



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Avaliação dos efeitos do meio condicionado de
Cryptococcus neoformans na resposta a agentes
indutores de estresse oxidativo**

João Mateus Vieira Dutra

Orientadora: Prof. Dra Patrícia Albuquerque de Andrade

Brasília

2020

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

**Avaliação dos efeitos do meio condicionado de *Cryptococcus neoformans* na
resposta a agentes indutores de estresse oxidativo**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Microbiana do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade de
Brasília como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Microbiana.**

Aluno: João Mateus Vieira Dutra
Orientadora: Prof. Dra Patrícia Albuquerque de Andrade

Brasília
2020

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo apoio constante no meu trabalho e durante a minha vida. Agradeço por eles estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas e em todos os desafios. Obrigado por terem compreendido minha ausência enquanto eu me dedicava a realização deste trabalho. Agradeço a minha mãe, Maria Celeste, por sempre ter colocado a educação dos filhos em primeiro lugar. Ao meu irmão, Vitor Fubu, pelo companheirismo, cooperação e risadas. E agradeço de forma especial ao meu pai, João Carlito, por ter empurrado montanhas para conseguir dar aos filhos o melhor possível. Seus ensinamentos e valores não serão esquecidos, e levarei sempre comigo as lembranças, músicas e sorrisos.

À minha orientadora, professora Patrícia Albuquerque, primeiramente por ter me dado a oportunidade de trabalhar sob sua orientação, e também por toda a confiança e liberdade durante o desenvolvimento desse projeto. Agradeço imensamente as orientações, aos conhecimentos transmitidos, a atenção me dada, a paciência em ler o mesmo texto várias vezes, e as críticas competentes e inteligentes que enriqueceram essa dissertação. Obrigado pelo profissionalismo e por ser uma inspiração na área acadêmica.

Aos professores André, Hugo e Ildinete, pelas valiosas ajudas em diversos momentos. Agradeço a eles também por todo o trabalho e esforço para o crescimento acadêmico da instituição e em prol da área acadêmica no Brasil.

A todos os companheiros do Lab 3 que estiveram presentes durante esse tempo. Agradeço ao Jhones, Stefânia, Fabián, Jéssica, Phil, Lara, Larissa, Hugo e outros. Obrigado pela colaboração, pela amizade, pelo companheirismo e por rirem das minhas piadas ruins. Agradeço especialmente a Fernanda por ter cedido muito do tempo e conhecimento dela para me acompanhar e auxiliar nos meus primeiros passos no mestrado.

Aos podcasters do MBMBAM, Xorume, PnN, Foro de Teresina e outros cujo o trabalho me fez companhia nas madrugadas e tornou menos solitário os momentos em que estive sozinho no laboratório.

Aos professores que compuseram a banca pelas recomendações e reflexões que muito ajudaram para o aperfeiçoamento dessa dissertação.

Aos amigos da Octogonal 7. Obrigado pelo carinho, pelo convívio, pela amizade, e por termos compartilhados momentos incríveis juntos. Agradeço também ao Bernardo e ao Guilherme pela longuíssima amizade que temos, por serem pessoas espetaculares, e por torcerem por mim, vivenciando e vibrando comigo a cada conquista.

A todos os amigos e amigas que acreditam em mim. Agradeço a todos aqueles que cederam um pouquinho do ombro para me ajudar, que me deram um pouquinho do tempo deles, que tiveram bons momentos comigo, que me fizeram rir em um dia qualquer, que trocaram boas energias e que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A Deus.

RESUMO

Cryptococcus neoformans são leveduras encapsuladas causadoras da criptococose. Esta é uma doença que afeta principalmente pacientes imunodeprimidos, e é considerada uma das principais infecções fúngicas associadas à AIDS. Essas leveduras habitam normalmente solo e árvores, mas eventualmente podem infectar animais e os seres humanos. Tanto no seu ambiente natural quanto na sua interação com hospedeiros, as células fúngicas devem lidar com uma variedade de fatores externos potencialmente tóxicos durante o curso de sua proliferação. Na interação das células fúngicas com as células do sistema imune do hospedeiro, os altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelas células do hospedeiro em um processo conhecido como explosão oxidativa (do inglês, *oxidative burst*) representam um enorme desafio externo para a sobrevivência do fungo. Um fator fundamental na resposta do fungo a esse estresse oxidativo imposto pelas células do hospedeiro, é a necessidade de uma rápida adaptação e sinalização para se defender dessa elevação potencialmente letal na concentração de EROs. Como o aumento do estresse oxidativo pode ocorrer rapidamente, como ilustrado pela explosão oxidativa, as vias de resposta do fungo devem ser similarmente rápidas. Estudos indicam que fenótipos associados à resistência microbiana ao estresse oxidativo podem ser regulados pelo sensoriamento de quórum (QS), um mecanismo de comunicação microbiana dependente da densidade celular que é mediado pela secreção de pequenas moléculas durante o crescimento microbiano. Em um estudo prévio do nosso grupo, demonstramos que moléculas de sensoriamento de quórum (QSMs) de *Cryptococcus neoformans* participam na regulação da síntese de melanina e da secreção do polissacarídeo da cápsula desse fungo, dois importantes mecanismos de defesa ao estresse oxidativo. Esses resultados sugerem uma possível relação entre esse mecanismo de regulação gênica e o aumento coordenado na defesa do fungo ao estresse oxidativo. Dessa maneira, esse trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade dessas moléculas secretadas por *C. neoformans* em alterar a resposta desse fungo a diferentes fontes de estresse oxidativo. Para isso produzimos meio condicionado (CM) proveniente do sobrenadante de culturas de *C. neoformans* (H99) crescidas em meio mínimo, este meio condicionado é potencialmente rico em QSMs. Observamos que culturas com uma maior densidade celular apresentaram maior capacidade de suportar o estresse oxidativo de diferentes agentes. Semelhantemente, quando culturas de *C. neoformans* iniciadas em densidades celulares mais baixas foram

colocadas para interagir com CM (proveniente de culturas em alta densidade celular) antes de serem desafiadas com concentrações letais de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi observado um aumento significativo na capacidade do fungo em sobreviver a esse agente estressor. Futuramente iremos avaliar quais moléculas presentes no CM podem ser responsáveis e quais mecanismos moleculares potencialmente relacionados ao aumento da resistência de *C. neoformans* ao estresse oxidativo na presença de CM. Acreditamos que tal conhecimento irá ajudar a entender melhor os mecanismos de regulação da resistência a agentes oxidantes pelo *C. neoformans*, e como esses mecanismos regulatórios contribuem para a persistência e virulência na interação do patógeno com seus hospedeiros humanos. Sendo esse um importante conhecimento para o desenvolvimento de estratégias de combate contra a sobrevivência desse patógeno.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans are encapsulated yeasts that cause cryptococcosis. This disease affects mainly immunocompromised patients and is considered one of the major fungal diseases AIDS-related. These yeasts are naturally found inhabiting soil and trees, but it can eventually infect animals and humans. Either in their natural environment or within humans, these fungal cells must deal with a variety of potentially toxic external factors during their proliferation. When interacting with the host's immune system cells, the high levels of reactive oxygen species (ROS), produced by host cells in a process known as oxidative burst, represent an enormous external challenge for the fungi structure. A key factor of the fungus' response to the oxidative stress imposed by the host cells is a rapid adaptation and signaling to defend against this potentially lethal ROS concentration. As the level of ROS increases very quickly, as illustrated by the oxidative burst, the response pathways of the fungus must be similarly rapid. Studies indicate that phenotypes associated with microbial resistance to oxidative stress might be regulated by quorum sensing (QS). QS is a microbial communication mechanism dependent on cell density that is mediated by the secretion of small molecules during microbial growth. In a previous study by our group, it was demonstrated that quorum sensing molecules (QSMs) from *Cryptococcus neoformans* participate in the regulation of melanin synthesis and polysaccharide secretion in the capsule of this fungi, two important defense mechanisms to oxidative stress. These results suggest a possible relationship between the QS mechanism of gene regulation and the coordinated increased resistance of the fungus against oxidative stress. Thus, this work aims to evaluate the ability of these molecules secreted by *C. neoformans* to influence the response of this fungus to different sources of oxidative stress. For this, we produced a conditioned medium (CM) from the supernatant of cultures of *C. neoformans* (H99) grown in minimal medium (MM), which is potentially rich in QSMs. We observed that cultures with a higher cell density showed a greater capacity to resist oxidative stress from different sources. Similarly, when *C. neoformans* cultures at lower cell densities were interacted with CM (from cultures at higher cell densities) before being challenged with lethal concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂), it resulted in a significant increase in the ability of the fungus to survive the oxidative stress. In the future, we will evaluate which molecules present in the CM may be responsible and which molecular mechanisms potentially related to the increase in the resistance of *C.*

neoformans to oxidative stress in the presence of CM. We believe that such knowledge will help improve the understanding behind the mechanisms of regulation of resistance to oxidizing agents by *C. neoformans*, and how these regulatory mechanisms contribute to the persistence and virulence of this fungal pathogen within its human hosts. It is a piece of important knowledge for the development of strategies against this human pathogen.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

CM – Meio condicionado

GXMgal – Galactoxilomanana

GXM – Glucuronoxilomanana

h – Hora

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

M – Molar

min - minutos

mL – Mililitro

mm - Milimêtro

mM – Milimolar

MM – Meio mínimo

nm - nanômetros

PBS – Tampão de fosfato

pH – Potencial hidrogeniônico

p/v – peso/volume

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

rpm – Rotações por minuto

SDA – Ágar Sabouraud dextrose

SNC – Sistema nervoso central

UFC – Unidades formadoras de colônias

V – Volume

µg – micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

µm – Micrômetros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do mecanismo de sensoriamento de quórum.....	16
Figura 2. Alguns tipos de moléculas sinalizadoras de sensoriamento de quórum em fungos.....	18
Figura 3. Ilustração da via <i>quorum sensing</i> Qsp1 em <i>Cryptococcus neoformans</i>	30
Figura 4. Diagrama da classificação das principais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.	32
Figura 5. Representação esquemática e ilustrativa da geração das espécies reativas no fagolisossomo, implicando na explosão oxidativa (<i>oxidative burst</i>).	34
Figura 6. Ilustração esquemática das etapas de produção e purificação do meio condicionado.	40
Figura 7. Suscetibilidade a peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	45
Figura 8. Diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	47
Figura 9. Culturas de <i>C. neoformans</i> tratadas com meio condicionado (CM), e posteriormente desafiadas com concentrações diferentes de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	48
Figura 10. Culturas de <i>C. neoformans</i> tratadas com meio condicionado (CM) diluído e desafiadas com Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	50
Figura 11. Culturas de <i>C. neoformans</i> tratadas com altas concentrações de meio condicionado (CM) e desafiadas com Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	50
Figura 12. Culturas de <i>C. neoformans</i> tratadas com meio condicionado (CM) e desafiadas com concentrações diferentes de Menadiona.	51
Figura 13. Meio condicionado de <i>C. neoformans</i> esterilizado ou acidificado não perde atividade protetora.....	53

Figura 14. Culturas de <i>C. neoformans</i> pré-tratadas com meio condicionado (CM) ou MM suplementado com Ácido Pantotênico (2 mM ou 4 mM) e desafiadas com concentrações de H ₂ O ₂	54
Figura 15. Culturas de <i>C. neoformans</i> tratadas com meio condicionado recém produzido tem maior eficiência contra H ₂ O ₂	56
Figura 16. Ensaio de crescimento com diluição seriada em SDA contendo 2 mM H ₂ O ₂ demonstrou uma diferença significativa na resistência de células tratadas com CM.	57
Figura 17. Ensaio de disco de difusão contendo H ₂ O ₂ (2% ou 0,5 M) mostrou que células H99 em meio sabourad sólido não possuem diferenças no diâmetro das zonas de inibição.....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>QUORUM SENSING</i>	15
1.2 SENSORIAMENTO DE QUÓRUM EM FUNGOS.....	16
1.3 <i>CRYPTOCOCCUS spp.</i>	18
1.3.1 ECOLOGIA	19
1.3.2 EPIDEMIOLOGIA	20
1.3.3 CRIPTOCOCOSE.....	21
1.4 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO.....	23
1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA	25
1.5.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA	25
1.5.2 TERMOTOLERÂNCIA A 37°C	27
1.5.3 SÍNTESE DE MELANINA	27
1.6 MOLÉCULAS <i>QUORUM SENSING</i> E <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	28
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO	30
1.8 ESTRESSE OXIDATIVO E <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	32
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 LINHAGEM CELULAR.....	38
3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	38
3.3 PREPARO DO MEIO CONDICIONADO DE <i>C. NEOFORMANS</i>	39
3.4 CURVA DE CRESCIMENTO	40
3.5 ENSAIO DE INTERAÇÃO COM MEIO CONDICIONADO.....	40
3.6 ENSAIO DE SENSIBILIDADE AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	41
3.7 DILUIÇÃO DO MEIO CONDICIONADO NO PRÉ-TRATAMENTO	41
3.8 ENSAIO DE SUSCETIBILIDADE A AGENTES GERADORES DE ÂNIONS SUPERÓXIDOS	41

3.9 PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO PANTOTÊNICO	42
3.10 CARACTERIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MEIO CONDICIONADO NA SUSCETIBILIDADE AO H ₂ O ₂	42
3.11 ENSAIO DE CRESCIMENTO POR DILUIÇÃO SERIADA	43
3.12 ENSAIO COM DISCOS DE DIFUSÃO	43
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 SENSIBILIDADE AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO DEPENDE DA FASE DE CRESCIMENTO	44
4.2 MEIO CONDICIONADO PROTEGE CÉLULAS EM FASE EXPONENCIAL DA AÇÃO LETAL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	47
4.3 AÇÃO PROTETORA DO MEIO CONDICIONADO CONTRA AGENTES GERADORES DE ÂNIONS SUPERÓXIDOS	51
4.4 TRATAMENTO DO MEIO CONDICIONADO COM CALOR OU MUDANÇAS NO PH NÃO ALTERA A AÇÃO PROTETORA CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO.....	52
4.5 ÁCIDO PANTOTÊNICO TEM AÇÃO PARCIALMENTE PROTETORA PARA A TOXICIDADE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	53
4.6 MEIO CONDICIONADO FRESCO CONFERE MAIOR RESISTÊNCIA AO ESTRESSOR OXIDATIVO.....	54
4.7 EFEITOS DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO CRESCIMENTO DAS CÉLULAS TRATADAS COM MEIO CONDICIONADO.....	57
5. PERSPECTIVAS	60
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

O Sensoriamento de Quórum ou QS (do inglês, *Quorum Sensing*) é um sistema de sinalização densidade-dependente usado por células microbianas para regular e coordenar a expressão de genes selecionados em uma população microbiana. Esse mecanismo de comunicação microbiana é mediado por moléculas sinalizadoras extracelulares chamadas autoindutores ou moléculas *quorum sensing* (QSMs – do inglês, *Quorum Sensing Molecules*) (ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.*, 2013). O acúmulo extracelular desses compostos autoestimulatórios de baixo peso molecular acontece continuamente durante o crescimento celular, porém, somente quando sua concentração atinge um nível estimulatório detectável, pelo aparato celular de recepção de sinal, é que a via metabólica do sensoriamento de quórum será ativada. Essa ativação dá início a um processo regulatório de genes de forma coordenada por toda a população microbiana (BASSLER, 1999; DE KIEVIT; IGLEWSKI, 2000). Esse mecanismo de sinalização densidade-dependente permite que células individuais se comportem como organismos multicelulares regulando diversos traços ecológicos importantes para o microrganismo, como bioluminescência, formação de biofilmes, expressão de fatores de virulência e esporulação (PADDER; PRASAD; SHAH, 2018).

Pesquisas com sensoriamento de quórum tiveram início com o estudo da expressão de bioluminescência na bactéria simbiótica marinha *Vibrio fischeri*, a qual produz e responde à moléculas sinalizadoras da classe acil-homoserina lactonas (AHL), que acumula no ambiente externo em razão do crescimento celular (BASSLER, 1999). ENGEBRECHT; NEALSON e SILVERMAN (1983) foram pioneiros na área, por identificar, clonar e analisar genes que codificam o complexo enzimático luciferase e os genes responsáveis pela regulação densidade-dependente do *V. fischeri*. A bioluminescência controlada pelo complexo LuxI/LuxR quando ligado ao autoindutor, promove a transcrição da estrutura operon luciferase (BASSLER, 1999). Essas foram as primeiras observações de como a expressão gênica pode ser acoplada a densidade da população.

1.1 QUORUM SENSING

O sensoriamento de quórum é um mecanismo bem conhecido de comunicação célula-a-célula para bactérias, onde essas fazem a comunicação mediada por moléculas sinalizadoras chamadas autoindutores, que irão contribuir para a regulação da expressão gênica (WONGSUK; PUMEEASAT; LUPLERTLOP, 2016).

Inicialmente, o sistema de sensoriamento de quórum foi considerado ser um mecanismo especializado de *V. fischeri*, onde LuxI/LuxR mediam o controle densidade-dependente da expressão do gene Lux (PADDER; PRASAD; SHAH, 2018). Porém, com o passar dos anos, outros sistemas homólogos a esse foram revelados (PADDER; PRASAD; SHAH, 2018). Por exemplo, traI/R (homólogos de luxI/R) controlam a transferência conjugal de plasmídeo entre bactérias de *Agrobacterium tumefaciens* (PADDER; PRASAD; SHAH, 2018). Similarmente, em *Pseudomonas aeruginosa*, a expressão de diversos fatores virulentos é controlada por um circuito de dois componentes (Las e Rhl) agindo em paralelo (PADDER; PRASAD; SHAH, 2018).

Considerando que a extensão da atuação da regulação por sensoriamento de quórum controla diversos processos importantes em diferentes bactérias, não surpreende que essa regulação mediada pela densidade celular também ocorra em diversas espécies de fungos (HOGAN, 2006). Estudos revelaram que em fungos, assim como em bactérias, existe também o uso da regulação por sensoriamento de quórum para influenciar comportamentos em nível populacional, como a patogenicidade/virulência e formação de biofilme (HOGAN, 2006). Similar ao sistema bacteriano, nos fungos o sensoriamento de quórum é mediado por pequenas moléculas sinalizadoras difusas que se concentram no ambiente extracelular. Uma vez que uma concentração suficiente de moléculas sinalizadoras é alcançada, ocorre o disparo de uma resposta regulatória em uma população local, resultando em uma expressão gênica sincronizada (HOGAN, 2006).

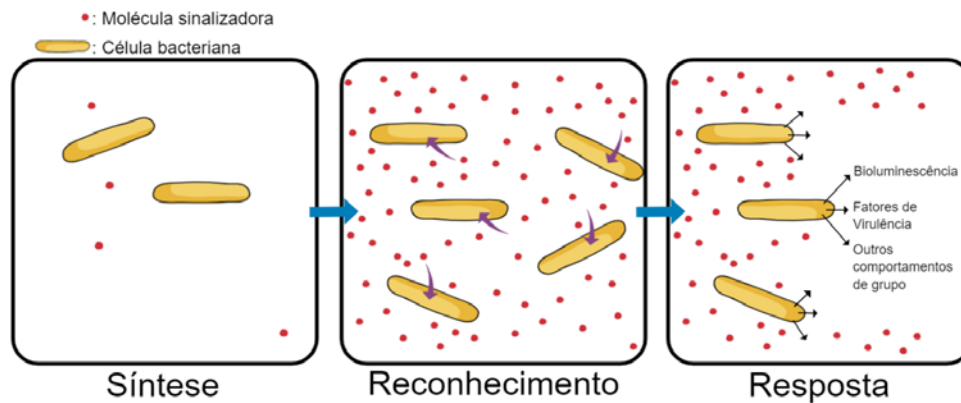


Figura 1. Ilustração do mecanismo de sensoramento de quórum. Durante o crescimento celular as moléculas sinalizadoras são produzidas continuamente, e essas são acumuladas no ambiente extracelular de maneira proporcional ao número de células daquela população microbiana. O reconhecimento desse sinal ativa a via metabólica de sensoramento de quórum, que dispara um processo regulatório na expressão de genes relacionados a aspectos celulares de comportamento de grupo. Esse mecanismo utiliza um sistema *feedback* pois o reconhecimento do autoindutor induz a produção e secreção de autoindutores adicionais no ambiente extracelular. Através desse reconhecimento coordenado, a população bacteriana inteira pode responder sincronizadamente ao estímulo externo. Figura elaborada pelo autor, e criada na plataforma Mind the Graph www.mindthegraph.com.

1.2 SENSORIAMENTO DE QUÓRUM EM FUNGOS

Em organismos eucarióticos, QS era desconhecido até HORNBY; JENSEN; LISEC; TASTO *et al.* (2001) descreverem a molécula farnesol, que atua como uma QSM no fungo patogênico *Candida albicans*. Acredita-se que esse trabalho foi a primeira identificação estrutural de um sistema de sensoramento de quórum em fungos e o primeiro trabalho a identificar a produção de farnesol em *Candida albicans*. Esse fungo possui a capacidade de transitar entre crescer como uma levedura com brotamentos ou crescer em uma forma filamentosa, e essa habilidade aparenta ser essencial para o estabelecimento da doença (SAVILLE; LAZZELL; MONTEAGUDO; LOPEZ-RIBOT, 2003). Era sabido que em densidades celulares menores que 10^6 células/mL, culturas de *C. albicans* se desenvolvem em formas filamentosas, enquanto que em densidades celulares maiores do fungo, as culturas crescem como leveduras (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012). O polimorfismo entre leveduras, hifas e pseudohifas é crítico para a virulência de *C. albicans* e corresponde a uma resposta adaptativa as mudanças no ambiente (SAVILLE; LAZZELL; MONTEAGUDO; LOPEZ-RIBOT, 2003). O grupo HORNBY; JENSEN; LISEC; TASTO *et al.* (2001)

descobriu que esse comportamento era controlado por uma QSM, a qual foi identificada como sendo o isoprenóide farnesol. Após a sua descoberta, foi demonstrado que farnesol apresenta múltiplos papéis na fisiologia de *C. albicans* como uma molécula sinalizadora e como indutor de efeitos deletérios nas células do hospedeiro e em outros microrganismos (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012). O farnesol tem capacidade de induzir a apoptose de fungos e modular células imunes do hospedeiro (SEMIGHINI; HORNBY; DUMITRU; NICKERSON *et al.*, 2006; WONGSUK; PUMEESSAT; LUPLERTLOP, 2016).

É importante citar que a filamentação de *C. albicans* pode ser suprimida ou pela alta densidade celular, ou por adição de sobrenadantes de culturas de *C. albicans* em fase estacionária (SAVILLE; LAZZELL; MONTEAGUDO; LOPEZ-RIBOT, 2003).

Em adição ao farnesol, o álcool aromático tirosol também foi relatado ser uma molécula *quorum sensing* de *C. albicans*, controlando crescimento, morfogênese e a formação de biofilme (CHEN; FUJITA; FENG; CLARDY *et al.*, 2004). Essas duas moléculas mostraram ter participação na regulação de processos fundamentais, como a morfologia celular, crescimento, formação de biofilme, resistência ao estresse oxidativo, e interação entre *C. albicans* e outros organismos (ALEM; OTEEF; FLOWERS; DOUGLAS, 2006; CHEN; FUJITA; FENG; CLARDY *et al.*, 2004; HORNBY; JENSEN; LISEC; TASTO *et al.*, 2001; WESTWATER; BALISH; SCHOFIELD, 2005).

Posteriormente, CHEN e FINK (2006) descreveram dois álcoois aromáticos em *Saccharomyces cerevisiae*, feniletanol e triptofol. Essas duas moléculas atuam como QSMs capazes de estimular a transição no desenvolvimento de levedura para sua forma filamentosa. Esses dois álcoois foram descritos como moléculas autossinalizadoras fúngicas que, assim como moléculas *quorum sensing* de bactérias, monitoram as condições do ambiente e regulam diversos comportamentos celulares de acordo com as condições presentes (CHEN; FINK, 2006). Mecanismos similares ao *quorum sensing* foram descritos em *Histoplasma capsulatum* (KÜGLER; SEBGHATI; EISSENBERG; GOLDMAN, 2000), em *Ceratocystis ulmi* (HORNBY; JACOBITZ-KIZZIER; MCNEEL; JENSEN *et al.*, 2004), e em *Neurospora crassa* (ROCA; ARLT; JEFFREE; READ, 2005).

ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.* (2013) demonstraram que meio mínimo suplementado com o sobrenadante proveniente de culturas em fase estacionária de *C. neoformans* era capaz de regular: o crescimento celular de culturas desse fungo; a produção de biofilme; a síntese de melanina; e a secreção do principal polissacarídeo capsular, glucuronoxilomanana (GXM). Essa regulação influenciada pelo meio condicionado demonstrou ser dose-dependente: quanto maior a concentração de CM presente no meio mínimo, menor o tempo para atingir uma maior quantidade de células. Adicionalmente, células fúngicas de *S.cerevisiae* e *C. albicans* crescidas em meio suplementado com CM de *C. neoformans* também apresentaram estimulação no crescimento celular de forma dose-dependente (ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.*, 2013).

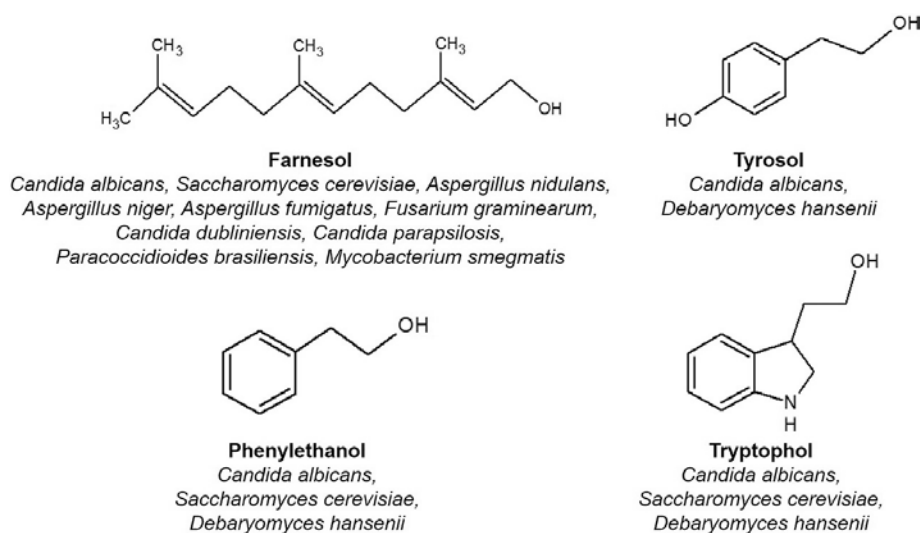


Figura 2. Alguns tipos de moléculas sinalizadoras de sensoriamento de quórum em fungos. Figura adaptada de KIM e YEON (2018).

1.3 *CRYPTOCOCCUS spp.*

Cryptococcus spp. são leveduras basidiomicéticas encapsuladas que vivem no meio ambiente, primariamente na forma de levedura. Esse fungo é capaz de se reproduzir assexuadamente por brotamento, ou sexuadamente com produção de basidiósporos (SORRELL, 2001). A maioria das espécies do gênero *Cryptococcus* não sobrevivem em tecidos animais, devido tanto a inabilidade de crescer em altas temperaturas quanto pela pressão imposta pelo sistema imune do hospedeiro.

C. neoformans é um patógeno intracelular facultativo, geralmente presente na forma de levedura durante as infecções. Sua forma filamentosa é raramente encontrada em tecidos infectados, sugerindo um menor potencial virulento (LIN, 2009). Esse fungo apresenta-se como leveduras globulosas, de 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamentos únicos ou múltiplos e são envolvidas por uma cápsula mucopolissacarídica (CASADEVALL; PERFECT, 1998). *C. neoformans* é capaz de causar uma amplitude de infecções indo da colonização assintomática dos tecidos pulmonares à meningoencefalite letal (ASLANYAN; SANCHEZ; VALDEBENITO; EUGENIN *et al.*, 2017).

Adicionalmente, é importante observar que leveduras do complexo *C. neoformans* geralmente causam doenças em indivíduos imunocomprometidos, enquanto que *C. gattii* são capazes de infectar indivíduos aparentemente imunocompetentes (IDNURM; REEDY; NUSSBAUM; HEITMAN, 2004).

1.3.1 ECOLOGIA

O isolado original de *C. neoformans* reportado por SANFELICE (1894) foi obtido de suco de pêssego. Entretanto, *C. neoformans* tem seu habitat principal em detritos ao redor de pombais e solos contaminados com carcaças de pombos ou dejetos de galináceos (BUCHANAN; MURPHY, 1998). É bem estabelecido que isolados de *C. neoformans* estão associados com excretas de aves, principalmente as de pombos (LIN, 2009). Excretas de aves, ricas em fontes de nitrogênio, como uréia e creatinina, oferecem condições favoráveis para o desenvolvimento desse fungo (LIN, 2009). Pombos servem como carreadores de *C. neoformans*, provavelmente contribuindo para a disseminação mundial do fungo, transportando a levedura em suas penas, patas e bico (LIN, 2009). A levedura se instala no Inglúvio (papo) de pombos e tem a capacidade de sobreviver na passagem do trato digestivo alcançando as fezes. As células de *C. neoformans* permanecem viáveis no Inglúvio de pombos por até 86 dias (SWINNE-DESGAIN, 1976), o que sugere o papel destas aves no transporte e disseminação de *C. neoformans*.

C. neoformans não pertence a microbiota normal humana, sendo encontrado em humanos somente como um isolado momentâneo. O microrganismo entra pela via respiratória na forma de leveduras desidratadas facilmente aerossolizadas

(CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006), ou como basidiósporos, podendo se espalhar para tecidos extrapulmonares após o estabelecimento nos pulmões (BUCHANAN; MURPHY, 1998). O tamanho reduzido do basidiósporo favorece sua entrada e deposição nos alvéolos pulmonares, demonstrando a eficiência do basidiósporo como agente infeccioso.

1.3.2 EPIDEMIOLOGIA

A pandemia de AIDS, o aumento do número de pacientes passando por transplantes de órgãos e tratamentos com corticoesteróides e outros agentes imunossupressores, são importantes fatores que produzem o estado de imunossupressão profunda, o qual favorece o estabelecimento de infecções fúngicas como a infecção por *C. neoformans* (CASADEVALL; PERFECT, 1998). A evolução da medicina nas últimas décadas permitiu múltiplos tratamentos que aumentaram significativamente a sobrevivência de indivíduos imunocomprometidos, aumentando também a frequência de uso de tratamentos que utilizam imunossupressores, como em transplantes de órgãos sólidos.

O aumento da população imunocomprometida acompanhou um crescimento dramático de *C. neoformans*, de um agente infeccioso raro em humanos, para um patógeno oportunista comum (PERFECT, 2005). A epidemia global do vírus HIV é um dos principais fatores que levam ao aumento do número de mortes por infecção fúngica (BROWN; DENNING; GOW; LEVITZ *et al.*, 2012). A infecção pelo vírus HIV está associada com mais de 80% dos casos mundiais de criptococose (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006). Neste cenário, a meningite criptocócica é a maior responsável pelas mortes por infecções fúngicas relacionadas ao vírus HIV (ARMSTRONG-JAMES; MEINTJES; BROWN, 2014).

Apesar da infecção afetar principalmente indivíduos imunodeficientes, evidências sugerem que a exposição e infecção de *C. neoformans* em humanos é extremamente comum (LINDELL; BALLINGER; MCDONALD; TOEWS *et al.*, 2006b), entretanto a infecção sintomática em si é relativamente rara. Ainda que comumente afete indivíduos com AIDS e pacientes recém transplantados, criptococose sintomática já foi observada em pacientes com câncer, usuários de drogas intravenosas, e indivíduos com várias condições autoimunes requerendo drogas terapêuticas

imunossupressoras (ASLANYAN; SANCHEZ; VALDEBENITO; EUGENIN *et al.*, 2017).

GOLDMAN; KHINE; ABADI; LINDENBERG *et al.* (2001) evidenciaram que a maioria dos adultos possuem anticorpos para *C. neoformans* e que, na cidade de Nova Iorque, a maioria das crianças desenvolvem anticorpos para antígenos criptocócicos antes dos dez anos de idade. Essas observações sugerem que infecções criptocócicas assintomáticas são frequentes, ocorrendo em uma idade jovem, porém a resposta imune é geralmente bem eficaz na prevenção da doença (GOLDMAN; KHINE; ABADI; LINDENBERG *et al.*, 2001).

No mundo, é estimado 223.100 casos por ano de criptococose meníngea, com 73% dos casos ocorrendo na África Subsaariana (RAJASINGHAM; SMITH; PARK; JARVIS *et al.*, 2017). Anualmente, é estimado que 181.100 casos fatais de criptococose meníngea ocorra no mundo, sendo 135.900 dessas mortes ocorrendo na África Subsaariana (RAJASINGHAM; SMITH; PARK; JARVIS *et al.*, 2017). Nessas áreas, a meningite criptocócica é a causa mais comum de infecção do sistema nervoso central, e quando não tratada tem mortalidade de 100% nas primeiras duas semanas da hospitalização (HAKIM; GANGAIDZO; HEYDERMAN; MIELKE *et al.*, 2000). No mundo, a meningite por criptococose resulta em 15% da mortalidade relacionada a AIDS (RAJASINGHAM; SMITH; PARK; JARVIS *et al.*, 2017).

1.3.3 CRIPTOCOCOSE

A criptococose abrange duas formas distintas do ponto de vista clínico: a criptococose oportunista associada as condições de imunodepressão celular, causada predominantemente por *C. neoformans*; e a criptococose primária de hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, causada predominantemente por *C. gattii* (MORETTI; RESENDE; LAZÉRA; COLOMBO *et al.*, 2008). Ambas podem provocar meningoencefalite, de evolução grave e fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente (MORETTI; RESENDE; LAZÉRA; COLOMBO *et al.*, 2008).

Após a entrada do fungo no hospedeiro suscetível, o microrganismo pode produzir infecção latente ou a doença aguda. A infecção criptocócica latente passa por

um período inicial assintomático (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006), enquanto que a infecção aguda se define por uma manifestação inicial logo após a entrada das células infecciosas no hospedeiro. A manifestação inicial da doença é controlada pelo inóculo, pelo status imune do hospedeiro, ou pela virulência da linhagem infecciosa (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

Geralmente as células fúngicas são eliminadas ou restringidas no pulmão dentro de granulomas, onde elas podem permanecer em um estado latente assintomático (LIN, 2009). Quando a imunidade do hospedeiro é comprometida ou suprimida, essas células criptocócicas dormentes podem ser reativadas, sendo capazes de se disseminar hematogênicamente causando infecções sistêmicas que podem envolver órgãos como a pele, olhos, ossos, pulmões, próstata ou trato urinário (GOLDMAN; KHINE; ABADI; LINDENBERG *et al.*, 2001; IGREJA; SANTOS LAZÉRA; WANKE; GUTIERREZ GALHARDO *et al.*, 2004; SOBEL; VAZQUEZ, 1999).

É sabido que *C. neoformans* tem uma preferência para infectar o sistema nervoso central (SNC) e causar a meningite criptocócica. A natureza do neurotropismo de *C. neoformans* é um tópico ativo de pesquisa e permanece como uma questão aberta (LIN, 2009). O tropismo para o SNC é atribuído tanto pela concentração de nutrientes no líquido cefalorraquidiano em concentrações adequadas para o fungo (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009), quanto pela ausência de ação do sistema complemento no líquido juntamente com a fraca resposta inflamatória no tecido cerebral (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009).

A criptococose do SNC pode resultar no óbito devido ao aumento da pressão intracraniana, com redução do sangue circulante no local (CRISSEY; PARISH; LANG, 1995). Os sinais e sintomas da criptococose do SNC é relativo quanto ao aumento da pressão intracraniana, se manifestando como: febre, dor de cabeça, confusão mental, vertigem, rigidez na nuca, sonolência, vômitos, paralisia dos nervos cranianos e coma. (LACAZ; PORTO; MARTINS; HEINS-VACCARI *et al.*, 2002; PERFECT; DISMUKES; DROMER; GOLDMAN *et al.*, 2010).

Embora existam algumas classes de antifúngicos, o número de compostos é limitado e o tratamento em geral é bastante prolongado, sendo que vários desses fármacos apresentam alta toxicidade e baixa eficácia (GUPTA; TOMAS, 2003). Nesse

contexto, ainda são necessários aprofundamentos científicos que busquem melhor compreender os mecanismos de sobrevivência dos fungos e a sua interação com seus hospedeiros humanos, de forma a estabelecer melhores estratégias e formas de combates contra esses patógenos (HEITMAN; MICROBIOLOGY; CASADEVALL; KOZEL *et al.*, 2011).

1.4 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

Uma variedade de fatores pode interferir no estabelecimento da infecção do *Cryptococcus spp.*, sendo a pele e a mucosa barreiras físicas importantes para contenção do microrganismo. Quando a célula fúngica atravessa as barreiras físicas do epitélio respiratório, esta alcança o alvéolo pulmonar onde será processada por células fagocíticas alveolares (VOELZ; MAY, 2010). Os fagócitos desencadearão uma resposta imunológica recrutando outras células inflamatórias por meio de citocinas e quimiocinas. O desenvolvimento da infecção irá depender da carga fúngica infecciosa, bem como a condição do sistema imune do hospedeiro (VOELZ; MAY, 2010).

Esse microrganismo tem a habilidade de se disseminar para o sistema nervoso central como uma célula individual ou dentro de um fagossomo de macrófago (ASLANYAN; SANCHEZ; VALDEBENITO; EUGENIN *et al.*, 2017). Essa forma de virulência é garantida pela habilidade do *C. neoformans* de sobreviver dentro do ambiente altamente ácido do fagossomo, proliferar-se dentro do macrófago, e se disseminar para sítios extrapulmonares (LINDELL; BALLINGER; MCDONALD; TOEWS *et al.*, 2006a). Chretien *et al* (2002) observaram pela primeira vez *in vivo* que *C. neoformans* pode circular em monócitos sanguíneos e que leveduras podem ser encontradas dentro de células endoteliais durante infecção de murinos. Potenciais reservatórios celulares incluem células endoteliais, monócitos, macrófagos e micróglia (CHRETIEN; LORTHOLARY; KANSAU; NEUVILLE *et al.*, 2002; FELDMESSER; KRESS; NOVIKOFF; CASADEVALL, 2000; FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001; LEE; KRESS; ZHAO; DICKSON *et al.*, 1995).

Geralmente, patógenos intracelulares podem sobreviver ou modular o ambiente ácido hostil encontrado no fagolisossomo. No caso do *C. neoformans*, estudos *in vivo* (FELDMESSER; KRESS; NOVIKOFF; CASADEVALL, 2000) confirmaram a observação feita por DIAMOND e BENNETT (1973) os quais sugeriram que *C.*

neoformans era capaz de sobreviver dentro de células fagocíticas. FELDMESSER; KRESS; NOVIKOFF e CASADEVALL (2000) reportaram também que leveduras *C. neoformans* encontrados dentro de macrófagos humanos se replicavam mais rápido do que as leveduras extracelulares. Curiosamente, quando o pH do fagolisossomo é artificialmente aumentado, há uma redução na proliferação intracelular da levedura, o que sugere que *C. neoformans* se multiplica preferencialmente em pH ácido (LEVITZ; NONG; SEETOO; HARRISON *et al.*, 1999).

TUCKER e CASADEVALL (2002) mostraram que *C. neoformans* é capaz de se reproduzir dentro de macrófagos em um processo que é associado com a formação de fagossomos com rompimentos e o acúmulo de vesículas citoplasmáticas contendo o polissacarídeo capsular do fungo. Esses dados sugerem a idéia de que mesmo que a formação do fagolisossomo ocorra, *C. neoformans* tem a capacidade de prejudicar sua completa funcionalidade (GARCIA-RODAS; CASADEVALL; RODRIGUEZ-TUDELA; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2011), indicando que *C. neoformans* subverte as ações fungicidas dos macrófagos através de um mecanismo único de patogênese intracelular (TUCKER; CASADEVALL, 2002).

C. neoformans tem a capacidade de continuar se replicando dentro da célula hospedeira ou sair. Essa saída pode ser tanto por um processo de lise letal para a célula fagocitária, quanto por um processo não-letal que deixa o fungo e a célula fagocitária intactos (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). Essa estratégia de extrusão fagossomal onde a célula fúngica consegue sair do fagócito sem danificar a célula do hospedeiro é denominado como vomocitose ou exocitose não-lítica (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006).

Das interações do *C. neoformans* com o macrófago, destacam-se: a capacidade de permanência e proliferação do fungo no fagolisossomo; 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 (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; LEVITZ, 1994; VOELZ; MAY, 2010).

1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

De um ponto de vista dano-resposta, fator de virulência é definido como componentes do microrganismo que tem a capacidade de causar dano, direta ou indiretamente, a um hospedeiro suscetível (CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A., 2009).

C. neoformans tem vários fatores de virulência clássicos e bem definidos, entre esses se destacam: a produção de melanina, a formação de cápsula e a capacidade de crescimento na temperatura corporal humana (37°C) (IDNURM; REEDY; NUSSBAUM; HEITMAN, 2004), além de serem descritos também a expressão da enzima lacase, e secreção de fosfolipase. Conseqüentemente, a virulência de *C. neoformans* é uma ação conjunta desses elementos clássicos e de outros elementos não descritos, que irão atuar como um todo na capacidade que esse fungo possui de causar uma doença (CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.-A., 2009).

STEENBERGEN; SHUMAN e CASADEVALL (2001) sugeriram que a virulência de *C. neoformans* em células mamíferas é uma consequência de adaptações que evoluíram para proteger o fungo contra predadores ambientais, como a ameba. Contudo, pouco ainda é conhecido sobre essas consequências adaptativas e suas atuações na regulação da expressão de fatores de virulência.

1.5.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA

C. neoformans tem uma cápsula composta primariamente por um polissacarídeo de alto peso molecular. Esse polissacarídeo é referido como glucuronoxilomanana (BUCHANAN; MURPHY, 1998). O GXM constitui cerca de 88% da cápsula, sendo fundamental na modulação da resposta imune, além de inibir a fagocitose por macrófagos (LAROCQUE-DE-FREITAS; ROCHA; NUNES; OLIVEIRA *et al.*, 2018). A síntese desses polissacarídeos ocorre dentro da célula, sendo então transportados por meio de vesículas através da parede celular para então se ligarem à parede, seja por ligação direta ou via ancoramento por proteínas (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). Por fim, os polissacarídeos são ligados entre si formando os polímeros que darão forma para cápsula (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012).

A cápsula de *C. neoformans* é constituída também por 10% Galactoxilomanana (GXMgal) e 2% manoproteínas (LAROCQUE-DE-FREITAS; ROCHA; NUNES; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Ainda que GXM seja mais abundante, GXMgal tem um efeito imunomodulatório mais potente (LAROCQUE-DE-FREITAS; ROCHA; NUNES; OLIVEIRA *et al.*, 2018). GXMgal é um potente ativador de células dendríticas no modelo murino, e quando camundongos foram tratados com GXMgal antes de serem infectados com *C. neoformans*, estes apresentaram uma proteção a infecção por *C. neoformans* (LAROCQUE-DE-FREITAS; ROCHA; NUNES; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A cápsula produzida pelo *C. neoformans* proporciona resistência para o fungo, tanto no ambiente externo quanto no hospedeiro. Essa cápsula é capaz de inibir o processo de fagocitose, o que impede processo de captura e transporte dos antígenos, dificultando a internalização deste microrganismo por fagócitos do sistema imune (ZARAGOZA; RODRIGUES; DE JESUS; FRASES *et al.*, 2009).

A cápsula é requerida principalmente para sobrevivência intracelular, pois mutantes acapsulares não conseguem replicar-se dentro dos macrófagos (FELDMESSER; KRESS; NOVIKOFF; CASADEVALL, 2000). Mutantes acapsulares são avirulentos, enquanto que isolados encapsulados variam nos graus de virulência, evidenciando que a cápsula é um fator chave na virulência (BUCHANAN; MURPHY, 1998).

Uma das características da cápsula é a habilidade de mudar de espessura de acordo com as condições ambientais. Durante a infecção, a cápsula aumenta significativamente, e esse aumento também ocorre na interação com macrófagos (FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001). O aumento capsular pode contribuir para a sobrevivência de *C. neoformans*, porque a cápsula polissacarídica tem propriedades antioxidantes (ZARAGOZA; RODRIGUES; DE JESUS; FRASES *et al.*, 2009). Células com cápsula polissacarídicas espessas mostraram menor suscetibilidade a radicais livres e peptídeos antimicrobianos, sugerindo uma proteção contra condições de estresse dentro do fagolisossomo (ZARAGOZA; RODRIGUES; DE JESUS; FRASES *et al.*, 2009). Além disso, tem sido descrito outros estressores que induzem o aumento da espessura capsular, como soro ou meio de cultura com privação de nutrientes. Corroborando com essa idéia, CHRISMAN; ALBUQUERQUE;

GUIMARAES; NIEVES *et al.* (2011) demonstraram que fosfolipídeos da membrana de macrófagos e de amebas são capazes de induzir o aumento capsular.

1.5.2 TERMOTOLERÂNCIA A 37°C

Um atributo virulento essencial é a capacidade que *C. neoformans* tem de crescer em temperaturas fisiológicas. Essa característica é essencial para que o patógeno consiga sobreviver e se estabelecer no hospedeiro. Fungos patogênicos que infectam humanos possuem em comum a capacidade de sobreviver e crescer em ambientes com temperatura a 37°C (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). A ampla maioria das espécies fúngicas são incapazes de causar doenças em humanos, esse fenômeno é marcadamente resultante da inabilidade desses fungos de crescerem a 37°C (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

1.5.3 SÍNTESE DE MELANINA

A melanina é um polímero pigmentado de cor escura produzida pela enzima lacase através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Este polímero fica retido na parede celular de *C. neoformans*, sendo principal responsável pela cor escura que se apresenta nas colônias em cultura. A melanina é um radical livre estável que é insolúvel em solventes fisiológicos e resistente a degradação por ácido (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Vários estudos associaram síntese de melanina e virulência. Mutantes albinos (Mel Δ) foram menos virulentos do que a linhagem selvagem parental (WILLIAMSON, 1997). Células *C. neoformans* melanizadas são significativamente menos suscetíveis aos efeitos antimicrobianos de oxidantes oxigênicos e nitrogênicos (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Estudos *in vitro* com *C. neoformans* e macrófagos demonstraram que células melanizadas são mais resistentes a fagocitose e a morte celular causada por células imunes efectoras (WILLIAMSON, 1997).

Essas observações sugerem que a melanina aumenta a virulência por reduzir a suscetibilidade da célula fúngica aos mecanismos imunes do hospedeiro. Células melanizadas são mais resistentes a fagocitose e ao dano causado por estresses oxidativos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003), além de apresentarem uma maior resistência

a condições ácidas (CORDERO; CAMACHO; CASADEVALL, 2020). A melanina tem capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro, e proporciona uma proteção maior à parede celular, e tornar o fungo mais resistente a compostos antifúngicos, como a anfotericina B (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; CORDERO; CAMACHO; CASADEVALL, 2020; GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003).

Estudos com mutante para lacase e com a linhagem complementar confirmaram que a lacase em *C. neoformans* é importante para a virulência em camundongos (WILLIAMSON, 1997). A enzima lacase protege as células de *C. neoformans* da explosão oxidativa em macrófagos alveolares (LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999). A lacase reduz moléculas de ferro para Fe^{2+} , que é um produto capaz de inibir a explosão oxidativa em macrófagos e, conseqüentemente, promovendo a virulência de *C. neoformans* (JANUSZ; PAWLIK; SWIDERSKA-BUREK; POLAK *et al.*, 2020).

1.6 MOLÉCULAS QUORUM SENSING E CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

O mecanismo de *quorum sensing* permite a regulação coordenada de comportamentos microbianos em resposta à densidade populacional. Essa abordagem coordenada garante que fatores metabolicamente dispendiosos somente serão produzidos quando necessários para a sobrevivência microbiana ou quando a população é suficientemente grande para a resposta ser efetiva (RUTHERFORD; BASSLER, 2012).

LEE; CHANG; NARDONE e KWON-CHUNG (2007) reportou um pequeno peptídeo, chamado Qsp1, que atua como regulador clássico no patógeno humano *C. neoformans*. HOMER; SUMMERS; GORANOV; CLARKE *et al.* (2016) revelou que o peptídeo Qsp1 utiliza um sistema de sinalização similar ao mecanismo *quorum sensing*. O peptídeo Qsp1 media uma sinalização autoregulatória que modula aspectos relacionados a virulência de *C. neoformans* (DU TOIT, 2016). Essa modulação é similar no mecanismo *quorum sensing* em bactérias que está frequentemente envolvido na regulação de fatores de virulência.

Qsp1 é um peptídeo sinalizador autoregulatório que amadurece extracelularmente e é importado para atuar na regulação de aspectos celulares. Qsp1 é sintetizado como um pró-peptídeo, exportado, e então clivado por uma protease

associada-à-célula, Pqp1, para então ser re-importado à célula como uma molécula madura por um transportador, Opt1, onde se inicia uma cascata sinalizadora intracelular para ter a ativação dos efeitos de QS na população (MAY, 2016).

Infecção causada por mutantes *qsp1*Δ foi atenuada em um modelo de infecção em camundongos (HOMER; SUMMERS; GORANOV; CLARKE *et al.*, 2016). Essa atenuação é característica de linhagens que falham em sobreviver dentro de macrófagos alveolares (JOHNSTON; MAY, 2013). De fato, a deleção de *qsp1* mostrou uma sobrevivência intracelular defeituosa (HOMER; SUMMERS; GORANOV; CLARKE *et al.*, 2016).

MAY (2016) especula que o ambiente confinado do fagossomo mimetiza a situação de alta densidade celular, sugerindo que Qsp1 tem função de promover mudança fenotípica pós-entrada na célula do hospedeiro, o que garante uma melhor sobrevivência intracelular.

Qsp1 não tem homólogos óbvios fora do grupo de fungos que inclui o *C. neoformans*, sugerindo ser um mecanismo espécie-específico (MAY, 2016). Como Qsp1 não é encontrado fora desse grupo de fungos, o bloqueio da sua sinalização sugere potencial para novo alvo terapêutico que pode, especificamente, reduzir a proliferação fúngica em um estágio inicial de infecção (MAY, 2016).

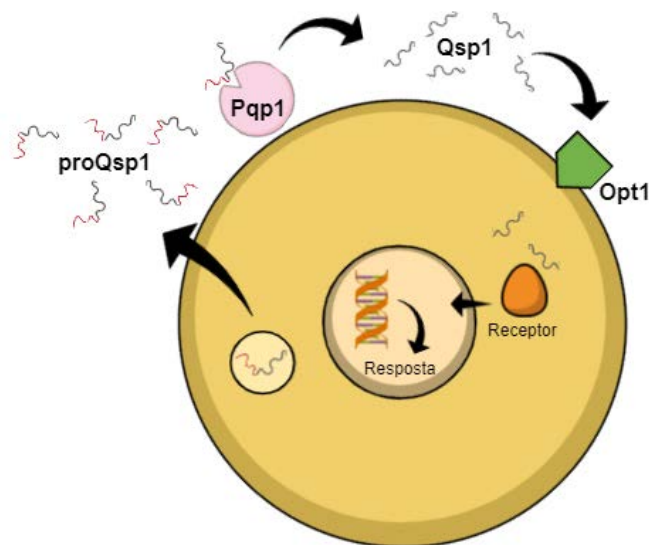


Figura 3. Ilustração da via *quorum sensing* Qsp1 em *Cryptococcus neoformans*. O pró-peptídeo proQsp1 é sintetizado e exportado da célula fúngica. Uma vez no ambiente externo, o proQsp1 é clivado pela protease associada-à-célula, Pqp1. O peptídeo maduro Qsp1 é importado por uma célula criptocócica via transportador Opt1. No ambiente intracelular, este peptídeo atua em mudanças morfológicas e de virulência via um receptor intracelular ainda não caracterizado. Figura elaborada pelo autor, e criada na plataforma Mind the Graph www.mindthegraph.com.

Complementarmente, ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.* (2013) investigaram a presença de regulação QS em *C. neoformans* utilizando meio condicionado (CM), o qual consiste em meio mínimo suplementado com sobrenadante de culturas de células desse fungo em fase estacionária. O CM produziu um aumento dose-dependente na taxa de crescimento e na produção de biofilme, e também causou um aumento na liberação de GXM e na síntese de melanina, importantes fatores de virulência desse fungo. ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.* (2013) identificaram a presença de ácido pantotênico (PA) no CM e demonstrou que essa molécula tem efeito densidade celular similar ao atribuído as QSMs. A utilização de ácido pantotênico comercial foi capaz de elicitar uma alta taxa no crescimento e na melanização, apesar de que o aumento não foi na mesma extensão que o induzido por CM (ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.*, 2013).

Até o presente momento, somente Qsp1 e PA foram descritas como moléculas cuja atividade se assemelha a de QSMs em *C. neoformans*.

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas são geradas em processos contínuos e constantes em decorrência das várias reações bioquímicas do metabolismo celular. Processos como a fosforilação de proteínas, a ativação de diversos fatores transcricionais, a apoptose, a imunidade, e a diferenciação, são todos processos dependentes da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em proporções adequadas (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). A presença intracelular de EROs precisa ser mantida em níveis baixos ou moderados. Quando produzido em excesso, as EROs começam a apresentar efeitos nocivos em importantes estruturas celulares como proteínas, lipídios, e ácido nucléicos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000).

Como forma de limitar os níveis intracelulares desses radicais livres e controlar sua produção excessiva, a célula tem um complexo sistema de proteção antioxidante baseado em enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (MISSALL; LODGE; MCEWEN, 2004). Por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado por meio da dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e essa reação é catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (WARRIS; BALLOU, 2019). A conversão de O_2 em H_2O_2 pela superóxido dismutase permite que essa espécie reativa seja parcialmente eliminada pela catalase e pela glutathiona peroxidase (WARRIS; BALLOU, 2019).

O desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os antioxidantes dão nome ao fenômeno conhecido por estresse oxidativo. Esse desequilíbrio é nocivo e ocorre por uma produção excessiva de radicais livres, ou em razão da velocidade de ação dos compostos antioxidantes para eliminar os radicais livres (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). Contudo, o estresse oxidativo é utilizado pela célula do sistema imune para eliminar ou induzir danos severos em patógenos invasores. De fato, fagócitos sintetizam e armazenam radicais livres para que estes sejam liberados quando um patógeno invasor precisa ser destruído (HOGAN; WHEELER, 2014). O importante papel de EROs no sistema imune pode ser exemplificado em indivíduos com a doença granulomatosa crônica (HOGAN; WHEELER, 2014), uma imunodeficiência caracterizada por um sistema NADPH oxidase defeituoso incapaz de produzir $O_2^{\bullet-}$. Indivíduos com essa doença estão mais propensos a infecções múltiplas e, em alguns casos, infecções persistentes, por possuírem um mecanismo de defesa oxidativo reduzido ou ausente (HOGAN; WHEELER, 2014).

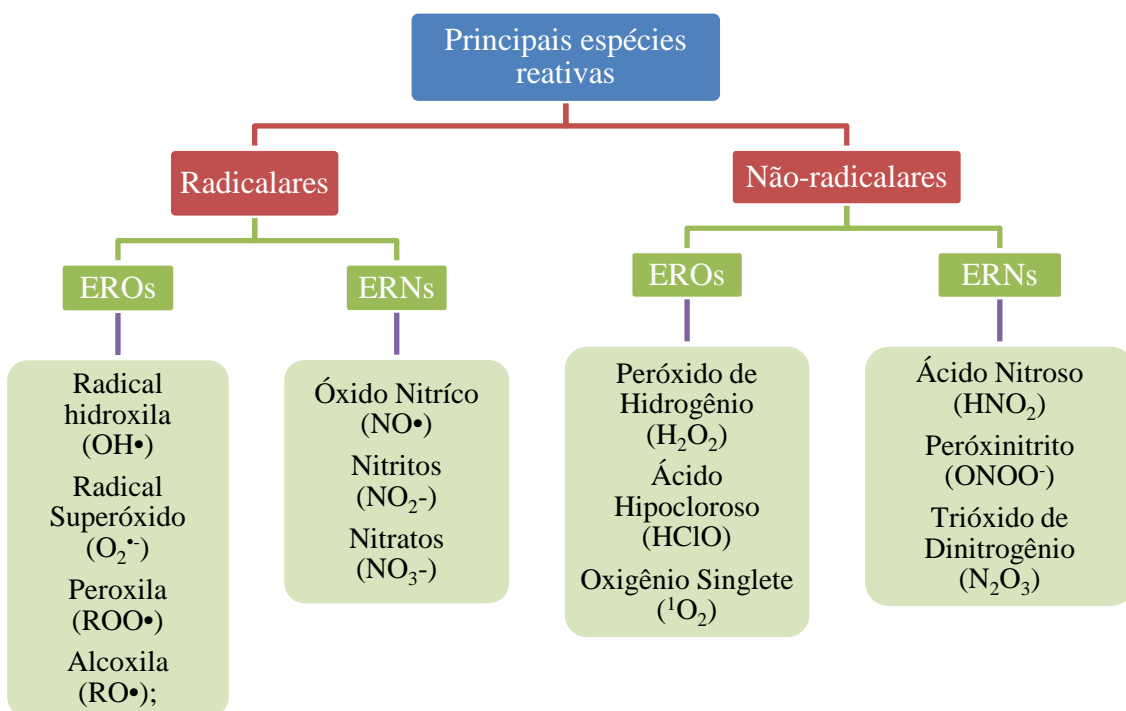


Figura 4. Diagrama da classificação das principais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. A classificação das espécies reativas depende de onde encontra-se o elétron desemparelhado, podendo ser classificado em espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Tanto EROs quanto ERNs podem ser subdivididos em espécies reativas radicalares e não-radicalares. Figura elaborada pelo autor.

1.8 ESTRESSE OXIDATIVO E *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

A adaptação do *Cryptococcus* ao ambiente do hospedeiro é crítico para sua capacidade de causar doença (CHANG; KANG; DOERING, 2019). É preciso haver o controle de aspectos críticos uma vez dentro ambiente hospedeiro, como adaptação ao pH alcalino e a privação de nutrientes, a produção da cápsula (OST; O'MEARA; HUDA; ESHER *et al.*, 2015), resistência a estressores de parede celular (LEV; DESMARINI; CHAYAKULKEEREE; SORRELL *et al.*, 2012), e tolerância ao estresse oxidativo (LEV; DESMARINI; CHAYAKULKEEREE; SORRELL *et al.*, 2012; UPADHYA; KIM; JUNG; PARK *et al.*, 2013).

Na interação com células do hospedeiro, as células fúngicas patogênicas lidam com uma variedade de desafios potencialmente tóxicos durante o curso de sua proliferação (MAY, 2016). Um importante exemplo de desafio o qual o fungo deve

superar são os altos níveis de espécies reativas de oxigênio produzidas por agentes microbicidas no mecanismo de explosão oxidativa (do inglês, *oxidative burst*). Esse mecanismo é caracterizado pela redução de moléculas de oxigênio, gerando rapidamente altos níveis de espécies reativas dentro do fagossomo.

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é gerado pela NADPH oxidase de fagócitos (WARRIS; BALLOU, 2019). O superóxido sozinho é geralmente considerado pouco tóxico contra microrganismos, contudo as quantidades geradas intrafagossomais são consideradas microbicidas (IMLAY, 2003). Os radicais superóxidos são instáveis e irão se converter em H_2O_2 de forma espontânea ou via superóxido dismutase (SOD) (WARRIS; BALLOU, 2019). A formação de superóxido leva ao acúmulo de espécies reativas, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hidroxila (OH^{\bullet}), e ácido hipocloroso (HClO) (WARRIS; BALLOU, 2019). Em neutrófilos, a mieloperoxidase (MPO) converte H_2O_2 em um composto altamente microbicida, o ácido hipocloroso (HClO) (WARRIS; BALLOU, 2019). As espécies oxidativas geradas pela redução de O_2 induzem o estresse oxidativo e provocam danos oxidativos no patógeno fagocitado. Microrganismos fagocitados acumulam danos celulares como resultado do estresse oxidativo, causando mutações no DNA que levam a mudanças na expressão gênica, assim como nas modificações pós-traducionais em proteínas, e na peroxidação em lipídios (WARRIS; BALLOU, 2019).

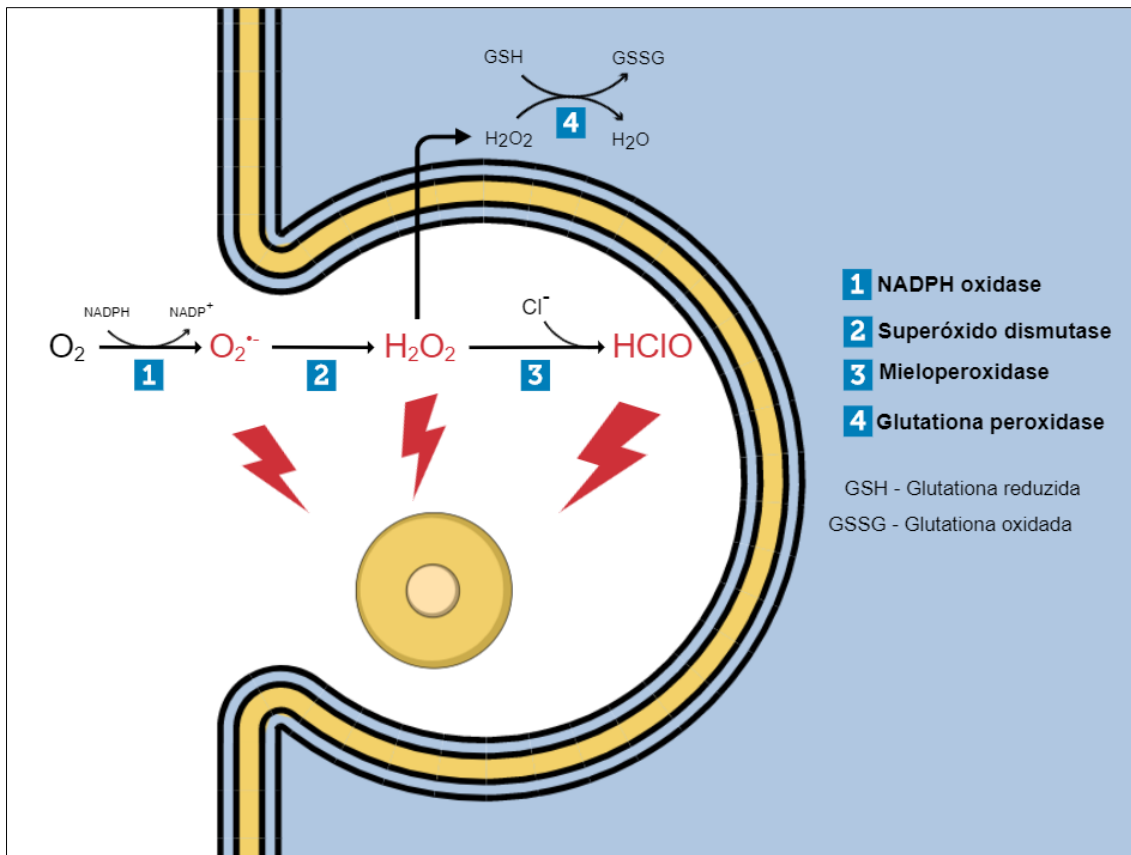


Figura 5. Representação esquemática e ilustrativa da geração das espécies reativas no fagolisossomo, implicando na explosão oxidativa (*oxidative burst*). A molécula de oxigênio (O_2) é reduzido pela NADPH oxidase em fagócitos, ou pela mitocôndria. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) gerado é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD). Esse H_2O_2 pode ser convertido pela mieloperoxidase (MPO) em ácido hipocloroso (HClO), ou pode sofrer outras reações, como a detoxificação pela em H_2O e O_2 pela glutaciona reduzida. A alta produção dessas espécies reativas no fagossomo é feita de forma rápida, o que confere uma potente atividade antimicrobiana e caracteriza a explosão oxidativa. Figura elaborada pelo autor, adaptado de (WARRIS; BALLOU, 2019).

A morte de células fúngicas por esse mecanismo oxidativo de defesa do hospedeiro representa uma importante linha de eliminação de microrganismos patogênicos (WESTWATER; BALISH; SCHOFIELD, 2005). De fato, correlações tem sido feitas entre a resposta de fungos patogênicos ao estresse e sua habilidade de proliferação dentro de um hospedeiro (MAY, 2016).

Um fator fundamental na resposta ao estresse oxidativo é a necessidade de uma rápida adaptação e sinalização para se defender da elevação letal de EROs (UPADHYA; KIM; JUNG; PARK *et al.*, 2013). O mecanismo molecular do fungo que confere resistência a morte fagolisossomal é um importante problema ainda não solucionado. O

aumento regulatório da produção de glucoroxilomanana capsular após endocitose, assim como o aumento na produção de melanina e fosfolipases B tem sido propostas como fatores que contribuem para a sobrevivência intracelular fúngica (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; FELDMESSER; KRESS; NOVIKOFF; CASADEVALL, 2000; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). A produção capsular dentro de células fagocíticas foi reportado contribuir para a sobrevivência do *C. neoformans* (FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001). Essa contribuição para o estabelecimento intracelular pode ocorrer por prover uma separação física entre os compostos microbicidas produzidos pelo hospedeiro e a superfície da célula fúngica (LEE; CHANG; NARDONE; KWON-CHUNG, 2007). Além disso, a melanina tem capacidade de proteger a célula da levedura por eliminar radicais livres intracelularmente, ou bloqueando a ação de peptídeos antimicrobianos como defensinas (DOERING; NOSANCHUK; ROBERTS; CASADEVALL, 1999). Enquanto que a fosfolipase B funciona dissolvendo membranas fagocíticas, portanto, permitindo as células fúngicas de entrar no citoplasma nutritivamente rico (COENJAERTS; HOPELMAN; SCHARRINGA; AARTS *et al.*, 2006).

Uma vez dentro do fagossomo, *C. neoformans* deve resistir aos níveis de espécies reativas de oxigênio para sobreviver dentro deste ambiente. Em *C. neoformans*, a melanina acumula na parede celular e está envolvida na tolerância a EROs, conferindo também resistência a diferentes tipos de estresses (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). Linhagens melanizadas de *C. neoformans* são menos suscetíveis ao estresse oxidativo do que linhagens não-melanizadas (WANG; CASADEVALL, 1994). Além de sintetizar melanina, as lacases conseguem interferir em parte na explosão oxidativa do fagócito, por sequestrar e reduzir ferro durante a infecção (JACOBSON; HONG, 1997; LIU; NIZET, 2009). Estudos demonstraram que tanto a melanina quanto a lacase facilitam a disseminação de *C. neoformans* dos pulmões para o SNC (NOVERR; WILLIAMSON; FAJARDO; HUFFNAGLE, 2004).

Surpreendentemente, as catalases (enzimas que detoxificam peróxido de hidrogênio) mostraram não ter papel principal na tolerância ao estresse por EROs em *C. neoformans*, talvez devido a uma redundância funcional com outros elementos na proteção contra EROs (GILES; STAJICH; NICHOLS; GERRALD *et al.*, 2006).

De forma complementar, WESTWATER; BALISH e SCHOFIELD (2005) demonstraram uma importante relação entre o mecanismo *quorum sensing* e o aumento da resistência contra o estresse oxidativo em *C. albicans*. Esse estudo evidenciou que *C. albicans* é capaz de regular coordenadamente uma resposta ao estresse oxidativo na população celular como um todo (WESTWATER; BALISH; SCHOFIELD, 2005). Culturas de *C. albicans* em fase estacionária tem maior resistência ao estresse oxidativo e o sobrenadante dessas culturas foi capaz de induzir uma proteção ao estresse oxidativo de culturas em fase exponencial (WESTWATER; BALISH; SCHOFIELD, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL – IDENTIFICAR POSSÍVEL RELAÇÃO ENTRE MOLÉCULAS *QUORUM SENSING* E/OU OUTROS METABÓLITOS DE PEQUENO PESO MOLECULAR E A RESPOSTA PROTETIVA AO ESTRESSE OXIDATIVO

Analisar efeitos do meio condicionado de *C. neoformans* em populações celulares suscetíveis à ação de agentes estressores oxidativos, caracterizando se possível, a resistência do fungo relacionado com moléculas *quorum sensing*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a suscetibilidade do *C. neoformans* ao estresse oxidativo em diferentes pontos do crescimento celular e confirmar possível relação densidade-dependente.
- Avaliar ação do meio condicionado de *C. neoformans* na sobrevivência da população em resposta a ação do estresse oxidativo.
- Estabelecer relação entre sobrevivência ao estresse oxidativo e interação com moléculas do meio condicionado
- Verificar ação de Qsp1 e do ácido pantotênico na sobrevivência da população de *C. neoformans* em resposta ao estresse oxidativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGEM CELULAR

A linhagem *Cryptococcus neoformans* H99 (ATCC 208821; Sorotipo A; Genótipo VNI) foi crescida por 48 horas em meio sabouraud (Sabouraud Dextrose, Difco) a 30°C, 200 rpm, para preparo de estoques da cultura em glicerol 35% armazenados a -80°C. A cada 20 dias, esses estoques foram utilizados para semear por esgotamento placas de sabouraud sólido (Sabouraud + ágar 1,5% pH 7,2). As placas recém semeadas foram incubadas em estufa a 30°C por 48h e posteriormente armazenadas a 4°C.

Antes de cada um dos experimentos realizados, uma colônia isolada do fungo foi inoculada em meio mínimo e crescida por 24h a 30°C, 200 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 3000xg/4°C/5 min e lavadas três vezes em tampão fosfato salina (PBS) 1X. As células então foram contadas em Câmara de Neubauer e a concentração do inóculo ajustada de acordo com o tipo de ensaio realizado.

3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Sabouraud

Sabouraud caldo 3% (p/v)

Esterilização por autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

Para o meio sólido: adição de 1,5% de ágar.

Para o meio sólido com H₂O₂: adição de 2 mM de peróxido de hidrogênio para 1L após a temperatura do meio SDA recém-esterilizado estar abaixo de 60°C.

Tampão Fosfato Salina (PBS) 1X

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 10 mM

KH₂PO₄ 2 mM

pH = 7,4 esterilização por autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

Meio Mínimo 1X

Glicose	15 mM
KH ₂ PO ₄	29,4 mM
MgSO ₄	10 mM
Glicina	13 mM

pH = 5,5 esterilização por autoclavagem 120°C 20 min, posteriormente adicionada Tiamina 3 µM.

Meio Mínimo Low-Salt 1X (baixa concentração de sais – 1/10 da concentração padrão)

Glicose	15 mM
KH ₂ PO ₄	2,94 mM
MgSO ₄	1,0 mM
Glicina	13 mM

pH = 5,5 esterilização por autoclavagem 120°C 20 min, posteriormente adicionada Tiamina 3 µM.

3.3 PREPARO DO MEIO CONDICIONADO DE *C. NEOFORMANS*

Uma colônia foi isolada individualmente da placa de sabouraud sólido previamente semeada e foi transferida para erlenmeyer contendo 500mL de Meio Mínimo Low-Salt 1x (meio mínimo com baixa concentração de sais, 1/10 da concentração da receita padrão), sendo a cultura colocada para crescer em um shaker a 30°C, 200 rpm por um período de 10 dias. Após o crescimento as células foram sedimentadas por centrifugação a 6000xg/4°C/20min, e o sobrenadante foi coletado para ser filtrado e concentrado em um sistema de ultrafiltração tangencial (QuixStand Benchtop System - GE Healthcare - 1 kDa). O sobrenadante filtrado foi chamado de “meio condicionado” (CM). Esse meio filtrado foi dividido em recipientes para passar por processo de liofilização, em Liotop L120, e foram então armazenados em temperatura ambiente até o momento de uso.

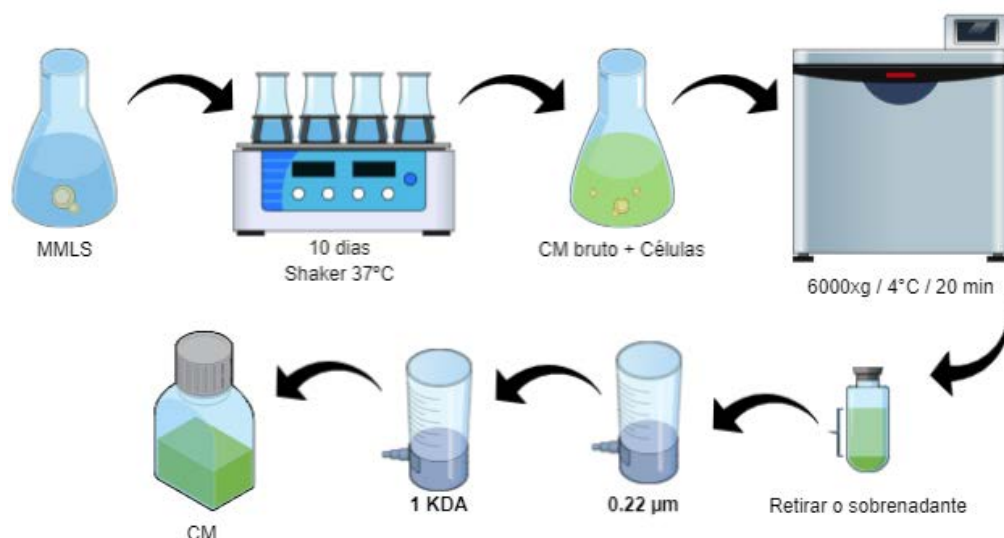


Figura 6. Ilustração esquemática das etapas de produção e purificação do meio condicionado. H99 foi inoculado em meio mínimo low-salt 1x e crescido por 10 dias. Após esse período a cultura foi centrifugada e o sobrenadante coletado e filtrado para remoção de células, e ultrafiltrado para remoção de moléculas de alto peso molecular. O meio condicionado puro (CM) foi liofilizado e armazenado em temperatura ambiente até o momento de uso. Figura elaborada pelo autor.

3.4 CURVA DE CRESCIMENTO

Uma colônia isolada da placa de sabouraud sólido foi transferida para um falcon 50 mL contendo Meio Mínimo (MM). As culturas foram incubadas por um período de 72 horas a 30°C e 200 rpm. A cada 12h uma alíquota foi retirada e a densidade óptica foi medida em OD₆₀₀ nm.

3.5 ENSAIO DE INTERAÇÃO COM MEIO CONDICIONADO

Uma colônia isolada da placa de sabouraud sólido foi transferida para um falcon 50 mL contendo Meio Mínimo (MM). As culturas foram incubadas por um período de 24 horas a 30°C e 200 rpm. Após esse período de crescimento, as culturas foram centrifugadas (3000xg a 4°C por 6 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas três vezes com PBS 1x. As amostras foram resuspensas em meio mínimo ou em meio condicionado. Essa interação com MM e CM durou 90 min a 30°C e 200 rpm.

3.6 ENSAIO DE SENSIBILIDADE AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Posteriormente ao ensaio de interação com meio condicionado, as amostras foram novamente lavadas duas vezes com PBS 1x e resuspendidas com H₂O ou H₂O contendo peróxido de hidrogênio em concentrações gradativas (0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, e 1,5 mM) ou H₂O com peróxido de hidrogênio com concentrações de 1,5 mM ou 3,5 mM. A interação com peróxido de hidrogênio durou 60 min a 30°C e 200 rpm. As amostras foram plaqueadas em placas tripartidas com sabouraud sólido. Células viáveis foram determinadas após um período de até 48h de incubação a 30°C.

3.7 DILUIÇÃO DO MEIO CONDICIONADO NO PRÉ-TRATAMENTO

Uma colônia isolada da placa de sabouraud sólido foi inoculada em falcon 50 mL contendo Meio Mínimo (MM). Culturas foram incubadas por um período de 24 horas a 30°C e 200 rpm. Após o período de crescimento, as culturas foram centrifugadas (3000xg a 4°C por 6 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com três vezes com PBS 1x. Culturas foram resuspensas em mesmo volume de meio mínimo, ou de meio condicionado (100%), ou de meio mínimo suplementado com meio condicionado (50%, 20%, 10%, 5%). Essa interação com o MM, CM e meio mínimo suplementado com CM, durou 90 min a 30°C e 200 rpm. As culturas foram então centrifugadas (3000xg a 4°C por 6 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS 1x. Contagem de células foi feita em uma câmara de Neubauer e amostras foram diluídas para manter padronização. As culturas foram resuspensas em H₂O ou H₂O contendo 1,5 mM ou 3,5 mM peróxido de hidrogênio. Após 60 min de interação com o H₂O₂ as amostras foram plaqueadas em placas tripartidas com sabouraud sólido. Células viáveis foram determinadas após um período de até 48h de incubação a 30°C.

3.8 ENSAIO DE SUSCETIBILIDADE A AGENTES GERADORES DE ÂNIONS SUPERÓXIDOS

Posterior ao ensaio de interação de 90 min com o CM e o MM, as culturas foram centrifugadas (3000xg a 4°C por 6 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas três vezes com PBS 1x. Foi feita a contagem de células em uma câmara

de Neubauer e amostras foram diluídas para manter padronização. As culturas foram resuspensas em H₂O ou H₂O suplementado com menadiona nas concentrações 0,5 mM ou 1,0 mM. O desafio com H₂O e H₂O contendo menadiona durou 60 min a 30°C e 200 rpm. Após esse desafio, as amostras foram plaqueadas em placas tripartidas com sabouraud sólido. Células viáveis foram determinadas após um período de até 48h de incubação a 30°C.

3.9 PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO PANTOTÊNICO

Uma colônia isolada da placa de sabouraud sólido foi inoculada em falcon 50 mL contendo Meio Mínimo (MM). Culturas foram incubadas por um período de 24 horas a 30°C e 200 rpm. Após o período de crescimento, as culturas foram centrifugadas (3000xg a 4°C por 6 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas três vezes com PBS 1x. Culturas foram resuspensas em mesmo volume de meio condicionado, de meio mínimo ou de meio mínimo suplementado com 2 mM ou 4 mM de ácido pantotênico (PA). Período de interação das amostras foi de 90 min a 30°C e 200 rpm.

3.10 CARACTERIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MEIO CONDICIONADO NA SUSCETIBILIDADE AO H₂O₂

Dois tratamentos foram feitos no meio condicionado: o CM teve seu pH acidificado com HCl (pH 5,6 do CM foi acidificado para pH 2,5); ou o CM foi esterilizado por autoclavagem a 120°C por 20 min. Culturas lavadas foram resuspensas em mesmo volume de MM, ou CM, ou de CM autoclavado (calor), ou de CM com pH 2,5. Período de interação das amostras com o CM e MM foi de 90 min a 30°C e 200 rpm. Após esse tratamento, as culturas foram centrifugadas (3000xg a 4°C por 6 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas três vezes com PBS 1x. Contagem de células foi feita em uma câmara de Neubauer e amostras foram diluídas para manter padronização. As culturas foram resuspensas em H₂O ou H₂O contendo 1,5 mM ou 3,5 mM peróxido de hidrogênio. As amostras foram plaqueadas em placas tripartidas com sabouraud sólido. Células viáveis foram determinadas após um período de até 48h de incubação a 30°C.

3.11 ENSAIO DE CRESCIMENTO POR DILUIÇÃO SERIADA

Uma colônia individual da placa de SDA (Ágar Sabouraud Dextrose) foi inoculada em falcon 50 mL contendo meio mínimo e esse foi incubado por 24h a 30°C e 200 rpm. Essa cultura foi dividida em igual volume e centrifugada (3000 xg a 4°C por 6 minutos), sobrenadante foi descartado e células foram resuspensas em igual volume com MM ou CM. Essas culturas foram incubadas por 90 minutos a 30°C e 200 rpm para permitir a interação das células com as moléculas do CM. Após esse período, as culturas foram novamente centrifugadas e lavadas com PBS 1x por três vezes. Contagem celular foi feita em câmara de Neubauer e diluição seriada foi preparada em uma placa para cultura celular de 96 poços. Foram feitas seis diluições iniciando com concentração celular de 10^7 células/mL. 5 μ L de cada diluição foi inoculado em uma placa SDA ou em uma placa SDA contendo 2 mM de peróxido de hidrogênio. Após inocular cada diluição nas placas, estas foram incubadas por 48h a 30°C.

3.12 ENSAIO COM DISCOS DE DIFUSÃO

Uma colônia isolada foi colocada em falcon 50 mL com MM e incubada por 24h a 30°C e 200 rpm. Essa cultura foi dividida em igual volume e colocadas para interagir com MM e CM como descritos no ensaio de interação com meio condicionado. Um volume de 100 μ L de cada cultura foi semeado em placas SDA com auxílio de uma alça de drigalski em aço. Discos de papéis estéreis (15 mm de diâmetro) saturados com 3 μ L de 2% H₂O₂ ou com 3 μ L de H₂O estéreis foram posicionado nas placas. Placas foram incubadas por 48h em 30°C, posteriormente fotografadas e o diâmetro da zona de inibição foi mensurado com Adobe Photoshop CS6 para Windows.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram feitos no software GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). O teste paramétrico ANOVA e o teste de regressão não-linear foram utilizados para verificar a viabilidade das colônias de *C. neoformans*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SENSIBILIDADE AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO DEPENDE DA FASE DE CRESCIMENTO

Investigamos se as células de *C. neoformans* em diferentes fases de crescimento respondem da mesma maneira ao estresse oxidativo. A cada 12h alíquotas de uma amostra crescida por 72h foram desafiadas com a suplementação externa de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Após 60 min de tratamento foi testada a viabilidade das culturas (Figura 7). Observamos que alíquotas no início da fase exponencial (de 12h e 24h) são significativamente mais suscetíveis ao peróxido de hidrogênio do que as alíquotas retiradas das amostras em fase estacionária (48h a 72h). Resultados obtidos sugerem uma relação entre a fase do crescimento celular e o aumento na resistência ao peróxido de hidrogênio em *C. neoformans*. Resultados similares foram reportados para *C. albicans* (WESTWATER; BALISH; SCHOFIELD, 2005) e *S. cerevisiae* (JAMIESON, 1992).

UPADHYA; CAMPBELL; DONLIN; AURORA *et al.* (2013) demonstrou que quanto maior a densidade celular de culturas *C. neoformans* ($OD_{650} = 1$ a 8), maior a taxa de degradação do H_2O_2 . Culturas celulares crescidas em altas densidades celulares ($OD_{650} \geq 4,0$) foram capazes de degradar H_2O_2 em 10 minutos, sendo mais tolerantes ao estressor exógeno (UPADHYA; CAMPBELL; DONLIN; AURORA *et al.*, 2013). De forma similar, os dados da figura 7 sugerem que densidades celulares de $OD_{600} \geq 3,0$ (crescidas por 48h a 72h) foram mais tolerantes ao estresse oxidativo do que densidades celulares de $OD \leq 2,5$ (12h a 36h). Esses dados indicam que a capacidade de degradar H_2O_2 exógeno dependem da densidade celular da cultura em crescimento.

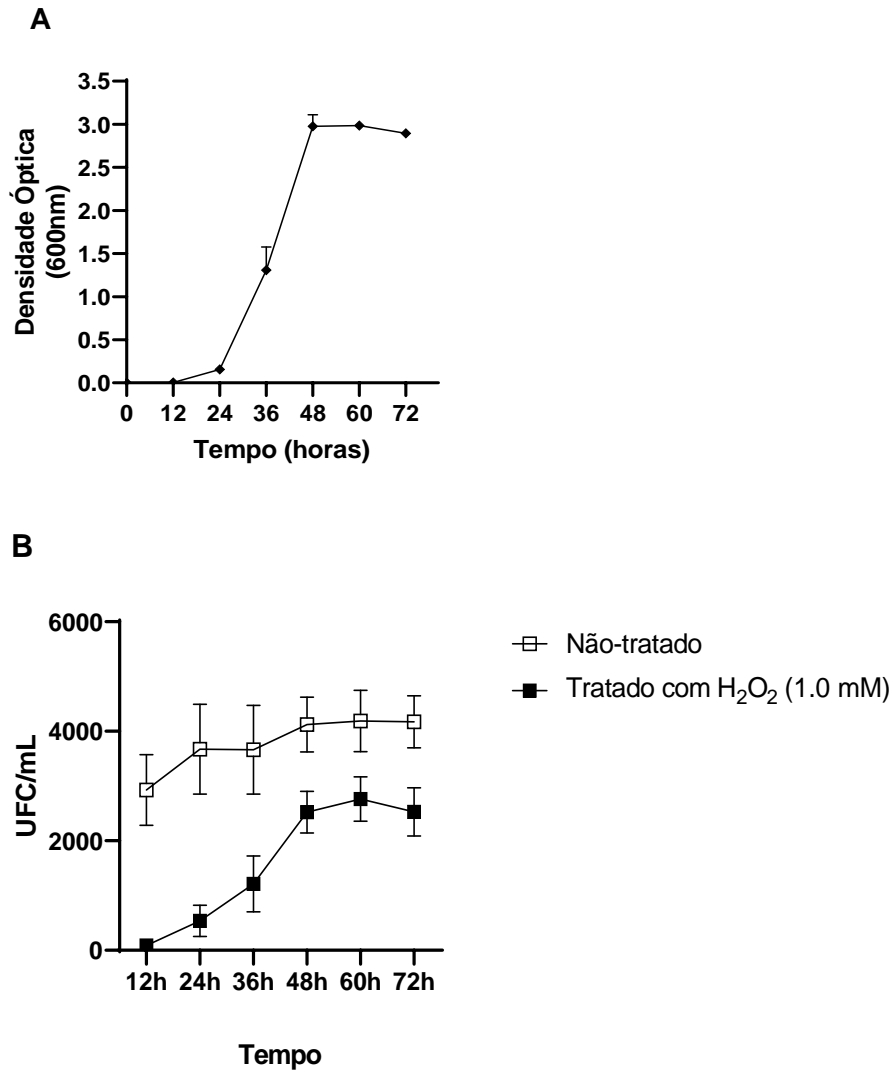


Figura 7. Suscetibilidade a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de células de culturas de *C. neoformans* coletadas em diferentes tempos após o início do crescimento. Uma cultura de *C. neoformans* em MM foi crescida a 30°C por três dias. Em intervalos de 12h, a densidade óptica (OD_{600nm}) da cultura foi medida (A), e alíquotas dessa cultura foram coletadas e desafiadas com peróxido de hidrogênio, 1,0 mM, por 60 minutos a 30°C (B). As amostras que foram desafiadas e amostras que não passaram por esse estímulo (resuspendidas com H₂O), foram plaqueadas em sabouraud sólido para avaliação da sobrevivência do fungo. Quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) em 1 mL estão expressas como médias ± desvio padrão de triplicatas. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico 2way ANOVA.

WESTWATER; BALISH e SCHOFIELD (2005) e JAMIESON (1992) demonstraram que *C. albicans* e *S.cerevisiae* são menos sensíveis ao estresse oxidativo quando estão em fase estacionária, do que células em crescimento exponencial. Semelhantemente, os dados obtidos na figura 7 sugerem que *C. neoformans* em fases de

crescimentos diferentes, tem tolerância diferentes ao estresse oxidativo do H₂O₂.

Assim como *C. albicans* e *S. cerevisiae*, *C. neoformans* também encontra estressores oxidativos após a ingestão por fagócitos. No contexto da fagocitose e do fungo patogênico, a concentração de H₂O₂ dentro do fagossomo durante a explosão oxidativo não é conhecido precisamente (UPADHYA; CAMPBELL; DONLIN; AURORA *et al.*, 2013). Estudos sugerem que a concentração efetiva de H₂O₂ pode alcançar centenas de micromolar (KIM; KIM; YADAVALLI; PISHKO, 2005). UPADHYA; CAMPBELL; DONLIN; AURORA *et al.* (2013) determinaram por curvas de mortes geradas por estresse oxidativo via H₂O₂ que o uso de 1 mM H₂O₂, em culturas de *C. neoformans*, resulta na morte de ~15% da população celular inicial. Verificamos então se a utilização da concentração determinada por esses autores resultaria em uma diferença estatística nas populações tratadas com MM ou CM. Ademais, como foi observado que a capacidade de tolerar ao estresse por H₂O₂ exógeno dependem da densidade celular da cultura em crescimento, era importante verificar também se o meio em que as culturas em alta densidade celular estão imersas poderiam ter efeitos na resposta de culturas em baixa densidade celular ao estressor exógeno H₂O₂.

Como *C. neoformans* encontra estresse oxidativo em um ambiente nutritivo limitado dentro do fagossomo (UPADHYA; CAMPBELL; DONLIN; AURORA *et al.*, 2013), as culturas celulares foram crescidas em um meio mínimo e crescidas em 30°C para que só uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo fosse verificada, prevenindo induções transcricionais não-específicas com base em trabalhos como o de UPADHYA; CAMPBELL; DONLIN; AURORA *et al.* (2013). Para determinar o efeito do H₂O₂ na viabilidade de células *C. neoformans*, as amostras foram desafiadas em várias concentrações de H₂O₂ (Figura 8). Células foram coletas por centrifugação, lavadas três vezes em PBS 1x gelado, diluídas e semeadas em placas tripartidas com sabouraud sólido para contar as unidades formadoras de colônias (UFC).

Amostras no início da fase exponencial (crescidas por 24h) interagiram com as moléculas presentes no meio condicionado antes do desafio com H₂O₂ (Figura 8). Os resultados apresentados na Figura 8 demonstraram que a partir de uma concentração de 0,25 mM H₂O₂ é possível observar uma diferença significativa no número de unidades

formadoras de colônias pré-tratadas com MM ou CM. Dados demonstraram também que existe uma diferença biológica observável no números de unidades formadoras de colônias nas concentrações acima de 0,75 mM H₂O₂. Os resultados obtidos sugerem que as amostras que interagiram com moléculas presentes no meio condicionado foram mais tolerantes ao H₂O₂ do que as amostras que não interagiram com CM.

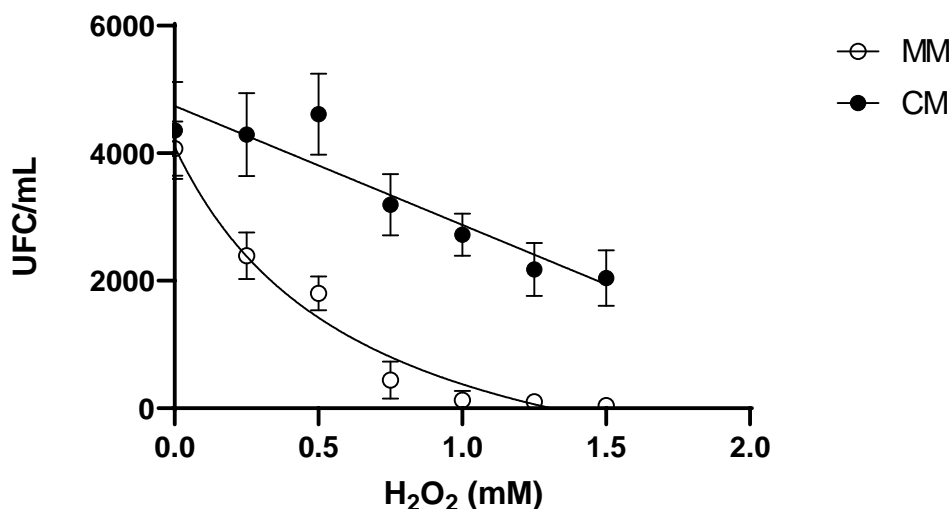


Figura 8. Diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em culturas tratadas com meio condicionado (CM) e meio mínimo (MM). Células no início da fase exponencial (crescidas por 24h em MM) foram coletadas e resuspensas com MM ou CM, e incubadas por 90 min a 30°C. Amostras foram lavadas com PBS e desafiadas com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,25; 1,50 mM) por 60 minutos a 30°C. Após o desafio, amostras foram plaqueadas em sabouraud sólido. Dados analisados pelo teste paramétrico de regressão não linear. Quantidade de unidades formadoras de colônias em 1 mL estão expressas como médias ± desvio padrão de triplicatas.

4.2 MEIO CONDICIONADO PROTEGE CÉLULAS EM FASE EXPONENCIAL DA AÇÃO LETAL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.

Verificamos se moléculas presentes no meio condicionado de *C. neoformans* em fase estacionária poderiam influenciar a resistência ao estressor oxidativo em células de fases iniciais do crescimento celular. Para isso, culturas de *C. neoformans* com baixa densidade celular (10⁴ células/mL) foram tratadas com meio condicionado antes de submetê-las ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Na etapa de desafio com o estressor, foram feito três grupos: um controle desafiado com H₂O; um grupo submetido ao estresse por peróxido de hidrogênio (1,5 mM); e um grupo submetido a uma alta concentração de peróxido de hidrogênio (3,5 mM).

Observamos que as células tratadas com CM apresentaram maior resistência após o tratamento com peróxido de hidrogênio quando comparadas com as células do controle que foram incubadas apenas com meio mínimo, conforme apresentado na Figura 9. Culturas que foram submetidas ao pré-tratamento com CM apresentaram uma maior resistência ao 1,5 mM H₂O₂ de forma significativa quando comparado ao controle não-tratado com CM (64,36% versus 6,35% respectivamente).

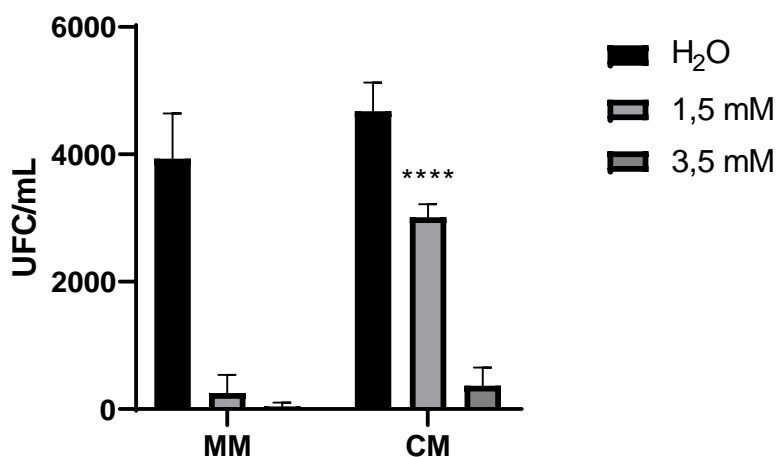


Figura 9. Culturas de *C. neoformans* tratadas com meio condicionado (CM), e posteriormente desafiadas com concentrações diferentes de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Células crescidas durante a noite em MM foram coletadas e resuspensas com MM ou CM, e incubadas por 90 min a 30°C. Amostras foram lavadas com PBS e desafiadas com peróxido de hidrogênio por 60 min a 30°C. Após o desafio, amostras foram plaqueadas em sabouraud sólido. Quantidade de unidades formadoras de colônias em 1 mL estão expressas como médias ± desvio padrão de triplicatas. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico 2way ANOVA. ****, P < 0,0001 para amostra CM quando comparada com a amostra MM.

Uma possível explicação para a maior resistência aos oxidantes pelas culturas em fase estacionária, pode ser pelo acúmulo de metabólitos antioxidantes durante a fase estacionária, o que pode levar a esse aumento da resistência ao estresse oxidativos dependente da densidade celular (WERNER-WASHBURNE; BRAUN; JOHNSTON; SINGER, 1993). Para culturas de células em fase estacionária, MORADAS-FERREIRA e COSTA (2000) sugerem que exposição a altos níveis de EROs endógeno pode resultar em uma resposta adaptativa. Por outro lado, BJARNSHOLT; JENSEN; BURMOLLE; HENTZER *et al.* (2005) sugerem uma relação entre moléculas *quorum sensing* e a resposta aos estressores. Como verificado no trabalho de ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.* (2013), amostras *C. neoformans* em baixa densidade celular,

quando suplementadas com meio condicionado de amostras em alta densidade celular, melanizaram de forma mais rápida do que amostras que não interagiram com meio condicionado. A melanina tem capacidade de proteger a levedura por eliminar radicais livres (DOERING; NOSANCHUK; ROBERTS; CASADEVALL, 1999). Essa melanização induzida pelo meio condicionado no trabalho de ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.* (2013) foi dose-dependente sugerindo a presença de QSMs compondo o meio condicionado de *C. neoformans*. Verificamos então, se a atividade de indução na resistência do *C. neoformans* ao H₂O₂ poderia ser uma atividade dose-dependente da concentração do meio condicionado.

Adicionalmente, experimentos confirmaram que o meio condicionado induz uma proteção das células de *C. neoformans* ao estresse oxidativo de maneira dose-dependente (Figura 10). Células de leveduras pré-tratadas com CM previamente diluído com volumes específicos de MM, exibiram uma menor taxa de sobrevivência do que células tratadas com amostras não-diluídas (Figura 10). É importante notar que como células foram lavadas antes do desafio com o agente oxidante, é improvável que a presença de moléculas antioxidantes, que tenham se acumulado durante o crescimento do fungo, sejam responsáveis pela atividade de resistência.

Os dados sugerem que o CM tem a capacidade de aumentar a resistência de células de leveduras para doses letais específicas de peróxido de hidrogênio. E esse aumento ocorre de maneira dose-dependente.

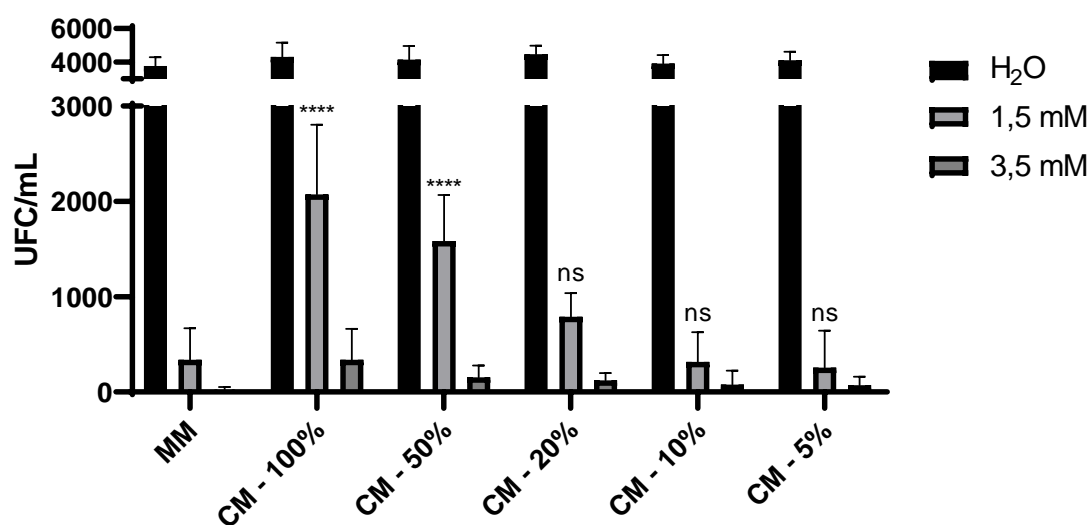


Figura 10. Culturas de *C. neoformans* tratadas com meio condicionado (CM) diluído e desafiadas com Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Culturas resuspendidas com MM ou CM (100%), ou CM diluído (50%, 20%, 10% e 5%), foram incubadas por 90 min a 30°C. Amostras foram desafiadas com H_2O_2 por 60 minutos a 30°C. Posteriormente, amostras foram plaqueadas em sabouraud sólido. As quantidades de sobreviventes estão expressas como médias \pm desvio padrão de triplicatas. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico 2way ANOVA. ****, $P < 0,0001$; ns, não significante, para amostras de sobrevivências comparadas com o grupo MM.

Adicionalmente, foi testado se a atividade de induzir a resistência ao estresse oxidativo apresentaria diferenças estatísticas relevantes quando utilizado concentrações altas de CM (200% e 500%), mas não foi verificado diferenças estatisticamente relevantes nos números de unidades formadoras de colônias de *C. neoformans* (Figura 11).

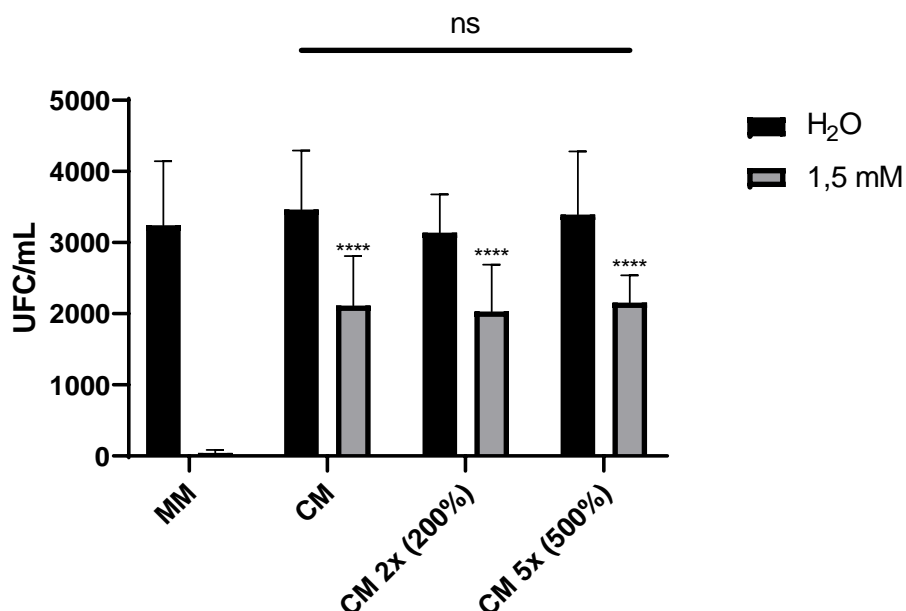


Figura 11. Culturas de *C. neoformans* tratadas com altas concentrações de meio condicionado (CM) e desafiadas com Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Culturas resuspendidas com MM, CM (100%), CM 2x (200%) ou CM 5x (500%), foram incubadas por 90 min a 30°C. Amostras foram desafiadas com H_2O_2 por 60 minutos a 30°C. Posteriormente, amostras foram plaqueadas em sabouraud sólido. As quantidades de sobreviventes estão expressas como médias \pm desvio padrão de triplicatas. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico 2way ANOVA. ****, $P < 0,0001$; ns, não significante, para amostras de UFC comparadas com o grupo MM.

4.3 AÇÃO PROTETORA DO MEIO CONDICIONADO CONTRA AGENTES GERADORES DE ÂNIONS SUPERÓXIDOS

Uma resposta ao estresse oxidativo pode ser disparada quando células sentem uma elevação de EROs (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001). Foi avaliado então se *C. neoformans* pré-tratado com CM também teria maior resistência contra agentes geradores de ânion superóxido. A Menadiona (Vitamina K3) é um agente ciclo-redox conhecido por aumentar significativamente o nível de ânions superóxidos intracelulares. Os resultados presentes na figura 12 demonstraram que culturas que não foram tratadas com CM foram significativamente mais sensíveis do que culturas que passaram por esse pré-tratamento.

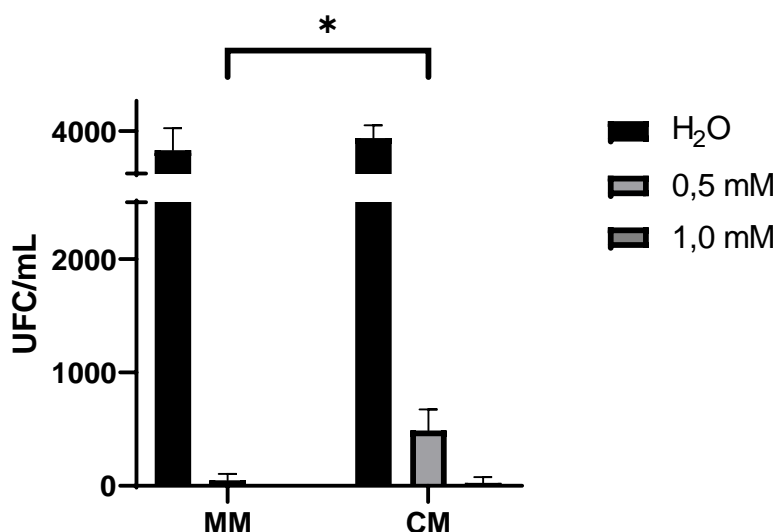


Figura 12. Culturas de *C. neoformans* tratadas com meio condicionado (CM) e desafiadas com concentrações diferentes de Menadiona. Cultura de células crescidas durante a noite foram lavadas com PBS, resuspendidas com MM ou CM, e incubadas por 90 min a 30°C. Amostras foram lavadas com PBS novamente e desafiadas com menadiona por 60 minutos a 30°C. Após esse período, foram feitas as devidas diluições e amostras foram plaqueadas em sabouraud sólido. As quantidades de sobreviventes estão expressas como médias \pm desvio padrão de triplicatas. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico 2way ANOVA. *, $P < 0,01$ para UFC/mL do grupo CM quando comparada com o grupo MM.

Em bactérias, a comunicação *quorum sensing* está envolvida na regulação de uma amplitude de funções celulares, incluindo resistência ao estresse oxidativo. Estudos mostraram que QSMs de *Pseudomonas aeruginosa* são necessários para uma ótima resistência ao peróxido de hidrogênio e ao fenazina metossulfato, agente gerador de ânion superóxido (BJARNSHOLT; JENSEN; BURMOLLE; HENTZER *et al.*, 2005). Como a resposta a agentes ciclo-redox parece ser distinta da resposta ao peróxido de hidrogênio (WESTWATER; BALISH; SCHOFIELD, 2005), os dados obtidos na figura 12 sugerem que o CM de *C. neoformans* induz uma resistência a menadiona, agente gerador de ânio superóxido, o que sugere que o CM tenha uma atividade de indução de tolerância a diversas formas de oxigênio reduzido.

4.4 TRATAMENTO DO MEIO CONDICIONADO COM CALOR OU MUDANÇAS NO PH NÃO ALTERA A AÇÃO PROTETORA CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO.

Verificamos se a atividade do CM responsável por induzir o aumento na resistência ao peróxido de hidrogênio era sensível ao calor (120°C por 20 min), e a mudanças no pH (Figura. 13). Amostras de CM de *C. neoformans* foram alteradas nas seguintes formas: esterilização a 120°C durante 20 minutos; ou tiveram seu pH alterado de 5,6 para 2,5; ou ambas as situações. Os CMs alterados foram utilizados para resuspender culturas de células seguindo o protocolo pré-estabelecido nesse trabalho, sem qualquer outra alteração. Os resultados obtidos (Figura 13) demonstram que não houve diferença significativa entre o CM sem alteração e o CM com alterações. Esses dados sugerem que a atividade do CM que induz o aumento da resistência de *C. neoformans* provavelmente não é feita por uma proteína. Contudo, ainda há uma possibilidade do fator responsável pela atividade ser um peptídeo.

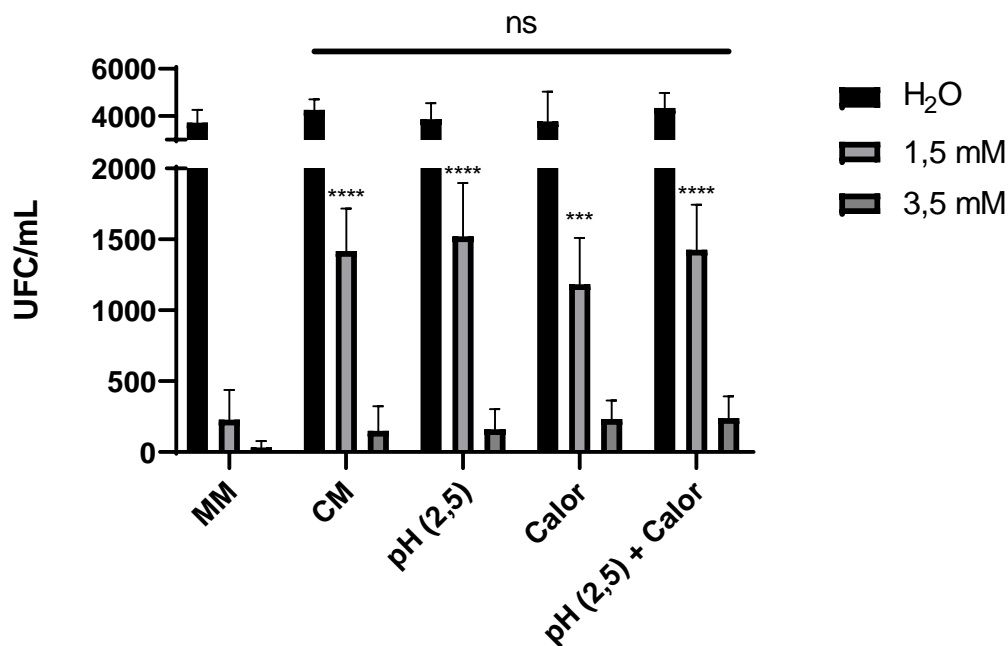


Figura 13. Meio condicionado de *C. neoformans* esterilizado ou acidificado não perde atividade protetora. Culturas de células crescidas durante a noite foram lavadas com PBS e resuspendidas com MM ou CM, ou CM previamente esterilizado ou acidificado ou ambos. Após interação por 90 min a 30°C, novas lavagens com PBS foram feitas e amostras passaram pelo desafio com peróxido de hidrogênio por 60 minutos a 30°C. Amostras foram plaqueadas em sabouraud sólido. As quantidades de sobreviventes estão expressas como médias \pm desvio padrão de triplicatas. Dados analisados pelo teste paramétrico 2way ANOVA. ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$; ns, não significante, para UFC/mL do grupo CM quando comparada com o grupo MM.

4.5 ÁCIDO PANTOTÊNICO TEM AÇÃO PARCIALMENTE PROTETORA PARA A TOXICIDADE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.

Como visto que o aumento da resistência ao peróxido de hidrogênio demonstrou ser densidade-dependente (Figura 10), verificamos se essa resistência correlaciona com o acúmulo de QSMs, que também regulam funções de forma densidade-dependente. Foi testado o efeito do ácido pantotênico (composto conhecido por atividade semelhante a QSMs em *C. neoformans*) na habilidade de resistir ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio. Os resultados indicaram que células tratadas com ácido pantotênico foram mais resistentes ao estresse oxidativo do que o controle (tratamento somente com MM), porém a suplementação do meio mínimo com o ácido pantotênico não restaurou a resistência ao H₂O₂ nos níveis observados com o CM (Figura 14). A inabilidade do

ácido pantotênico de mimetizar completamente as propriedades do meio condicionado, levanta a possibilidade que outros fatores possam estar envolvidos, atuando de forma coordenada para conferir uma maior resistência do fungo ao estresse oxidativo.

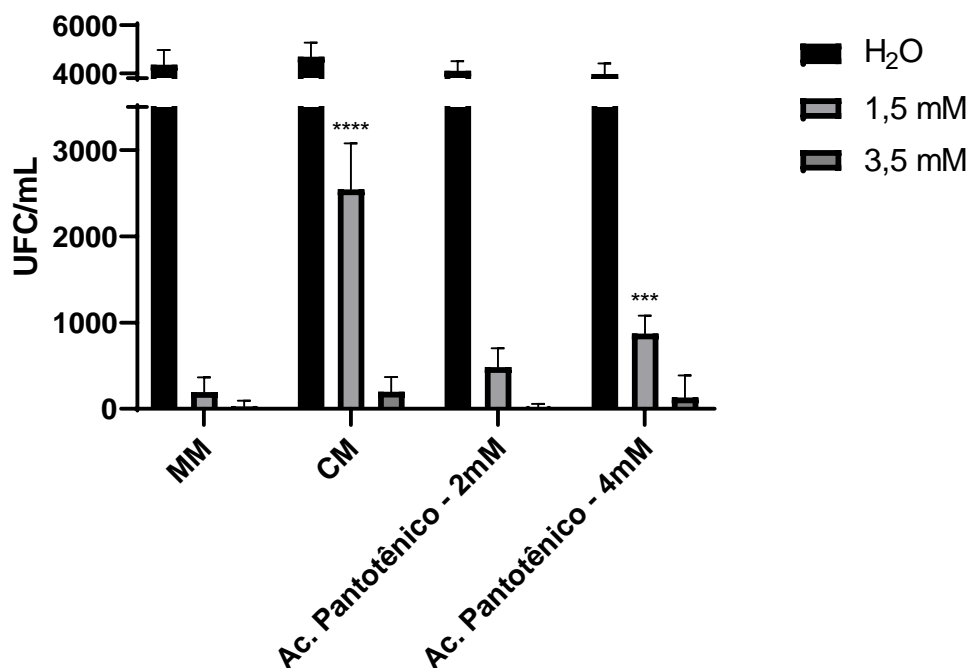


Figura 14. Culturas de *C. neoformans* pré-tratadas com meio condicionado (CM) ou MM suplementado com Ácido Pantotênico (2 mM ou 4 mM) e desafiadas com concentrações de H₂O₂. Células de *C. neoformans* crescidas durante a noite, lavadas e resuspendidas com MM ou CM ou MM suplementado com ácido pantotênico 2 mM ou 4 mM, e incubadas por 90 min a 30°C. Após o pré-tratamento amostras foram desafiadas com peróxido de hidrogênio por 60 minutos a 30°C. As quantidades de sobreviventes estão expressas como médias ± desvio padrão de triplicatas. Dados analisados pelo teste paramétrico 2way ANOVA. ***, P < 0,001; ****, P < 0,0001; para UFC/mL do grupo CM quando comparada com o grupo MM.

4.6 MEIO CONDICIONADO FRESCO CONFERE MAIOR RESISTÊNCIA AO ESTRESSOR OXIDATIVO.

Ao longo do projeto foi sendo observado uma queda na eficiência do meio condicionado em induzir uma resistência ao estressor oxidativo nas culturas de *C. neoformans*. O protocolo de produção e uso do meio condicionado estabelecido em (ALBUQUERQUE; NICOLA; NIEVES; PAES *et al.*, 2013) demonstra que o CM possui grande eficácia na indução da taxa de crescimento celular e da melanização de células de *C. neoformans*, mesmo após meses de armazenamento em temperatura

ambiente do meio condicionado liofilizado. Na figura 9 pode-se observar que a taxa de unidades formadoras de colônias após o tratamento com H_2O_2 é de aproximadamente 64,3% quando comparado com o controle que não teve tratamento com H_2O_2 , enquanto que na figura 13 essa mesma taxa é de ~33,2% quando relacionada com o controle.

Comparamos então a eficiência na indução da resistência ao estressor pelo meio condicionado liofilizado e armazenado, com a eficiência do meio condicionado recém filtrado e liofilizado, denominado “CM fresco”. O CM liofilizado que vinhamos utilizando foi armazenado em temperatura ambiente por aproximadamente três meses, enquanto que o “CM fresco” foi filtrado, liofilizado e utilizado no experimento dentro de um período de duas semanas. Na figura 15-A é possível observar que o CM recém produzido tem uma eficiência na indução da resistência ao H_2O_2 significativamente maior do que a eficiência do CM armazenado (63,2% e 48,3%, respectivamente). Contudo, quando avaliado a eficiência na indução da resistência contra a menadiona (figura 15-B), não houve uma diferença significativa quando comparado o CM recém produzido com o CM armazenado. Não obstante, é importante notar que o fator componente do CM que induz a resistência ao estresse de H_2O_2 teve uma menor eficiência após o armazenamento prolongado do CM liofilizado. Contudo, não foi possível estabelecer uma diferença significativa nos resultados obtidos no ensaio com menadiona (figura 15-B), possivelmente em razão da concentração de ânion superóxido gerado pela menadiona, o qual dá origem a outros radicais livres, e induz um estresse forte o suficiente para não ter uma diferença estatística observável entre o CM e o CM fresco.

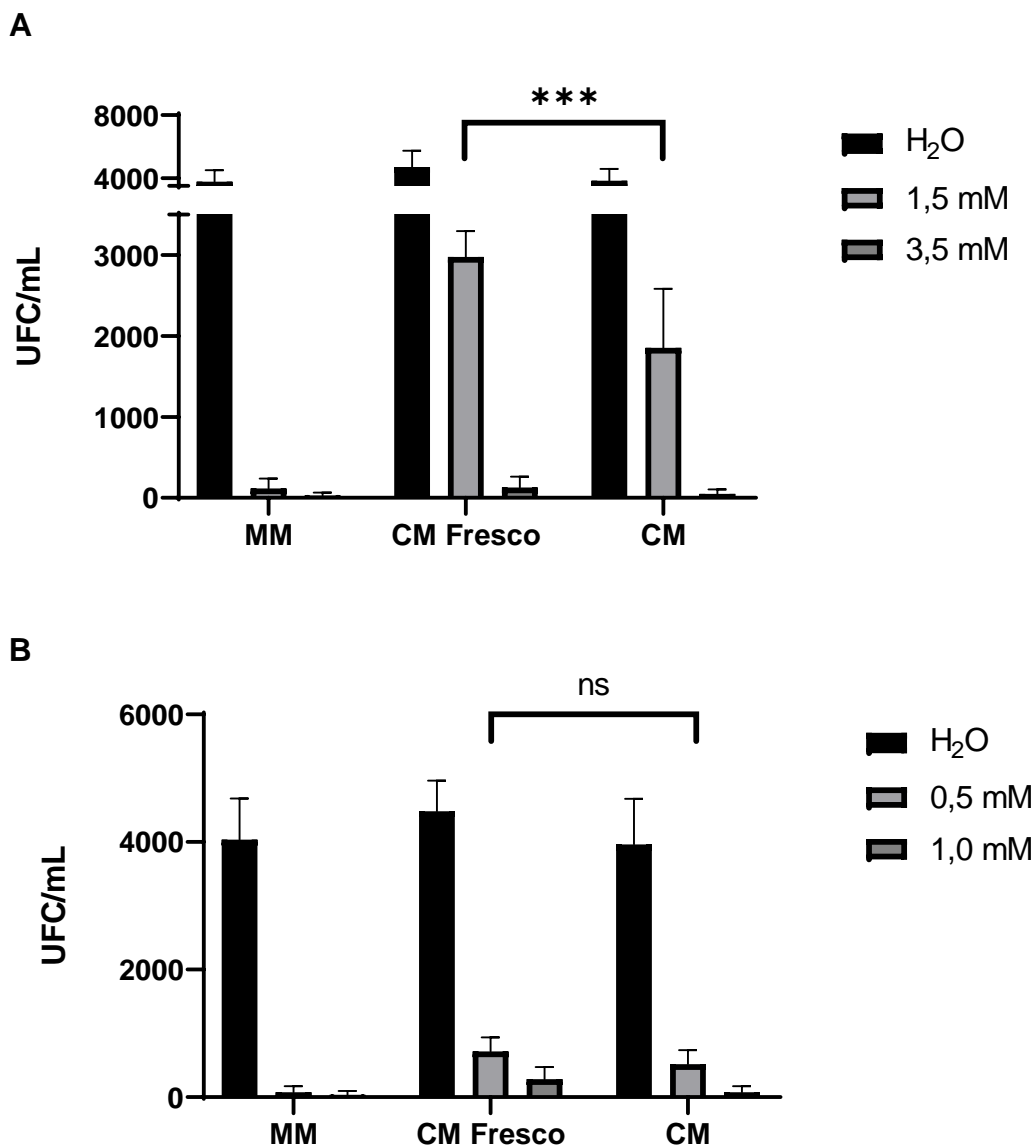


Figura 15. Culturas de *C. neoformans* tratadas com meio condicionado recém produzido tem maior eficiência contra H₂O₂. Culturas de células crescidas durante a noite foram lavadas com PBS e resuspendidas com MM ou CM (armazenado por ~3 meses), ou CM fresco (CM recém filtrado e liofilizado). Após interação por 90 min a 30°C, novas lavagens com PBS foram feitas e amostras foram desafiadas com H₂O₂ (A) ou Menadiona (B) por 60 minutos a 30°C. Amostras foram plaqueadas em sabouraud sólido. As quantidades de sobreviventes estão expressas como médias ± desvio padrão de triplicatas. Dados analisados pelo teste paramétrico 2way ANOVA. ***, P < 0,001; ns, não significante, para UFC/mL do grupo CM quando comparada com o grupo MM.

4.7 EFEITOS DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO CRESCIMENTO DAS CÉLULAS TRATADAS COM MEIO CONDICIONADO

Para identificar a existência de possíveis diferenças fenotípicas tanto na interação do *C. neoformans* com o CM quanto na resposta ao estresse oxidativo após essa interação, foi feito um ensaio de diluição seriada usando a levedura criptocócica H99. Não foi possível verificar uma diferença na sensibilidade ao crescimento quando leveduras foram crescidas no somente no SDA (Figura 16). Contudo, utilizando a concentração de 2 mM peróxido de hidrogênio com base no trabalho feito por LEIPHEIMER; BLOOM; CAMPOMIZZI; SALEI *et al.* (2019), a presença de um estressor oxidativo H₂O₂ no meio SDA resultou na nulidade do crescimento de colônias que interagiram com MM, enquanto que a cultura que interagiu com CM foi visualmente mais resistente ao estresse (Figura 16). Esses resultados sugerem que a interação das leveduras com moléculas de culturas de *C. neoformans* em fase estacionária, promovem uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo causado por H₂O₂ exógeno, auxiliando na capacidade de manter a replicação e crescimento das leveduras na presença do estressor.

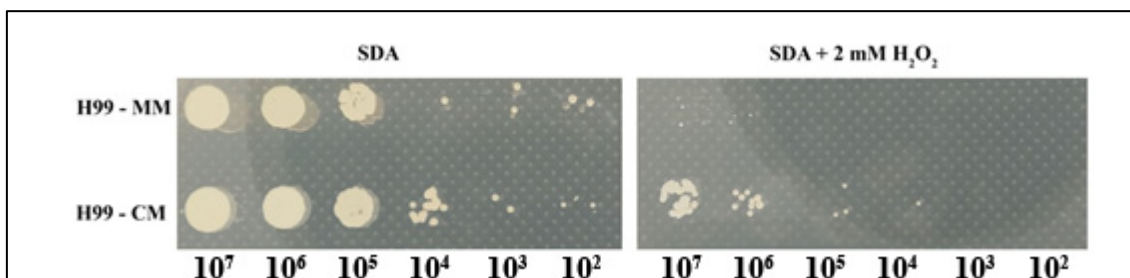


Figura 16. Ensaio de crescimento com diluição seriada em SDA contendo 2 mM H₂O₂ demonstrou uma diferença significativa na resistência de células tratadas com CM. Culturas de células H99 crescidas durante a noite foram tratadas com MM ou CM, e então diluídas seriadamente por 10. Foi inoculado 5 µl de cada cultura diluída em SDA ou SDA contendo 2 mM H₂O₂. Placas foram então incubadas a 30°C por 2 dias. A concentração celular inicial é de 1 x 10⁷ células/mL.

Um importante aspecto relacionado a virulência de *C. neoformans*, é a capacidade de sobreviver e se replicar dentro de células fagocíticas. A habilidade de sobrevivência de *C. neoformans* dentro do ambiente rigoroso do fagossomo sugere a presença de mecanismos capazes de não só neutralizar espécies moleculares reativas, como também de reparar danos celulares causados pelo estresse oxidativo e nitrosativo

(UPADHYA; CAMPBELL; DONLIN; AURORA *et al.*, 2013). Os resultados sugerem que a interação com as moléculas presentes no meio condicionado de culturas em alta densidade promoveu a capacidade de manter a replicação mesmo com a presença do H₂O₂ (Figura 16). Em *C. neoformans*, vários genes codificadores de enzimas do sistema de defesa antioxidante mostraram ter importância na resistência *in vitro* ao estresse oxidativo (MISSALL; LODGE; MCEWEN, 2004). Dentro desses genes, é extremamente importante verificar a expressão de Tsa1, por ser altamente conservado e essencial para resistência ao estresse oxidativo por peróxido (UPADHYA; CAMPBELL; DONLIN; AURORA *et al.*, 2013). Em *C. neoformans*, a deleção desse gene, linhagem tsa1Δ, é severamente sensível ao estresse oxidativo e possui baixa taxa de sobrevivência dentro de macrófagos (MISSALL; LODGE, 2005). *C. neoformans* também contém duas glutatonas peroxidases Gpx1 e Gpx2, ambas respondem diferentemente a vários estressores, porém Gpx2 é induzido na resposta ao estresse gerado por H₂O₂. Outras enzimas descritas com importantes papéis na resistência ao estresse oxidativo por *C. neoformans* incluem CuZn-superóxido dismutase citosólica (Sod1) (COX; HARRISON; MCDADE; TABORDA *et al.*, 2003), superóxido dismutase mitocondrial (Sod2) (GILES; BATINIC-HABERLE; PERFECT; COX, 2005), a citocromo c peroxidase (Ccp1) (GILES; PERFECT; COX, 2005), e a oxidase alternativa (Aox1) (AKHTER; MCDADE; GORLACH; HEINRICH *et al.*, 2003).

De forma complementar aos resultados obtidos no crescimento com diluição seriada, foram feitos ensaios com discos de difusão contendo H₂O₂. O trabalho de BOUKLAS; PECHUAN; GOLDMAN; EDELMAN *et al.* (2013) demonstrou que células mais velhas de *C. neoformans* tem maior resistência ao estresse oxidativo quando comparadas com células mais novas de *C. neoformans*. Contudo, os ensaios de disco de difusão que realizamos não demonstraram uma diferença visualmente significativa nos diâmetros das zonas de inibição das células que interagiram, ou não, com as moléculas do CM (Figura 17). Possivelmente, a diferença não foi alcançada devido a altíssima concentração de H₂O₂ (2% ou 0,5 M) para que se possa visualizar uma diferença diamétrica. Dessa maneira pretendemos repetir futuramente esse experimento utilizando diferentes concentrações do estressor.

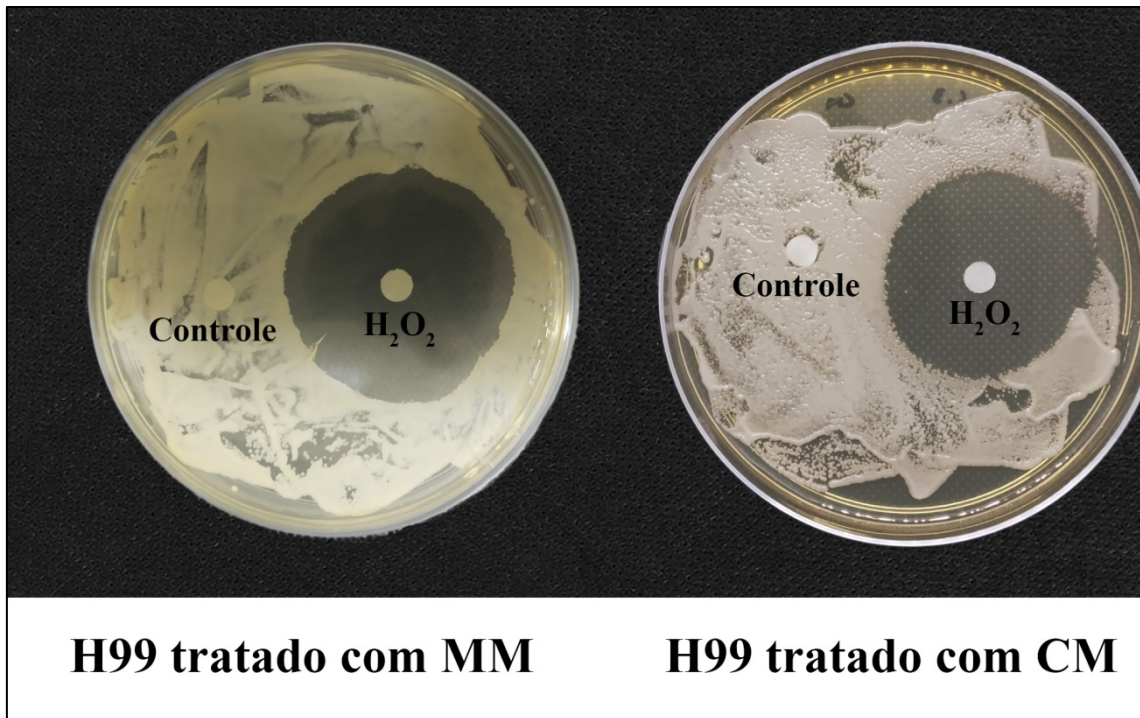


Figura 17. Ensaio de disco de difusão contendo H₂O₂ (2% ou 0,5 M) mostrou que células H99 em meio sabourad sólido não possuem diferenças no diâmetro das zonas de inibição. Cultura de células H99 crescidas durante a noite foram tratadas com MM ou com CM por 90 minutos, e subsequentemente semeadas em placas contendo SDA. Não houve diferença significativa na cultura tratada com MM e na cultura tratada com CM (halos com 1,20 cm e 0,966 cm de diâmetro, respectivamente).

5. PERSPECTIVAS

As seguintes metas são propostas para continuidade do trabalho:

1. Avaliar se pequenas quantidades de EROs no meio condicionado são os fatores adaptativos responsáveis pela resistência do *C. neoformans* ao H₂O₂;
2. Verificar expressão de genes antioxidantes na exposição ao meio condicionado;
3. Determinar se atividade do meio condicionado se mantém nos diferentes mutantes já conhecidos de *C. neoformans*;
4. Verificar individualmente a ação das moléculas presentes no CM, que já foram catalogadas pelo nosso grupo, na promoção da resistência ao estresse oxidativo, comparando-as com os resultados obtidos pela interação com o CM.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que o sobrenadante de culturas de *Cryptococcus neoformans* em fase estacionária tem a capacidade de induzir resistência a estressores oxidativos exógenos em culturas de *C. neoformans* com menor densidade celular. Culturas de células *C. neoformans* que entraram em contato com as moléculas presentes no sobrenadante de culturas *C. neoformans* em fase estacionária demonstraram maior resistência a estressores oxidativos exógenos, em comparação a culturas que não entraram em contato com esse sobrenadante.

Estudos anteriores demonstraram que o meio condicionado de culturas de *C. neoformans* em alta densidade celular tem a capacidade de induzir efeitos nos fatores de virulência de culturas *C. neoformans* em baixa densidade celular. A interação de 60 minutos das culturas em baixa densidade celular com o meio condicionado de culturas em alta densidade não induziu mudanças morfológicas observáveis nas colônias quando comparadas aos controles. Colônias que interagiram com o meio condicionado não apresentaram diferenças notáveis no formato das colônias, no diâmetro das colônias ou na pigmentação pela presença melanização, quando comparadas com as colônias que não interagiram com o meio condicionado.

Os resultados obtidos sugerem a possível presença de uma molécula *quorum sensing* ou de um metabólito de pequeno peso molecular com capacidade de induzir uma resposta antioxidante. Resultados obtidos indicam que o contato com o meio condicionado, antes do desafio com H₂O₂, disparou uma resposta adaptativa com capacidade antioxidante. Contudo, ainda é preciso avaliar a expressão de genes antioxidantes para caracterizar melhor esse mecanismo antioxidante pelo sobrenadante de culturas em fase estacionária.

É importante ressaltar que na literatura já existiam evidências de moléculas de sensorialmente de quórum induzindo um aumento na resistência a estressores oxidativos, porém somente em *C. albicans* e *S. cerevisiae*. De forma que o presente trabalho se torna relevante para caracterização da mecanismo *quorum sensing* em *C. neoformans*, tal qual para acrescentar informações ao mecanismo de *quorum sensing* em fungos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTER, S.; MCDADE, H. C.; GORLACH, J. M.; HEINRICH, G. *et al.* Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, 71, n. 10, p. 5794-5802, Oct 2003.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi--a review. **Med Mycol**, 50, n. 4, p. 337-345, May 2012.

ALBUQUERQUE, P.; NICOLA, A. M.; NIEVES, E.; PAES, H. C. *et al.* Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, 5, n. 1, p. e00986-00913, Dec 31 2013.

ALEM, M. A.; OTEEF, M. D.; FLOWERS, T. H.; DOUGLAS, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. **Eukaryot Cell**, 5, n. 10, p. 1770-1779, Oct 2006.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. **Current biology : CB**, 16, p. 2161-2165, 12/01 2006.

ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends Microbiol**, 22, n. 3, p. 120-127, Mar 2014.

ASLANYAN, L.; SANCHEZ, D. A.; VALDEBENITO, S.; EUGENIN, E. A. *et al.* The Crucial Role of Biofilms in *Cryptococcus neoformans* Survival within Macrophages and Colonization of the Central Nervous System. **J Fungi (Basel)**, 3, n. 1, Feb 24 2017.

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. 1999.

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P. O.; BURMOLLE, M.; HENTZER, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. **Microbiology**, 151, n. Pt 2, p. 373-383, Feb 2005.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr Opin Immunol**, 12, n. 1, p. 64-76, Feb 2000.

BOUKLAS, T.; PECHUAN, X.; GOLDMAN, D. L.; EDELMAN, B. *et al.* Old *Cryptococcus neoformans* cells contribute to virulence in chronic cryptococcosis. **mBio**, 4, n. 4, Aug 13 2013.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ, S. M. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, 4, n. 165, p. 165rv113, Dec 19 2012.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerg Infect Dis**, 4, n. 1, p. 71-83, Jan-Mar 1998.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Citeseer, 1998.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.-A. Virulence factors and their mechanisms of action: The view from a damage-response framework. **Journal of water and health**, 7 Suppl 1, p. S2-S18, 08/01 2009.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. **J Water Health**, 7 Suppl 1, p. S2-s18, 2009.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, 3, n. 4, p. 354-358, Aug 2000.

CHANG, A. L.; KANG, Y.; DOERING, T. L. Cdk8 and Ssn801 Regulate Oxidative Stress Resistance and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, 10, n. 1, Feb 12 2019.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, 20, n. 3, p. 507-544, v-vi, Sep 2006.

CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes Dev**, 20, n. 9, p. 1150-1161, May 1 2006.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J. *et al.* Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. 101, n. 14, p. 5048-5052, 2004.

CHRETIEN, F.; LORTHOLARY, O.; KANSAU, I.; NEUVILLE, S. *et al.* Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J Infect Dis**, 186, n. 4, p. 522-530, Aug 15 2002.

CHRISMAN, C. J.; ALBUQUERQUE, P.; GUIMARAES, A. J.; NIEVES, E. *et al.* Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS Pathog**, 7, n. 5, p. e1002047, May 2011.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, 87, p. 1-41, 2014.

COENJAERTS, F. E.; HOEPELMAN, A. I.; SCHARRINGA, J.; AARTS, M. *et al.* The Skn7 response regulator of *Cryptococcus neoformans* is involved in oxidative stress signalling and augments intracellular survival in endothelium. **FEMS Yeast Res**, 6, n. 4, p. 652-661, Jun 2006.

CORDERO, R. J. B.; CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Melanization in *Cryptococcus neoformans* Requires Complex Regulation. **mBio**, 11, n. 1, p. e03313-03319, 2020.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular aspects of medicine**, 22, n. 4-5, p. 217-246, 2001 Aug-Oct 2001.

COX, G. M.; HARRISON, T. S.; MCDADE, H. C.; TABORDA, C. P. *et al.* Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun**, 71, n. 1, p. 173-180, Jan 2003.

CRISSEY, J. T.; PARISH, L. C.; LANG, H. **Manual of medical mycology**. Blackwell Scientific, 1995. 0865423636.

DE KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infect Immun**, 68, n. 9, p. 4839-4849, Sep 2000.

DIAMOND, R. D.; BENNETT, J. E. Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages *in vitro*. **Infect Immun**, 7, n. 2, p. 231-236, Feb 1973.

DOERING, T. L.; NOSANCHUK, J. D.; ROBERTS, W. K.; CASADEVALL, A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Med Mycol**, 37, n. 3, p. 175-181, Jun 1999.

DU TOIT, A. Fungal Biology: A fungal quorum-sensing system. **Nat Rev Microbiol**, 14, n. 7, p. 404-405, Jul 2016.

ENGBRECHT, J.; NEALSON, K.; SILVERMAN, M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. **Cell**, 32, n. 3, p. 773-781, Mar 1983.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; NOVIKOFF, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infect Immun**, 68, n. 7, p. 4225-4237, Jul 2000.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **Trends in microbiology**, 9, p. 273-278, 07/01 2001.

GARCIA-RODAS, R.; CASADEVALL, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. *et al.* *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. **PLoS One**, 6, n. 9, p. e24485, 2011.

GILES, S. S.; BATINIC-HABERLE, I.; PERFECT, J. R.; COX, G. M. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. **Eukaryot Cell**, 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2005.

GILES, S. S.; PERFECT, J. R.; COX, G. M. Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genet Biol**, 42, n. 1, p. 20-29, Jan 2005.

GILES, S. S.; STAJICH, J. E.; NICHOLS, C.; GERRALD, Q. D. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. **Eukaryot Cell**, 5, n. 9, p. 1447-1459, Sep 2006.

GOLDMAN, D. L.; KHINE, H.; ABADI, J.; LINDENBERG, D. J. *et al.* Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, 107, n. 5, p. E66, May 2001.

GÓMEZ, B.; NOSANCHUK, J. Melanin and fungi. **Current opinion in infectious diseases**, 16, p. 91-96, 05/01 2003.

GUPTA, A. K.; TOMAS, E. New antifungal agents. **Dermatol Clin**, 21, n. 3, p. 565-576, Jul 2003.

HAKIM, J. G.; GANGAIDZO, I. T.; HEYDERMAN, R. S.; MIELKE, J. *et al.* Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. **Aids**, 14, n. 10, p. 1401-1407, Jul 7 2000.

HEITMAN, J.; MICROBIOLOGY, A. S. f.; CASADEVALL, A.; KOZEL, T. R. *et al.* **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast.** ASM Press, 2011. 9781555815011.

HOGAN, D.; WHEELER, R. T. The complex roles of NADPH oxidases in fungal infection. **Cell Microbiol**, 16, n. 8, p. 1156-1167, Aug 2014.

HOGAN, D. A. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. **Eukaryot Cell**, 5, n. 4, p. 613-619, Apr 2006.

HOMER, C. M.; SUMMERS, D. K.; GORANOV, A. I.; CLARKE, S. C. *et al.* Intracellular Action of a Secreted Peptide Required for Fungal Virulence. **Cell Host Microbe**, 19, n. 6, p. 849-864, Jun 8 2016.

HORNBY, J. M.; JACOBITZ-KIZZIER, S. M.; MCNEEL, D. J.; JENSEN, E. C. *et al.* Inoculum size effect in dimorphic fungi: extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. **Appl Environ Microbiol**, 70, n. 3, p. 1356-1359, Mar 2004.

HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J. *et al.* Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl Environ Microbiol**, 67, n. 7, p. 2982-2992, Jul 2001.

IDNURM, A.; REEDY, J. L.; NUSSBAUM, J. C.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryot Cell**, 3, n. 2, p. 420-429, Apr 2004.

IGREJA, R. P.; SANTOS LAZÉRA, M. D.; WANKE, B.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C. *et al.* Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Medical Mycology**, 42, n. 3, p. 229-238, 2004.

IMLAY, J. A. Pathways of Oxidative Damage. 57, n. 1, p. 395-418, 2003.

JACOBSON, E. S.; HONG, J. D. Redox buffering by melanin and Fe(II) in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, 179, n. 17, p. 5340-5346, Sep 1997.

JAMIESON, D. J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. **J Bacteriol**, 174, n. 20, p. 6678-6681, Oct 1992.

JANUSZ, G.; PAWLIK, A.; SWIDERSKA-BUREK, U.; POLAK, J. *et al.* Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. **Int J Mol Sci**, 21, n. 3, Jan 31 2020.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cell Microbiol**, 15, n. 3, p. 403-411, Mar 2013.

KIM, S.-R.; YEON, K.-M. Quorum Sensing as Language of Chemical Signals. *In: Fundamentals of Quorum Sensing, Analytical Methods and Applications in Membrane Bioreactors*, 2018. p. 57-94. (Comprehensive Analytical Chemistry).

KIM, S. H.; KIM, B.; YADAVALLI, V. K.; PISHKO, M. V. Encapsulation of enzymes within polymer spheres to create optical nanosensors for oxidative stress. **Anal Chem**, 77, n. 21, p. 6828-6833, Nov 1 2005.

KÜGLER, S.; SEBGHATI, T. S.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. 97, n. 16, p. 8794-8798, 2000.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M. *et al.* Tratado de Micologia Médica Lacaz. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 44, 10/01 2002.

LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F.; ROCHA, J. D. B.; NUNES, M. P.; OLIVEIRA, P. A. V. *et al.* Involvement of the capsular GalXM-induced IL-17 cytokine in the control of *Cryptococcus neoformans* infection. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 16378, 2018/11/06 2018.

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**, 64, n. 3, p. 591-601, 2007/05/01 2007.

LEE, S. C.; KRESS, Y.; ZHAO, M.-L.; DICKSON, D. W. *et al.* *Cryptococcus neoformans* survive and replicate in human microglia. 73, n. 6, p. 871-879, 1995.

LEIPHEIMER, J.; BLOOM, A. L. M.; CAMPOMIZZI, C. S.; SALEI, Y. *et al.* Translation Regulation Promotes Oxidative Stress Resistance in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. 2019.

LEV, S.; DESMARINI, D.; CHAYAKULKEEREE, M.; SORRELL, T. C. *et al.* The Crz1/Sp1 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity. **PLoS One**, 7, n. 12, p. e51403, 2012.

LEVITZ, S. M. Macrophage-*Cryptococcus* interactions. **Immunol Ser**, 60, p. 533-543, 1994.

LEVITZ, S. M.; NONG, S. H.; SEETOO, K. F.; HARRISON, T. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infect Immun**, 67, n. 2, p. 885-890, Feb 1999.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infect Genet Evol**, 9, n. 4, p. 401-416, Jul 2009.

LINDELL, D. M.; BALLINGER, M. N.; MCDONALD, R. A.; TOEWS, G. B. *et al.* Diversity of the T-cell response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun**, 74, n. 8, p. 4538-4548, Aug 2006a.

LINDELL, D. M.; BALLINGER, M. N.; MCDONALD, R. A.; TOEWS, G. B. *et al.* Immunologic homeostasis during infection: coexistence of strong pulmonary cell-mediated immunity to secondary *Cryptococcus neoformans* infection while the primary infection still persists at low levels in the lungs. **J Immunol**, 177, n. 7, p. 4652-4661, Oct 1 2006b.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends Microbiol**, 17, n. 9, p. 406-413, Sep 2009.

LIU, L.; TEWARI, R. P.; WILLIAMSON, P. R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. **Infection and immunity**, 67, n. 11, p. 6034-6039, 1999/11// 1999.

MAY, R. C. Custom-Made Quorum Sensing for a Eukaryote. **Dev Cell**, 37, n. 5, p. 391-392, Jun 6 2016.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K. Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, 4, n. 2, p. 487-489, Feb 2005.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K.; MCEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryot Cell**, 3, n. 4, p. 835-846, Aug 2004.

MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. **Redox Rep**, 5, n. 5, p. 277-285, 2000.

MORETTI, M. L.; RESENDE, M. R.; LAZÉRA, M. S.; COLOMBO, A. L. *et al.* Guidelines in cryptococcosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, 41, n. 5, p. 524-544, Sep-Oct 2008.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiol**, 5, n. 4, p. 203-223, Apr 2003.

NOVERR, M. C.; WILLIAMSON, P. R.; FAJARDO, R. S.; HUFFNAGLE, G. B. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. **J Clin Invest**, 114, n. 12, p. 1693-1699, 2004.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clin Microbiol Rev**, 25, n. 3, p. 387-408, Jul 2012.

OST, K. S.; O'MEARA, T. R.; HUDA, N.; ESHER, S. K. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* Alkaline Response Pathway: Identification of a Novel Rim Pathway Activator. **PLOS Genetics**, 11, n. 4, p. e1005159, 2015.

PADDER, S. A.; PRASAD, R.; SHAH, A. H. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. **Microbiol Res**, 210, p. 51-58, May 2018.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 45, n. 3, p. 395-404, Sep 1 2005.

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. **Clin Infect Dis**, 50, n. 3, p. 291-322, Feb 1 2010.

RAJASINGHAM, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infect Dis**, 17, n. 8, p. 873-881, Aug 2017.

ROCA, M. G.; ARLT, J.; JEFFREE, C. E.; READ, N. D. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryot Cell**, 4, n. 5, p. 911-919, May 2005.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2, n. 11, Nov 1 2012.

SANFELICE, F. J. A. I. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. 4, p. 463-495, 1894.

SAVILLE, S. P.; LAZZELL, A. L.; MONTEAGUDO, C.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. **Eukaryot Cell**, 2, n. 5, p. 1053-1060, Oct 2003.

SEMIGHINI, C. P.; HORNBY, J. M.; DUMITRU, R.; NICKERSON, K. W. *et al.* Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. **Mol Microbiol**, 59, n. 3, p. 753-764, Feb 2006.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 35, p. 1136-1144, 2009.

SOBEL, J. D.; VAZQUEZ, J. A. Fungal infections of the urinary tract. **World J Urol**, 17, n. 6, p. 410-414, Dec 1999.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol**, 39, n. 2, p. 155-168, Apr 2001.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, 31, n. 2, p. 47-60, Feb 2014.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes Infect**, 5, n. 7, p. 667-675, Jun 2003.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 26, p. 15245-15250, Dec 18 2001.

SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. **Sabouraudia**, 14, n. 3, p. 313-317, Nov 1976.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 5, p. 3165-3170, Mar 5 2002.

UPADHYA, R.; CAMPBELL, L. T.; DONLIN, M. J.; AURORA, R. *et al.* Global transcriptome profile of *Cryptococcus neoformans* during exposure to hydrogen peroxide induced oxidative stress. **PLoS One**, 8, n. 1, p. e55110, 2013.

UPADHYA, R.; KIM, H.; JUNG, K.-W.; PARK, G. *et al.* Sulphiredoxin plays peroxiredoxin-dependent and -independent roles via the HOG signalling pathway in *Cryptococcus neoformans* and contributes to fungal virulence. **Molecular Microbiology**, 90, n. 3, p. 630-648, 2013/11/01 2013.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot Cell**, 9, n. 6, p. 835-846, Jun 2010.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect Immun**, 62, n. 7, p. 3004-3007, Jul 1994.

WARRIS, A.; BALLOU, E. R. Oxidative responses and fungal infection biology. **Semin Cell Dev Biol**, 89, p. 34-46, May 2019.

WERNER-WASHBURNE, M.; BRAUN, E.; JOHNSTON, G. C.; SINGER, R. A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Rev**, 57, n. 2, p. 383-401, Jun 1993.

WESTWATER, C.; BALISH, E.; SCHOFIELD, D. A. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. **Eukaryot Cell**, 4, n. 10, p. 1654-1661, Oct 2005.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Front Biosci**, 2, p. e99-107, Nov 1 1997.

WONGSUK, T.; PUMESAT, P.; LUPLERTLOP, N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **J Basic Microbiol**, 56, n. 5, p. 440-447, May 2016.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S. *et al.* The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, 68, p. 133-216, 2009 2009.