                        |
| 12 | OPI3-12         | ATAGCCCCTTCACCGACAAG    | 63,6 | Confirmação de   |

|    |         |                      |      |   |
|----|---------|----------------------|------|---|
|    |         |                      |      | Deleção/Reconstituição do locus OPI3                |
| 13 | OPI3-13 | GGCGCGGGTAACTTATATCC | 62,1 | Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus OPI3 |

Fonte: Produzido pelo autor

Para que a construção do cassete de deleção fosse possível, a reação foi realizada em duas etapas (Figura 4). Na primeira etapa a reação de amplificação foi realizada a um volume de 50µL, utilizando 36,35 µL de H<sub>2</sub>O MiliQ; 10 µL de Tampão de Taq (OneTaq 5x); 0,4 µL de dNTPs (200 µM) – (estoque 25 mM); 1 µL de Template (DNA molde de *C. neoformans* H99 - sorotipo A); 1 µL de Primer F [10 µM]<sub>0</sub> [0,2 µM]<sub>1</sub> do fragmento (1+2) que correspondem a região flanqueadora 5' do gene OPI3; 1 µL de Primer R [10 µM]<sub>0</sub> [0,2 µM]<sub>1</sub> do fragmento (7+8) que correspondem a região flanqueadora 3' de OPI3; 0,25 µL de Taq (0,25 µL – 1,25 u/ 50 µL).

O plasmídeo **pPZPHYG** foi utilizado para a amplificação do fragmento (3+4) que corresponde à região 5' do marcador seletivo **HPH**, controlado por promotor de actina de *C. neoformans* e do fragmento (5+6) que corresponde à região 3' de **HPH** (gene de resistência a Higromicina B), o qual possui terminador *TrpC* de *C. neoformans*.

Para a reação de amplificação dos fragmentos (3+4) e (5+6), a partir de um mix contendo, 160,875 µL de H<sub>2</sub>O MiliQ; 45 µL de Tampão de Taq (OneTaq 5x para C<sub>f</sub> 1x); 45 µL dNTPs (10mM para C<sub>f</sub> 0,2mM); 1,125 µL de Taq (0,25 µL – 1,25 u/ 50 µL).

Utilizou-se 47 µL do mix para a amplificação do fragmento (3+4) e 1 µL de Template (DNA molde de *C. neoformans* H99 - sorotipo A); 1 µL de Primer F (M13Re) [10 µM]<sub>0</sub> [0,2 µM]<sub>1</sub>; 1 µL de Primer R (NSL\_hph4) [10 µM]<sub>0</sub> [0,2 µM]<sub>1</sub>.

Para a reação de amplificação do fragmento (5+6) foram utilizados 47 µL do mix; 1 µL de Template (DNA molde de *C. neoformans* H99 - sorotipo A); 1 µL de Primer F (NSR\_hph) [10 µM]<sub>0</sub> [0,2 µM]<sub>1</sub>; 1 µL de Primer R (MF14) [10 µM]<sub>0</sub> [0,2 µM]<sub>1</sub>.

Nesta etapa, os oligonucleotídeos utilizados foram (5'OPI3F e M13REC+5'OPI3R) para o fragmento (1+2), que corresponde à região flanqueadora 5'; (M14FC +3'opi3F e 3'OPI3R) para o fragmento (7+8) correspondente a região flanqueadora 3' do OPI3; M13Re e NSL\_hph para o fragmento 3' de *HPH*; NSR\_hph e MF14 para o fragmento 3' de *HPH*. As reações foram realizadas no termociclador – Thermal Cycler – Simpli Ampby Life. Todos os oligonucleotídeos utilizados no presente estudo estão descritos na **Tabela1**

O ciclo utilizado para a reação com os fragmentos (1+2) e (7+8) foi (Figura 1):

**Figura 1:** Condições da PCR para a reação com os fragmentos (1+2) e (7+8).

| Temperatura  | Tempo | Etapa                |             |
|--------------|-------|----------------------|-------------|
| 94 °C        | 2'    | Desnaturação inicial |             |
| 94°C         | 30''  | Desnaturação         | } 35 ciclos |
| 58°C (1 e 2) | 30''  | Anelamento           |             |
| 56°C(3 e 4)  |       |                      |             |
| 68°C         | 1'    | Extensão             |             |
| 68°C         | 7'    | Extensão final       |             |

Fonte: Elaborado pelo autor

O ciclo utilizado para a reação com os fragmentos (3+4) e (5+6) foi (Figura 2):

**Figura 2:** Condições da PCR para a reação com os fragmentos (3+4) e (5+6).

| Temperatura  | Tempo | Etapa                |             |
|--------------|-------|----------------------|-------------|
| 94 °C        | 2'    | Desnaturação inicial |             |
| 94°C         | 30''  | Desnaturação         | } 35 ciclos |
| 58°C (3 e 4) | 30''  | Anelamento           |             |
| 61°C (5 e 6) |       |                      |             |
| 68°C         | 1'    | Extensão             |             |
| 68°C         | 7'    | Extensão final       |             |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após as reações, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a fim de checar se os fragmentos eram compatíveis com os tamanhos esperados. Em seguida, os fragmentos foram purificados com o kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados. Os tamanhos esperados foram: (1+2): 997pb; (7+8): 930 pb; (3+4) *hph*: 1235 pb; (5+6) *hph*: 1295 pb.

Para a segunda etapa, cujo objetivo foi fusionar os fragmentos (1+2) com (3+4) e (5+6) com (7+8) em duas reações de amplificação distintas, realizou-se uma PCR de sobreposição para obtenção dos fragmentos (1+4) (1+4 – equivalente a região flanqueadora 5' do OPI3fusionada à região 5' do marcador seletivo) e (5+8) (5+8 – equivalente à região flanqueadora 3' do OPI3fusionada à região 3' do marcador seletivo). Para o fragmento (1+4) fusionado com *HPH*, o tamanho esperado foi de 2212Kb. Para o fragmento (5+8) fusionado com *HPH*, o tamanho esperado foi de 2145Kb.

Em seguida, os tamanhos dos amplicons foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Para amplificação dos fragmentos citados foram utilizados os oligonucleotídeos 5'OPI3F e NSL\_hph8 para amplificar o fragmento (1+4) cuja marca escolhida foi *HPH*; eNSR\_hph e 3'OPI3R para amplificar o fragmento (5+8) cuja marca escolhida foi *HPH*.



Para as reações da segunda etapa para a construção do cassete de deleção do gene OPI3 utilizou-se a técnica de PCR Dupla-Junta foi escolhida a enzima OneTaq® DNA Polymerase e utilizados os seguintes componentes para cada reação: 1U OneTaq® DNA Polymerase, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTP's, 15 ng de cada fragmento, 1X de tampão e H<sub>2</sub>O até o volume final de 50 µL. O ciclo utilizado para as reações foi (Figura 3):

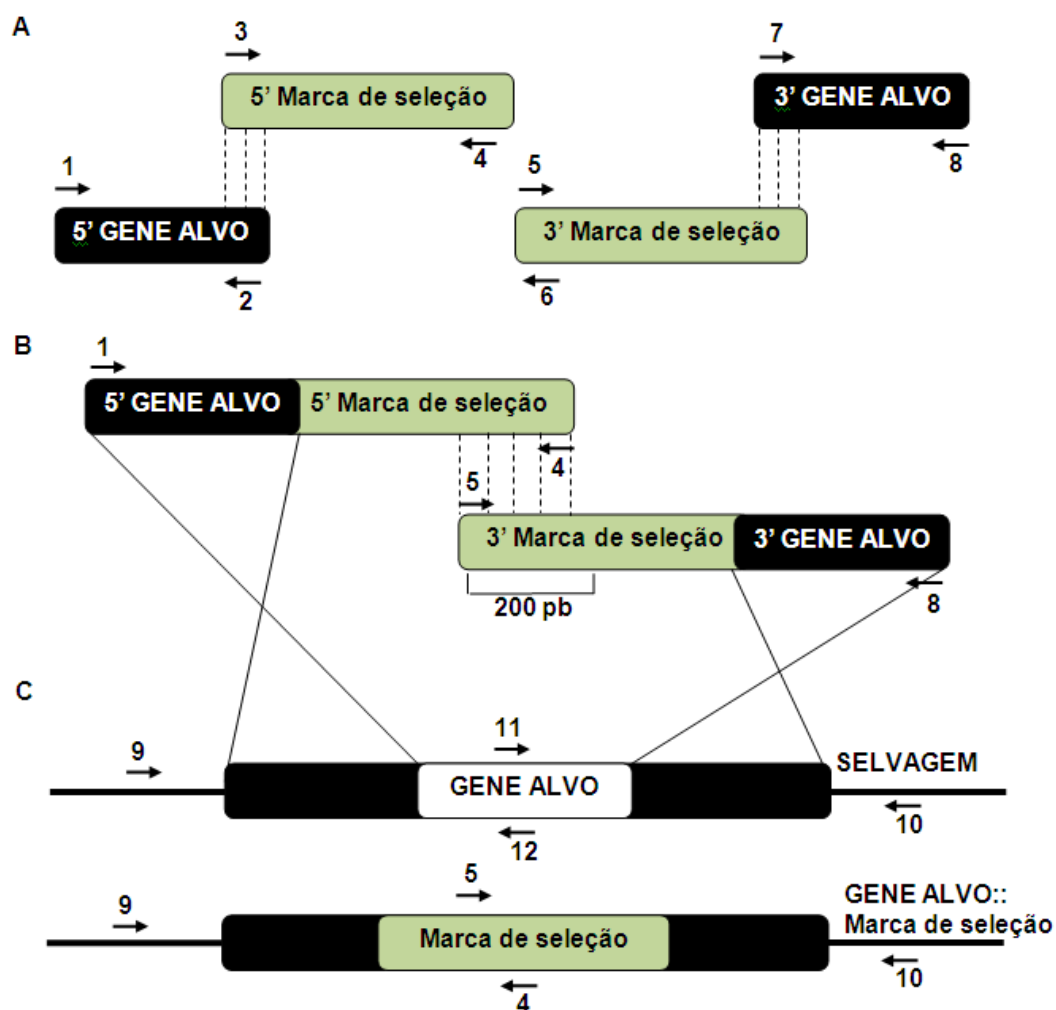
**Figura 3:** Condições da PCR para a reação de segunda etapa.

| Temperatura | Tempo | Etapa                |             |
|-------------|-------|----------------------|-------------|
| 94 °C       | 2'    | Desnaturação inicial |             |
| 94 °C       | 30"   | Desnaturação         | } 35 ciclos |
| 64 °C       | 30"   | Anelamento           |             |
| 72 °C       | 1'    | Extensão             |             |
| 72 °C       | 7'    | Extensão final       |             |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, os fragmentos obtidos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com kit *GFX PCR DNA and Gel band purification Kit* (GE Healthcare) e quantificados para posterior transformação por biobalística.

**Figura 4:** Representação da técnica de PCR Dupla-Junta. (A) Os oligonucleotídeos 1 e 2 tem como alvo a região 5' adjacente ao gene alvo enquanto o par 7 e 8 foi utilizado para amplificação da região 3' do mesmo gene, tais amplicons foram obtidos a partir do DNA genômico de H99. As regiões 5' e 3' de *HPH* foram amplificadas usando os pares 3 e 4 e como molde o plasmídeo pPZPHYG para a marca de resistência à Higromicina. (B) Fusão dos fragmentos 5' do gene alvo com 5' de *HPH* com 3' de *HPH*, utilizando os primers 1 e 4 para a região 5' e 3 e 8 para a região 3', os moldes utilizados foram os fragmentos 1+2; 3+4; 5+6 e 7+8, os quais foram obtidos na etapa anterior. (C) Os fragmentos 1+4 e 5+8 foram co-transformados em leveduras de *C. neoformans*. As células de H99 receberam *HPH* como marca de seleção. Existe uma região de 200 pb de sobreposição entre os fragmentos 1 + 4 e 5 + 8 que recombinarão *in vivo* após a transformação do fungo.



Fonte: Modificado de KIM *et al.*, 2009.

#### 4.2.2. Transformação de *C. neoformans* por biobalística para obtenção do mutante OPI3

Colônias isoladas das linhagens H99 de *C. neoformans* foram inoculadas em YPD líquido durante a 24h sob agitação a 30° C e no dia seguinte foram lavadas com solução salina para serem inoculadas em placas de YPD+ Sorbitol 1 M a serem transformadas.

Para preparação das partículas (tungstênio M10, diâmetro de 0,7 µm, Biorad), com DNA a ser transformado, realizou-se as seguintes etapas:

1. Esterilização das partículas: pesou-se 30 mg de partículas e adicionou-se 1 mL de etanol 70%. A mistura foi agitada em vortex por 20 minutos, velocidade máxima e centrifugada à velocidade máxima por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 mL de água ultrapura estéril. O precipitado foi ressuspenso e centrifugado à velocidade máxima por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o processo de lavagem foi repetido outras duas vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as partículas ressuspenso em 500 µL de glicerol 50% estéril.

2. Precipitação do DNA a ser transformado nas partículas: as partículas estéreis foram sonicadas por 7 minutos para evitar a presença de grumos e em seguida foram agitadas (velocidade máxima) em vortex por 2 minutos. Acrescentou-se na seguinte ordem: 50 µL de partículas estéreis, 5 µL de DNA (quantidade total variou de 0,5 a 1 µg), 50 µL de CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) estéril, 20 µL de espermidina (0,1 M, Sigma) estéril. Essa mistura foi levada ao vortex por 10 minutos, agitação branda e, em seguida, centrifugada por 10 segundos à velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 150 µL de etanol absoluto às partículas. Centrifugou-se por 10 segundos à velocidade máxima e esse processo foi repetido mais duas vezes. Ao final da última lavagem, adicionou-se uma quantidade de etanol absoluto em volume múltiplo de 4 µL de acordo com a quantidade de placas a serem bombardeadas. As partículas foram sonicadas por 3 segundos, e 4 µL foram imediatamente distribuídos nas membranas carreadoras estéreis já encaixadas nos discos carreadores que, em seguida, foram incubados em sílica, onde permaneceram por pelo menos 30 minutos até o momento do bombardeamento. Os parâmetros utilizados para a transformação por biobalística (BIOMICS, Brasil) foram: distância de 6 cm do alvo, pressão do gás Hélio a 1.200 psi (são utilizadas 4 membranas de 300 psi para cada tiro) e pressão de vácuo a 27 mmHg. Após o bombardeamento, as placas foram embaladas em papel alumínio e incubadas a 30°C por 48 h. Após esse período, foram lavadas com YPD líquido e as células inoculadas em placas com meio seletivo, Higromicina B. Após 72 h de incubação a 30°C os transformantes foram transferidos para uma nova placa de YPD contendo Higromicina B para confirmação da estabilidade da marca de seleção. O DNA genômico dos possíveis transformantes foi extraído conforme protocolo para posterior confirmação via PCR tradicional.

#### 4.2.3. Extração do DNA genômico de *C. neoformans*

Para a extração do DNA genômico de *C. neoformans*, células foram cultivadas durante 24h em 5 mL de YPD líquido a 30°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 6 minutos a 4000 rpm. O precipitado foi ressuspensionado em 1,5 mL de água estéril e centrifugado à velocidade máxima durante 5 minutos e seu sobrenadante descartado.

Adicionou-se 0,5 mL de fenol: clorofórmio (Bioagency), 0,5 mL de tampão TENTIS (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 % Triton X-100, 1 % SDS) e pérolas de vidro (diâmetro:400-600 µm, Sigma). Os tubos foram agitados em vortex por 10 minutos e logo em seguida submetidos à centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima. A fase aquosa obtida foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol absoluto a fim de precipitar o DNA. O tubo foi agitado e centrifugado em velocidade máxima por 15 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µL de etanol 70 % (v/v) e agitou-se novamente antes de centrifugar novamente por 5 minutos à velocidade máxima. Em seguida, o excesso de álcool foi removido com auxílio de uma pipeta e os tubos foram secados a temperatura ambiente por 5 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 50 µL H<sub>2</sub>O ultrapura, acrescida de RNase A (150 µg/mL) e incubou-se os tubos a 37 °C por 1 hora e depois o DNA foi armazenado em freezer (-20 °C).

#### 4.2.4. Confirmação da deleção de OPI3 por PCR

Para a confirmação da integração do cassete de deleção OPI3::HPH, serão utilizados oligonucleotídeos desenhados externamente às regiões de OPI3 escolhidas para a construção do cassete de deleção, e combinados com oligonucleotídeos que reconhecem a região do marcador seletivo *HPH*. Para as amplificações, será utilizada a enzima OneTaq® DNA Polymerase *PCR* (BIOLABS), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 5' OPI3F (1) e NSR-hph (5) para amplificar a região 5' dos mutantes contendo a marca de seleção *HPH*; e NSL-hph (4) e OPI3-10 (10) para amplificar a região 3' dos mutantes contendo a seleção *HPH*. Para completar a reação, serão utilizados 10ng de DNA extraído dos três mutantes

caracterizados fenotipicamente e crescidos em meio contendo higromicina em um volume de reação de 20 µL contendo 1U OneTaq® DNA Polymerase, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTP's. O ciclo utilizado para todas as reações será (Figura 5):

**Figura 5:** Condição da PCR para todas as reações de confirmação da deleção de OPI3.

| Temperatura | Tempo | Etapa                |             |
|-------------|-------|----------------------|-------------|
| 94 °C       | 2'    | Desnaturação inicial |             |
| 94 °C       | 30"   | Desnaturação         | } 35 ciclos |
| 63 °C       | 30"   | Anelamento           |             |
| 72 °C       | 1'    | Extensão             |             |
| 72 °C       | 7'    | Extensão final       |             |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os tamanhos esperados para os dois fragmentos serão confirmados por eletroforese em gel de agarose. O tamanho esperado para o amplicon da região 5' do mutante é de 2212Kb e para a região 3' será de 2313 Kb para o mutante resistente à Higromicina.

#### 4.3. Avaliação fenotípica *in vitro* dos mutantes OPI3

Foram selecionados 3 prováveis mutantes OPI3 a partir da placa de transformação que foram denominados como: OPI3(1), OPI3(8), OPI3(16) e usamos um mutante previamente produzido em uma biblioteca comercial de mutantes por deleção de *C. neoformans* OPI3 (2E6). Procedemos com a análise fenotípica desses mutantes para avaliar qual deles apresentava fenótipo mais parecido com o do mutante previamente obtido na biblioteca de mutantes. Então foram inoculados os

mutantes e o *C.neoformans*. H99 em 5 mL de meio sabouraud (SAB) em tubo tipo FALCON e incubados durante 24h 30°C sob agitação para crescimento. Após o crescimento extraiu-se 1mL de cada linhagem e colocou-se em tubo tipo eppendorff. As células foram centrifugadas a 3000g/5min, desprezou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com solução PBS a uma concentração de 1x. A amostra de *C. neoformans* H99 foi diluída em solução PBS a 1:100 e as amostras dos mutantes numa diluição de 1:50 para contagem na Câmara de Neubauer. Para a maioria dos testes, foram inoculadas 10 mil células das diferentes linhagens (mutantes ou células do tipo selvagem).

#### **4.3.1. Crescimento em meio condicionado**

Há uma concentração inicial de  $2 \times 10^7$  células por mL em MM de *C. neoformans* do tipo selvagem, dos mutantes OPI3 (1), (8), (16), (2E6) realizou-se a diluição seriada nas concentrações de  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$  e  $2 \times 10^4$  de cada um deles. Em placas contendo CM glicerol, MM e SAB pipetou-se 2 $\mu$ L de cada diluição referente ao *C. neoformans* do tipo selvagens e dos mutantes de OPI3. Foi observado o crescimento nos intervalos de 24h e 48h. O meio condicionado foi produzido a partir de sobrenadante de culturas de H99 crescidas em meio mínimo por 5 dias, filtradas para remoção de células e concentradas por liofilização.

#### **4.3.2. Teste de curva de crescimento**

Foram inoculadas  $2 \times 10^4$  células das diferentes linhagens (mutantes e linhagem selvagem) de poços de placas de 96 poços em um volume de 200 microlitros por poço dos seguintes meios de cultura: meio Sabouraud, meio YPD e meio mínimo, com ou sem suplementação com meio condicionado de H99 em diferentes concentrações (5%, 50%, 100%). As placas foram a seguir incubadas em um leitor de placa (EON –BIOTEK) com incubação a 30 °C ou 37 °C e agitação (180 rpm), o crescimento das diferentes culturas foi acompanhado pela leitura da sua densidade ótica a 600 nm a cada 30 minutos durante 96 horas.

#### **4.3.3. Estresse térmico**

As leveduras foram plaqueadas em meio YPD sólido (acrescido de 2% de ágar bacteriológico) em conjunto com linhagens selvagens para controle e incubadas a 30, 37 e 39 °C por 48-72 h.

#### **4.3.4. Síntese de melanina**

A produção de melanina foi avaliada por meio do inóculo  $1 \times 10^5$  das leveduras selvagens e mutantes em meio L-DOPA. As células foram incubadas a 30°C e visualmente observadas para avaliação do grau de melanização por até 7 dias.

#### **4.3.5. Produção de fosfolipase**

A capacidade de sintetizar fosfolipase foi avaliada após incubação de  $1 \times 10^5$  células de levedura em meio de emulsão de gema de ovo a 30 °C por 48 horas. Em seguida, os halos opacos formados pelas colônias foram aferidos com auxílio de uma régua e a razão diâmetro da colônia/diâmetro da colônia e halo, de cada uma das cepas, foi comparada.

#### **4.3.6. Integridade da parede celular**

A determinação de possíveis defeitos na síntese de parede celular dos mutantes OPI3 foi realizada após o inóculo de leveduras crescidas em YPD ágar, acrescido de 0,5% e 1% de *Congo Red* e SDS 0,05% incubadas a 30°C durante 48-72h, visto que linhagens que apresentam defeito na constituição e organização da parede celular apresentam dificuldade de crescimento nesses meios de cultura (RONCERO & DURÁN, 1985).

#### **4.3.7. Estresse osmótico**

O efeito de agentes osmóticos sobre os mutantes OPI3 foram testados em meio YPD, acrescido de NaCl 1,5 M e Sorbitol 2 M. Em ambos os testes as placas foram incubadas a 30°C durante 48-72 h.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Avaliação da função gênica de OPI3 através de deleção gênica no modelo *C. neoformans***

O gene OPI3 de *C. neoformans* foi previamente identificado em uma prospecção de uma biblioteca comercial de mutantes de *C. neoformans*, que não

respondiam à adição de meio condicionado de uma linhagem selvagem desse fungo (H99) (LIU *et al.*, 2008). A fim de confirmarmos esse fenótipo e termos uma linhagem pronta para a reconstituição desse gene, desenhamos oligonucleotídeos para a construção de um cassete de deleção *OPI3::HPH* para integração no *lócus* das leveduras haploides de *C. neoformans* variedade *grubii* H99 (sorotipo A), o qual confere resistência à Higromicina B.

O cassete foi obtido *in vitro* por PCR Dupla-Junta e os tamanhos obtidos dos produtos da reação foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (dados não mostrados) e, assim, os fragmentos foram co-transformados em células leveduriformes haplóides de *C. neoformans* variedade *grubii* H99 (sorotipo A) por meio da técnica de biobalística.

## **5.2. Avaliação fenotípica *in vitro* do mutante do gene de OPI3 de *C. neoformans***

Foram selecionados três mutantes, que foram submetidos a alguns testes fenotípicos e de virulência com o objetivo de analisar o papel do gene OPI3 em *C. neoformans*. Esses mutantes foram analisados juntamente com o mutante de OPI3 da biblioteca comercial (2E6) (LIU, ET AL 2008) e a linhagem parental de tipo selvagem H99.

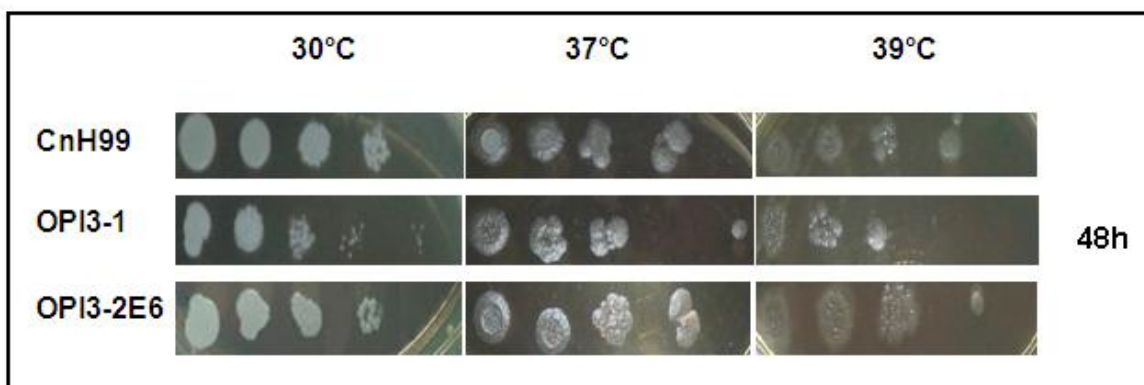
### **5.2.1. Estresse térmico**

A temperatura parece ser o fator mais importante na regulação da morfologia e do crescimento de *C. neoformans*. Este microrganismo pode crescer em temperaturas entre 25°C e 37°C, mas cresce melhor a 30°C (LIN, 2009). Sabe-se que a capacidade de crescer a temperatura de 37°C é fundamental para a patogenicidade e a garantia da sobrevivência do patógeno durante a infecção no hospedeiro. Neste sentido, a cepa selvagem e o mutante foram avaliados quanto à sua capacidade de crescimento a 30 °C, 37 °C em meio líquido e sólido e a 39 °C (meio sólido).

**Figura 6:** Teste de estresse térmico em meio YPD em diferentes temperaturas. Diluição seriada em concentrações de  $2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^3$  das linhagens

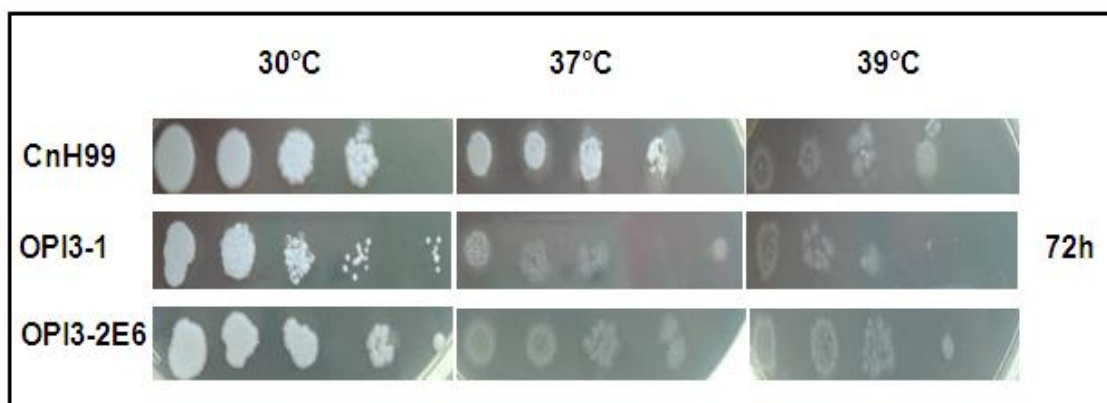


selvagens e mutantes de OPI3 realizado a 30, 37 e 39°C e documentado após 48 horas.



Fonte: Produzido pelo autor

**Figura 7:** Teste de estresse térmico em meio YPD em diferentes temperaturas. Diluição seriada em concentrações de  $2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^3$  das linhagens selvagens e mutantes de OPI3 realizado a 30, 37 e 39°C e documentado após 72 horas.



Fonte: Produzido pelo autor

Em mutantes do gene OPI3 de *Saccharomyces cerevisiae* observou-se a ausência do fosfolípido *N*-metiltransferase que catalisa as duas metilações terminais na via biossintética de fosfatidilcolina, resultando em um acúmulo de fosfatidil-monometiletanolamina, causando um fenótipo de crescimento sensível à temperatura (BOLOGNESE & MCGRAW, 2000).

No mutante do gene OPI3 de *C. neoformans* observou-se um retardo no crescimento em relação a cepa selvagem, mas esse retardo acontece tanto a 30 graus, quanto a 37, embora a 37 o retardo no crescimento do mutante parece ser

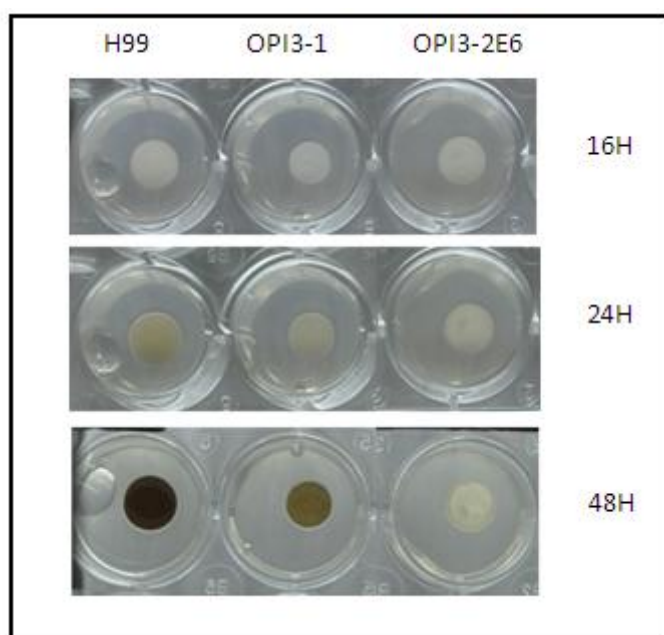
mais pronunciado, sugerindo que este mutante tenha sensibilidade de crescimento nas temperaturas testadas. Notou-se que ocorreu uma mudança no aspecto e no padrão das colônias nas temperaturas de 37 e 39 °C, as colônias tanto dos mutantes quando de H99 se apresentaram com mais brilho e translúcidas.

### 5.2.2. Síntese de melanina

O *C. neoformans* sintetiza melanina a partir de L-DOPA e outras catecolaminas e tem uma total dependência de substratos exógenos (MISSALL *et al.*, 2005; EISENMAN & CASADEVALL, 2012), dessa forma as cepas mutantes e selvagens foram avaliadas quanto à capacidade de sintetizar melanina em meio L-DOPA ágar.

A produção de melanina, principalmente por fungos neurotrópicos, incluindo *C. neoformans*, tem sido associada à virulência (LIN & HEITMAN, 2006). E uma possível explicação para o mecanismo de virulência através da produção de melanina seria a eficácia que este pigmento tem de eliminar radicais livres, além de proteger o *C. neoformans* contra a fagocitose (DIAMOND, ROOT. & BENNETT, 1972).

**Figura 8:** Teste de produção de melanina. A uma concentração de  $10^5$  células/mL do selvagem (H99) e dos mutantes OPI3 foram plaqueadas em meio L-DOPA, incubados a 30 °C e documentados após 48h de incubação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Notou-se que a melanização do mutante do gene OPI 3-1 de *C. neoformans* foi mais lenta não melanizando tanto quanto o H99, mas com uma melanização melhor do que OPI3-2E6, no período observado. Como a melanização sabidamente depende da densidade celular, e conseqüentemente do crescimento do fungo precisamos realizar outros testes em que possamos excluir os efeitos do crescimento nesse teste, bem como o efeito da adição de CM.

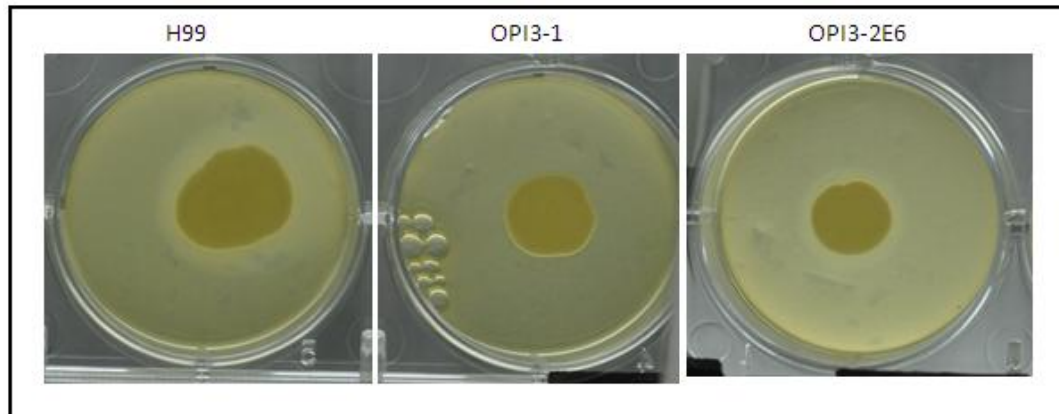
### 5.2.3. Produção de fosfolipase

A produção de fosfolipase pela cepa selvagem e pelo mutante do gene OPI3 de *C. neoformans* foi analisada através da incubação em meio de emulsão de gema de ovo. Esse teste se trata de um ensaio qualitativo, ou seja, não permite fazer a diferenciação da fosfolipase que se encontra ativada ou, no caso de halo com defeito, não é possível saber qual teve alteração na sua produção.

Estudos apontam para uma atividade enzimática correlacionada com a virulência e a patogenicidade da criptococose. Dessa forma, a atividade da fosfolipase extracelular produzida por *C. neoformans* pode ser capaz de romper as membranas celulares de mamíferos e permitir que as células de levedura penetrem os tecidos do hospedeiro (CHEN *et al.*, 1997).

De acordo com a figura 9 foi observado que a fosfolipase, a colônia de OPI3-1 não apresentou um halo distinguível, quando comparada a H99 e OPI3-2E6 após 48h de inoculação. O halo continuou ausente em tempos posteriores, sugerindo que a mutação possa apresentar um papel na produção dessa enzima pelo fungo.

**Figura 9:** Ensaio de fosfolipase em meio emulsão de gema de ovo. As cepas H99 e mutante OPI3 foram inoculadas em meio emulsão de gema de ovo A 30° C e documentadas após 48 horas de incubação. A presença de halo opaco ao redor da colônia indica a atividade de fosfolipase.

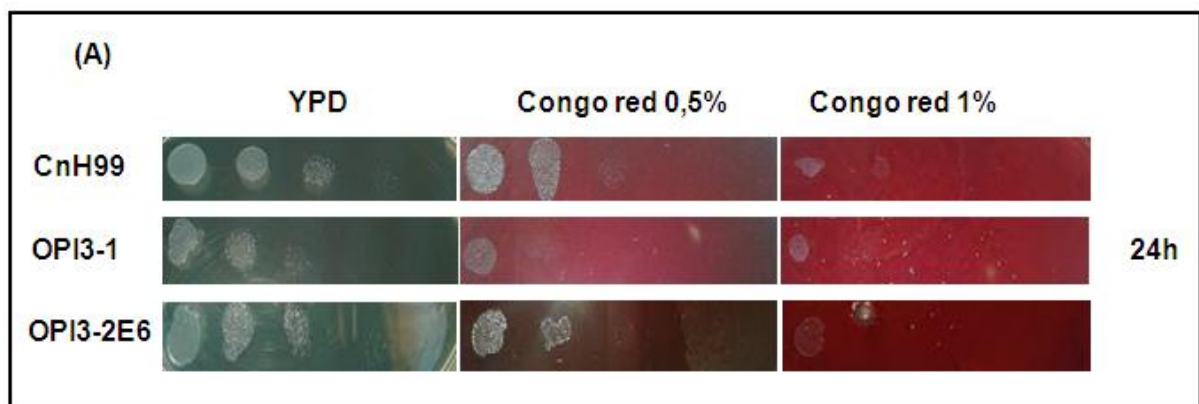


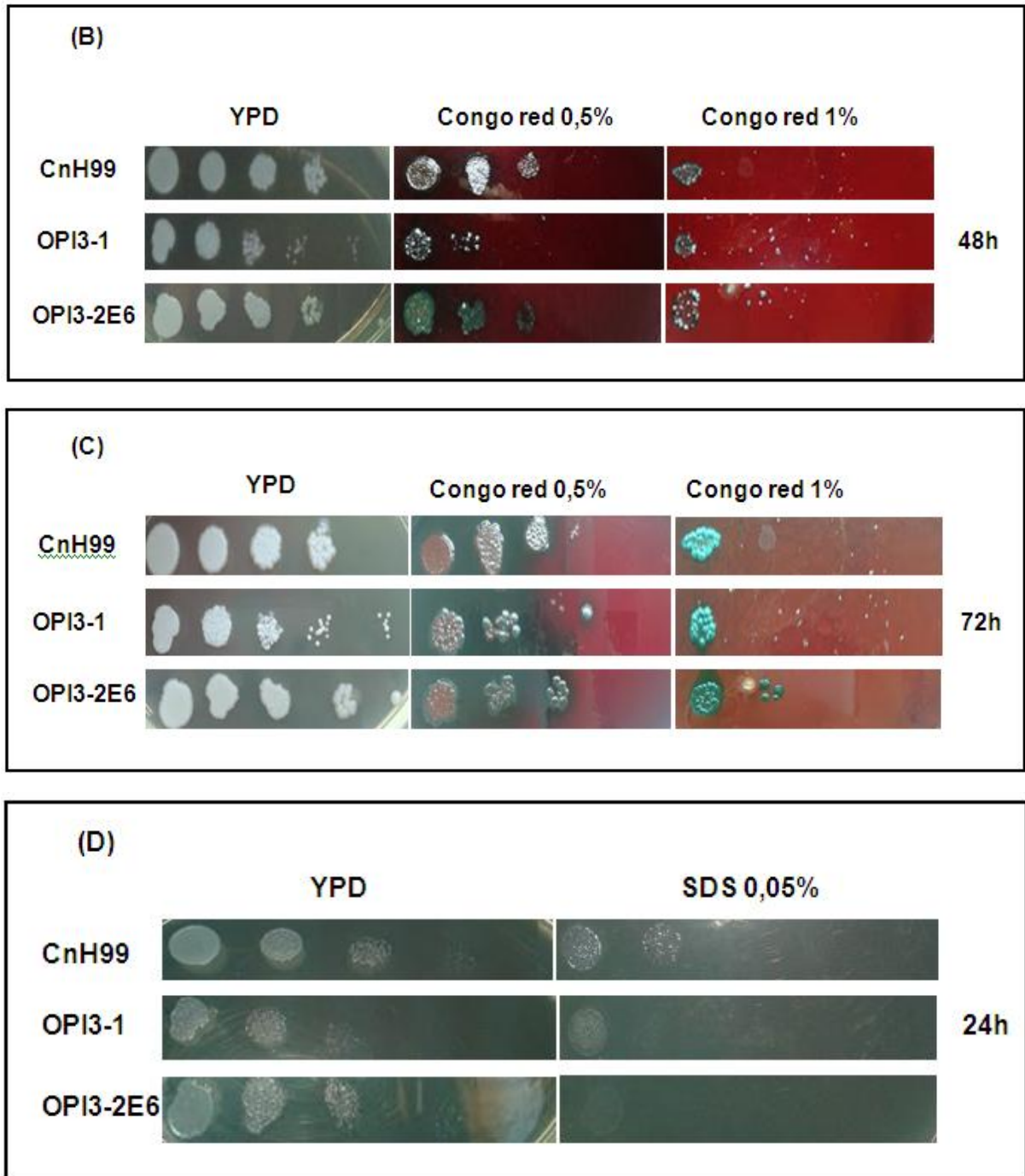
Fonte: Elaborado pelo autor

#### 5.2.4. Integridade da parede celular

Com o objetivo de analisar se o gene OPI3 teria participação nas vias relacionadas à manutenção da integridade da parede celular, foram realizados testes em meios indicadores de defeitos na estrutura da parede celular e membrana celular na temperatura de 30 °C.

**Figura 10:** Teste de estresse de parede na temperatura de 30° C utilizando meios de estresse observados nos intervalos de 24, 48, 72 horas **(A)** Estresse de parede em meio Congo Red 0,5 e 1% a 30 °C após 24 horas. **(B)** Estresse de parede em meio Congo Red 0,5 e 1% a 30 °C após 48 horas **(C)** Estresse de parede em meio Congo Red 0,5 e 1% a 30 °C após 72 horas. **(D)** Estresse de e parede em meio acrescido de SDS a 0,05% a parede 30 °C após 24 horas. **(E)** Estresse de e parede em meio acrescido de SDS a 0,05% a parede 30 °C após 48 horas.





Fonte: Produzido pelo autor

O congo red liga-se a  $\beta$ -1,4-glucana que está presente na parede celular, alterando a sua integridade. Já o SDS rompe a membrana plasmática e lisa células com defeitos na membrana (LIU *et al.*, 2011). Foi possível observar que o mutante OPI3 teve um crescimento mais lento se comparado com a linhagem selvagem, isso pode ser observado através das imagens, onde o crescimento do H99 é visto até a terceira diluição, enquanto o mutante, somente na primeira e tem um crescimento,

praticamente nulo na segunda diluição. Isso indica que o mutante provavelmente é mais sensível a estressores de parede, podendo também está envolvido nas vias de manutenção de parede celular. Este mesmo fato foi observado na presença de SDS, visto que o mutante teve um crescimento menor. Como já dito, em meio YPD o mutante também teve um crescimento mais lento, dessa forma é necessário que seja realizado outros testes fenotípicos com outros agentes estressores como cafeína (0,5 mg/mL e 1 mg/mL) e Calcofluor *White* (0,5 mg/mL e 1,5 mg/mL) para que melhor caracterize a sensibilidade deste mutante.

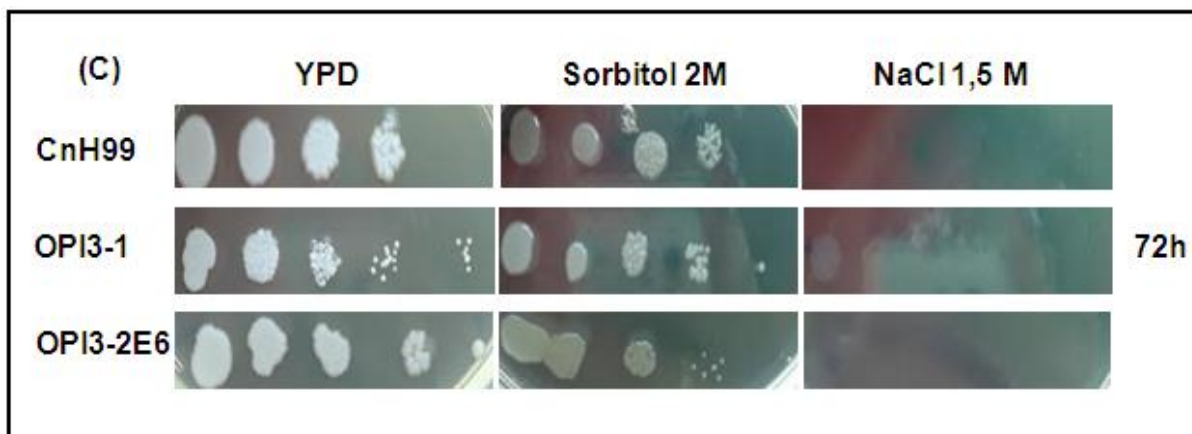
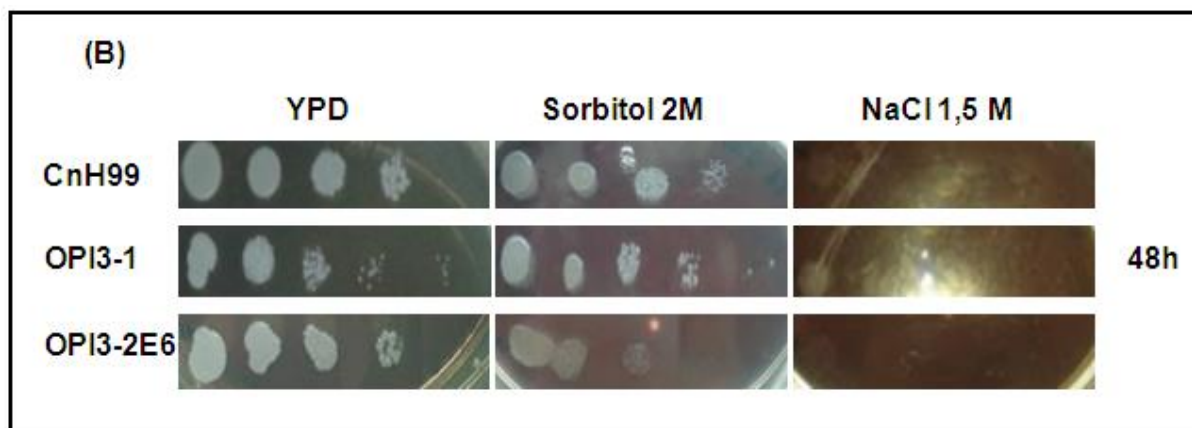
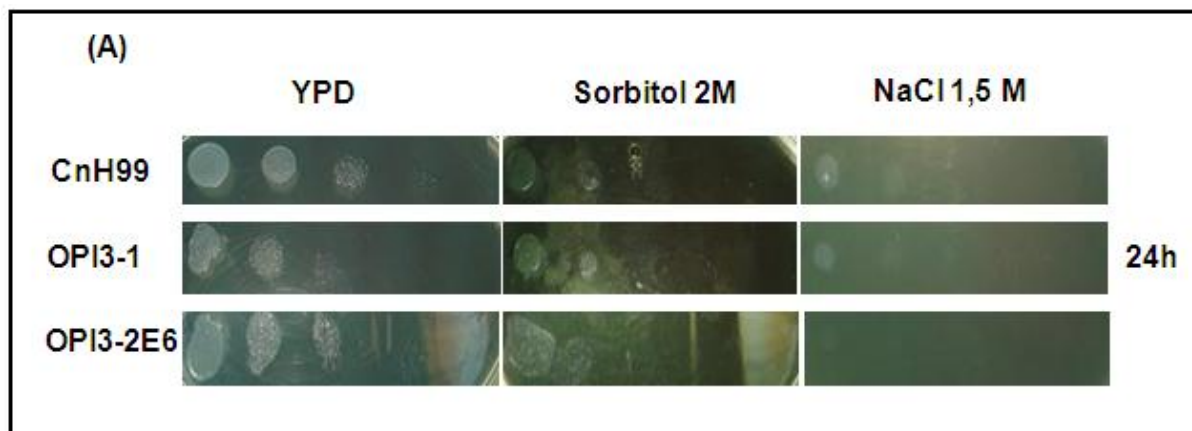
### 5.2.5. Estresse osmótico

Avaliou-se também, o efeito do estresse osmótico sobre as linhagens selvagem e mutante através da observação do crescimento das colônias em meios de cultura com adição de alguns estressores na temperatura de 30° C. Observou-se que a incubação das linhagens na temperatura de 30 °C na presença de sorbitol 2M e NaCl 1,5M não provocou qualquer alteração ou retardo do crescimento de células mutantes em relação às linhagens selvagens, indicando que o gene OPI3 talvez não possua relação com alterações envolvendo a estabilidade da fluidez e permeabilidade da membrana celular. Diferentemente do esperado, uma vez que esse mutante apresenta problemas na produção de fosfolípidios de membrana. Serão feitos outros testes usando outros estressores, para melhor caracterizar o papel desse gene, nesse fenótipo.

**Figura 11:** Teste de estresse osmótico das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3. **(A)** Diluição seriada das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3 realizado a 30 °C e documentado após 24 horas. **(B)** Diluição seriada das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3 realizado a 30 °C e documentado após 48 horas. **(C)** Diluição seriada das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3 realizado a 30 °C e documentado após 72 horas.

**Figura 11:** Teste de estresse osmótico das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3. **(A)** Diluição seriada das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3 realizado a 30 °C e documentado após 24 horas. **(B)** Diluição seriada das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3 realizado a 30 °C e documentado após 48 horas. **(C)** Diluição seriada das

linhagens selvagem e mutante do gene OPI3 realizado a 30 °C e documentado após 72 horas.



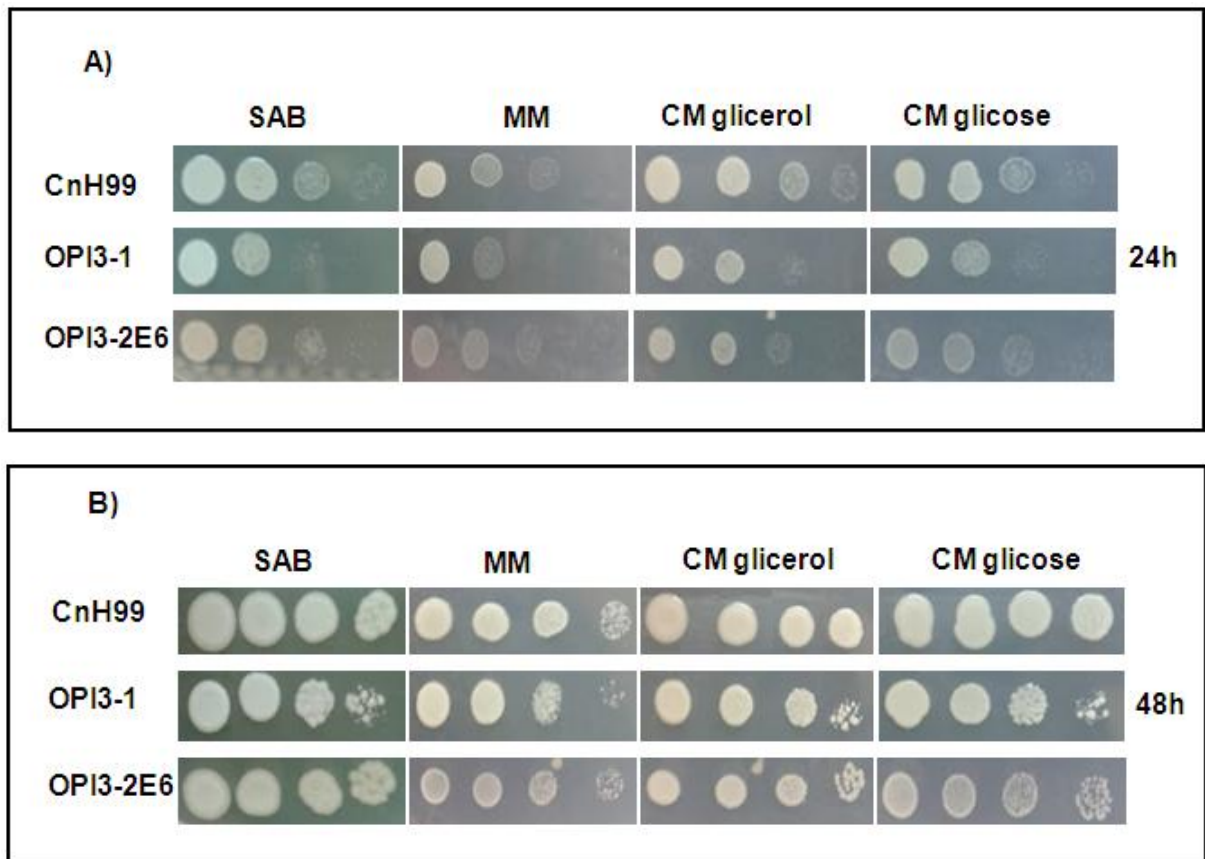
Fonte: Produzido pelo autor

### 5.2.6. Crescimento em meio condicionado

Como demonstrado pelo nosso grupo (ALBUQUERQUE *et al*, 2014), a adição de sobrenadante de culturas de *C. neoformans* (meio condicionado –CM) em fase estacionaria a novas culturas desse fungo induz um aumento significativo no

crescimento planctônico e em biofilmes, melanização e produção de GXM. Com base nos efeitos do crescimento, foi feita uma prospecção de uma biblioteca comercial de mutantes de *C. neoformans* pela qual identificamos um mutante (OPI-3 (2E6)) que demonstrou defeitos no aumento de crescimento induzido pela adição de CM. Para caracterização fenotípica dos mutantes de OPI-3 produzidos nesse trabalho, incluímos alguns testes de crescimento na presença de CM para confirmar esse fenótipo.

**Figura 12:** Teste de crescimento em meio condicionado das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3. **(A)** Diluição seriada das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3 realizado a 30 °C e documentado após 24 horas. **(B)** Diluição seriada das linhagens selvagem e mutante do gene OPI3 realizado a 30 °C e documentado após 48 horas.



Fonte: Produzido pelo autor

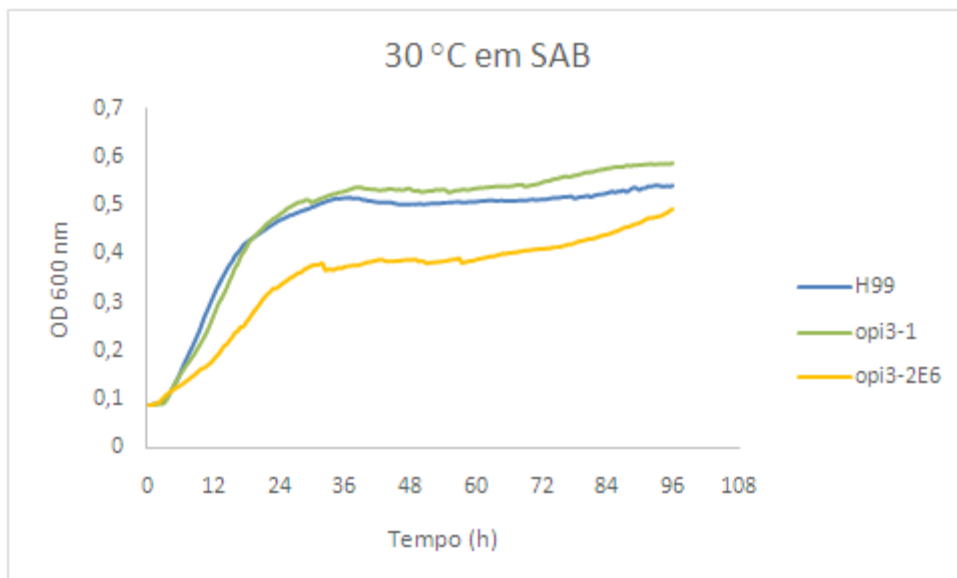
Nota-se que o mutante OPI3 teve um crescimento mais lento na presença de CM se comparado com a linhagem selvagem, corroborando para o fato de que este mutante possui defeitos no aumento de crescimento induzido pela adição de CM, confirmando o fenótipo já observado em estudo anterior.

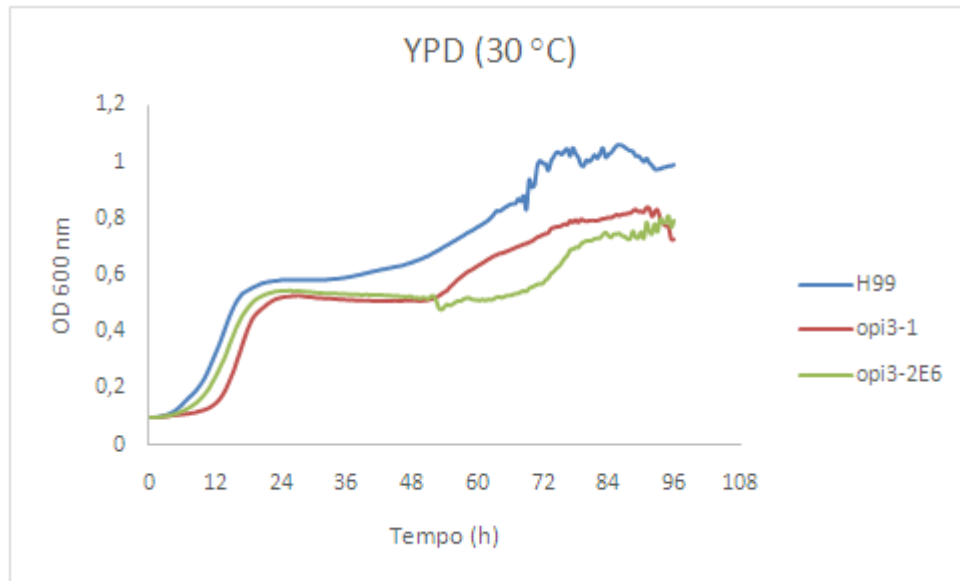


### 5.2.7. Teste de curva de crescimento

Analisou-se a capacidade de crescimento das cepas selvagem e mutante nas temperaturas de 30 e 37 °C e em diferentes meios de cultura líquido: meio Sabouraud, meio YPD e meio mínimo, com ou sem suplementação com meio condicionado de H99 em diferentes concentrações (5%, 50%, 100%).

**Gráfico 1:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 30 °C. Foram medidas através da densidade ótica a 600 nm a cada 30 minutos durante 96 horas, para a análise em diferentes meios de cultura. **A)** Crescimento de *C. neoformans* H99, mutante OPI3-1 e OPI3-2E6 a temperatura de 30 °C em meio SAB. **B)** Crescimento de *C. neoformans* H99, mutante OPI3-1 e OPI3-2E6 a temperatura de 30 °C em meio YPD.

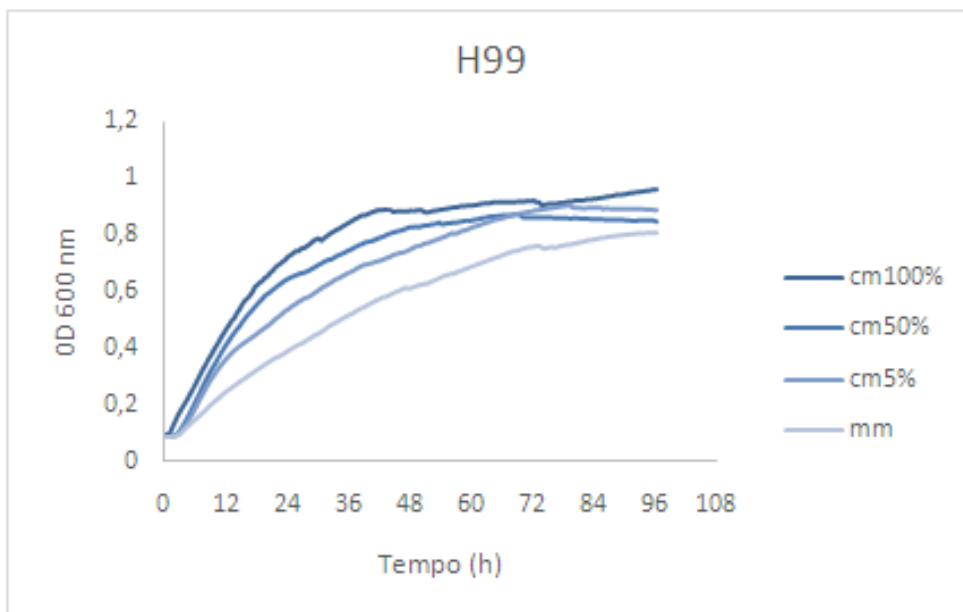


**B**

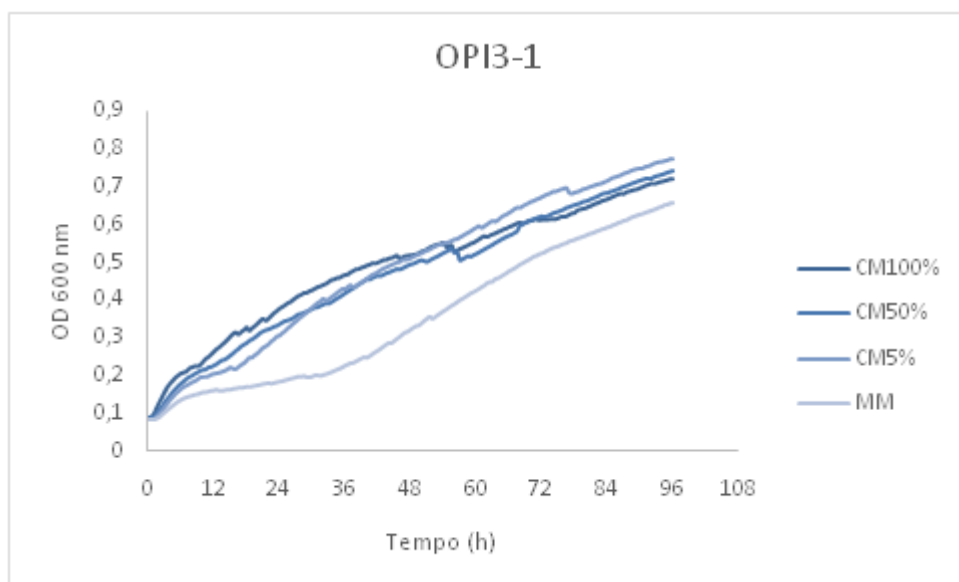
Fonte: Produzido pelo autor.

Observa-se que a temperatura de 30 °C em meio SAB o crescimento de OPI3-2E6 foi mais lento, enquanto o crescimento de OPI3-1 foi semelhante ao da linhagem selvagem. Já quando as diferentes linhagens foram crescidas no meio YPD as três linhagens apresentaram crescimento semelhante, e maior do que em SAB. Sugerindo que nutricionalmente esse meio é mais favorável ao crescimento desse fungo.

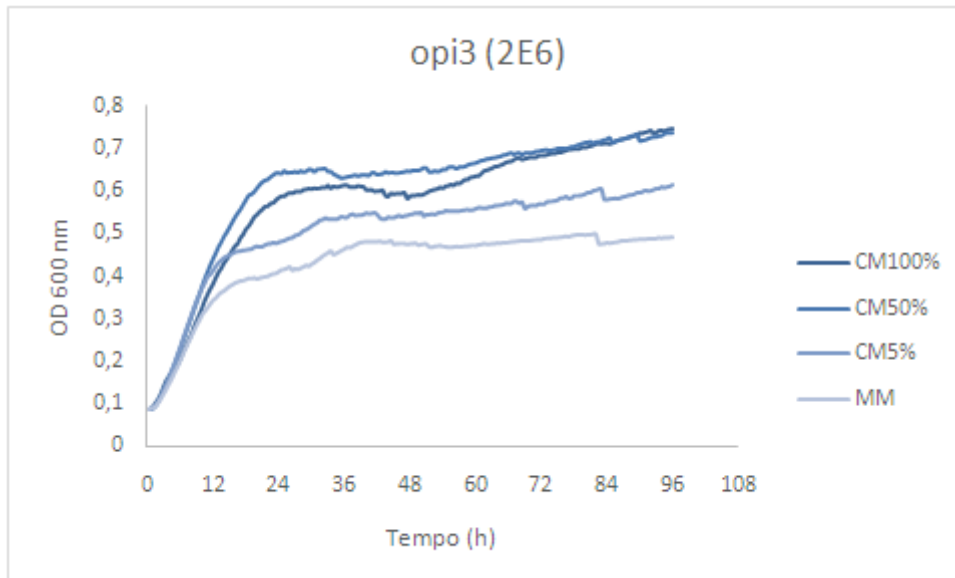
**Gráfico 2:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 30 °C. Foram medidas através da densidade ótica a 600 nm a cada 30 minutos durante 96 horas, para a análise em diferentes meios de cultura. A) Crescimento de *C. neoformans* H99 a temperatura de 30 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 5%. B) Crescimento de *C. neoformans* mutante OPI3-1 a temperatura de 30 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 5%. C) Crescimento de *C. neoformans* mutante OPI3-2E6 a temperatura de 30 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 5%.



**B**



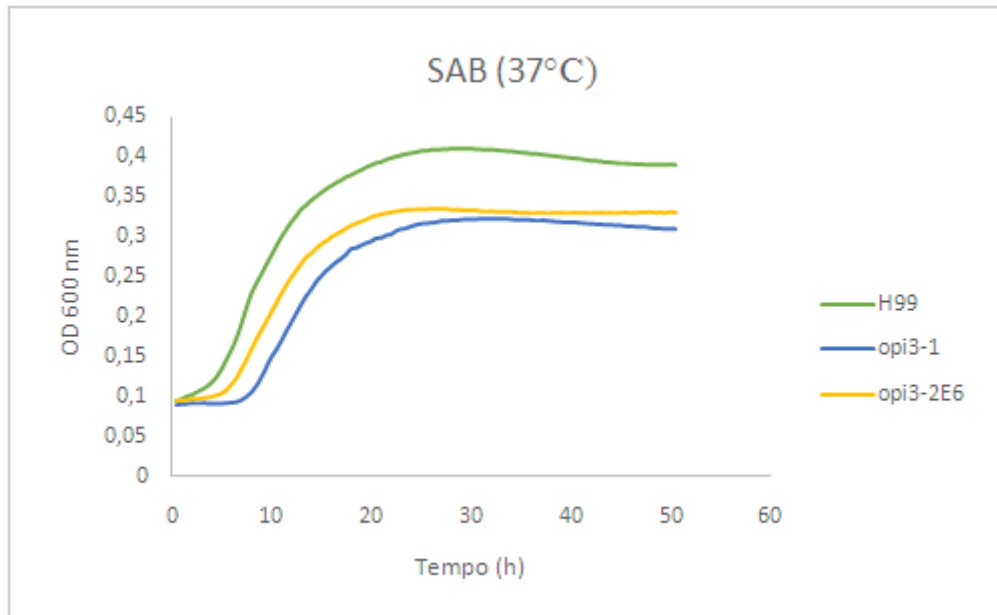
C



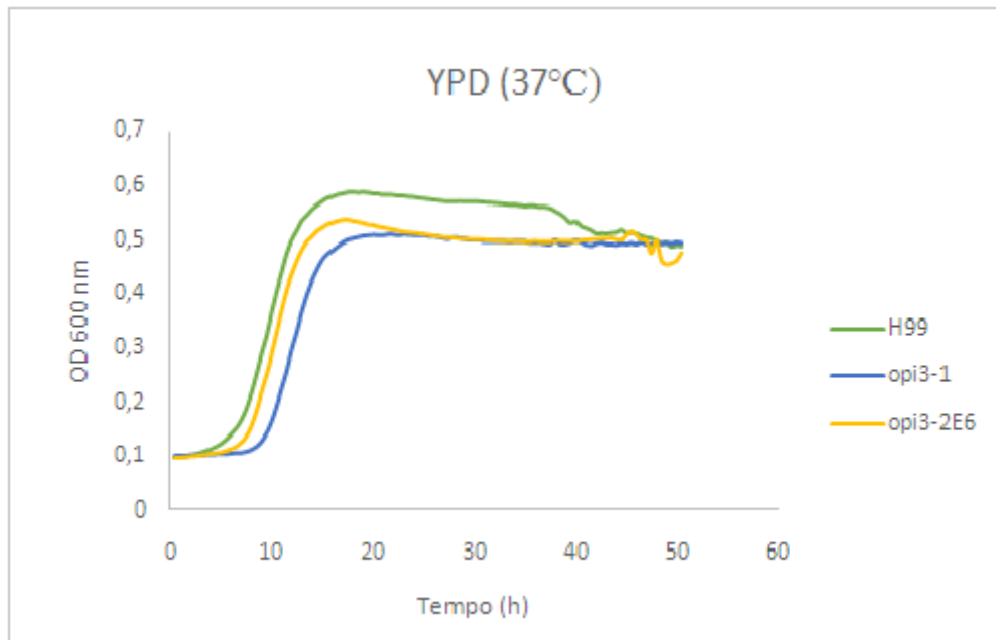
Fonte: Produzido pelo autor.

A cepa selvagem obteve um maior crescimento em CM 100% e um menor crescimento em MM como esperado, embora o aumento do crescimento não tenha sido tão significativo como em testes anteriores. Já o mutante OPI3-1 teve curvas de crescimento bem parecidas nas diferentes concentrações de CM nas primeiras horas de crescimento, exceto no meio MM, onde observou um crescimento um pouco mais lento, e excluindo os efeitos dose dependentes normalmente observados em resposta ao CM em células do tipo selvagem. O mutante OPI3-2E6 demonstrou um maior crescimento na fase estacionária em CM 100% se comparado ao CM 5% e MM em relação ao CM 50%, diferentemente do que observado anteriormente (ALBUQUERQUE, *et al*, 2014). O que pode ser explicado por algum mecanismo de microevolução do fungo.

**Gráfico 3:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 37 °C. Foram medidas através da densidade ótica a 600 nm a cada 30 minutos durante 96 horas, para a análise em diferentes meios de cultura. A) Crescimento de *C. neoformans* H99, mutante OPI3-1 e OPI3-2E6 a temperatura de 37 °C em meio SAB. B) Crescimento de *C. neoformans* H99, mutante OPI3-1 e OPI3-2E6 a temperatura de 37 °C em meio YPD.



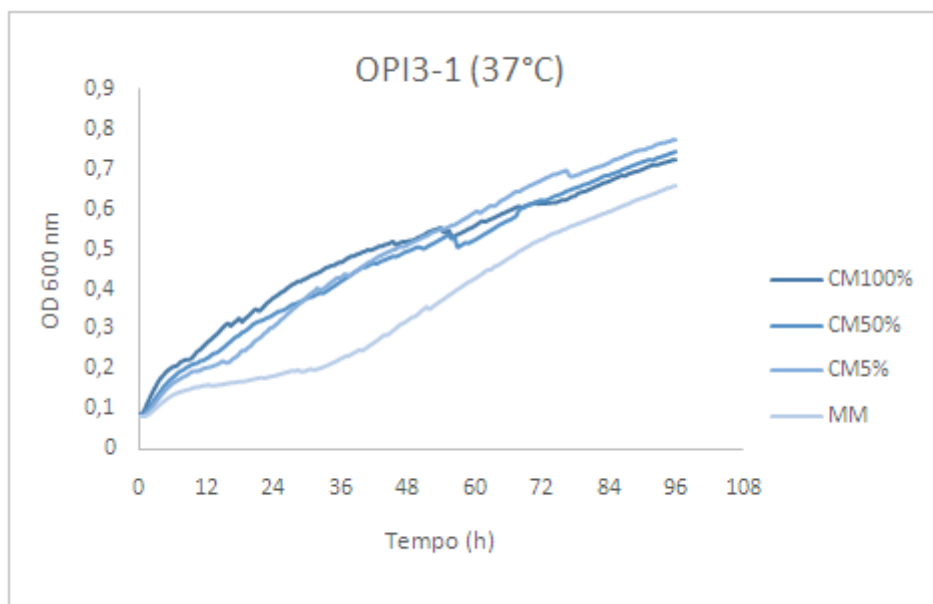
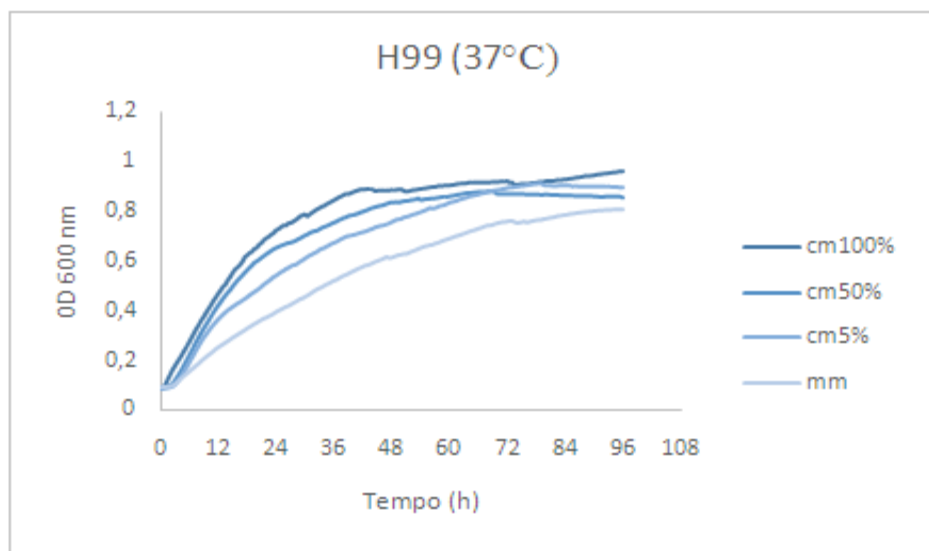
**B**



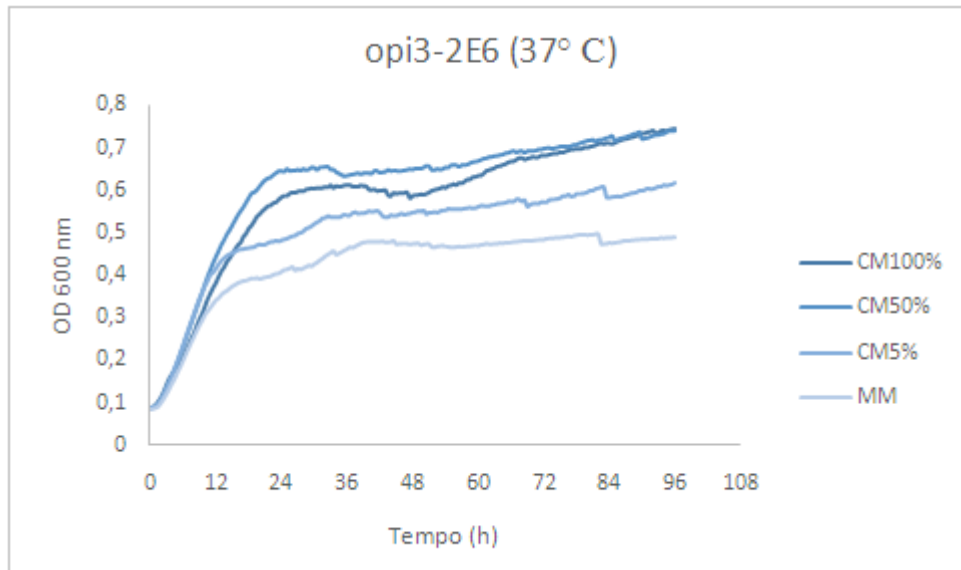
Fonte: Produzido pelo autor.

Em meio SAB a uma temperatura de 37 °C o mutante OPI3-1 demonstrou crescer ligeiramente mais devagar que a linhagem selvagem. No meio YPD observou-se que as curvas de crescimento do mutante OPI3-1 E OPI3-2E6 foram muito parecidas. Novamente o *C. neoformans* H99 teve um maior crescimento. Observou-se também, que nessa temperatura, todas as linhagens cresceram menos do que a 30 °C.

**Gráfico 4:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 37 °C. Foram medidas através da densidade ótica a 600 nm a cada 30 minutos durante 96 horas, para a análise em diferentes meios de cultura. A) Crescimento de *C. neoformans* H99 a temperatura de 37 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 5%. B) Crescimento de *C. neoformans* mutante OPI3-1 a temperatura de 37 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 5%. C) Crescimento de *C. neoformans* mutante OPI3-2E6 a temperatura de 37 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 5%.



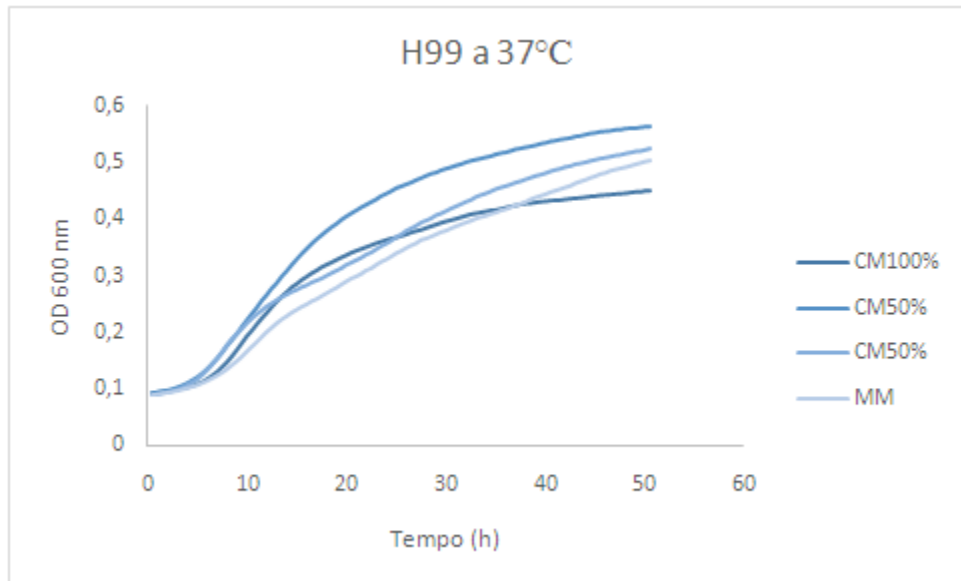
C



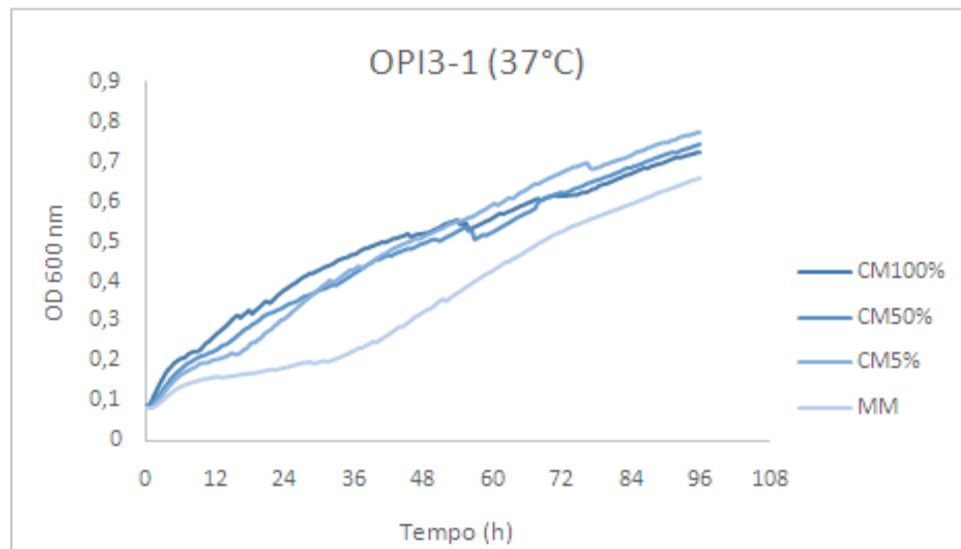
Fonte: Produzido pelo autor.

A uma temperatura de 37 °C observou que a linhagem selvagem teve uma curva de crescimento muito parecida com a observada a 30° C. Já o OPI3-1 nos diferentes meios não demonstrou ter as fases de adaptação, exponencial e estacionária bem definidas. Também foi possível analisar o crescimento do mutante OPI3-2E6 a 37 °C com uma curva de crescimento bem definida, obtendo um maior crescimento quando em CM 50%, seguido de CM 100% e 5%.

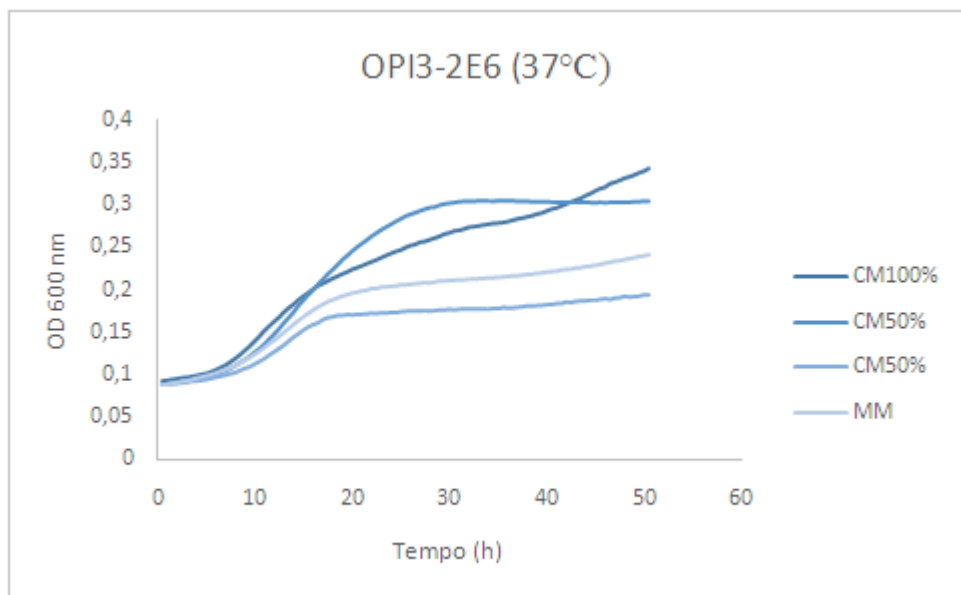
**Gráfico 5:** As curvas de crescimento de *C. neoformans* a temperatura de 37 °C. Foram medidas através da densidade ótica a 600 nm a cada 30 minutos durante 96 horas, para a análise em diferentes meios de cultura. **A)** Crescimento de *C. neoformans* H99 a temperatura de 37 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 50%. **B)** Crescimento de *C. neoformans* mutante OPI3-1 a temperatura de 37 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 50%. **C)** Crescimento de *C. neoformans* mutante OPI3-2E6 a temperatura de 37 °C em meio MM, CM 100%, CM 50% e CM 50%.



**B**



**C**





Fonte: Produzido pelo autor.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As infecções fúngicas oportunistas invasivas vem ganhando destaque em cuidados relacionados à saúde, devido ao crescimento da população de pacientes imunodeprimidos, principalmente pacientes com AIDS. A criptococose é uma doença oportunista invasiva causada pela levedura encapsulada *C. neoformans* e possui distribuição mundial, sendo também uma das micoses mais prevalentes entre pacientes imunodeprimidos. A meningoencefalite criptocócica é a infecção fúngica mais comum do SNC e pode ser fatal se não tratada.

Diante disso, os fatores de virulência expressos no *C. neoformans* são essenciais para o aumento de sua patogenicidade. Estes fatores de virulência se encontram bem definidos, dentre eles a cápsula de polissacarídeo é uma característica distintiva entre os fungos patogênicos, podendo citar também a produção de melanina pela enzima lacase, a produção de urease, de fosfolipases e a habilidade de crescimento a 37°C, além do parasitismo de macrófagos.

Por meio deste estudo foi possível observar três possíveis mutantes do gene OPI3 que apresentam alguns defeitos na produção de alguns fenótipos de virulência de *Cryptococcus neoformans*. Através dos resultados de testes fenotípicos constatou-se que o mutante OPI3 não possui termossensibilidade, no entanto nas temperaturas de 37 e 39°C tanto a linhagem H99 quanto o mutante se apresentaram com um aspecto incomum. Foi possível notar que o mutante OPI3 teve um crescimento mais lento em todos os meios de cultura utilizados YPD, o que pode ser um interferente na interpretação de alguns dos resultados.

No teste de produção de melanina foi possível verificar uma diferença entre as cepas selvagem e mutante, notando que a selvagem produz uma maior quantidade de melanina do que a mutante. Entre os mutantes OPI3 identificou que o OPI3-2E6 possui a menor melanização quase que imperceptível no teste.

O mutante OPI3-1 permaneceu com a ausência do halo de fosfolipase surgindo apenas um halo bem menor se comparado com a cepa H99 e o mutante OPI3-2E6, após as 48h de incubação em meio gema de ovo a 30° C. O teste de integridade de parede celular indicou que o mutante provavelmente é mais sensível a estressores de parede, podendo também está envolvido na manutenção dessa via.

Na incubação das linhagens em temperatura de 30°C na presença de meios de cultura contendo sorbitol 2M e NaCl 1,5M não provocou qualquer alteração visível ou retardo do crescimento de células mutantes em relação às linhagens selvagens, indicando que o gene OPI3 possivelmente não possui relação com alterações envolvendo a estabilidade da fluidez e permeabilidade da membrana celular.

De forma geral, o CM usado neste trabalho não apresentou uma atividade muito alta, devido a problemas que ocorreram relacionados com o armazenamento em temperatura inadequada. Com isso, é de extrema importância que se repita as curvas de crescimento com um novo CM a fim de termos resultados mais conclusivos.

## 7. PERSPECTIVAS

A identificação de novas moléculas e a elucidação de genes e proteínas envolvidas na regulação do fenômeno de QS em *C. neoformans* é um assunto que já vem sendo alvo de pesquisas pelo nosso grupo. O estudo de QS tem a importância de encontrar moléculas que estão envolvidas na resistência e em fatores de virulência de *C. neoformans*, dessa forma este conhecimento ajudará na detecção de mecanismos responsáveis pela patogenicidade deste fungo. Além disso, o QS regula a produção de peptídeos antimicrobianos, sendo então objeto de colaboração para eventuais pesquisas de novos fármacos para o tratamento da criptococose.

Este trabalho é o início da caracterização da função do gene OPI3 em *C. neoformans* e serão necessários outros estudos para melhor identificar a relação deste gene com a regulação de vias envolvendo fenótipos presentes nos principais fatores de virulência, para assim ter um entendimento satisfatório do possível papel desse gene na regulação da expressão gênica do fenômeno de QS desse fungo.

Os experimentos sugeridos para serem realizados como continuidade desta pesquisa são: confirmação da deleção de OPI3 por técnica de PCR; confirmação dos mutantes OPI3 por Southern Blot; Novos testes fenotípicos a citar, a produção de urease, de cápsula, teste de resistência a luz UV, crescimento em meios com diferentes concentrações de nitrogênio, testes de fusão, testes de acasalamento, análises microscópicas, testes de virulência com células em cultura e / ou modelos animais. Além da avaliação *in vitro* da sobrevivência do mutante OPI3 após ensaio de fagocitose por macrófagos. Acreditamos que a caracterização desse gene poderá fornecer indícios importantes do papel de fosfolipídios na virulência desse fungo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIO, A.; DESNOS-OLLIVIER, M. & DROMERA, F. Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-Macrophage Interactions Reveal that Fungal Background Influences Outcome during Cryptococcal Meningoencephalitis in Humans. *mBio*. v. 2, n. 4. 2011. doi:10.1128/mBio.00158-11.

ALBUQUERQUE, P., & CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi—a review. *Medical mycology*, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.

ALBUQUERQUE, P., NICOLA, A. M., NIEVES, E., PAES, H. C., WILLIAMSON, P. R., SILVA-PEREIRA, I., & CASADEVALL, A. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, v. 5, n. 1, p. e00986-13, 2014.

ALVAREZ, M., & CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Current Biology*, v. 16, n. 21, p. 2161-2165, 2006.

ARENAS, R. *Micología Médica Ilustrada*. 3ª ed. México: McGraw-Hill, 2008. 447 p.

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.

BABU, A. K., GOPALAKRISHNAN, R., & SUNDARARAJAN, L. Pulmonary cryptococcosis: An unusual presentation. *Lung India: Official Organ of Indian Chest Society*, v. 30, n. 4. p. 347–350. 2013. <http://doi.org/10.4103/0970-2113.120618>

BADDLEY, J. W.; SCHAIN, D. C.; GUPTA, A. A.; LODHI, S. A.; KAYLER, L. K.; FRADE, J. P.; LOCKHART, S. R.; CHILLER, T.; BYNON JR, J. S. & BOWER, W. A. Transmission of *Cryptococcus neoformans* by Organ Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. v. 52. n. p.e94–e98. 2011.

BADIEE, P. Evaluation of Human Body Fluids for the Diagnosis of Fungal Infections. *BioMed Research International*. 2013.

BADIEE, P., & HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *The Indian Journal of Medical Research*. v. 139, n. 2. p. 195–204. 2014.

BAHN, Y-S.; COX, G. M.; PERFECT, J. R. & HEITMAN, J. Carbonic Anhydrase and CO<sub>2</sub> Sensing during *Cryptococcus neoformans* Growth, Differentiation, and Virulence. *Current Biology*, v. 15. p. 2013–2020. 2005.

BALLOU, E. R.; ALSPAUGH, J. A. & NICHOLS, C. B. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. cap. 4. 2012.

BAKER, R. D. et al. K. SALFELDER: Cryptococcosis. *The Pathologic Anatomy of Mycoses*. p. 383- 464. 1971.

BEN-AMI, R.; HALABURDA, K.; KLYASOVA, G.; METAN, G.; TOROSIAN, T.; AKOVA, M. A multidisciplinary team approach to the management of patients with suspected or diagnosed invasive fungal disease. *J Antimicrob Chemother*. v. 68, n.3. p. 25-33. 2013. doi: 10.1093/jac/dkt390.

BENHAM, R. W. Cryptococci-Their Identification by Morphology and by Serology. *The Journal of Infectious Diseases*. New York, 1935.

BIVANCO, F. C.; MACHADO, C. D. S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. *Arq Med ABC*. v. 31, n. 2. p. 102-109. 2006.

BOLOGNESE, C. P., & MCGRAW, P. The isolation and characterization in yeast of a gene for arabidopsis s-adenosylmethionine: Phospho-ethanolaminemethyltransferase. *PlantPhysiology*, v. 124, n. 4, p. 1800-1813, 2000.

BONIFAZ, A. Micología Médica Básica. 4ª ed. México: McGraw-Hill, 2012. 600 p.

BOSE, I.; REESE, A. J.; ORY, J. J.; JANBON, G. & DOERING, T. L. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, v. 2, n. 4. p. 655–663. 2003

BOVERS, M.; HAGEN, F. & BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev IberoamMicol*. v. 25. p. 4-12. 2008.

- BOWMAN, S. M., & FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.
- BRANDT, M. E.; PFALLER, M. A.; HAJJEH, R. A.; GRAVISS, E. A.; REES, J. *et al.* Molecular subtypes and antifungal susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates in human immunodeficiency virus-associated cryptococcosis. *J. Infect. Dis.* v. 174. p. 812–820. 1996.
- BRUESKE, C. H. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. *J ClinMicrobiol.* v. 23. p. 631-633. 1986.
- BUCHANAN, K. L., & MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Emerging infectious diseases*, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.
- BUTINAR, L., SANTOS, S., SPENCER-MARTINS, I., OREN, A., & GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, v. 244, n. 2, p. 229-234, 2005.
- BUTLER, M. J.; DAY, A. W.; HENSON, J. M. & MONEY, N. P. Pathogenic Properties of Fungal Melanins. *Mycologia.* v. 93, n. 1 p. 1-8. 2001.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; ARECHAVALA, A.; TUR-TUR, C.; ERASO, E.; JAUREGIZAR, N.; QUINDÓS, G. & NEGRONI, R. La utilidad clínica de los derivados triazólicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas. *RevEspQuimioter.* v. 28, n. 4. p.169-182. 2015.
- CARRIS, L. M., LITTLE, C. R., & STILES, C. M. Introduction to Fungi. *The Plant Health Instructor*, 2012.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J. Water Health.* v. 7, n. 1. p. 2-18. 2009.
- CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? *The Journal of Clinical Investigation*, v.120, n. 5. p. 1389–1392. 2010. <http://doi.org/10.1172/JCI42949>

- CASADEVALL, A.; STEENBERGEN J. N. & NOSANCHUK, J.D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi — the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology*. v. 6. p.332–337. 2003;
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L. & NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*. v. 3. p.354–358. 2000.
- CHANG Y. C. & KWON-CHUNG, K. J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*. v. 181. p. 5636–5643. 1999.
- CHANG, Y. C. & KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* v. 66. p. 2230–2236. 1998.
- CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A. & KWON-CHUNG, K. J. The second gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun*. v. 64. p. 1977–1983. 1996.
- CHANG, Y. C.; WICKES, B. L. & KWON-CHUNG, K. J. Further analysis of the CAP59 locus of *Cryptococcus neoformans*: structure defined by forced expression and description of a new ribosomal protein-encoding gene. *Gene*. v. 167. p.179–183. 1995.
- CHATURVEDI, V., FLYNN, T., NIEHAUS, W. G., & WONG, B. Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, v. 142, n. 4, p. 937-943, 1996.
- CHEN, J., & SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1→3),(1→6)-glucans. *Mycological research*, v. 111, n. 6, p. 635-652, 2007.
- CHERNIAK, R. & SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide Antigens of the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun*. v. 62, n. 5 p. 1507-1512. 1994.

CHEN, H., M. FUJITA, Q. FENG, J. CLARDY AND G. R. FINK. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl AcadSci U S A*. v.101. n.14.p. 5048-5052. 2004.

CHEN, L. C., BLANK, E. S., & CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 3, n. 5, p. 570-574, 1996.

CHEN, S. C., MULLER, M., ZHOU, J. Z., WRIGHT, L. C., & SORRELL, T. C. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor?. *Journal of Infectious Diseases*, v. 175, n. 2, p. 414-420, 1997.

CHRISMAN, C.J.; ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and Nonlytic Exocytosis. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 76, n. 18, p. 6056-6062. Set. 2010. doi:10.1128/AEM.00812-10

COCHRANE, V. W. Physiology of fungi. *Physiology of fungi.*, 1958.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; & CASADEVALL, A. The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* v. 9 p. 19–38. 2014.

CORDEIRO, R. A.; MOURÃO, C. I.; ROCHA, M. F. G.; MARQUES, F. J. F.; TEIXEIRA, C. E. C.; MIRANDA, D. F.O.; NETO, L. V. P.; BRILHANTE, R. S. N.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C. Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis* n.32, p. 557–564. 2013. DOI 10.1007/s10096-012-1774-8

COX, G. M., HARRISON, T. S., MCDADE, H. C., TABORDA, C. P., HEINRICH, G., CASADEVALL, A., & PERFECT, J. R. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infection and immunity*, v. 71, n. 1, p. 173-180, 2003.

COX, G. M., MCDADE, H. C., CHEN, S. C., TUCKER, S. C., GOTTFREDSSON, M., WRIGHT, L. C., ... & PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, v. 39, n. 1, 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.

CRUISCKSHANK, R.; DUGUID, J. P.; MARMION, B. P. & SWAIN, R. H. A. Centrifuges, colorimeters and bacterial counts. *Medical Microbiology*, 1975.

DEFENDORF, A. R. Yeasts and Their Relation to Malignant Tumors. *Transactions of the American Microscopical Society*. v. 18. p. 219-247. Mar. 1897.

DEL POETA, M. & CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. *Mycopathologia*. v.173, n. 5-6. p. 303-310. 2012. doi: 10.1007/s11046-011-9473-z.

DESALERMOS, A.; KOURKOUMPETIS, T. K. & MYLONAKIS, E. Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis. *Expert Opin Pharmacother*. v. 13, n. 6. p. 783-789. 2012.

DIAMOND, R. D.; ROOT, R. K. & BENNETT, J. E. Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes in vitro. *J. Infect. Dis*. v. 125 p. 367–376. 1972.

DOERING, T. L. How sweet it is! Cel wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol*. v.63. p. 223–247. 2009.

DUIN, D. V.; CASADEVALL, A. & NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.46. n.11, p. 3394-3400. 2002.

DUIN, D. V.; CLEARE, W.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother*. v. 48, n. 6, p. 2014-2020. Jun. 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.6.2014–2020.2004

DYKSTRA, M.A.; FRIEDMAN, L. & MURPHY, J. W. Capsule size of *Cryptococcus neoformans*: control and relationship to virulence. *Infect. Immun.* v. 16, p. 129–135. 1977.

ELKHAIMI, M., KAADIGE, M. R., KAMATH, D., JACKSON, J. C., BILIRAN JR, H., & LOPES, J. M. Combinatorial regulation of phospholipid biosynthetic gene expression by the UME6, SIN3 and RPD3 genes. *Nucleic acids research*, v. 28, n. 16, p. 3160-3167, 2000.

ELLERBROEK, P. M.; WALENKAMP, A. M.; HOEPELMAN, A. I.; COENJAERTS, F. E.; Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. *Curr Med Chem.* v. 11. p. 253-266. 2004.

EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J bacteriol.* v. 62, n. 6. p. 685-690. 1951.

EISENMAN, H. C. & CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 931-940, 2012.

FELDMESSER, M., KRESS, Y., NOVIKOFF, P., & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 7, p. 4225-4237, 2000.

FELDMESSER, M., TUCKER, S., & CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends in microbiology*, v. 9, n. 6, p. 273-278, 2001.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P. & CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *J. Clin. Microbiol.* v. 35 n. 9. p. 2243-2251. 1997.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F. & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 37, n. 3. p. 838-840. 1999.

FRASES, S.; PONTES, B.; NIMRICHTER, L.; VIANA, N. B.; RODRIGUES, M. L. & CASADEVALL, A. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *PNAS*. v. 106, n. 4. p. 1228-1233. 2009.

GATES, M.A.; THORKILDSON, P. & KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol. Microbiol.* v. 52. p. 13–24. 2004.

GREENBERG, M. L., KLIG, L. S., LETTS, V. A., LOEWY, B. S., & HENRY, S. A. Yeast mutant defective in phosphatidylcholine synthesis. *Journal of bacteriology*, v. 153, n. 2, p. 791-799, 1983.

GOW, N. A., BROWN, A. J., & ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current opinion in microbiology*, v. 5, n. 4, p. 366-371, 2002.

GUARNER, J., & BRANDT, M. E. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. *Clinical Microbiology Reviews*. v.24, n.2. p. 247–280. 2011. <http://doi.org/10.1128/CMR.00053-10>

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. D. S., & PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HENRICKSON, R. V. Cryptococcosis in Man and Captive Exotic Animals. *The Journal of Zoo Animal Medicine*. v. 3, n. 1. p. 27-30. Mar. 1972.

HORNBY, J. M., E. C. JENSEN, A. D. LISEC, J. J. TASTO, B. JAHNKE, R. SHOEMAKER, P. DUSSAULT & K. W. NICKERSON. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* v. 67. n.7. p. 2982-2992. 2001.

HORST, C. M. V. D.; SAAG, M. S.; CLOUD, G. A. *et al.* Treatment Of Cryptococcal Meningitis Associated With The Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Massachusetts Medical Society*. v. 337, n. 1. p. 15-21. 1997.

IGREJA, R. P.; LAZÉRAS, M. D. S.; WANKES, B.; GALHARDO, M. C. G.; KIDD, S. E. & MEYER, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Medical Mycology*. v. 42. p. 229-238. 2004.

IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y.; & KAUFMAN, L. Antigenic Characterization of *Cryptococcus neoformans* Serotypes and Its Application to Serotyping of Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 22-29. Jul. 1982.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S. & SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiology and immunology*, v. 47. n.4. p. 271-277. 2003.

JACOBSON, E. S.; JENKINS, N. D. & TODD, J. M. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infect Immun* v. 62. p.4085-4086. 1994.

JACOBSON, E.S.; TINGLE, M. J. & QUINN, P. L. Effect of hypertonic solutes upon the polysaccharide capsule in *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*. v. 32, p. 14–23. 1989.

JANBON, G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res.* v. 4, p. 765–771. 2004.

JESCH, S. A.; ZHAO, X.; WELLS, M. T. & HENRY, S. A. Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 10, p. 9106-9118, 2005.

JUNIOR, A. M. B; SANTOS, B. F. O.; CARVALHO, E. O.; MÉLO, D. L. F. M; TRINDADE, R. C. & STOIANOFF, M. A. R. Biological activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical and environmental isolates. *J Bras Patol Med Lab*, v. 49, n. 3, p. 160-168. Jun. 2013.

KANIPES, M. I., HILL, J. E., & HENRY, S. A. The *Schizosaccharomyces pombe* cho1+ gene encodes a phospholipid methyltransferase. *Genetics*, v. 150, n. 2, p. 553-562, 1998.

KAPLAN, J. E.; HANSON, D.; DWORKIN, M. S.; FREDERICK, T.; BERTOLLI, J.; LINDEGREN, M. L. *et al.* Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated

opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.*v.30, n. 1. p. 5-14. 2000.

KIM, H. S.; KIM, S-Y.; YOO, J. K.; LEE, Y-W.; BAHN, Y-S. An Efficient Gene-disruption Method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. *BiochemBiophys Res Commun.* v. 390. p. 983-88. 2009.

KIM, M. S., KIM, S. Y., JUNG, K. W., BAHN, Y. S. Targeted gene disruption in *Cryptococcus neoformans* using double-joint PCR with split dominant selectable markers. *Methods Mol Biol.* v. 845. p. 67-84. 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-539-8\_5.

KNOKE, M. & SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. *Mycoses.* v. 37. p. 229-233. 1994.

KOZUBOWSKI, L. & HEITMAN, J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev.* v. 36. n. 1. p. 78-94. 2012. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00286.x.

KUMAR, P.; YANG, M.; HAYNES, B. C.; SKOWYRA, M. L. & DOERING, T. L. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. *Elsevier.* v. 21 p. 597–602. Set. 2011. DOI 10.1016/j.sbi.2011.08.006

KWON-CHUNG, K. J. BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. & DIAZ, M. (1557) Proposal to Conserve the Name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *International Association for Plant Taxonomy.* v. 51, n. 4. pp. 804-806. 2002.

KWON-CHUNG, K. J., & BENNETT, J. E. Distribution of a and  $\alpha$  mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *American Journal of Epidemiology,* v. 108, n. 4, p. 337-340, 1978.

KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. Cryptococcosis: Medical mycology. Philadelphia, Lea &Febiger, chap 16, p. 397-446, 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C. & WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 2, p. 602-605, 1992.

KWON-CHUNG, K. J. & RHODES, J. C. Encapsulation and Melanin Formation as Indicators of Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 51, n. 1. p. 218-223. 1986.

KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the Sexual State of *Cryptococcus neoformans*. *Micological Society of America*. v. 68, n. 4. p. 821-833. Jul.1976. DOI: 10.2307/3758800

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I. & POPKIN, T. J. Melanin-Lacking Mutants of *Cryptococcus neoformans* and Their Virulence for Mice. *Journal Of Bacteriology*, v. 150. n. 3, p. 1414-1421 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D.; ELLIS, D. & HOWARD, D. H. Virulence, Serotype, and Molecular Characteristics of Environmental Strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infection and Immunity*. v. 60, n. 5. p. 1869-1874. 1992.

LACAZ, C. S.; J. ASSIS, J. L. & BITTENCOURT, J. M. T. Micoses do Sistema Nervoso. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. v. 5. p. 1-52. 1947.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G. & BRAKHAGEA, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. v. 38. p. 143–158. 2003.

LANTERNIER, F., CYPOWYJ, S., PICARD, C., BUSTAMANTE, J., LORTHOLARY, O., CASANOVA, J.-L., & PUEL, A. Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. *Current Opinion in Pediatrics*, v 25. n. 6. p. 736–747. 2013. <http://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000031>

LEE, H., CHANG, Y. C., NARDONE, G., & KWON-CHUNG, K. J. TUP1 disruption in *Cryptococcus neoformans* uncovers a peptide-mediated density-dependent growth phenomenon that mimics quorum sensing. *Molecular microbiology*, v. 64, n. 3, p. 591-601, 2007.

- LEROUX, S. & ULLMANN, A. J. Management and diagnostic guidelines for fungal diseases in infectious diseases and clinical microbiology: critical appraisal. *ClinMicrobiol Infect.* v. 19, n. 12. p. 1115-1121. 2013
- LEVITZ, S. M. Macrophage-Cryptococcus interactions. *Immunology series*, v. 60, p. 533-543, 1993.
- LI, S. S. & MODY, C. H. *Cryptococcus*, *Proc Am Thorac Soc.* v. 7. p.186-196, 2010. DOI: 10.1513/pats.200907-063AL
- LILLY, V. G., & BARNETT, H. L. Physiology of the Fungi. *Physiology of the fungi.*, 1951.
- LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, v. 9. n. 4. p. 401–416. 2009. doi:10.1016/j.meegid.2009.01.013
- LIN, X., & HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, v. 60, p. 69–105. 2006. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142102
- LINDENBERG, A. S. C.; CHANG, M. R.; PANIAGO, A. M. M.; LAZÉRA, M. S.; MONCADA, P. M. F.; BONFIM, G. F.; NOGUEIRA, S. A. & WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso Do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* v, 50, n. 2. p. 75-78. 2008.
- LITTMAN, M. L. & TSUBURA, E. Effect of Degree of Encapsulation upon Virulence of *Cryptococcus Neoformans*. *Experimental Biology and Medicine*. 1959.
- LIU, O. W., CHUN, C. D., CHOW, E. D., CHEN, C., MADHANI, H. D., & NOBLE, S. M. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell*, v. 135, n. 1, p. 174-188, 2008.
- LIU, T. B.; WANG, Y.; STUKES, S.; CHEN, Q.; CASADEVALL, A. & XUE, C. The F-box protein Fbp1 regulates sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, v. 10, n. 6, p. 791-802, 2011.

MADHANI, H. D. Quorum sensing in fungi: Q&A. *PLoS Pathog*, v. 7, n. 10, p. e1002301, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V. & CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MANSOUR, M. K., & LEVITZ, S. M. Interactions of fungi with phagocytes. *Current opinion in microbiology*, v. 5, n. 4, p. 359-365, 2002.

McCLELLAND, E. E.; PERRINE, W. T.; POTTS, W. K.; CASADEVALL, A. Relationship of Virulence Factor Expression to Evolved Virulence in Mouse-Passaged *Cryptococcus neoformans* Lines. *Infect. Immun.* v. 73 n. 10, p. 7047-7050. Oct. 2005. DOI: 10.1128/IAI.73.10.7047-7050.2005.

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

MCGRAW, P., & HENRY, S. A. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *opi3* gene: effects on phospholipid methylation, growth and cross-pathway regulation of inositol synthesis. *Genetics*, v. 122, n. 2, p. 317-330, 1989.

MEYER, V., WANKA, F., VAN GENT, J., ARENTSHORST, M., VAN DEN HONDEL, C. A., & RAM, A. F. Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 9, p. 2975-2983, 2011.

MIHU, M. R.; PATTABHI, R.; & NOSANCHUK, J. D. The impact of antifungals on toll like receptors. *Frontiers in Microbiology*. v.5, n.99 .2014. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00099>

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2012. Vigilância Epidemiológica da Criptococose. BRASIL. Secretária de Vigilância em Saúde. 2012.

MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E.; HAMILL, R.; BRANDT, M. E. *et al.* The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis*. v. 36, n. 6. p. 789-794. 2003.



MISSALL, T. A.; MORAN, J. M.; CORBETT, J. A. & LODGE, J. K. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 1, p. 202-208, 2005.

MITCHELL, T. G. & PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *American Society for Microbiology*. v. 8, n. 4. p. 515–548. Out. 1995.

MODY, C. H. & WARREN, P. W. Host defense to pulmonary mycosis. *Can J Infect Dis*. v. 10, n. 2. p. 147-155. 1999.

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*.v. 173. p. 173:321–327. 2012.

MOORE-LANDECKER, E. Fundamentals of the fungi. *Fundamentals of the fungi*., 1972.

MOORE, T. D., & EDMAN, J. C. The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Molecular and Cellular Biology*, v. 13, n. 3, p. 1962-1970, 1993.

MULLER, H. E. & SETHI, K. K. Proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans* against human plasma proteins. *Med Microbiol Immunol*. v.158. p. 129-134. 1972.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S. & PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 4393 p.

NARASIPURA, S. D., AULT, J. G., BEHR, M. J., CHATURVEDI, V., & CHATURVEDI, S. Characterization of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Molecular microbiology*, v. 47, n. 6, p. 1681-1694, 2003.

- NEILSON, J. B.; IVEY, M. H. & BULMER, G. S. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect Immun.* v. 20. n. 1. p. 262-266. 1978.
- NOSANCHUK, J. D. & CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide melanin and monoclonal antibody binding. *Infect. Immun.* v. 65. p. 1836–1841. 1997.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A. & COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases.* v. 52, n. 5, p. 561-670. Jul. 2010. DOI: 10.1086/655683
- ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J. & HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO Journal,* v. 16, n. 10, p. 2576-2589, 1997.
- OKABAYASHI, K.; HASEGAWA, A. & WATANABE, T. Capsule associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* v. 163. p. 1-8. 2007.
- OKACHI, S.; WAKAHARA, K.; KATO, D.; UMEYAMA, T.; YAGI, T. & HASEGAWA, Y. Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient. *Respirology Case Reports.* v. 3. n. 3. p. 95–98. 2015.
- OLIVEIRA, J. C. Tópicos em Micologia Médica. 4ª ed. Rio de Janeiro. 2014. 230 p.
- OLIVEIRA, R. A.; ATOBE, J. H.; SOUZA, S. A. & SANTOS, D. W. C. L. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome at a Reference Hospital for Infectious Diseases in Brazil. *Springer.* 2014. DOI 10.1007/s11046-014-9755-3
- OLSZEWSKI, M. A., NOVERR, M. C., CHEN, G. H., TOEWS, G. B., COX, G. M., PERFECT, J. R., & HUFFNAGLE, G. B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American journal of pathology,* v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.

O'MEARA, T. R. & ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 25, n. 3. p. 387–408. 2012.

OSTERHOLZER, J. J., SURANA, R., MILAM, J. E., MONTANO, G. T., CHEN, G. H., SONSTEIN, J., ... & OLSZEWSKI, M. A. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *The American journal of pathology*, v. 174, n. 3, p. 932-943, 2009.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.45, n.6, p.299-305, 2003.

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. v. 23, n. 4. p. 525-530. 2009.

PARKS, L. W., SMITH, S. J., & CROWLEY, J. H. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast—a review. *Lipids*, v. 30, n. 3, p. 227-230, 1995.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Guidelines for Management of Cryptococcosis*. v. 50. p. 291-322. 2010.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY JR, F. L.; MOWAT, E.; RAMAGE G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96-well plate based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols*. v.3, n.9, p. 1494-1500. Aug. 2008. doi:10.1038/nprot.2008.141

POLACHEK, I. The Discovery of Melanin Production in *Cryptococcus neoformans* and its Impact on Diagnosis and the Study of Virulence. *Zbl. Bakt.* v. 276. p. 120-123.1991.

PREITSCHOPF, W.; LÜCKL, H.; SUMMERS, E.; HENRY, S. A.; PALTAUF, F.; & KOHLWEIN, S. D. Molecular cloning of the yeast OPI3 gene as a high copy number suppressor of the cho2 mutation. *Current genetics*, v. 23, n. 2, p. 95-101, 1993.

PYRGOS, V.; SEITZ, A. E.; STEINER, C. A.; PREVOTS, D. R. & WILLIAMSON, P. R. Epidemiology of Cryptococcal Meningitis in the US: 1997–2009. *PLoS ONE*. v. 8, n.2. p. 562-569. 2013.doi:10.1371/journal.pone.0056269

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S. & TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes and Infection*. p.293-301. 1999.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*. v. 7. p. 58–67. 2008.

RONCERO, C., & DURAN, A. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *Journal of bacteriology*, v. 163, n. 3, p. 1180-1185, 1985.

RYAN, K. J. & RAY, C. G. *Sherris: Microbiología Médica*. 5ª ed. México: McGraw-Hill, 2010. 793 p.

SAAG, M. S.; GRAYBILL, R. J.; LARSEN, R. A.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; POWDERLY, W. G.; SOBEL, J. D.; DISMUKES, W. E. Practice guidelines for the management of cryptococcal meningitis. *Clinical of Infectious Diseases* v. 30, n. 7. p.710-718. 2000.

SABIITI, W.; ROBERTSON, E.; BEALE, M. A.; JOHNSTON, S. A.; BROUWER, A. E.; LOYSE, A.; JARVIS, J. N.; GILBERT, A. S.; FISHER, M. C.; HARRISON, T. S.; MAY, R. C. & BICANIC, T. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 124, n. 5, p. 2000-2008. May. 2014. <http://www.jci.org>

SALAS, S. D.; BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J. ; PERFECT, J. R. & WILLIAMSON, E. R. Effect of the Laccase Gene, CNLAC1, on Virulence of

*Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Experimental Medicine*. v. 184. p. 377-386. 1996.

SALAS-SANTIAGO, B., & LOPES, J. M. *Saccharomyces cerevisiae* Essential Genes with an Opi- Phenotype. *G3: Genes| Genomes| Genetics*, v. 4, n. 4, p. 761-767, 2014.

SANTANGELO, R., ZOELLNER, H., SORRELL, T., WILSON, C., DONALD, C., DJORDJEVIC, J., ... & WRIGHT, L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infection and immunity*, v. 72, n. 4, p. 2229-2239, 2004.

SCHUCK, S., PRINZ, W. A., THORN, K. S., VOSS, C., & WALTER, P. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *The Journal of cell biology*, v. 187, n. 4, p. 525-536, 2009.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3 – Critococosepulmonar. *J. Bras. Pneumol*. v. 35. n. 11. p. 1136-1144. 2009.

SHEARER, C. A., DESCALS, E., KOHLMAYER, B., KOHLMAYER, J., MARVANOVÁ, L., PADGETT, D., ... & VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, v. 16, n. 1, p. 49-67, 2007.

SHI, M., LI, S. S., ZHENG, C., JONES, G. J., KIM, K. S., ZHOU, H., ... & MODY, C. H. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *The Journal of clinical investigation*, v. 120, n. 5, p. 1683, 2010.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; PONCE-DE-LEÓN., L. A. & CORZO-LEÓN, D. E. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *CurrFungalInfect Rep*. v. 6. p. 23–34. 2012. DOI 10.1007/s12281-011-0081-7

SILVA, D. M. C; DAYANE C.S.S.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; OSHIDA, J. T. U.; OLIVEIRA, L.; CARVALLHO, A. F. & MELHEM, M. S. C. . A new culture medium for recovering the agents of Cryptococcosis from environmental sources. *Braz. J. Microbiol., São Paulo* , v. 46, n. 2, p. 355-358, Jun. 2015 .

SLOAN, D. J. & PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clinical Epidemiology*. v. 6. p. 169-182. Mai. 2014.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology*. v. 39, p. 155–168. Fev. 2001.

SPEED, B. & DUNT, D. Clinical and Host Differences Between Infections with the Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Infectious Diseases*. v. 21. p.28-34. 1995.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; & DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*. v. 31. p. 47–60. Jan. 2014. DOI: 10.1002/yea.2997.

STEINBACH, W. J.; REEDY, J. L.; CRAMER, R. A.; PERFECT, J. R. & HEITMAN, J. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 6, p. 418-430, 2007.

SUBRAMANIAN, S. & MATHAI, D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. *J Postgrad Med*. v. 51, n. 5. p. 21-26. 2005.

TAYLOR, J. W., JACOBSON, D. J., & FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual review of phytopathology*, v. 37, n. 1, p. 197-246, 1999.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718 p.

TSUJI, O. V.; BARBABOSA, I. M. & RIVERA, T. C. Criptococosis. Historia natural y estado actual del tratamiento. *Acta Pediátrica de México*. v. 26, n. 1. 2005.

URÁN, M. E., & CANO, L. E. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*, v. 2, p. 2, 2008.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M.; HUNDEIKER, M. & BONIFAZ, A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis,

trichosporonosis and geotrichosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* v.11, n.5. p. 381-393. 2013. doi: 10.1111/ddg.12097.

VOELZ, K., & MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryotic cell*, v. 9, n. 6, p. 835-846, 2010.

VU, K., THAM, R., UHRIG, J. P., THOMPSON, G. R., NA POMBEJRA, S., JAMKLANG, M., ... GELLI, A. Invasion of the Central Nervous System by *Cryptococcus neoformans* Requires a Secreted Fungal Metalloprotease. *mBio*, v. 5, n. 3, p. 1101–14. 2014. <http://doi.org/10.1128/mBio.01101-14>

WARKENTIEN, T. & CRUM-CIANFLONE, N. F. An Update on Cryptococcosis Among HIV-Infected Persons. *Int J STD AIDS.* v. 21, n. 10. p. 679-689. 2010. doi:10.1258/ijsa.2010.010182

WILLIAMSON, P.R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*, *Front. Biosci.* v.2. p. 99–107. 1997.

WONG, B. *et al.* Production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis. *Infection and immunity*, v. 58, n. 6, p. 1664-1670, 1990.

WOZNIAK, K. L., VYAS, J. M., & LEVITZ, S. M. In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. *Infection and immunity*, v. 74, n. 7, p. 3817-3824, 2006.

YU, J. H., & KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 43, p. 437-458, 2005.

ZARAGOZA, O; FRIES, B. C. & CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO<sub>2</sub>. *Infect. Immun.* v. 71. p. 6155–6164. 2003.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E. & CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, v. 68, p. 133–216. 2009. [http://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01204-0](http://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01204-0)

ZHAI, B., ZHU, P., FOYLE, D., UPADHYAY, S., IDNURM, A., & LIN, X. Congenic Strains of the Filamentous Form of *Cryptococcus neoformans* for Studies of Fungal Morphogenesis and Virulence. *Infection and Immunity*, v.81, n. 7. p.2626–2637. 2013. <http://doi.org/10.1128/IAI.00259-13>