

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**

# **“Caracterização da resposta de fungos patogênicos a diferentes condições de interação intra e inter- reinos”**

**Lorena da Silveira Derengowski**

**Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 2011

Derengowski, Lorena da Silveira

Caracterização da resposta de fungos patogênicos a diferentes condições de interação intra e inter-domínios/ Lorena da Silveira Derengowski

Brasília, 2011

176 pags.

Tese (Doutorado em Biologia Molecular)

Universidade de Brasília/ Instituto de Biologia / Departamento de Biologia Celular

Orientador: Ildinete Silva Pereira

Referências bibliográficas: 314

1. Fungos Patogênicos 2. *Quorum-Sensing* 3. Biofilme 4. Propranolol 5. Transcritoma 6. Interação hospedeiro-patógeno I. Silva-Pereira, Ildinete. II. UnB, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Doutorado em Biologia Molecular III. Bases moleculares de interações inter e intra-domínios envolvendo fungos patogênicos humanos

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, e no Laboratório de Microbiologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia do *Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University* sob orientação da Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira e co-orientação do Prof. Dr. Arturo Casadevall.

Lorena da Silveira Derengowski

**Caracterização da resposta de fungos patogênicos a diferentes condições de interação  
intra e inter-domínios.**

Brasília, 20 de maio de 2011.

---

**Orientador:** Dra Ildinete Silva Pereira, Universidade de Brasília (UnB)

---

**Examinador externo:** Dr. Carlos P. Taborda, Universidade de São Paulo (USP)

---

**Examinador externo:** Dr. Márcio Rodrigues, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

---

**Examinador interno:** Dra Andrea Q. Maranhão, Universidade de Brasília (UnB)

---

**Examinador interno:** Dr. Aldo H. Tavares, Universidade de Brasília (UnB)

---

**Suplente:** Dra Patrícia Albuquerque, Universidade de Brasília (UnB)

---

**Suplente:** Dra Simoneide Silva, Universidade de Brasília (UnB)

Aos pequeninos seres, símbolos da simplicidade Divina. Fornecedores de alimentos para o corpo e devaneios para a alma. De natureza contraditória, algumas vezes senhores da devastação, outras esperança de salvação. Aos fascinantes microrganismos!

## **Agradecimentos**

Aos **meus pais, Ana Heloísa e Vitor**, pelo incentivo incansável que me fortaleceu para a realização de mais um sonho. Só tenho a agradecer a todas as oportunidades que vocês me ofereceram e ao amor incondicional que vocês sempre demonstraram! Indiretamente, vocês são responsáveis por cada parágrafo desse trabalho. Amo vocês!

À querida professora **Ildinete**, pelos bons ensinamentos que adquiri de uma grande orientadora, e pelas sempre divertidas conversas que pude desfrutar ao lado de uma grande amiga. Trabalhar ao seu lado foi bastante importante na definição de minhas atitudes tanto profissionais quanto pessoais. Obrigada por ser um exemplo para mim!

Ao professor **Arturo Casadevall**, pela oportunidade maravilhosa, essencial para meu crescimento como pesquisadora. *Thank you for the wonderful oppportunity!*

Ao meu namorado **Felipe**, pelo amor e pelo companheirismo! Em muitos momentos de tensão, suas palavras trouxeram o alívio. Obrigada pela presença constante, mesmo que em alguns momentos à distância. Te amo!

À querida professora e amiga **Cynthia**, pelas sempre pertinentes sugestões e pelos inúmeros auxílios prestados, seja revisando texto, seja propondo novos experimentos. E, não menos importante, agradeço a ti, Cynthia, pelos bons momentos de descontração e pela companhia sempre tão prazerosa!

Aos pesquisadores **Márcio Rodrigues, Carlos Taborda, Aldo Tavares, Andrea Maranhão, Patrícia Albuquerque, Simoneide Silva**, pelo aceite em compor minha banca.

Aos professores **Márcio Poças, Andrea Maranhão, Marcelo Brígido, Anamelia, Renato Resende e Loreny Giugliano**, por todos os ensinamentos e pela disposição em me ajudar sempre que necessário.

À todos os amigos do **laboratório 3**, em especial ao **Aldo, Thiago, Calli, Eveline e Marciano**, pelos conselhos, idéias, artigos, e, principalmente, pela gostosa companhia. E aos amigos do **laboratório 4**, **Marcus e Larissa**, pela ajuda sempre que necessária e pelas agradáveis conversas.

Aos amigos do **Casadevall's lab**, em especial à **Carol, Radamés, Fernanda, Alena, André, Patty, Allan, Antônio, Johanna, Mônica, Rocio e Julie**, por me acolherem tão bem em uma terra nova e estranha, e por me ajudarem sempre, dentro e fora do laboratório! E aos grandes amigos que fiz nos EUA, **Carol, Laura, Fernanda, Rada, Allan, Mari e Leo**. Foi muito bom conhecer e conviver com todos vocês! Vocês animaram a minha estada na Terra do Tio Sam! Espero que em breve possamos tomar mais algumas cervejas e/ou caipirinhas juntos!

A **todos os demais professores e colegas da BioMol**. Obrigada por todo o auxílio, pelas discussões, comentários e pelo agradável convívio!

Aos **amigos da Microbiologia**, em especial ao **Alex**, pelas idéias frutíferas e pelos bate-papos fora de hora.

Aos funcionários do laboratório, **Fátima, Dona Ivonildes e Thompson**, e do departamento, **Ana e Daniel**, pela presteza e disposição em me ajudar quando necessário!

A todos os **meus familiares**, em especial à **Nathalia, Vó Nair, Vô Marcellino, Vó Diva (in memoriam)**, tios (em especial ao tio **Fábio**), tias e primos (em especial ao **Reynaldo**), e aos meus “sogros”, **Adelaide e Zé**, pelo carinho e apóio de sempre!

Aos meus grandes amigos do coração, **Barbara, Tella, Rafa, Rê, Nádia e Carol**, pela bela amizade que vem se fortalecendo a cada ano. Obrigada pelos divertidos momentos de ócio! Vocês são pessoas muito especiais na minha vida!

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

# Índice

<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xv</b>
<b>Resumo</b>	<b>xvii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xviii</b>
<b>1. Introdução e Justificativa</b>	<b>1</b>
1.1 Fungos Patogênicos	2
1.2 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a Paracoccidioidomicose	3
1.3 <i>Candida albicans</i> e a Candidíase	7
1.3.1. Formação de biofilmes por <i>Candida albicans</i>	10
1.3.2. <i>Quorum-sensing</i> em <i>Candida albicans</i> e outros fungos	12
1.3.3. Comunicação entre microrganismos e células hospedeiras	15
1.4 <i>Cryptococcus neoformans</i> e a Criptococose	16
1.4.1. Fatores de virulência em <i>Cryptococcus neoformans</i>	20
1.4.2. Origem e manutenção da virulência em <i>C. neoformans</i>	23
<b>2. Objetivos</b>	<b>26</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>29</b>
3.1 Linhagens celulares e manutenção	
3.1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	30
3.1.2. <i>Candida albicans</i>	30
3.1.3. <i>Cryptococcus neoformans</i>	30
3.1.4. Macrófagos murinos J774.1	30
3.1.5. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	31
3.2 Preparo de soluções	
3.2.1. Tampões	31
3.2.2. Solução de farnesol	31
3.2.3. Soluções de propranolol e metoprolol	32

3.2.4. Soluções livres de RNase	32
3.1.5. Soluções para eletroforese em géis de agarose	32
3.3 Análise dos efeitos do farnesol em <i>P. brasiliensis</i>	
3.3.1. Efeito do farnesol no crescimento de <i>P. brasiliensis</i>	33
3.3.2. Efeito do farnesol na viabilidade de <i>P. brasiliensis</i>	33
3.3.3. Efeito do farnesol no dimorfismo de <i>P. brasiliensis</i>	34
3.3.4. Efeito do farnesol na permeabilidade das células de <i>P. brasiliensis</i>	35
3.3.5. Efeito do farnesol nas estruturas citoplasmáticas e na parede celular de <i>P. brasiliensis</i>	35
3.3.6. Avaliação dos efeitos do meio condicionado de <i>C. albicans</i> na morfologia de <i>P. brasiliensis</i>	36
3.3.7. Ensaio preliminares para verificação da identidade química da molécula presente no meio condicionado de <i>C. albicans</i> que inibe a morfogênese de <i>P. brasiliensis</i>	36
3.3.8. Análise estatística dos resultados	36
3.4. Análise dos efeitos de propranolol na formação de biofilme de <i>C. albicans</i>	
3.4.1. Efeito do propranolol na morfologia de <i>C. albicans</i>	37
3.4.2. Efeito do propranolol na adesão de <i>C. albicans</i> a superfícies abióticas	37
3.4.3. Efeito do propranolol na adesão de <i>C. albicans</i> a células epiteliais	37
3.4.4. Efeito do propranolol na formação de biofilmes por <i>C. albicans</i>	38
3.4.5. Efeito do propranolol em diferentes tempos de desenvolvimento do biofilme de <i>C. albicans</i>	39
3.4.6. Análise do padrão de expressão gênica de <i>C. albicans</i> em resposta ao propranolol	39
3.4.7. Análise estatística dos resultados	41
3.5. Comparação do transcrito de <i>C. neoformans</i> quando na interação com amebas em macrófagos murinos	
3.5.1. Análise da cinética de internalização de leveduras de <i>C. neoformans</i> por amebas e macrófagos murinos	42
3.5.2. Infecção <i>ex vivo</i> de amebas em macrófagos murinos com leveduras de <i>C. neoformans</i>	42

3.5.3. Extração de RNA total de leveduras de <i>C. neoformans</i> internalizadas	43
3.5.4. Microarranjos de cDNA	44
3.5.5. Validação por RT-PCR em tempo real de genes diferencialmente expressos	47
3.5.6. Infecção de <i>Galleria mellonella</i> com linhagens de <i>C. neoformans</i>	48
3.5.7. Infecção intratraqueal de camundongos com <i>C. neoformans</i>	49
3.5.8. Coloração <i>India ink</i> para mensuração de tamanho de cápsula	49
3.5.9. Curva de crescimento de linhagens de <i>C. neoformans</i> em diferentes fontes de carbono	50
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Efeito do farnesol, uma molécula de <i>quorum-sensing</i> de <i>Candida albicans</i>, no crescimento e na morfogênese de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b>	<b>52</b>
4.1.1. Efeito do farnesol no crescimento e na viabilidade de <i>P. brasiliensis</i>	53
4.1.2. Efeito do farnesol na morfogênese de <i>P. brasiliensis</i>	55
4.1.3. Efeito do farnesol na integridade de estruturas celulares de <i>P. brasiliensis</i>	59
4.1.4. Conclusão	63
<b>4.2 Efeito do propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, na morfogênese e formação de biofilmes por <i>Candida albicans</i></b>	<b>65</b>
4.2.1. Efeito do propranolol na morfogênese de <i>C. albicans</i>	65
4.2.2. Efeito do propranolol na formação de biofilmes de <i>C. albicans</i>	66
4.2.3. Efeito do propranolol na adesão de <i>C. albicans</i> a superfícies abióticas e bióticas	71
4.2.4 Efeito do propranolol na modulação da expressão de genes que codificam adesinas de <i>C. albicans</i>	73
4.2.5. Conclusão	75
<b>4.3 Comparação do transcrito de <i>C. neoformans</i> quando na interação com amebas e macrófagos murinos</b>	<b>76</b>
4.3.1. Cinética de internalização de leveduras de <i>C. neoformans</i> por amebas e macrófagos murinos	77

4.3.2. Extração de RNA total de <i>C. neoformans</i> internalizado por amebas e macrófagos	79
4.3.3. Identificação e categorização dos genes de <i>C. neoformans</i> cuja expressão foi modulada após internalização por amebas e macrófagos murinos	80
4.3.4. Validação dos dados do microarranjo por RT-PCR em tempo real	86
4.3.5. Discussão dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjo	88
a) Genes relacionados ao transporte de íons e pequenas moléculas	88
b) Genes relacionados ao metabolismo adaptado às condições de estresse nutricional	90
c) Genes relacionados ao estresse oxidativo e à cadeia de transporte de elétrons	95
d) Genes relacionados ao estresse térmico	98
e) Genes relacionados à maquinaria de transcrição/tradução	100
f) Genes relacionados à biossíntese de ergosterol e síntese de parede	102
g) Genes relacionados à virulência	104
4.3.6. Avaliação do papel do transportador de açúcar CNAG_05662 na virulência de <i>C. neoformans</i>	106
4.3.7. Conclusão	116
<b>Perspectivas</b>	<b>118</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>120</b>
<b>Anexos</b>	<b>144</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Etapas do processo de formação de biofilme por <i>C. albicans</i> .	11
<b>Figura 2.</b> Ciclo infeccioso de <i>C. neoformans</i> .	19
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do ensaio de microarranjo utilizando-se o <i>3DNA Array 350 Kit</i> .	46
<b>Figura 4.</b> Farnesol exerce efeito fungicida em <i>P. brasiliensis</i> .	54
<b>Figura 5.</b> Efeito do farnesol na filamentação de <i>P. brasiliensis</i> .	57
<b>Figura 6.</b> Efeito do farnesol no processo de transição de micélio para levedura em <i>P. brasiliensis</i>	58
<b>Figura 7.</b> Efeito de diferentes concentrações do meio condicionado (CM) de <i>C. albicans</i> no dimorfismo de <i>P. brasiliensis</i> .	59
<b>Figura 8.</b> Microscopia de fluorescência de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> e <i>C. albicans</i> coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio.	60
<b>Figura 9.</b> Ultraestrutura de células de <i>P. brasiliensis</i> tratadas com diferentes concentrações de farnesol.	62
<b>Figura 10.</b> Morfologia de colônias de <i>C. albicans</i> crescidas em meio YPD ágar suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB 20%) na ausência (A) ou na presença (B) de 750 µM de propranolol.	66
<b>Figura 11.</b> Efeito do propranolol na formação de biofilme de <i>C. albicans</i> .	67
<b>Figura 12.</b> Inibição da formação de biofilme por células de <i>C. albicans</i> cultivadas em diferentes concentrações de propranolol por 24h.	68
<b>Figura 13.</b> Efeito do propranolol ao longo do desenvolvimento do biofilme de <i>C. albicans</i> .	69
<b>Figura 14.</b> Efeito do propranolol no biofilme maduro de <i>C. albicans</i> .	70
<b>Figura 15.</b> Efeito do metoprolol na formação de biofilme de <i>C. albicans</i> .	71
<b>Figura 16.</b> Propranolol inibe a adesão de células de <i>C. albicans</i> a superfícies abióticas.	72
<b>Figura 17.</b> Propranolol inibe a adesão de <i>C. albicans</i> a células epiteliais.	73
<b>Figura 18.</b> Ensaio de fagocitose de <i>C. neoformans</i> por macrófagos murinos e amebas.	78

<b>Figura 19.</b> Perfil eletroforético do RNA total extraído do fungo <i>C. neoformans</i> após ser co-cultivado com amebas <i>A. castellanii</i> por 6 h.	79
<b>Figura 20.</b> Categorização dos genes de <i>C. neoformans</i> cuja expressão foi modulada quando do co-cultivo com ameba <i>A. castellanii</i> por 6 h.	81
<b>Figura 21.</b> Categorização dos genes de <i>C. neoformans</i> cuja expressão foi modulada quando do co-cultivo com macrófagos murinos por 6 h.	82
<b>Figura 22.</b> Validação por PCR em tempo real dos dados do microarranjo.	87
<b>Figura 23.</b> Modulação de vias metabólicas de <i>C. neoformans</i> após interação com células fagocíticas.	92
<b>Figura 24.</b> Curva de crescimento do isolado mutante M1 e do isolado parental H99 de <i>C. neoformans</i> .	108
<b>Figura 25.</b> Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> após infecção com a linhagem mutante M1 e a linhagem parental H99 de <i>C. neoformans</i> .	108
<b>Figura 26.</b> Curva de sobrevivência de camundongos Balb/C após infecção intratraqueal com a linhagem mutante M1 e a linhagem parental H99 de <i>C. neoformans</i> .	109
<b>Figura 27.</b> Tamanho do corpo celular e da cápsula dos isolados M1 e H99 de <i>C. neoformans</i> .	110
<b>Figura 28.</b> Curva de crescimento dos isolados M1 e H99 de <i>C. neoformans</i> em diferentes fontes de carbono.	112
<b>Figura 29.</b> Verificação do crescimento dos isolados M1 e H99 de <i>C. neoformans</i> em glicose, xilose e manitol.	113
<b>Figura 30.</b> Curva de crescimento dos isolados M1 e H99 de <i>C. neoformans</i> em diferentes póliois como única fonte de carbono.	114

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos para <i>C. albicans</i> utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.	41
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos para <i>C. neoformans</i> utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.	47
<b>Tabela 3.</b> Efeito do propranolol nos níveis de expressão de genes que codificam as adesinas ALS1, ALS3 e HWP1 de <i>C. albicans</i> .	74
<b>Tabela 4.</b> Genes de <i>C. neoformans</i> cuja modulação foi similar quando da interação do fungo com macrófagos murinos e amebas.	83
<b>Tabela 5.</b> Genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram modulação diferente em resposta à interação do fungo com macrófagos murinos e amebas.	85
<b>Tabela 6.</b> Análise de similaridade da seqüência protéica predita para o transportador de açúcar de <i>C. neoformans</i> utilizando-se ferramentas de bioinformática .	111

## Lista de abreviaturas

°C	Graus Celsius
cDNA	Seqüência de DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Grama
g	Força gravitacional
h	Hora
L	Litro
log	logarítmico
M	Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ng	Nanograma
OD	Densidade ótica
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	peso/volume
RNA	Ácido ribonucléico

RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa - Reação em cadeia da polimerase
SDS	Sódio dodecil sulfato
TEB	Tampão Tris-EDTA-borato
Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
v	Volume
V	Volts
YPD	Meio de cultura “Yeast-Peptide-Dextrose”
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
%	Por Cento

## Resumo

Nas últimas décadas, a relevância clínica do Reino Fungi vem aumentando, principalmente em virtude da maior incidência de micoses sistêmicas e do número limitado de fármacos eficazes no tratamento de infecções fúngicas. Dentre os fungos de importância médica podemos destacar o fungo dimórfico e oportunista *Candida albicans*, o qual é capaz de infectar uma ampla gama de tecidos, além de ser um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais. A maioria das septicemias nosocomiais causadas por esse microrganismo deve-se à formação de comunidades microbianas denominadas biofilmes. A formação de biofilme confere ao patógeno maior resistência a terapias antifúngicas e às defesas do hospedeiro. Nesse contexto, avaliamos o efeito do propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, na formação do biofilme de *C. albicans*. Os resultados indicaram que o propranolol desempenha um efeito inibitório na filamentação e na adesão de *C. albicans* a superfícies, inibindo assim a formação do biofilme por esse fungo. A inibição da formação de biofilmes por *C. albicans* também é mediada pelo farnesol, uma molécula autoindutora produzida por esse patógeno. Nesse trabalho foi também demonstrado o potencial antimicrobiano do farnesol no fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, o qual é descrito como o agente etiológico da paracoccidioidomicose. Nossos resultados mostraram que o farnesol desempenha um significativo efeito fungicida em *P. brasiliensis*, provavelmente por desencadear a degradação de organelas intracelulares. Além disso, o farnesol, assim como o sobrenadante de uma cultura crescida de *C. albicans*, inibem o processo de transição morfológica de *P. brasiliensis*, sugerindo um possível envolvimento dessa molécula em interações interespecíficas entre esses fungos. Os resultados obtidos tanto para o propranolol quanto para o farnesol mostram-se promissores e devem ser melhor explorados, principalmente tendo-se em mente o alto custo e a alta toxicidade geralmente apresentados pelas drogas antifúngicas atualmente disponíveis. Outro fungo patogênico e oportunista que merece destaque é *Cryptococcus neoformans*. Esse fungo é capaz de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos, revelando a existência de mecanismos que permitem sua adaptação ao ambiente inóspito do fagossomo da célula hospedeira. Uma hipótese é de que os atributos necessários para a sobrevivência de *C. neoformans* ao ambiente do interior de macrófagos foram previamente selecionados a partir de interações entre esse fungo e predadores ambientais, como amebas. A fim de verificarmos essa hipótese, comparamos a resposta transcricional de *C. neoformans* ao microambiente de macrófagos e de amebas. Nossos resultados sugerem que, embora o fungo expresse alguns grupos de genes específicos em resposta a um dado fagócito, de modo geral a resposta metabólica de *C. neoformans* a amebas e macrófagos é bastante similar, indicando privação nutricional e estresse oxidativo nesses ambientes.

## Abstract

In recent decades, the clinical relevance of the Fungi Kingdom is increasing, mainly due to higher incidence of systemic mycoses and the limited number of effective drugs to treat fungal infections. Among the medically important fungi, we can highlight the opportunistic dimorphic fungus *Candida albicans*, which is able to infect a wide range of host tissues, besides being one of the major causative agents of nosocomial infections. *C. albicans* is associated to nosocomial infections in part due its ability to adhere to a variety of biomaterials such as catheters, forming biofilms. Biofilms have clinical repercussions mainly due to their notorious resistance to antimicrobials agents and host immune defenses. The difficulty in treating biofilm-associated infections emphasizes the importance of studying drugs that are active against its formation. In this context, we evaluated the effects of propranolol, which has been used clinically as a beta-adrenergic receptor antagonist, in *C. albicans* adherence and biofilm formation. Here, we demonstrate that propranolol inhibits germ tubes formation and the adherence of *C. albicans* cells on abiotic surfaces as well as on epithelial cells, resulting in decreased in biofilm formation. *C. albicans* biofilm development can also be inhibited by the autoinducer farnesol as *quorum-sensing* mechanism. Moreover, studies revealed that farnesol affect the growth of a number of bacteria and fungi, pointing to a potential role as an antimicrobial agent. In this sense, we evaluated the effects of farnesol on the thermal dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiologic agent of the most prevalent mycosis in Latin America, paracoccidioidomycosis. Our data indicate that farnesol acts as a potent antimicrobial agent against *P. brasiliensis*. The fungicide activity of farnesol reduces the viability of this pathogen and delays the dimorphism, suggesting an antimicrobial activity against *P. brasiliensis*, probably due the massive cytoplasmic organelles degeneration. The results showed by both propranolol and farnesol are particularly interesting, since it could be further explored in order to evaluate the possible use of these compounds as antimicrobial agents. Another pathogenic and opportunistic fungus of clinical relevance is the yeast *Cryptococcus neoformans*. This fungus is able to survive and replicate within the phagosome of macrophages, revealing that it have evolved mechanisms allowing its survival within the phagocytic cells, which are considered an inhospitable habitat. Since replication in an animal host is not essential as part of *C. neoformans* life cycle, it was proposed that fungal virulence for mammals originated from selection by environmental predators, such as amoebas. In this perspective, we compared the transcriptional response of *C. neoformans* after interaction with macrophages and amoebas. Our results suggest a conserved metabolic response of *C. neoformans* to the environment of both phagocytic cells by the expression of genes related with nutritional and oxidative stress.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

---

# 1. Introdução Geral

## 1.1. Fungos Patogênicos

Fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos encontrados em diversos nichos ecológicos, como água, solo e ar, ou em relações de comensalismo/parasitismo com plantas e animais (Almeida, 2008). Estima-se que haja aproximadamente 150 mil espécies, das quais apenas poucas centenas são descritas como sendo capazes de causar doença em humanos. Nas últimas décadas, entretanto, a relevância clínica do reino Fungi vem aumentando devido à maior incidência de micoses sistêmicas, as quais impõem um sério problema de saúde pública por serem responsáveis por taxas elevadas de mortalidade e morbidade em todo mundo (Romani, 2004). Ademais, o número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas é limitado, e a baixa toxicidade seletiva dos medicamentos existentes associada ao aumento da resistência microbiana às drogas atuais demonstram a necessidade de estudos para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas.

Dentre os fungos de importância médica destacam-se os dimórficos e os oportunistas, os quais são responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas em humanos e outros mamíferos. Os fungos dimórficos, cujos representantes mais estudados são *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomices dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, apresentam a notável capacidade de transitar entre duas formas (levedura e micélio) em resposta a sinais extracelulares (Rooney & Klein, 2002; Klein & Tebbets, 2007). Já os fungos *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e representantes do gênero *Candida* estão entre os mais comumente isolados de infecções oportunistas, coexistindo normalmente com seus hospedeiros, sem estabelecer o processo infeccioso. Porém, em determinadas condições favoráveis, como distúrbios do sistema imunológico, tais microrganismos demonstram um potencial patogênico, podendo causar doença (Almeida, 2008). Fatores intrínsecos do hospedeiro, como velhice, gravidez e o desenvolvimento de patologias que alteram a imunidade celular (como neoplasias, diabetes, SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), e fatores extrínsecos, como cirurgias de transplante de órgãos e o uso contínuo de antibióticos ou corticosteróides, favorecem o surgimento de micoses oportunistas.

A seguir trataremos de alguns aspectos relacionados à biologia e às infecções causadas pelos fungos patogênicos *P. brasiliensis*, *C. albicans* e *C. neoformans*, os quais foram objetos de estudo do presente trabalho.

## **1.2. *Paracoccidioides brasiliensis* e a Paracoccidioidomicose**

Primeiramente relatado por Adolpho Lutz em 1908 (revisado por San-Blas *et al.*, 2002), o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é descrito como o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica prevalente na América Latina (Franco, 1987; McEwen *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 2001). As áreas de maior incidência da PCM são: Brasil (80% dos casos), Venezuela e Colômbia (McEwen *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 2001). No Brasil ocorrem aproximadamente 150 mortes por ano em virtude da PCM, sendo os estados mais afetados São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (Prado *et al.*, 2009). E embora a PCM seja, na maioria dos casos, assintomática, evoluindo em apenas 2% dos aproximadamente 10 milhões de indivíduos infectados, essa micose tem importância em saúde coletiva devido aos custos sociais e econômicos derivados não apenas da doença em atividade, como também das freqüentes seqüelas secundárias conseqüentes da infecção, o que pode resultar na morbidade do paciente (McEwen *et al.*, 1995).

O processo de transição dimórfica de *P. brasiliensis* foi relatado primeiramente por Splendore (1912). *In vitro*, esse processo é unicamente dependente da mudança de temperatura, sugerindo que, de alguma forma, o fungo percebe e responde, via sinalização celular, a esse sinal. À temperatura ambiente (25°C), *P. brasiliensis* se apresenta na forma de micélio, caracterizada por uma estrutura tubular de talo filamentosos (hifa) septado com comprimento de 1-3 µm (Carbonell, 1969; Franco, 1993). Quando submetido à temperatura de 37°C (*in vitro*) ou a partir da invasão de tecidos do hospedeiro, *P. brasiliensis* diferencia-se para a forma de levedura, caracterizada por células em forma oval ou esférica, multinucleadas e que se reproduzem por brotamentos laterais, o que resulta em uma estrutura com a aparência de roda de leme, a qual é a principal característica taxonômica e de diagnóstico desse fungo. (Carbonell, 1969; Franco, 1993).

Trabalhos recentes vêm mostrando fortes evidências moleculares da existência de reprodução sexuada em *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005; Matute *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2010). Entretanto, a forma teleomórfica desse fungo ainda é desconhecida,

o que dificulta sua classificação taxonômica, uma vez que esta é classicamente fundamentada nos estágios de reprodução sexuada, em conjunto com observações fenotípicas. Sendo assim, a classificação taxonômica de *P. brasiliensis* vem sendo baseada em comparação filogenética de seqüência do DNA que codifica para subunidade maior do RNA ribossômico (26S), associadas a análises morfológicas. Atualmente, o fungo *P. brasiliensis* é classificado como um ascomiceto (filo Ascomycota), membro da ordem Onygenales, família Onygenaceae. Pertencentes ao mesmo clado estão algumas espécies de fungos dimórficos e patogênicos como *B. dermatitidis*, *Emmonsia* e *H. capsulatum* (Leclerc *et al.*, 1994; Guarro *et al.*, 1999; Bialek *et al.*, 2000).

Desde 1930, quando foi descrito por Almeida (revisto por Franco *et al.*, 1994), o fungo *P. brasiliensis* vem sendo considerado como uma espécie única. Entretanto, é notável a diversidade genética entre diferentes isolados de *P. brasiliensis* (Molinari-Madlum, *et al.*, 1999; Matute *et al.*, 2006), além da grande variação nos níveis de virulência desses isolados em modelos de infecção experimental (Singer-Vermes *et al.*, 1989). De fato, trabalhos recentes vêm propondo que *P. brasiliensis* não é uma espécie única (clonal) como se acreditava. Matute *et al.* (2006) mostraram, com base em estudos filogenéticos de 65 isolados de *P. brasiliensis*, a existência de três diferentes espécies crípticas decorrentes de dois eventos independentes de especiação. Ademais, em pelo menos uma dessas espécies, observou-se a presença de recombinação nas regiões gênicas analisadas, o que constitui uma forte evidência de uma possível reprodução sexuada neste fungo. Mais recentemente, Teixeira *et al.*, (2009) propuseram a existência de uma nova espécie filogenética, o grupo “Pb01-like”, o qual exhibe grande divergência morfológica e de seqüência gênica quando comparado aos demais isolados analisados. Estima-se que o grupo “Pb01-like” tenha dividido um mesmo ancestral comum com a espécie *P. brasiliensis* a 32 milhões de anos atrás e eventos de recombinação também sugerem a existência de reprodução sexuada nesse grupo. Devido as marcantes diferenças entre o grupo “Pb01-like” e os demais representantes da espécie *P. brasiliensis*, foi sugerida a existência de uma nova espécie denominada *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira *et al.*, 2009).

Embora o habitat e o ciclo biológico de *P. brasiliensis* ainda não tenham sido determinados com precisão, informações acumuladas até o presente momento sugerem que este apresente uma fase saprofítica no solo e/ou em vegetais (Restrepo *et al.*, 2001). Em condições adversas (limitação de umidade e nutrientes), *P. brasiliensis* produziria

propágulos da forma miceliana denominados de conídios, os quais mediarão sua disseminação, podendo infectar, por via aerógena, o homem (Restrepo *et al.*, 2001). Assim, após inalados, os conídios atingirão os pulmões, onde sofrerão a transição para a forma de levedura, fundamental para o estabelecimento da infecção (revisado por Rooney & Klein, 2002). Posteriormente, a infecção poderia ser disseminada para os demais tecidos do hospedeiro, tornar-se latente ou crônica, ou ainda ser erradicada, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da virulência do fungo (Franco, 1987; San-Blas *et al.*, 2002).

A maioria dos indivíduos infectados por *P. brasiliensis* desenvolve apenas infecção assintomática, definida como paracoccidiodomicose-infecção, a qual acomete principalmente indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas. Já no caso do indivíduo vir a desenvolver a doença, as manifestações clínicas são diversas, sendo caracterizadas principalmente por lesões pulmonares e mucocutâneas (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). Nesse caso, a PCM pode dar origem a duas formas que se diferenciam quanto a características clínicas, imunológicas e histopatológicas: a forma aguda (tipo juvenil) ou a forma crônica (tipo adulto). A PCM aguda está associada a taxas de mortalidade significativas, sendo geralmente de caráter bastante severo, e acometendo, principalmente, jovens de ambos os sexos. Já a forma crônica, que é a mais comum, se caracteriza por apresentar lesões restritas a alguns órgãos, e progredir mais lentamente, podendo acarretar seqüelas pulmonares e subcutâneas, ou mesmo vir a causar a morte do indivíduo. Os pacientes que desenvolvem esse tipo de manifestação clínica da doença são principalmente adultos do sexo masculino (Franco, 1987; Brummer *et al.*, 1993). A maior incidência em indivíduos do sexo masculino não apresenta relação com o grau de exposição dos mesmos, uma vez que estudos indicam que ambos os sexos possuem contato similar com o patógeno. Além disso, indivíduos que ainda não atingiram a puberdade desenvolvem a doença independentemente do sexo. Assim, a prevalência em indivíduos do sexo masculino vem sendo relacionada a componentes hormonais do hospedeiro, os quais provavelmente podem modular a patogenia do fungo (San-Blas *et al.*, 2002; revisado por Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Nesse contexto, Restrepo *et al.* (1984) mostraram que o hormônio feminino  $\beta$ -estradiol inibe a transição *in vitro* de *P. brasiliensis* da forma miceliana para levedura, sugerindo um potencial papel protetor desse hormônio.

A PCM é caracterizada por ser uma doença de padrão granulomatoso. O desenvolvimento do granuloma é essencial para destruição e contenção do fungo, a fim

de evitar sua disseminação pelo organismo. Entretanto, o padrão do granuloma formado varia em virtude do isolado de *P. brasiliensis* e da resposta do hospedeiro (Zacharias *et al.*, 1986; Singer-Vermes *et al.*, 1989). Hospedeiros resistentes à infecção por *P. brasiliensis*, por exemplo, são aptos a formar um granuloma epitelióide compacto e a desenvolver uma resposta imunológica efetiva (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). Muitos estudos sugerem que a resposta imunológica celular, caracterizada pela produção de citocinas do tipo 1 (IFN- $\gamma$ , IL-12) parece ser o principal mecanismo de defesa contra *P. brasiliensis*. (Cano *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 2000; Arruda *et al.*, 2000). A produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é particularmente importante na PCM por ativar macrófagos para a produção de óxido nítrico (NO), que atua como o principal agente microbicida contra *P. brasiliensis* (Bocca *et al.*, 1998). O IFN- $\gamma$  também estimula macrófagos infectados por *P. brasiliensis* a secretar fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), necessário para a persistência do granuloma (Souto *et al.*, 2000).

Tanto a formação de granuloma, quanto a importância de se desenvolver uma resposta imunológica do tipo celular, são características de uma resposta protetora máxima contra patógenos intracelulares (Rumbley & Phillips, 1999). De fato a forma de levedura de *P. brasiliensis* pode atuar como um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se replicar no interior de células epiteliais e de macrófagos e neutrófilos não ativados (Brummer *et al.*, 1989; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). Depois de inalados, os conídios de *P. brasiliensis* encontram os macrófagos alveolares residentes no pulmão, sendo então fagocitados e convertendo-se para a forma de levedura parasita. A transição pode ainda ocorrer primeiro, seguida pela fagocitose das leveduras (Cano *et al.*, 1992; Aristizabal, 1998; Gonzalez *et al.*, 2000). Após o processo de fagocitose, *P. brasiliensis* é exposto a um arsenal de moléculas microbicidas no interior das células fagocíticas hospedeiras. Apesar disso, as leveduras de *P. brasiliensis* devem possuir estratégias elaboradas ou fatores de virulência usados para escapar da destruição e sobreviver no interior dos macrófagos como parasitas intracelulares dessas células. Visando melhor compreender esse processo, um trabalho realizado por nosso grupo identificou 152 genes que foram diferencialmente expressos após leveduras de *P. brasiliensis* terem sido internalizadas por macrófagos (Tavares *et al.*, 2007). Esses genes estão relacionados, principalmente, a uma resposta em virtude de limitação de glicose e aminoácidos e do estresse oxidativo sofrido pelo fungo no microambiente hostil do interior do fagócito (Tavares *et al.*, 2007), evidenciando uma plasticidade

transcricional que permite *P. brasiliensis* a adaptar-se e sobreviver como um parasita intracelular.

### **1.3. *Candida albicans* e a Candidíase**

*C. albicans* é um patógeno oportunista encontrado normalmente na microbiota gastrointestinal e na mucosa oral de indivíduos saudáveis (Rupp, 2007). Entretanto, em situações na qual a defesa do organismo encontra-se comprometida, *C. albicans* pode romper o equilíbrio entre parasita e hospedeiro e causar infecção. No homem, múltiplas manifestações clínicas estão associadas a infecções por *Candida*, que variam desde doenças mucocutâneas até infecções invasivas (Almeida, 2008). Os primeiros relatos que remetem a um tipo de candidíase oral, popularmente conhecido como “sapinho”, datam de 1665. Entretanto, somente após cerca de 200 anos, em 1846, foi documentada a correlação entre a existência de “sapinhos” e a presença de um fungo nas lesões, cuja identificação precisa deu-se apenas em 1923, por Berkhout. Porém, a adoção oficial do binômio *Candida albicans* para o agente etiológico do “sapinho” data de 1954 (revisto por Calderone, 2002). Nos últimos anos o interesse médico por infecções por *Candida* spp. vem aumentando principalmente em virtude do uso exacerbado de antibióticos de grande espectro, os quais favorecem o desenvolvimento de doenças fúngicas. Outros fatores, como o elevado número de casos de pacientes transplantados e pessoas portadoras do vírus HIV, além do uso clínico de drogas imunossupressoras, como corticosteróides, contribuem para a relevância da candidíase no cenário médico atual (Almeida, 2008).

Em termos de variedade de tipos de infecções, *C. albicans* destaca-se entre os fungos patogênicos, já que o mesmo é capaz de infectar mucosas, pele e unhas, além de poder atingir a corrente sanguínea e infectar diversos tecidos (Odds, *et al.*, 2004). Dentre as infecções mais comuns causadas por *C. albicans* destacam-se a candidíase invasiva e a candidíase vulvovaginal. A candidíase invasiva é uma das doenças fúngicas de maior relevância médica mundial, sendo freqüente e muitas vezes fatal em pacientes imunodeprimidos (Laín *et al.*, 2008). Já a candidíase vulvovaginal é uma infecção comum entre as mulheres e está associada a um elevado índice de morbidade e altos custos de tratamento (Falagas *et al.*, 2006).

Embora o termo “fungo dimórfico” seja comumente aceito em referência a *C. albicans*, este microrganismo tem a capacidade de adotar uma variedade de morfologias

(levedura, pseudohifa e hifa), podendo ser considerado um organismo “polimórfico” (Sudbery *et al.*, 2004). As leveduras de *C. albicans* são células diplóides arredondadas que podem se reproduzir sexuadamente ou assexuadamente, por brotamento assimétrico. A formação de pseudohifa ocorre quando a célula nascente permanece ligada à célula parental, formando brotamentos alongados. Já as hifas verdadeiras são estruturas tubulares septadas cujos tubos germinativos apresentam crescimento apical (revisto por Calderone, 2002; Berman, 2006). O processo de transição morfológica entre essas diferentes formas ocorre em resposta a diversos estímulos externos e pode permitir a adaptação a uma grande variedade de nichos biológicos, além de ser bastante importante para a patogenicidade deste fungo (Lo *et al.*, 1997; Chaffin *et al.*, 1998). A transição de levedura para micélio em *C. albicans*, por exemplo, é desencadeada por sinais ambientais como soro, temperatura fisiológica de 37°C, pH igual ou superior a 7.0, concentrações de CO<sub>2</sub> próximas a 5,5%, N-acetilglucosamina (GlcNAc), dentre outros. A diferenciação em leveduras unicelulares é estimulada por temperaturas baixas e pH ácido, além de altas concentrações de glicose (Whiteway & Bachewich, 2007). Esse processo de transição morfológica em *C. albicans* vem sendo descrito como um importante fator de virulência desse fungo há muitos anos. Porém, inicialmente acreditava-se que apenas a forma miceliana estava correlacionada com a patogenia. Isso porque em infecções por *C. albicans* a forma fúngica comumente recuperada das lesões era a miceliana (Barnett, 2008). Este fato levou alguns pesquisadores a afirmarem que, em medicina clínica, a morfologia relevante de *Candida* era apenas o micélio (Whittle & Gresam, 1960). Entretanto, atualmente acredita-se que tanto a forma de micélio quanto a forma de levedura possuem papel na patogênese, já que linhagens mutantes em genes essenciais para a aquisição de ambas as morfologias apresentam virulência atenuada (Yang, 2003). Assim, as leveduras parecem ser importantes para a disseminação e busca de novos nichos, enquanto as hifas parecem fundamentais para a invasão e o conseqüente dano do tecido hospedeiro (Barnett, 2008).

Além da habilidade de transitar entre diferentes formas, outros fatores tem sido relacionados com a virulência de *C. albicans*, tais como a produção de enzimas hidrolíticas, a capacidade de adesão a diferentes substratos, e a capacidade em formar biofilmes. É sabido que *C. albicans* produz e secreta dezenas de enzimas hidrolíticas, as quais, quando secretadas, permitem o rompimento de membranas celulares do hospedeiro e da matriz extracelular, facilitando a disseminação e a invasão de outros tecidos pelo microrganismo. Dentre essas hidrolases secretadas por *C. albicans* destaca-

se a fosfolipase B (*PLB1*). Ibrahim *et al.* (1995) demonstraram que o nível de produção dessa enzima por nove diferentes isolados de *C. albicans* é diretamente relacionado com a gravidade da doença causada em modelo murino de candidíase. Ainda, linhagens mutantes deficientes para o gene *plb1* possuem capacidade de penetrar em células endoteliais e epiteliais humanas bastante comprometida (Leidich *et al.*, 1998). Além da PLB, as enzimas hidrolíticas do tipo SAP (do inglês “Secreted Aspartyl Proteinase”), codificadas por uma família de 10 diferentes genes (*SAP1* – *SAP10*), vêm sendo amplamente estudadas e parecem apresentar importante papel na virulência de *C. albicans*. Dentre as características das proteínas SAPs que as enquadram como determinantes de virulência destacam-se: (i) a capacidade de degradar inúmeras proteínas humanas, como colágeno, laminina, fibronectina, imunoglobulinas, entre outras; (ii) a associação entre a produção de SAP e outros processos de virulência, como filamentação e adesão; (iii) a correlação entre a secreção de proteínas SAPs por isolados clínicos e laboratoriais de *C. albicans* e a virulência dos mesmos; e (iv) as observações de que mutantes para genes da família SAP apresentam virulência atenuada em modelos de infecção em animais (Naglik *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2007).

Outro fator crucial para a patogenia causada por *C. albicans* é a capacidade desse fungo em aderir a diferentes células e tecidos do hospedeiro, permitindo a colonização microbiana, seguida pela invasão e disseminação para diversos órgãos. Na superfície das células de *C. albicans* estão presentes moléculas denominadas adesinas, as quais contribuem para a adesão do microrganismo a células epiteliais e endoteliais, proteínas do soro e da matrix extracelular, além de facilitar a adesão a diferentes substratos artificiais (Chaffin *et al.*, 1998). As adesinas mais bem descritas para *C. albicans* incluem as proteínas da família ALS (do inglês “Agglutinin-Like Sequence”) e a proteína HWP1 (do inglês “Hyphal Wall Protein 1”). Existem ao menos 8 genes que codificam proteínas representantes da família ALS. Essas proteínas estão conectadas à superfície celular e acredita-se que elas são as responsáveis pela adesão das células fúngicas ao colágeno, a fibronectina, a laminina e às células epiteliais e endoteliais do hospedeiro (Filler, 2006; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). A proteína HWP1 está presente apenas na superfície de hifas e facilita a adesão de *C. albicans* ao epitélio do hospedeiro (Staab *et al.*, 1999). Além da importância para a colonização do tecido hospedeiro por *C. albicans*, o processo de adesão é fundamental para formação de comunidades microbianas denominadas biofilmes.

### **1.3.1. Formação de biofilmes por *Candida albicans***

Em adição aos inúmeros tipos de infecções que podem ser causadas por *C. albicans*, este fungo é também considerado um dos maiores agentes responsáveis por infecções nosocomiais. Estudos realizados na década de 90 mostraram que mais de 78% das doenças hospitalares causadas por fungos tinham como agente etiológico leveduras do gênero *Candida* (Ribeiro *et al.*, 2004). A maioria das septicemias nosocomiais causadas por esse microrganismo deve-se à introdução de catéteres e/ou sondas que facilitam a adesão por *C. albicans* e o desenvolvimento de biofilme (Kojic & Darouiche, 2004). Biofilmes são definidos como comunidades microbianas aderidas a uma superfície e envoltas por uma matriz exopolimérica (Ramage *et al.*, 2005). O processo de formação do biofilme por *C. albicans* pode ser dividido em quatro fases: fase inicial ou adesão (0-11h), fase intermediária (12-30h), maturação (38-72h) e dispersão (Figura 1). A primeira etapa da formação do biofilme por *C. albicans* ocorre quando leveduras desse fungo se aderem a uma superfície, tal como catéteres, válvulas cardíacas, lentes oculares, entre outras. A adesão é mediada por fatores inespecíficos, como hidrofobicidade e forças eletrostáticas, e por fatores específicos, como adesinas presentes na superfície do fungo (Ramage *et al.*, 2005). Dentre as proteínas de superfície celular que contribuem para a formação do biofilme *in vitro* destacam-se as proteínas da família ALS e HWP1 (Nobile *et al.*, 2006a e 2006b). Além disso, Hwp1 também tem um papel importante na formação do biofilme *in vivo*, como mostrado por Nobile *et al.* (2006b). A próxima etapa para a formação do biofilme por *C. albicans* inclui a proliferação celular e a síntese de uma matriz extracelular constituída predominantemente de carboidratos (glicose e manose) e proteínas (Baillie & Douglas, 2000; Chandra *et al.*, 2001). O biofilme maduro deve exibir uma arquitetura tridimensional complexa constituída por uma mistura de diferentes formas morfológicas (levedura, hifas e pseudohifas) envoltas por uma matriz extracelular (Kojic & Darouiche, 2004). E, embora o processo de morfogênese não seja um pré-requisito absoluto para a formação do biofilme, o mesmo é necessário para a aquisição de uma estrutura espacial organizada, uma vez que a presença de hifas fornece integridade estrutural e uma arquitetura com múltiplas camadas, característica de um biofilme maduro (Baillie & Douglas, 2000; Douglas, 2003). A etapa final no desenvolvimento do biofilme consiste na dispersão de células leveduriformes não aderentes, as quais são liberadas das comunidades microbianas para o meio exterior, podendo iniciar a

formação de um novo biofilme, ou se disseminar para outros tecidos do hospedeiro (Finkel & Mitchell, 2011). Vale ainda ressaltar que bactérias são comumente encontradas em biofilmes *in vivo* de *C. albicans*, indicando a ocorrência de interações interespecíficas (Jabra-Risk *et al.*, 2004).

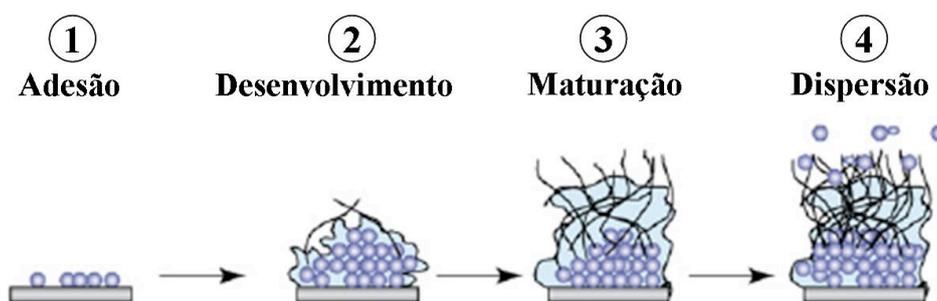


Figura 1. **Etapas do processo de formação de biofilme por *C. albicans*.** Na etapa inicial de formação do biofilme por *C. albicans*, células leveduriformes aderem a um substrato (1). Posteriormente, as células se propagam e iniciam a formação de tubos germinativos. É nessa etapa, também denominada etapa intermediária, que a matriz celular começa a ser sintetizada (2). Na etapa de maturação a biomassa formadora do biofilme expande, há o acúmulo de matriz extracelular e a resistência a antifúngicos aumenta (3). A etapa final ou dispersão ocorre quando leveduras se desprendem da comunidade microbiana e vão colonizar outros ambientes, podendo iniciar a formação de um novo biofilme (4). Adaptado de Blankenship & Mitchell (2006).

Alguns trabalhos estimam que nas últimas décadas cerca de 65% dos casos de infecções microbianas em humanos estejam correlacionadas com a formação de biofilmes pelo patógeno (Ramage *et al.*, 2006). A formação de biofilme por *C. albicans* implica em importantes repercussões clínicas por conferir ao microrganismo maior resistência a terapias antifúngicas e às defesas do hospedeiro (Ramage *et al.*, 2005). De fato, biofilmes de *C. albicans* são significativamente mais resistentes a ação de antifúngicos da classe dos azóis, anfotericina B, flucitosina, terbinafina e nistatina (Baillie & Douglas, 1999; Ramage *et al.*, 2001 e 2002; Vedyappan *et al.*, 2010). Entretanto, os mecanismos responsáveis pela resistência do biofilme a antimicrobianos são ainda pouco compreendidos. Especula-se que a resistência esteja relacionada à limitação difusional a passagem do agente microbicida conferida pela matriz

extracelular (Al-Fattani & Douglas, 2006), e à expressão de inúmeros genes que influenciam na patogenicidade, como bombas de efluxo de drogas e adesinas (Chandra *et al.*, 2001).

Tendo em vista as dificuldades no tratamento de infecções relacionadas a biofilmes, nota-se a necessidade no desenvolvimento de novas drogas que atuem inibindo a formação dessas comunidades microbianas ou que desempenhem atividade microbicida em patógenos associados a biofilmes. Outra possibilidade é o desenvolvimento de estratégias alternativas, como o bloqueio de sinais extracelulares que são importantes para formação e manutenção de biofilmes. Nesse sentido, uma estratégia promissora é a interferência nos processos de comunicação celular, uma vez que estes têm sido relacionados ao estabelecimento de infecções e à formação de biofilmes microbianos (Hoiby *et al.*, 2010).

### **1.3.2. Quorum-Sensing em *Candida albicans* e outros fungos**

Atualmente, muitos trabalhos têm mostrado a existência de mecanismos de comunicação entre células bacterianas, cujo principal papel é coordenar a expressão de determinados genes em resposta ao aumento da densidade populacional (Miller & Bassler, 2001). Esse processo de comunicação é conhecido como percepção de *quorum* (QS – do inglês “*quorum sensing*”), e ocorre por meio da liberação de sinalizadores químicos, os autoindutores (QSM – do inglês “*quorum-sensing molecules*”), que são acumulados durante o crescimento celular (Bassler, 1999; de Kievit & Iglewski, 2000). Quando a concentração dos autoindutores ultrapassa uma concentração limite, ocorre a ativação e/ou inibição da expressão de diferentes genes levando à coordenação de atividades biológicas na população, tais como bioluminescência, produção de antibióticos, simbiose, motilidade, esporulação, acasalamento, formação de biofilme, virulência, entre outras (Miller & Bassler, 2001; Zhang, 2003; Cegelski *et al.*, 2008). Dessa forma, o QS permite que as bactérias, quando em altas densidades populacionais, sincronizem seu comportamento, passando, muitas vezes, a atuar de forma semelhante à de organismos multicelulares (de Kievit & Iglewski, 2000). Em bactérias patogênicas, tal sincronismo mostra-se particularmente importante durante a infecção, pois, permite que o organismo coordene sua virulência, propiciando um mecanismo de escape das defesas do hospedeiro o que resulta no estabelecimento bem sucedido do processo infeccioso (de Kievit & Iglewski, 2000). De um modo geral, a ampla incidência de QS entre os procariotos sugere que a regulação da expressão gênica dependente da

densidade celular é um importante fator para o sucesso adaptativo do microrganismo em uma grande variedade de ambientes (Hogan, 2006). Em vista disso, alguns trabalhos avaliam que a interferência nos mecanismos de comunicação ou de QS entre microrganismos pode representar uma alternativa potencial para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. A estratégia global envolveria a inibição de mecanismos específicos responsáveis pela promoção da infecção e que são essenciais para o desenvolvimento e a persistência da patogênese (revisado por Cegelski *et al.*, 2008).

Recentemente foi demonstrado que, assim como descrito para bactérias, alguns fungos também apresentam o fenômeno de *quorum-sensing* (Hogan, 2006). O primeiro relato da existência de QS em eucariotos ocorreu a partir da descrição por dois grupos independentes da existência de um fator no sobrenadante de culturas de *C. albicans* capaz de reprimir o desenvolvimento de hifas (Hornby *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2001). A molécula identificada por Hornby *et al.* (2001) como sendo a responsável pelos efeitos observados foi o E,E-farnesol. Já Oh *et al.* (2001) mostraram que a molécula ativa era um composto bastante similar porém menos efetivo que o farnesol, o ácido farnesóico. Essa diferença na identificação do autoindutor deu-se principalmente em virtude das diferenças entre as linhagens de *C. albicans* utilizadas nos dois estudos.

O farnesol é um álcool sesquiterpeno intermediário da via de biossíntese do ergosterol (Hogan, 2006). Em *C. albicans*, além de afetar a transição morfológica, o farnesol possui papel inibitório na formação de biofilmes desse fungo, atuando nas etapas de adesão celular, maturação do biofilme e dispersão (Deveau & Hogan, 2011). Adicionalmente, análises feitas por microarranjos de DNA mostraram que o cultivo do fungo na presença de farnesol resulta na expressão diferencial de genes associados ao desenvolvimento de hifas, resistência a drogas, biogênese da parede celular, transporte de ferro e à resposta ao choque-térmico (Cao *et al.*, 2005; Enjalbert & Whiteway, 2005). Além disso, o farnesol confere ao fungo maior resistência ao estresse oxidativo, desempenhando um possível papel na persistência de *C. albicans* no ambiente intracelular de fagócitos (Westwater *et al.*, 2005). De fato, estudos *in vivo* mostram que o farnesol atua como um fator de virulência, uma vez que a administração exógena dessa molécula leva a um aumento na taxa de mortalidade de camundongos infectados com *C. albicans* (Navarathna *et al.*, 2007a). O farnesol também atua interferindo na progressão da resposta imune do hospedeiro, inibindo a expressão de INF- $\gamma$ , citocina crítica na resposta imune celular, e aumentando a expressão de IL-5, relacionada à resposta imune humoral (Navarathna *et al.*, 2007b).

Os efeitos desencadeados pelo farnesol são também relatados em interações antagonistas interespecíficas, já que essa QSM de *C. albicans* inibe o dimorfismo e a formação de biofilmes em outras espécies de *Candida* (Jabra-Rizk *et al.*, 2006b) e induz apoptose no fungo *Aspergillus nidulans* (Semighini *et al.*, 2006). Outros trabalhos mostram a inibição do crescimento de bactérias, como *Staphylococcus aureus* (Jabra-Rizk *et al.*, 2006a; Koo *et al.*, 2002), e fungos, como *Saccharomyces cerevisiae* (Machida *et al.*, 1998, 1999), mediada por esse sesquiterpeno. O farnesol ainda atua inibindo a produção de uma QSM (quinolona) da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e, conseqüentemente, inibe a expressão do fator de virulência piocianina de *P. aeruginosa* por ela controlado (Cugini *et al.*, 2007). Vale ressaltar que moléculas secretadas por *P. aeruginosa* também possuem efeito em *C. albicans*, fato particularmente interessante em virtude dos numerosos relatos que indicam coexistência desses microrganismos em uma variedade de infecções oportunistas (Bauernfeind *et al.*, 1987; El-Azizi *et al.*, 2004; Hermann *et al.*, 1999; Nseir *et al.*, 2007). Nesse sentido, QSMs de *P. aeruginosa* inibem a filamentação e promovem a reversão morfológica de micélio para levedura em *C. albicans* (Hogan *et al.*, 2004), além de pequenas moléculas secretadas pelas células bacterianas, denominadas fenazinas, induzirem morte celular em *C. albicans* (Gibson *et al.*, 2009).

Outra molécula de percepção de *quorum* em *C. albicans* e que apresenta efeitos antagônicos àqueles observados para o farnesol vem sendo estudada: o tirosol. A resposta de *C. albicans* a esse autoindutor é refletida na morfologia, no crescimento e na formação de biofilme (Chen *et al.*, 2004; Alem *et al.*, 2006). Chen *et al.* (2004) mostraram que *C. albicans* secreta continuamente tirosol ao longo de seu crescimento e o acúmulo desta molécula é proporcional ao aumento da densidade celular. A adição externa de tirosol a uma cultura de *C. albicans* diminui a fase lag de crescimento desse microrganismo e acelera a conversão morfológica de levedura para micélio, promovendo a formação de tubos germinativos (Chen *et al.*, 2004). O tirosol também induz a filamentação nos estágios iniciais e intermediários de formação do biofilme (Alem *et al.*, 2006). Um trabalho recente mostrou ainda um efeito similar ao observado para o tirosol sendo desencadeado por uma terceira molécula produzida por *C. albicans* (Nigam *et al.*, 2010). A molécula em questão é o 3(R)-hidroxi-ácido-tetradecanóico (3(R)-HTDE), um metabólito resultante da  $\beta$ -oxidação do ácido linoléico, o qual induz filamentação e formação de biofilme em *C. albicans* (Nigam *et al.*, 2010).

O fenômeno de QS foi também identificado no fungo dimórfico *H. capsulatum*, no qual o aumento da densidade populacional promove o acúmulo de um fator que, ao atingir uma determinada concentração, modula a incorporação do polissacarídeo  $\alpha$ -(1,3)-glucana na parede celular das células leveduriformes (Kügler *et al.*, 2000). Já no fitopatógeno *Ceratocystis ulmi* foi observado que a morfologia das células é dependente do tamanho do inóculo e mediada por uma molécula lipofílica extracelular (Hornby *et al.*, 2004). Mais recentemente, Chen & Fink (2006) mostraram que leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* secretam álcoois aromáticos que atuam como moléculas de QS capazes de induzir mudanças morfogenéticas nesse fungo em resposta à limitação de fonte de nitrogênio.

### **1.3.3. Comunicação entre microrganismos e células hospedeiras**

Além da comunicação celular entre células microbianas descrita acima, que confere vantagem adaptativa e facilita o estabelecimento de infecções por organismos patogênicos, evidências recentes mostram a existência de mecanismos de comunicação entre microrganismos e células hospedeiras. Esse processo de sinalização celular entre diferentes reinos é mediado por pequenas moléculas, tais como as QSMs produzidas por microrganismos e os hormônios produzidos pelo hospedeiro (revisado por Hughes & Sperandio, 2008). Como exemplo de comunicação inter-reino no qual uma molécula sinalizadora bacteriana interfere na expressão de genes eucarióticos pode-se citar o papel do autoindutor 3-oxo-C12-HSL da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Essa QSM atua modulando a resposta imune do hospedeiro, uma vez que inibe a expressão de TNF- $\alpha$  e IL12 (Telford *et al.*, 1998), e induz a expressão de INF- $\gamma$  (Smith *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos vêm mostrando também a modulação da expressão gênica de microrganismos mediada por sinalizadores do hospedeiro. Sperandio *et al.* (2003) verificaram que a epinefrina e a norepinefrina, hormônios do hospedeiro relacionados ao estresse, afetam a transcrição de genes de virulência da bactéria *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Além disso, antagonistas beta- e alfa-adrenérgicos, que bloqueiam o efeito da epinefrina, são capazes de inibir a ação desse hormônio em *E. coli*. Resultados similares foram reportados para a bactéria *Borrelia burgdorferi*. Scheckelhoff *et al.* (2007) mostraram que a epinefrina e a norepinefrina induzem a expressão da proteína de superfície OspA de *B. burgdorferi*, enquanto o competidor adrenérgico propranolol bloqueia o efeito desses hormônios neuroendócrinos. O propranolol também apresenta um efeito inibitório na formação de tubos germinativos

em *C. albicans* sem alterar a taxa de crescimento celular. Baker *et al.* (2002) relatam que, embora a ação do propranolol na morfogênese ainda não tenha sido completamente desvendada, esse efeito possivelmente deve-se à inibição da síntese de diacilglicerol (DAG), já que o propranolol se liga ao seu precursor, o ácido fosfatídico. Uma vez que o processo de transição da forma de levedura para a forma miceliana em *C. albicans* está diretamente relacionado ao desenvolvimento da infecção, o efeito do propranolol nesse fungo mostra-se particularmente interessante. Além disso, a filamentação de *C. albicans* é fundamental para a formação de um biofilme maduro, o que sugere um potencial papel do propranolol na inibição do desenvolvimento de biofilme por esse fungo.

Com base nos relatos apresentados, o estudo dos mecanismos de comunicação entre microrganismos e entre estes e seus hospedeiros apresenta um grande potencial com vistas ao futuro desenvolvimento de novos antimicrobianos. O estudo de agentes terapêuticos alternativos mostra-se de particular relevância, principalmente tendo-se em mente o alto custo e a alta toxicidade geralmente apresentados pelas drogas antifúngicas atualmente disponíveis para o tratamento das micoses sistêmicas. Nesse contexto inserem-se os dois primeiros objetivos desse trabalho, os quais serão descritos mais detalhadamente posteriormente.

#### **1.4. *Cryptococcus neoformans* e a Criptococose**

*Cryptococcus neoformans* é um patógeno oportunista que acomete principalmente pacientes imunodeprimidos. *C. neoformans* foi primeiramente identificado como um patógeno humano pelos médicos alemães Otto Busse e Abraham Buschke em 1894. Entretanto, a importância médica desse fungo aumentou drasticamente apenas após a década de 80, em consequência da epidemia acarretada pelo HIV - do inglês, *Human Immunodeficiency Virus* – (revisado por Casadevall & Perfect, 1998). Estimativas recentes sugerem que, por ano, cerca de 1 milhão de indivíduos portadores do HIV desenvolvem criptococose, nome dado a doença causada por *Cryptococcus*, dos quais 600 mil casos são fatais (Park *et al.*, 2009). E, embora a prevalência de criptococose em pacientes soro-positivos vem diminuindo em países desenvolvidos devido ao uso de terapias antiretrovirais associadas ao uso de antifúngicos, a criptococose continua epidêmica em países da África e do sudeste da

Ásia, atingindo cerca de 30% dos pacientes com SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - (revisado por Casadevall & Perfect, 1998). Além de portadores do vírus HIV, fatores de risco que colaboram para o desenvolvimento da criptococose incluem condições médicas que contribuem para um estado imunodeprimido do paciente, como transplantes de órgãos e tratamentos que fazem uso de imunossupressores, tais como corticóides e quimioterapias (Kiertiburanakul *et al.*, 2006; Chayakulkeeree & Perfect, 2006).

O fungo *C. neoformans* é comumente encontrado em forma de levedura haplóide, reproduzindo-se, predominante, por brotamentos (reprodução assexuada). Essas células leveduriformes possuem uma característica única que distingue *C. neoformans* das demais leveduras de importância médica: a presença de uma cápsula composta por polissacarídeos. Já a forma sexuada, denominada *Filobasidiella neoformans*, é caracterizada pela presença de basidiósporos, o que enquadra *C. neoformans* como um representante do Filo Basidiomycota.

A atual classificação taxonômica, baseada nas propriedades imunológicas dos polissacarídeos presentes na cápsula, em análises filogenéticas e comparação de seqüências genômicas, divide a espécie *C. neoformans* em duas principais variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Franzot *et al.*, 1999; Sidrim *et al.*, 2010). *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* tem característica cosmopolita, sendo encontrado em uma grande diversidade de ambientes, tais como excreta de pássaros, em especial pombos, matéria orgânica vegetal em decomposição e troncos de árvores (Granados & Castañeda 2005; Costa *et al.* 2010). Da mesma forma, a ocorrência de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* é descrita em vários ambientes, porém sua prevalência dá-se predominantemente no continente europeu (Martinez *et al.* 2001). Ademais, o gênero *Cryptococcus* compreende outra espécie patogênica, *C. gatti* (sorotipos B e C), cuja capacidade em causar doença em indivíduos imunocompetentes é o seu principal diferencial (Qazzafi *et al.* 2007; Wilbur & Heyborne 2009).

A infecção por *C. neoformans* ocorre por via respiratória, pela inalação de propágulos pelo hospedeiro, os quais atingem os alvéolos pulmonares onde são capazes de se proliferar (Figura 2). Uma vez presente no pulmão, e caso o fungo não seja erradicado pelo hospedeiro, a infecção pode tornar-se latente pela contenção do patógeno em granulomas, podendo, porém, ser reativada ou evoluir para a forma aguda da doença (Perfect & Casadevall, 2002; Chayakulkeeree & Perfect, 2006). É no espaço

alveolar que *C. neoformans* encontra a primeira linha de defesa do hospedeiro: os macrófagos alveolares (Brummer, 1999). Tais fagócitos, assim como os neutrófilos, são capazes de rapidamente internalizar as leveduras. O processo de fagocitose é seguido pela acidificação do fagossomo e a fusão deste ao lisossomo (Levitz *et al.*, 1999). E, embora o ambiente no interior de fagócitos seja extremamente hostil, *C. neoformans* é capaz de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos *in vivo*, como mostrado por Feldmesser *et al.* (2000). A persistência deste fungo no interior de células fagocíticas pode facilitar sua disseminação, uma vez que macrófagos alveolares contendo leveduras em seu interior podem translocar-se do pulmão para outros órgãos, servindo assim como carreadores (Brummer, 1999). O resultado da disseminação pode levar à forma mais grave da infecção por *C. neoformans*, que ocorre quando as leveduras atingem o sistema nervoso central, causando inflamação nas meninges, ou seja, meningite criptococal (revisado por Casadevall & Perfect, 1998; Perfect & Casadevall, 2002).

É importante ressaltar que a capacidade de *C. neoformans* em sobreviver no ambiente intracelular de fagócitos pode representar um determinante primário no desenvolvimento da infecção, podendo resultar na disseminação ou, em caso contrário, na erradicação do fungo (Casadevall & Perfect, 1998; Feldmesser *et al.*, 2001). Entretanto, é sabido que o microambiente intracelular de fagócitos é extremamente inóspito, sendo definido como um meio indutor de estresse oxidativo/nitrosativo, além de fornecer uma baixa disponibilidade de nutrientes como ferro, aminoácidos e glicose aos microrganismos internalizados. Adicionalmente, peptídeos antimicrobianos e enzimas hidrolíticas conferem ao ambiente intracelular características ainda mais hostis para a sobrevivência de patógenos (Amer & Swanson, 2002; Lorenz & Fink, 2002; Romani, 2004). Dessa forma, muitos autores vêm buscando compreender de que maneira microrganismos como *C. neoformans* se adaptaram ao ambiente intracelular de macrófagos.

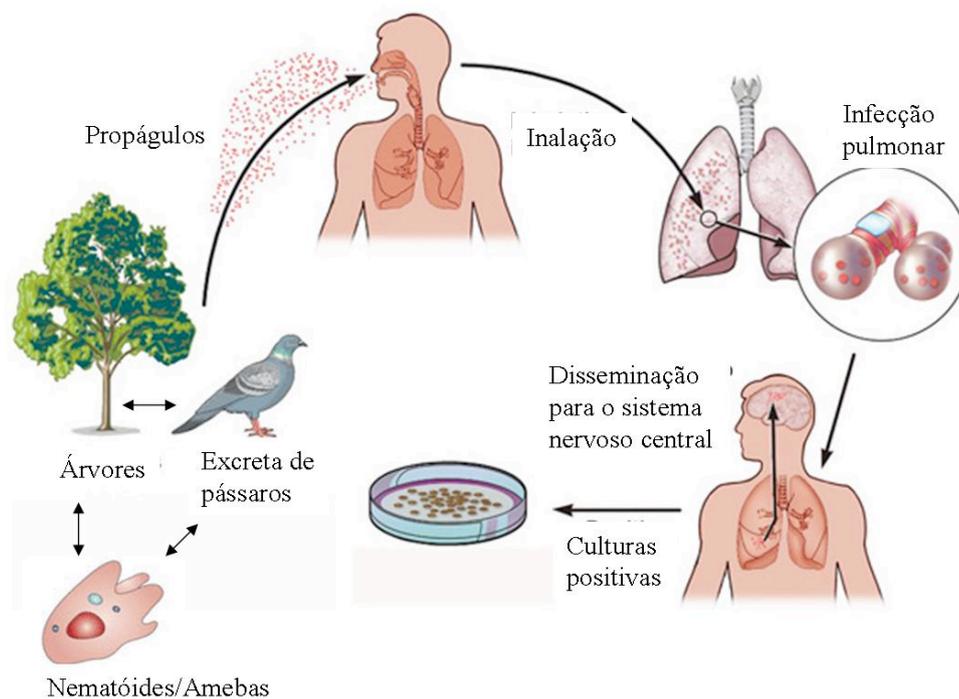


Figura 2. **Ciclo infeccioso de *Cryptococcus*.** O fungo *Cryptococcus* é encontrado no solo, em árvores e excreta de pássaros, podendo interagir com predadores microbianos e animais silvestres e assim manter sua virulência. Ocasionalmente, seres humanos podem inalar propágulos os quais podem estabelecer uma infecção pulmonar. Caso o hospedeiro se torne imunodeprimido, o fungo pode disseminar do pulmão para o sistema nervoso central, causando uma forma mais severa da doença. Adaptado de Hull & Heitman (2002).

Visando identificar os mecanismos moleculares envolvidos na sobrevivência e adaptação de *C. neoformans* ao ambiente hostil do interior de células fagocíticas, Fan *et al.* (2005) analisaram o perfil transcricional desse fungo após internalização por macrófagos da linhagem J774. Com o uso da tecnologia de microarranjos, os autores observaram que *C. neoformans* responde ao ambiente intracelular desses macrófagos expressando diferencialmente 280 genes quando comparado com o fungo cultivado *in vitro*. O aumento nos níveis de transcritos relacionados ao metabolismo de ácido graxo e o ciclo do glioxilato, bem como a expressão de genes envolvidos na captação de nutrientes, como transportadores de hexoses, de aminoácidos e de ferro, indicam a provável adaptação do parasita a um ambiente nutricionalmente pobre. Além disso, genes relacionados à detoxificação de moléculas oxidativas e nitrosativas e ao processo

de autofagia também tiveram a expressão aumentada, enquanto genes envolvidos nos processos de transcrição e tradução foram reprimidos após a fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos (Fan *et al.*, 2005). Resultados similares foram observados para outros microrganismos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *C. albicans* e *P. brasiliensis* (Schnappinger *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2007). Em suma, todos esses trabalhos revelaram que patógenos intracelulares facultativos são capazes de reprogramar rapidamente a maquinaria de expressão gênica, de modo a permitir sua sobrevivência no microambiente inóspito do interior de macrófagos.

#### **1.4.1. Fatores de virulência em *C. neoformans***

Casadevall & Pirofski (1999, 2001) definem virulência como a capacidade relativa de um microrganismo causar dano ao hospedeiro, sendo a virulência unicamente observada em um hospedeiro susceptível. Vale ressaltar que a virulência não é uma característica unicamente do microrganismo, e sim um fenômeno altamente complexo e dinâmico, que inclui fatores tanto do parasita quanto do hospedeiro.

O protocolo padrão utilizado na identificação de potenciais fatores de virulência é a mutagênese sítio-dirigida, que permite o estudo de cepas mutantes específicas, e a correspondente cepa reconstituída, em modelo de infecção animal. Baseando-se no “Postulado molecular de Koch”, Falkow (2004) definiu que para um gene ser considerado de virulência, a infecção ou patogênese causada pelo mutante deve ser atenuada quando comparada à infecção causada pelo tipo selvagem e pela cepa reconstituída. Esse conceito ficou conhecido como “Postulado de Falkow”.

Muitos fatores de virulência contribuem para o estabelecimento da infecção por *C. neoformans* em mamíferos. Entretanto, os três fatores de virulência clássicos definidos para este fungo são a capacidade de crescer a 37°C, a presença da cápsula polissacarídica, e a produção de melanina.

A capacidade do microrganismo em crescer a temperaturas que variam entre 35 a 40°C é definida como termotolerância. Dentre as 38 diferentes espécies do gênero *Cryptococcus*, somente as únicas espécies patogênicas, *C. neoformans* e *C. gattii*, são capazes de crescer a temperaturas iguais ou superiores a 37°C. De fato, tal habilidade é um fator de virulência, já que 37°C é aproximadamente a temperatura corporal de vários mamíferos, incluindo o homem (Perfect, 2006). Em *C. neoformans* a termotolerância parece requerer algumas proteínas, tais como calcineurina fosfatase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina e a proteína RAS1, uma vez que isolados mutantes incapazes de

sintetizar tais proteínas não crescem *in vitro* a 37°C (Odom *et al.*, 1997; Alspaugh *et al.*, 2000). Além disso, esses mutantes são avirulentos em modelo de infecção animal (Odom *et al.*, 1997; Waugh *et al.*, 2002) por não crescerem à temperatura corporal, ressaltando a importância da termotolerância para o estabelecimento da infecção.

A cápsula é definida como o principal fator de virulência em *C. neoformans* e vem sendo exaustivamente estudada por inúmeros pesquisadores. A cápsula é composta basicamente por dois polissacarídeos: glucuronoxilomanana (GXM), o qual corresponde a cerca de 90% da massa total de polissacarídeos presentes na cápsula, e galactoxilomanana (GalXM), cujas propriedades antigênicas lhe conferem particular interesse. Ambos polissacarídeos são polímeros complexos de elevada massa molecular (revisado por Zaragoza *et al.*, 2009). A GXM consiste basicamente de ácido glicurônico, xilose e manose, e diferenças em sua estrutura são a base para a sorotipagem de isolados de *C. neoformans*; já a GalXM é composta de galactose, xilose e manose (McFadden & Casadevall, 2001). Outro componente da cápsula que aparece em menor quantidade são as manoproteínas, as quais possuem manose como carboidrato predominante. Entretanto ainda pouco se sabe a respeito de sua estrutura e função (McFadden e Casadevall, 2001; revisado por Zaragoza *et al.*, 2009).

Na natureza, a cápsula desempenha um importante papel na proteção do fungo a estresses ambientais, como a dessecação (Aksenov *et al.*, 1973). Já no hospedeiro mamífero, a cápsula tem se mostrado um importante fator de virulência de *C. neoformans*, uma vez que mutantes acapsulares apresentam virulência atenuada em modelo murino de infecção quando comparados à cepa parental e ao mutante reconstituído (Fromtling *et al.*, 1982; Chang & Know-Chung, 1994). A correlação entre cápsula e virulência pode estar associada a dois principais fatores: a) a proteção contra a fagocitose por macrófagos e outros fagócitos conferida pela cápsula (Kozel *et al.*, 1988, 1993); b) as propriedades imunomodulatórias de polissacarídeos capsulares que podem promover a evasão do sistema imune por *C. neoformans*, facilitando sua sobrevivência no interior do hospedeiro (Monari *et al.*, 2006; Vecchiarelli, 2000).

A melanina é um pigmento hidrofóbico e negativamente carregado, sintetizado por polimerização oxidativa de compostos fenólicos (Langfelder *et al.*, 2003). A síntese da melanina é catalisada pela enzima lacase, a qual utiliza catecolaminas, dentre elas dopamina e epinefrina, como substrato. Muitos fungos patogênicos produzem melanina, tais como *Histoplasma capsulatum*, *P. brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* (Gomez *et al.*, 2001; Morris-Jones *et al.*, 2003; Nosanchuk *et al.*, 2002). A melanização também foi

descrita em *C. neoformans* (Nosanchuk *et al.*, 2001b; Rosas *et al.*, 2000), e acredita-se que a mesma contribua para a virulência desse fungo por protegê-lo contra radicais livres produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro durante a infecção (revisado por Nosanchuk & Casadevall, 2003). Adicionalmente, dependendo do tipo de melanina e da resposta imune do hospedeiro, esta pode desempenhar papel imunomodulador, desencadeando uma resposta pro- ou anti-inflamatória (Mednick *et al.*, 2005). Por fim, leveduras melanizadas de *C. neoformans* são menos suscetíveis a anfotericina B quando comparadas a células não produtoras de melanina, o que pode afetar o tratamento de infecções em pacientes imunocomprometidos (Wang & Casadevall, 1994). Tais evidências, adicionadas ao fato que cepas mutantes para o gene que codifica a enzima lacase são menos virulentas que a cepa parental e/ou a cepa reconstituída em modelo murino de infecção (Salas *et al.*, 1996), confirmam o papel da melanina na virulência de *C. neoformans*.

A produção de fosfolipases e urease por *C. neoformans* também vem sendo sugerida como fator de virulência desse fungo. Fosfolipases são hidrolases que possuem como substratos fosfolipídeos (Ghannoum, 2000). Pelo menos duas enzimas com atividade fosfolipásica foram descritas como potenciais fatores de virulência em *C. neoformans*: a) fosfolipase B (Chen *et al.*, 1997), cuja atividade é importante para a sobrevivência e replicação das leveduras no interior de fagócitos, e para a disseminação fúngica (Noverr *et al.*, 2003); b) fosfatidil-inositol fosfolipase C, a qual apresenta um importante papel na manutenção da morfologia celular e integridade da parede de *C. neoformans*, além de ser essencial para a expressão fenotípica de múltiplos fatores de virulências, como crescimento a 37°C, produção de melanina e a própria secreção de fosfolipase B (Chayakulkeeree *et al.*, 2008). Ademais, a deleção dos genes *Plb1*, que codifica a enzima fosfolipase B, e *Plc1*, que codifica a enzima fosfolipase C, causa uma evidente atenuação da virulência em modelo murino de infecção por inalação (Cox *et al.*, 2001; Chayakulkeeree *et al.*, 2008).

A urease é descrita como um importante fator de virulência da bactéria *Helicobacter pylori*, o principal agente causador de úlceras gástricas e duodenais em humanos (Lee *et al.*, 1993; Mera, 1995). É proposto que essa enzima atue no microambiente gastro-intestinal, elevando o pH do meio e, assim, permitindo a sobrevivência de *H. pylori* na mucosa gástrica e, conseqüentemente, o estabelecimento da infecção. De fato, o papel da urease na colonização dessa bactéria em modelos experimentais já foi relatado (Eaton & Krakowka, 1994; Tsuda *et al.*, 1994). Para *C. neoformans* foi

mostrado que camundongos infectados com isolados mutantes para o gene *Ure1* apresentam menor taxa de mortalidade quando comparados aos animais infectados com o tipo selvagem (Cox *et al.*, 2000). Uma vez que a transcrição do gene *Ure* em *H. pylori* é induzida em resposta a condições de baixo pH (Akada *et al.*, 2000; Pflock *et al.*, 2005), admite-se uma possível regulação desse gene por pH em outros microrganismos que sejam submetidos a ambientes ácidos no processo da infecção, como é o caso de *C. neoformans* ao ser submetido ao ambiente intracelular de fagócitos.

O metabolismo de polióis em leveduras também tem sido considerado uma potencial via bioquímica relacionada com a virulência (Perfect *et al.*, 1998). Polióis acíclicos como glicerol, arabitol e manitol são produzidos em abundância por uma grande quantidade de fungos (Janings, 1984). *C. neoformans* produz D-manitol *in vitro* e *in vivo*, o qual vem se confirmando como fator de virulência desse fungo, já que cepas mutantes não produtoras de manitol são menos patogênicas quando comparadas com a cepa parental (Wong *et al.*, 1990; Chaturvedi *et al.*, 1996). Uma possível explicação para o papel do manitol na virulência de *C. neoformans* é que a síntese e acúmulo desse poliól pode interferir na adaptação da levedura a diferentes ambientes, uma vez que cepas não produtoras de manitol são mais susceptíveis ao estresse térmico e osmótico. Além disso, altos níveis de manitol presentes no interior e ao redor da células fúngica podem proteger *C. neoformans* de intermediários reativos de oxigênio produzidos por fagócitos (Chaturvedi *et al.*, 1996). Um trabalho recente mostra ainda que *C. neoformans* responde ao manitol aumentando o tamanho de sua cápsula polissacarídica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Guimarães *et al.*, 2010).

#### **1.4.2. Origem e manutenção da virulência em *C. neoformans***

Apesar da capacidade de *C. neoformans* em proliferar e desenvolver doença no hospedeiro mamífero, o ciclo de vida desse fungo independe do parasitismo em células animais. Com base nesse fato, algumas questões sobre a origem e a manutenção de fatores que auxiliam no estabelecimento da infecção por *C. neoformans* em hospedeiros mamíferos vem sendo formuladas. Nesse contexto, pergunta-se: como *C. neoformans* adquiriu a capacidade de infectar humanos e outros animais? Por que um microrganismo saprofítico expressa fatores de virulência e possui estratégias sofisticadas que permitem sua sobrevivência no interior de macrófagos? Como/por que fatores relacionados à virulência de *C. neoformans* foram selecionados e vem sendo

mantidos ao longo da evolução? (Steenbergen *et al.*, 2001; Steenbergen & Casadevall, 2003; Steenbergen *et al.*, 2004).

A observação de que isolados ambientais de *C. neoformans* recuperados de amostras de solo são aptos a sobreviver e se reproduzir em animais, podendo desenvolver criptococose (Casadevall & Perfect, 1998), associada ao fato de que cepas ambientais expressam constitutivamente uma variedade de fatores importantes para a patogênese, sugerem que a virulência de *C. neoformans* teve origem e é mantida devido a pressões seletivas que esse organismo sofre no seu meio-ambiente natural (Casadevall *et al.*, 2003). Tais dados, em adição ao fato de *C. neoformans* ser um parasita intracelular facultativo, o que certamente requer estratégias sofisticadas que permitam a sobrevivência do mesmo no ambiente hostil do interior de macrófagos, sugerem que, possivelmente, os atributos de virulência desse fungo patogênico foram selecionados em resposta a interações de *C. neoformans* com predadores ambientais, como amebas (Steenbergen *et al.*, 2001; Casadevall *et al.*, 2003).

Amebas e macrófagos possuem propriedades comuns: ambas as células apresentam característica fagocitária e mantêm as partículas ingeridas no interior de vacúolos, além de secretarem enzimas lisossomais para degradação das partículas fagocitadas (Swanson & Hammer, 2000). Em 2001, Steenbergen *et al.* mostraram que a interação de *C. neoformans* com a ameba *Acanthamoeba castellanii* resulta na ingestão do fungo seguida pela replicação intracelular do mesmo e o acúmulo de vesículas contendo polissacarídeos no citoplasma das células amebóides, remetendo a um processo bastante similar ao que ocorre durante a interação entre *C. neoformans* e macrófagos. Além disso, cepas mutantes deficientes na síntese de cápsula e na produção de fosfolipase, dois importantes fatores de virulência de *C. neoformans*, são incapazes de se reproduzir no interior de *A. castellanii*. De fato, cepas acapsulares são mortas após ingeridas pela ameba; por outro lado, cepas acapsulares e melanizadas são resistentes ao potencial fungicida de *A. castellanii*, o que indica um papel da melanina na proteção contra predadores amebóides (Steenbergen *et al.*, 2001). Esses resultados observados quando da interação entre *C. neoformans* e *A. castellanii* são bastante similares a resultados prévios mostrados para *C. neoformans* e macrófagos (Cox *et al.*, 2001), indicando que fatores de virulência requeridos nos hospedeiros mamíferos também são fatores de virulência na interação com amebas. Com isso, sugeriu-se que a estratégia de sobrevivência intracelular usada por *C. neoformans* em macrófagos de mamíferos é consequência da seleção evolutiva para a sua sobrevivência contra a predação por

protozoários no solo. Ademais, resultados semelhantes foram obtidos quando do estudo da interação de *A. castellanii* com *B. dermatitidis*, *S. schenckii* e *H. capsulatum* (Steenbergen *et al.* 2004).

Dados interessantes foram também obtidos da interação entre *C. neoformans* e a espécie amebóide de vida livre *Dictyostelium discoideum*. Steenbergen *et al.* (2003) mostraram que o co-cultivo de uma cepa de virulência atenuada de *C. neoformans* com *D. discoideum*, *in vitro*, aumenta significativamente a virulência do fungo, conforme verificado em modelo murino de infecção (Steenbergen *et al.*, 2003). Esses dados sugerem uma potencial explicação acerca da origem de certos fatores de virulência em *C. neoformans*, reforçando a idéia de que os mesmos foram selecionados por pressões sofridas pelo fungo em seu ambiente natural. Tal hipótese foi previamente sugerida para outros patógenos intracelulares facultativos, como *Legionella pneumophila* e *Mycobacterium avium*, para os quais foi mostrado que a interação com ameba resulta em aumento da virulência (Brieland *et al.*, 1997; Cirillo *et al.*, 1997).

Nesse contexto, estudos adicionais comparando a interação entre *C. neoformans*-macrófago e *C. neoformans*-ameba podem ser de grande relevância para auxiliar ainda mais na compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela origem e manutenção de fatores de virulência importantes no estabelecimento da infecção em mamíferos, bem como a adaptação de *C. neoformans* ao hospedeiro animal. Dentro do que foi descrito no item exposto acima está inserido o último objetivo do presente trabalho, o qual será apresentado com mais detalhes a seguir.

## **OBJETIVOS**

---

## 2. Objetivos

### **Objetivo 1:**

**Avaliar os efeitos do farnesol, uma molécula de sensoramento de quorum de *C. albicans*, em *P. brasiliensis*.**

- Analisar os principais efeitos do farnesol no crescimento, na viabilidade e no dimorfismo de *P. brasiliensis*.
- Verificar o efeito do farnesol na permeabilidade celular e nas estruturas celulares de *P. brasiliensis*.
- Avaliar o efeito do sobrenadante de uma cultura crescida de *C. albicans* em *P. brasiliensis*.

### **Objetivo 2:**

**Avaliar o efeito do propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, na formação de biofilme de *C. albicans in vitro*.**

- Verificar o efeito do propranolol no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*.
- Verificar a ação do propranolol na adesão de *C. albicans* a superfícies abióticas e bióticas.
- Avaliar os efeitos do propranolol na expressão de genes relacionados à formação de biofilme em *C. albicans*.

### **Objetivo 3:**

#### **Comparar o transcrito do fungo *C. neoformans* quando na interação com amebas e macrófagos murinos.**

- Analisar a expressão gênica de leveduras de *C. neoformans* durante interação com a ameba *A. castellanii*.
- Analisar a expressão gênica de *C. neoformans* durante interação com macrófagos murinos J774.1 e comparar com os dados obtidos para infecção de *C. neoformans* com amebas.
- Validar os experimentos de microarranjo de cDNA realizados por RT-PCR em tempo real.
- Avaliar o possível papel de genes de *C. neoformans* cuja expressão foi aumentada durante a interação com ameba na virulência do fungo em modelo de infecção animal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Linhagens Celulares e Manutenção**

##### **3.1.1. *Paracoccidioides brasiliensis***

Foi utilizado para esse estudo o isolado virulento Pb18 de *P. brasiliensis* (Singer-Vermes *et al.*, 1989). A forma leveduriforme foi mantida em meio sólido Fava-Netto (protease peptona 0,3%, peptona 1%, extrato de carne 0,5%, dextrose 4%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e ágar 1,6 % pH 7,2) por 6-7 dias em uma estufa bacteriológica aquecida a 37°C, sendo repicado semanalmente. A forma miceliana deste isolado foi mantida em meio sólido Ágar Batata (Difco), em estufa a 25°C.

##### **3.1.2. *Candida albicans***

A linhagem ATCC10231 de *C. albicans* foi crescida por 48h em meio sólido Fava-Netto a 37°C, e posteriormente mantida a 4°C, com repiques sendo realizados quinzenalmente. Nessas condições mais de 95% das células de *C. albicans* permaneciam na forma de levedura.

##### **3.1.3. *Cryptococcus neoformans***

A linhagem H99 de *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A) foi crescida por 48h em meio líquido YPD (extrato de levedura 1%, glicose 2%, bacto-peptona 2% pH 7,2) a 30°C, para posterior preparo de estoques da cultura em glicerol 35%, os quais foram mantidos a -80°C. Para os experimentos, uma fração do estoque foi descongelada e adicionada a meio YPD líquido, sendo as leveduras cultivadas por 48h a 30°C sob agitação.

##### **3.1.4. Macrófagos murinos J774.1**

Os macrófagos murinos da linhagem J774.1 foram mantidos a temperatura de -80°C em 90% de meio DME (Dulbeccos Modified Eagle's Medium – GibcoBRL#11965) suplementado com 20% soro fetal bovino (Gibco BRL, USA), NCTC-109 10% (GibcoBRL#21340) e 1% solução de aminoácidos não essenciais (GibcoBRL#11140), e 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido). Para utilização nos experimentos, os macrófagos foram descongelados e cultivados em placas para cultura de células (Falcon#1005) contendo meio DME suplementado com 10% soro fetal bovino, 10% NCTC-109 e 1%

solução de aminoácidos não essenciais, o qual era previamente esterilizado por filtração (0.2 µm). As células foram mantidas a 37°C com atmosfera de ar umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.1.5. *Acanthamoeba castellanii***

A linhagem 30234 de *A. castellanii* foi mantida no escuro em meio PYG (peptona 2%, extrato de levedura 0,1%, glicose 1,8%, pH 7,2) a 28°C, sendo repicada a cada 5-7 dias.

Para todos os tipos celulares, a contagem do número de células para a utilização nos experimentos foi determinada em câmara de Neubauer.

## **3.2. Preparo de soluções**

### **3.2.1. Tampões**

#### **a) Tampão fosfato (PBS) 10X**

NaCl	1,5 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M
NaN <sub>3</sub>	0,02 %

O pH foi ajustado para 7,2.

#### **b) Tampão SSC 1X**

Citrato de Sódio	0,03 M	pH 7,0
NaCl	0,3 M	

### **3.2.2. Solução de Farnesol**

A partir de uma solução estoque de uma mistura de estereoisômeros de farnesol (Fluka/Sigma – Sigma-Aldrich#46191), foram realizadas diluições em metanol 100% de modo que o mesmo volume (4 µL) das diferentes diluições fosse adicionado ao ensaio pra obtenção da concentração final desejada. Ao controle foi adicionado o mesmo volume do diluente puro (metanol) à cultura.

### **3.2.3. Soluções de Propranolol e Metoprolol**

Propranolol (Sigma-Aldrich) foi diluído em água destilada estéril para uma concentração final de 17 mM. A solução estoque de metoprolol (Sigma-Aldrich) foi preparada de forma similar para uma concentração final de 10 mM.

### **3.2.4. Soluções livres de RNase**

Todos os reagentes e águas utilizados no preparo de soluções para o uso em experimentos com RNA estavam em condições livres de RNase, preparados conforme descrito por Sambrook & Russel (2001).

### **3.2.5. Soluções para eletroforese em géis de agarose**

#### **a) Tampão de Corrida Tris-EDTA-borato (TEB) 10X**

Trizma base	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M

O pH foi ajustado para 8,0 com ácido bórico.

#### **b) Tampão de Amostra para RNA (10X)**

Glicerol	50 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)
Xileno cianol	0,1 % (p/v)

#### **c) Solução de Brometo de Etídio**

- Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada.
- Concentração final de uso: 0,5 µg/mL.

### **3.3. Análise dos efeitos do farnesol em *P. brasiliensis***

Culturas de *P. brasiliensis* (levedura e/ou micélio) foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações de farnesol para verificação de possíveis alterações na taxa de crescimento, no processo de transição dimórfica, na permeabilidade celular e nas estruturas celulares desse fungo.

#### **3.3.1. Efeito do farnesol no crescimento de *P. brasiliensis***

Leveduras de *P. brasiliensis* ( $2 \times 10^5$  cells/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 200  $\mu$ L final de meio líquido YPD, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de farnesol, até atingirem a fase estacionária de crescimento. As células foram mantidas a 37°C sob agitação (150 rpm). A avaliação dos efeitos do farnesol na taxa de crescimento do fungo foi realizada pela verificação diária da densidade óptica (OD) em leitor de ELISA (Elx800) a 630 nm, após vigorosa agitação da placa em vortex. Experimentos similares foram realizados para a fase miceliana de *P. brasiliensis*, alterando-se a temperatura de cultivo para 25°C. Os controles utilizados nesse experimento foram: controle de crescimento (cultura sem farnesol), controle do diluente (cultura com 2% de metanol) e o branco (apenas meio de cultura). A concentração mínima inibitória (CIM) foi definida como sendo aquela que promove 80% de inibição do crescimento quando comparada com o controle (cultura sem farnesol). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.3.2. Efeito do farnesol na viabilidade de *P. brasiliensis***

As análises de viabilidade celular foram realizada utilizando-se o reagente MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium; Invitrogen#M6494), o qual avalia a atividade mitocondrial, sendo metabolizado por enzimas desidrogenases e resultando na formação de um produto de coloração roxo denominado formazan (Vistica *et al.*, 1991). Para determinação da concentração mínima letal (CML), leveduras de *P. brasiliensis* ( $2 \times 10^5$  cells/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 200  $\mu$ L final de meio líquido YPD, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de farnesol. Após 15 dias de incubação a 37°C sob agitação (150 rpm), uma solução de 5 mg/mL de MTT diluído em 0,15M tampão fosfato (PBS) foi adicionada a cada poço da placa para uma concentração final de 0,5 mg/mL. Após 4h de incubação a 37°C, o meio contendo MTT foi parcialmente removido e 100  $\mu$ L de

DMSO foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan formados. Os resultados foram mensurados por verificação da densidade óptica (OD) em leitor de ELISA (Elx800) a 490 nm. A concentração mínima letal (CML) foi definida como sendo aquela que promove 80% de morte celular quando comparada com o controle (cultura sem farnesol). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O efeito do farnesol na viabilidade celular foi também estimado por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Leveduras de *P. brasiliensis* ( $2 \times 10^5$  cells/mL) foram ressuspensas em meio YPD e farnesol foi adicionado para uma concentração final de 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu$ M. Ao controle (sem farnesol) adicionou-se 2% de metanol. Após incubação a 37°C por 4 dias sob agitação (150 rpm), as células foram recuperadas por centrifugação (4000 x g / 5 min), lavadas e plaqueadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion Agar* - Difco) suplementado com 4% de soro de cavalo, cultivando-se por 12 dias. Posteriormente, as UFCs foram contadas. A taxa de sobrevivência do fungo após o tratamento com farnesol foi comparada ao controle (culturas crescidas sem farnesol). A porcentagem de morte celular foi calculada como  $(1 - N1/N2) \times 100$ , onde N1 é a média do número de colônias da triplicata de cada tratamento com farnesol, e N2 é a média do número de colônia da triplicata do controle (sem farnesol).

### **3.3.3. Efeito do farnesol sobre o dimorfismo de *P. brasiliensis***

Os efeitos no processo de transição dimórfica de *P. brasiliensis* mediados por farnesol também foram avaliados. Para tanto,  $2 \times 10^5$  cells/mL foram cultivadas em placas de 24 poços contendo 1 mL final de meio líquido YPD, na ausência ou na presença de farnesol. As concentrações de farnesol utilizadas foram a CIM, previamente definida, e concentrações sub-inibitórias, as quais foram adicionadas a inóculos de células tanto da fase de levedura como da fase miceliana de *P. brasiliensis* cultivados a 25°C por 24 e 48h, e a 37°C por 4 dias, respectivamente. Os efeitos do farnesol na morfologia celular foram verificados por microscopia óptica. A porcentagem de células em transição e o tamanho médio dos tubos germinativos foram calculados.

### **3.3.4. Efeito do farnesol na permeabilidade das células de *P. brasiliensis***

Visando avaliar o efeito do farnesol na permeabilidade de leveduras de *P. brasiliensis*, realizou-se o ensaio de coloração com Alaranjado de Acridina (AA) e Brometo de Etídio (BE). Brevemente,  $2,5 \times 10^6$  cel/mL de *P. brasiliensis* foram cultivadas na ausência (controle) ou na presença de farnesol (25, 50, 100 e 150  $\mu$ M). Como controle positivo da metodologia, leveduras de *P. brasiliensis* e *C. albicans* foram tratadas com 50 mM de peróxido de hidrogênio. As células foram posteriormente coletadas por centrifugação (4000 x g / 10 min), ressuspendidas em PBS e 20  $\mu$ L da suspensão de célula foram corados, por 5 min, com uma solução recém preparada de AA (100  $\mu$ g/mL) / BE (100  $\mu$ g/mL) na proporção de 1:1. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência (Carl Zeiss). Os experimentos foram realizados em triplicate.

### **3.3.5. Efeito do farnesol nas estruturas citoplasmáticas e na parede celular de *P. brasiliensis***

A avaliação do efeito do farnesol nas estruturas celulares de *P. brasiliensis* foi realizada utilizando-se as metodologias de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

**MET:** Leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas a 36°C por 3 dias em meio sem (controle suplementado com 2% de metanol) ou com farnesol (25, 50 e 150  $\mu$ M). As células foram recuperadas por centrifugação a 4000 x g por 5 min, lavadas quatro vezes com tampão PBS (pH 7,2) e fixadas durante a noite a 4°C (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído e 0,1 M tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, com 3% sacarose e 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Após fixação, as células foram coletadas por centrifugação (4000 x g / 5 min), lavadas quatro vezes com 0,1 M tampão cacodilato de sódio (4000 x g / 15 min). As amostras foram pós-fixadas por 1 h (1% tetróxido de ósmio, 0,8% ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio), contrastadas *en bloc* com 0,5% de acetato de uranila, desidratadas em concentrações crescentes de acetona e emblocadas em resina Spurr. Após ultramicrotomia, os cortes foram contrastados com acetato de uranila/citrato de chumbo, e observados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 a 80 kV.

**MEV:** Leveduras de *P. brasiliensis* foram incubadas com diferentes concentrações de farnesol (0, 25 and 50  $\mu$ M) por 5, 10 e 24 h. Posteriormente, as células foram fixadas durante a noite a 4°C (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído e 0,1 M tampão

cacodilato de sódio, pH 7,2, com 3% sacarose e 3 mM CaCl<sub>2</sub>), recuperadas por centrifugação (4000 x g / 5 min), e lavadas quatro vezes com 0,1 M tampão cacodilato de sódio (4000 x g / 15 min). As amostras foram pós-fixadas por 1 h (1% tetróxido de ósmio, 0,8% ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio), e desidratadas em concentrações crescentes de acetona para posterior secagem ao ponto crítico (BAL-TEC CPD-030 – Electron Microscopy Sciences, USA), e revestimento com ouro e paládio (Balzers Union SCD-040 – Electron Microscopy Sciences, USA). Para visualização utilizou-se o microscópio eletrônico JEOL (Tokyo, Japan) JEM 840A.

### **3.3.6. Avaliação dos efeitos do meio condicionado de *C. albicans* na morfologia de *P. brasiliensis***

Levedura de *C. albicans* (ATCC10231) foram crescidas por cerca de 40 h a 30°C sob agitação (150 rpm). Após esse período a cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi coletado, filtrado e usado como meio condicionado (CM). Diferentes concentrações do CM obtido foram adicionadas a inóculos ( $5 \times 10^4$  cel/mL) de células da fase de levedura de *P. brasiliensis* submetidas a cultivo na temperatura de 23°C. Os efeitos do CM na morfologia celular foram verificados por microscopia óptica.

### **3.3.7. Ensaios preliminares para verificação da identidade química da molécula presente no meio condicionado de *C. albicans* que inibe a morfogênese de *P. brasiliensis***

Visando uma avaliação preliminar das propriedades químicas da molécula efetora presente no CM de *C. albicans* que inibe a morfogênese de *P. brasiliensis*, o sobrenadante da cultura de *C. albicans* foi tratado com proteinase K (100 µg/mL / 50°C / O.N.) ou autoclavado por 30 min. Posteriormente, os CMs tratados foram adicionados a culturas de *P. brasiliensis* que foram submetidas ao processo de transição dimórfica, como descrito anteriormente.

### **3.3.8. Análise estatística dos resultados**

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa de computador “Mynova”, versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). Os dados estão apresentados como médias +/- SEM (erro padrão da média). Para comparações entre dois dados (condição experimental X condição controle) foi utilizado o teste-t de Student, sendo considerados os valores de  $P < 0,05$  como significativamente diferentes.

### **3.4. Análise dos efeitos de propranolol na formação de biofilme de *C. albicans***

#### **3.4.1. Efeito do propranolol na morfologia de *C. albicans***

Leveduras de *C. albicans* foram cultivadas em meio YPD ágar suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), contendo ou não 750 µM de propranolol. As placas foram incubadas por 48 h a 36°C. Posteriormente, analisou-se macroscopicamente a morfologia da colônia, e microscopicamente, por microscopia óptica, a morfologia celular.

#### **3.4.2. Efeito do propranolol na adesão de *C. albicans* a superfícies abióticas**

10<sup>6</sup> cel/mL de *C. albicans* em meio YPD suplementado, ou não (controle), com 20% de SFB foram cultivadas em placa de 96 poços (Corning Incorporated, Corning N.Y.) na ausência ou na presença de diferentes concentrações de propranolol, por 24 h a 36°C. As células não aderidas foram descartadas, os poços foram lavados com tampão PBS 1X estéril e as células aderidas foram fixadas a 56°C por 30 min para posterior coloração com cristal violeta 0,1% (15 min / temperatura ambiente). Depois de coradas, as células foram lavadas com PBS 1X e secas a temperatura ambiente por 3 h para ser realizada a leitura da densidade óptica a 630 nm.

#### **3.4.3. Efeito do propranolol na adesão de *C. albicans* a células epiteliais**

Células de *C. albicans* foram crescidas por 24 h a 36°C em meio YPD, lavadas e diluídas para uma concentração de 10<sup>4</sup> cel/mL em meio DME contendo 20% de SFB. Células HeLa foram crescidas em meio DME suplementado com 10% SFB a 37°C (5% CO<sub>2</sub>) em placas de cultura de células de 24 poços até atingirem a confluência. As células foram então lavadas com PBS 1X e 100 µL da suspensão de células de *C. albicans* foram adicionados para o ensaio de adesão. Após co-cultivo a 37°C por 1 h na presença de diferentes concentrações de propranolol, as células de *C. albicans* não aderidas foram lavadas três vezes com tampão PBS 1X pré-aquecido a 37°C. As células fúngicas aderidas foram recuperadas após lise das células HeLa com água MilliQ estéril e semeadas em placas contendo meio YPD ágar. Após incubação a 37°C por 24 h, o

número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado. Esse experimento foi realizado em triplicata.

#### **3.4.4. Efeito do propranolol na formação de biofilme por *C. albicans***

As análises da formação do biofilme foram realizadas pelo ensaio de MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-difeniltetrazolium brometo) baseando-se no protocolo previamente descrito por Hawser & Douglas (1994), e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

**Ensaio com MTT:**  $5 \times 10^6$  cel/mL de leveduras de *C. albicans* em meio YPD suplementado, ou não (controle), com 20% de SFB foram cultivadas em placa de 24 poços na ausência ou na presença de diferentes concentrações de propranolol (0,5; 0,75; ou 1 mM) por 24 h a 36°C. Ao controle (sem propranolol) foi adicionado água destilada estéril. Após o cultivo, o meio foi descartado e as células que permaneceram aderidas à placa foram lavadas três vezes com PBS 1X e quantificadas pelo ensaio de MTT, como descrito por Hawser e Douglas, 1994. Brevemente, uma solução estoque de MTT (5 mg/mL) foi adicionada para uma concentração final em cada poço de 0,5 mg/mL. A placa foi então incubada no escuro a 36°C por 4h. Posteriormente, o meio foi removido e as células remanescentes foram lavadas três vezes com 0,15 M PBS. Para solubilizar os cristais de formazan formados, 1 mL de DMSO foi adicionado por poço. Os resultados foram mensurados por verificação da densidade óptica (OD) em leitor de ELISA (Elx800) a 490 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Alternativamente, o mesmo protocolo foi utilizado para avaliar o efeito do metoprolol na formação de biofilme de *C. albicans*, bem como a ação conjunta do propranolol e do metoprolol.

**MEV:** Para análise da arquitetura do biofilme de *C. albicans* formado na presença de diferentes concentrações de propranolol (0, 0,5, 0,75 ou 1 mM) por MEV, o biofilme foi cultivado em catéteres de polivinil cloreto (PVC). As células aderidas ao catéter foram fixadas durante a noite a 4°C (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7.2, com 3% sacarose e 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ), lavadas três vezes com 0,1 M de tampão cacodilato de sódio. As amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de acetona, submetidas à secagem ao ponto crítico (BAL-TEC CPD-030 – Electron Microscopy Science, USA), e revestimento com ouro e paládio (Balzers Union SCD-040 – Electron Microscopy Sciences, USA). Para visualização utilizou-se o microscópio eletrônico JEOL (Tokyo, Japan) JEM 840A.

### **3.4.5. Efeito do propranolol em diferentes tempos do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans***

$10^6$  cel/mL de leveduras de *C. albicans* em meio YPD suplementado, ou não (controle), com 20% de SFB foram cultivadas em placas de 96 poços. A adição de propranolol para uma concentração final de 1 mM foi realizada após diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, e 6h) do início da formação do biofilme (t=0h). Para todas as condições, a placa foi incubada por um período total de 24h a 36°C. Alternativamente, 0,5, 0,75 ou 1mM de propranolol foi adicionado a um biofilme pré-formado por 24h. Nesse caso, o ensaio foi realizado por 48h a 36°C. Os efeitos do propranolol ao longo do desenvolvimento do biofilme foram mensurados pelo ensaio de MTT, conforme descrito previamente.

### **3.4.6. Análise do padrão de expressão gênica de *C. albicans* em resposta ao propranolol**

Para avaliar os níveis de expressão de genes potencialmente importantes na formação do biofilme de *C. albicans* em resposta ao propranolol, o fungo foi cultivado em meio YPD suplementado com 20% de SFB por 24 h, na presença ou na ausência de 0,75 mM propranolol. As células foram coletadas por centrifugação (5000 X g / 10 min) e submetidas a extração do RNA total.

**Extração do RNA total de *C. albicans*:** Após coleta das células, a lise do fungo foi realizada por vigorosa agitação em 1 mL de Trizol na presença de pérolas de vidro (Sigma) por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10000 × g por 1 min) para a remoção dos restos celulares do fungo, e o lisado celular foi usado para a obtenção do RNA total. A extração do RNA foi realizada conforme especificado pelo fabricante do reagente Trizol® (Invitrogen). À amostra coletada adicionou-se 200 µl de clorofórmio, misturando-se vigorosamente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (12.000 g / 15 min / 4°C) e a fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo. Adicionou-se 500 µl de isopropanol e, após 10 min de incubação a temperatura ambiente, a amostra foi novamente centrifugada (12.000 g / 10 min / 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% (7500 g / 5 min / 4°C). Em seguida deixou-se o sedimento secando à temperatura ambiente e, posteriormente, o mesmo foi ressuscitado em água MilliQ livre de RNAses.

**Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNases:** Após quantificação por espectrofotometria e verificação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%, em condições livre de RNase (Sambrook & Russel, 2001), cerca de 10 µg do RNA total obtido foi submetido a tratamento com DNase I livre de RNase (Promega) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. As condições de tratamento com DNase I, para um volume final de 100 µL de reação, foram: Tampão da DNase I 1X; 10 U da enzima DNase I livre de RNase (Promega). O tratamento foi realizado a 37° C por 30 minutos, parando-se a reação pela adição do tampão de para e aquecendo-se a 65° C por 10 minutos. Após precipitação padrão com etanol (Sambrook & Russel, 2001), o RNA total tratado com DNase I livre de RNase foi novamente quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, sendo todos os procedimentos realizados em condições livres de RNase (Sambrook & Russel, 2001).

**Síntese da Primeira Fita de cDNA:** A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total de *C. albicans* cultivado de acordo com as condições especificadas anteriormente, e tratado com DNase I livre de RNase. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µg de iniciador dT<sub>12-18</sub>, sendo a mistura incubada a 70°C / 10 minutos, e imediatamente colocada no gelo por cerca de 1 minuto. Em seguida, para um volume final de 25 µL, os seguintes reagentes foram adicionados (para as concentrações finais indicadas): tampão da transcriptase reversa 1X; DTT 8 mM; dNTPs 0,4 mM cada. Após incubação a 42°C por 2 minutos, 200U da enzima transcriptase reversa (SuperScript II, Invitrogen) foram adicionadas para cada sistema, seguido de incubação a 42°C por 1 h. Finalmente, a enzima foi desnaturada aquecendo-se a 70°C por 20 minutos.

**PCR em tempo real:** Para as análises de expressão gênica foram realizados experimentos de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção por SYBR Green, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Os ensaios de amplificação foram realizados no aparelho 7500 *Fast System SDS Software* (Applied Biosystems) em reações de 10 µL contendo 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 5 µL de solução completa para PCR contendo SYBR Green (2X) (Applied Biosystems) e 0,02µL da reação síntese de cDNA como molde. Após a desnaturação inicial a 95°C por 20 s, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 95°C por 3 s e 60°C por 20 s. A fim de confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à

análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. O método de comparação do ciclo limiar (CT) ou *crossing threshold* (Livak *et al.*, 2001) foi empregado para a avaliação da variação da expressão (*fold-change*) de cada gene de interesse, sendo utilizado o gene constitutivo 18S de *C. albicans* para normalização. O CT é o número de ciclos no qual a quantidade de alvo amplificado atinge o limiar de fluorescência emitida, ou *threshold*, definido pelo pesquisador. O método de comparação do CT tem como base de cálculo a equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  onde  $\Delta\Delta CT = (\Delta CT \text{ experimento} - \Delta CT \text{ controle})$ , sendo que  $\Delta CT \text{ experimento} = CT \text{ do gene de interesse no experimento} - CT \text{ do gene constitutivo no experimento}$  e  $\Delta CT \text{ controle} = CT \text{ do gene de interesse no controle} - CT \text{ do gene constitutivo no controle}$ . Os experimentos foram realizados em triplicata para todos os genes analisados. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados usando o programa *Primer 3*, disponível no endereço eletrônico <http://www-genome.wi.mit.edu>, e estão listados na tabela 1.

Tabela 1. **Oligonucleotídeos para *C. albicans* utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.**

Iniciadores	Gene	Seqüência (5'→3')
ALS1 F	Als1	CAGAGTTATGCCAAGTCTCAATAA
ALS1 R		CCCATTGTACCAGATGTGTAACCA
ALS3 F	Als3	GTACTAGTGCAAGTCCGGGAGATA
ALS3 R		ACCATGAGCAGTCAAATCAACAGA
HWP1 F	Hwp1	CCGGAATCTAGTGCTGTCGT
HWP1 R		TAATTGGCAGATGGTTGCAT
18S F	18S rRNA	GGAAACTCACCAGGTCCAGA
18S R		AACTAAGAACGGCCATGCAC

### 3.4.7. Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa de computador “Mynova”, versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). Os dados estão apresentados como médias +/- SEM (erro padrão da média). Para comparações entre dois dados (condição experimental X condição controle) foi utilizado o teste-t de Student, sendo considerados os valores de  $P < 0,05$  como significativamente diferentes.

### **3.5. Comparação do transcrito de *C. neoformans* quando na interação com amebas e macrófagos murinos**

#### **3.5.1. Análise da cinética da internalização de leveduras de *C. neoformans* por amebas e macrófagos murinos**

Em placas de 96 poços foram inoculadas, por poço,  $1 \times 10^5$  células de macrófagos ou  $2 \times 10^5$  células de amebas em 200  $\mu\text{L}$  de meio DME suplementado (soro fetal bovino 20%, NCTC-109 10% e solução de aminoácidos não essenciais 1%) ou meio PYG, respectivamente. As células foram cultivadas por 18 h, sendo as amebas mantidas a 28°C e os macrófagos a 37°C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, o sobrenadante das culturas foi removido, as células remanescentes lavadas com PBS 1X estéril, e  $1 \times 10^6$  leveduras de *C. neoformans* foi adicionada a cada poço. Em ambos os casos, a proporção levedura:macrófago ou ameba foi cerca de 5:1. Para as infecções em macrófagos adicionou-se à co-cultura 10  $\mu\text{g/mL}$  (concentração final) do anticorpo 18B7 para opsonização. As co-culturas de *C. neoformans* com ameba ou macrófago foram então incubadas por 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h e 6h respectivamente a 28°C ou a 37°C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o período de incubação, o sobrenadante da cultura foi descartado sendo adicionado 100  $\mu\text{L}$  de metanol gelado a cada poço. A placa foi incubada por 30 min a temperatura ambiente para fixação das células, o metanol foi descartado e os poços foram lavados 3 vezes com tampão PBS 1X. A cada poço foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de uma solução 1:10 do corante Giemsa em água destilada. A coloração foi realizada por 2h a temperatura ambiente, seguida de lavagens com PBS 1X. Utilizando microscopia óptica, de cem a duzentas células de amebas ou macrófagos foram contadas no intuito de determinar a porcentagem de leveduras de *C. neoformans* internalizadas a cada ponto pós-infecção. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

#### **3.5.2. Infecção *ex vivo* de amebas e macrófagos murinos com leveduras de *C. neoformans***

Em frascos de 175  $\text{cm}^2$  (BD Molecular Biotechnology) foram inoculadas  $2 \times 10^7$  células de *A. castellanii* em 75 mL de meio PYG. Alternativamente, foram inoculadas  $10^7$  células de macrófagos murinos da linhagem J774.1 em 75 mL de meio DME suplementado (soro fetal bovino 20%, NCTC-109 10% e solução de aminoácidos não

essenciais 1%). As células foram cultivadas por 18 h, sendo as amebas mantidas a 28°C e os macrófagos a 37°C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Leveduras de *C. neoformans* foram cultivadas em meio YPD por 24 h a 30°C sob agitação (150 rpm). Posteriormente as células foram coletadas por centrifugação (2000 x g por 5 min), lavadas duas vezes com tampão PBS 1X, ressuspensas em meio PYG ou DME suplementado e utilizadas na infecção.

As culturas de amebas ou macrófagos nos frasco de cultura foram infectadas com 10<sup>8</sup> leveduras de *C. neoformans*, seguindo uma proporção aproximada levedura:macrófago ou ameba de 5:1. Para as infecções em macrófagos adicionou-se à co-cultura 10 µg/mL (concentração final) do anticorpo 18B7 para opsonização. Os frascos foram então incubados por 6 h a 28°C para infecção de amebas, ou a 37°C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> para infecção de macrófagos. Como controle foram utilizadas levedura de *C. neoformans* crescido *in vitro* nas mesmas condições experimentais. Nesse sentido, para o experimento controle da interação de *C. neoformans* com amebas, o fungo foi cultivado em meio PYG por 6h a 28°C. Da mesma forma, para controle do experimento de interação entre *C. neoformans* e macrófagos, leveduras foram cultivadas em meio DME suplementado e na presença de 10 µg/mL do anticorpo 18B7 por 6h a 37°C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.5.3. Extração de RNA total de leveduras de *C. neoformans* internalizadas**

Após 6 h de infecção, as leveduras de *C. neoformans* não fagocitadas foram removidas por lavagens com PBS 1X e as amebas ou macrófagos infectados lisados pela adição de deoxicolato 25 mM. Este tratamento promove a lise das amebas e macrófagos enquanto o fungo permanece intacto e viável. As células leveduriformes foram recuperadas por centrifugação (3400 × g por 10 min) e usadas para o isolamento do RNA total de *C. neoformans* empregando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA). A lise do fungo foi realizada em três ciclos de 2 minutos cada de vigorosa agitação em 1 mL de Trizol na presença de micropérolas de vidro (Sigma). Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas (10000 × g por 1 min) para a remoção das micropérolas de vidro e dos restos celulares do fungo, e o lisado celular foi usado para a obtenção do RNA total, seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o RNA total foi purificado empregando-se o RNAeasy kit (Qiagen), com o objetivo de minimizar contaminações com DNA genômico. A quantidade e qualidade do RNA extraído foram avaliadas,

respectivamente, por espectrofotometria ( $A_{260}/A_{280}$ ) e por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), de acordo com metodologia padrão. O RNA extraído foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Como controle foi extraído o RNA total de levedura de *C. neoformans* crescido *in vitro* nas mesmas condições experimentais quando da interação, porém na ausência de amebas e/ou macrófagos.

#### **3.5.4. Microarranjos de cDNA**

Devido à quantidade limitada de RNA extraído em um único experimento de infecção de amebas ou macrófagos por *C. neoformans*, os dados de expressão gênica analisados nesse estudo foram obtidos a partir de três *pools* independentes de RNA. Cada *pool* foi derivado de dois a três experimentos de infecção de amebas ou macrófagos (cerca de 15 a 20 frascos de 175  $\text{cm}^2$  contendo células fagocíticas confluentes infectadas com *C. neoformans*), que resultaram em cerca de 25 a 30  $\mu\text{g}$  de RNA total.

Primeiramente, a qualidade e a quantificação do RNA total foi reavaliada no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante e posteriormente submetida aos ensaios de microarranjo de cDNA. Os experimentos e as análises de microarranjo foram realizados na Universidade de Washington em St. Louis. O microarranjo utilizado, o qual foi desenvolvido por *Cryptococcus Community Microarray Consortium (The Genome Center at Washington University: <http://gtac.wustl.edu/>)*, inclui 7,775 seqüências em duplicata representadas por oligonucleotídeos de aproximadamente 70 bases, específicos para o sorotipo D de *C. neoformans*.

**Preparo da sonda complexa e hibridação com os microarranjos:** Para a obtenção da sonda complexa o RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA, empregando-se o *3DNA Array 350 Kit* (Genisphere, Hatfield, PA), cujas três etapas principais estão representadas esquematicamente na figura 3.

A primeira etapa refere-se à síntese do cDNA, a ser empregado como sonda. Para tanto, primeiramente 1  $\mu\text{L}$  do iniciador oligo(dT) modificado na sua porção 5' terminal com seqüência de captura específica para um determinado fluoróforo foi adicionado a 8  $\mu\text{g}$  de RNA total e a solução foi aquecida a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, seguida pelo rápido resfriamento em gelo por 2 min. Para a síntese dos cDNAs referentes à amostra experimental (fungo internalizado pelo fagócito) ou ao controle (fungo cultivado *in vitro*) foram utilizados oligonucleotídeos com diferentes modificações em sua porção 5' terminal, as quais permitiam a captura de um fluoróforo específico (Cy3 ou Cy5). Dessa

forma, amostra experimental e controle puderam ser diferentemente marcadas ao final do procedimento, permitindo a detecção e interpretação dos sinais obtidos.

A síntese do cDNA foi realizada por 2 horas a 42°C em uma reação contendo: 1 µL dos dNTPs (dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 10 mM cada), 1 µL do inibidor de ribonuclease (Superase-In; Ambicon), 4 µL do tampão da enzima 5X, 2 µL de ditioneitol (DTT) 0,1 M e 1 µL da enzima transcriptase reversa (Superscript II RNase H- 200U/µL, Invitrogen). A seguir, os RNAs presentes nas amostras foram submetidos à hidrólise alcalina pela adição de 3,5 µL de NaOH 0,5 M – EDTA 50 mM e incubação a 65°C por 15 min. Para neutralização da reação foram adicionados 5 µL de Tris-HCl 1 M (pH 7). As amostras a serem co-hibridizadas (amostra experimental e seu respectivo controle) foram então combinadas e concentradas utilizando microconcentradores Microcon YM30 (Millipore), seguindo as recomendações do fabricante.

A segunda etapa se refere à hibridação primária, ou hibridação do cDNA às lâminas de microarranjo. Aproximadamente 5 µL de cada amostra experimental (RNA do fungo internalizado pelo fagócito), agora pareada com seu respectivo controle (RNA do fungo cultivado *in vitro*), foi misturada com 26 µL de tampão de hibridação com formamida (Genisphere), 2 µL da solução bloqueadora 50 dT (Genisphere) e 19 µL de água livre de RNase/DNase. Um total de 48 µL da sonda complexa foram hibridados com as lâminas de microarranjo por 20 horas a 43°C. As lâminas foram então gentilmente submersas por 11 min primeiramente em solução de SSC 2 X, SDS 0,2% a 43°C, e posteriormente em solução de SSC 2 X a temperatura ambiente e solução de SSC 0,2 X a temperatura ambiente.

Por fim, a terceira etapa ou hibridação secundária, a qual foi realizada utilizando-se reagentes complementares conferidos pelo *3DNA Array 350 Kit* (Genisphere, Hatfield, PA), refere-se à hibridação dos fluoróforos Cy3 e Cy5 ao cDNA, o que ocorre devido a existência de uma seqüência de captura que é complementar a modificação na porção 5' terminal do iniciador oligo(dT) utilizado na síntese do cDNA (Figura 3). Para cada reação, 2,5 µL do reagente de captura 3DNA com Cy3, 2,5 µL do reagente de captura 3DNA com Cy5, 26 µL do tampão de hibridação com SDS (Genisphere) e 21 µL de água livre de RNase/DNase foram utilizados. Os reagentes foram misturados e incubados no escuro por 10 min a 80°C, seguido por incubação por 15 min a 50°C. Para hibridação, cada lâmina foi incubada no escuro com 48 µL da solução previamente preparada por 3h a 65°C. As lâminas foram então gentilmente submersas por 11 min

primeiramente em solução de SSC 2 X, SDS 0,2% a 43°C, e posteriormente em solução de SSC 2 X a temperatura ambiente e solução de SSC 0,2 X a temperatura ambiente.

**Detecção dos sinais de hibridação e análise dos dados:** As lâminas foram digitalizadas no scanner *Axon 4000B* (Molecular Devices) para detecção da fluorescência emitida pelos fluoróforos Cy3 e Cy5. A análise das imagens foi feita utilizando-se o *GenePix v6.1* (Molecular Devices) e a intensidade do sinal foi calculada e normalizada pelo *GeneSpring 7.2 software* (Agilent, Santa Clara, CA). Por fim, os resultados foram filtrados, sendo que somente aqueles genes que tiveram a variação de sua expressão (*fold-change*) alterada em duas vezes (induzido ou reprimido) foram considerados como diferencialmente expressos. Além disso, apenas valores com  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

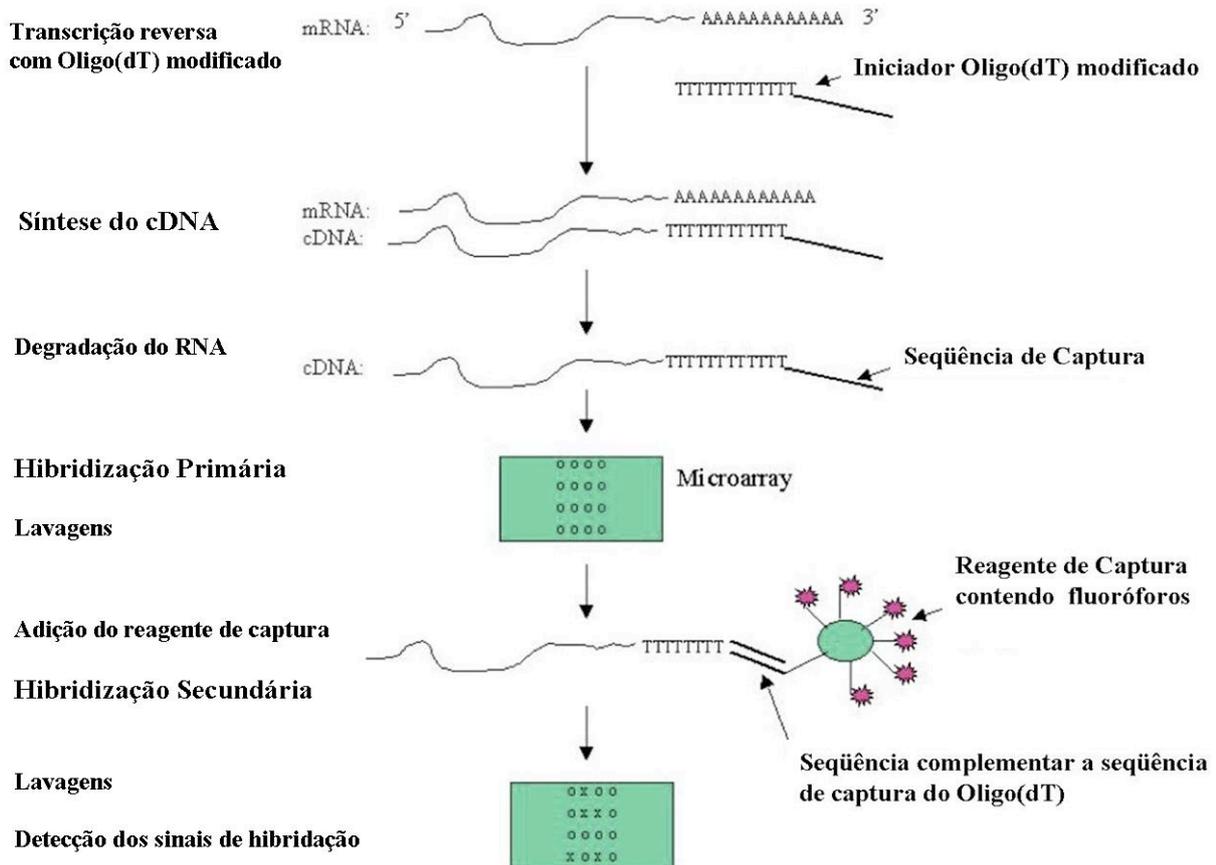


Figura 3. **Representação esquemática do ensaio de microarray utilizando-se o 3DNA Array 350 Kit.** Adaptado de <http://www.genisphere.com>.

Tabela 2. **Oligonucleotídeos para *C. neoformans* utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.**

Iniciadores	Produto do Gene	Seqüência (5'→ 3')
Act F	Actina 1	TTGTCCTCCCAATCTTCAC
Act R		CGGCGACTTCTTCTTCATA
Stp F	Proteína transportadora de açúcar	TACCGTCCCCATCTTCTCTG
Stp R		ATACCAGCAACGACCCAAAG
Cat3 F	Catalase 3	GTTAAACCAAGCCGCAATA
Cat3 R		CTGATACCTTGACCCCGAAA
Ths F	Trehalose Sintase	GCCCAAAGAAGTGGAGATCA
Ths R		AGAGCTCCATTGCTCCAGAA
Plc F	Fosfolipase C	GTCTTTGTCATGGGCGACTT
Plc R		TAGCCGAAGGATGAACTTGG
a-Gbe F	Enzima de ramificação da 1,4-alpha glucana	ATCCTTGGCTGGAACCTTTT
a-Gbe R		CTTTGAGAATTTCGGCGAGAC
Aox F	Oxidase Alternativa	CCCATTTACACCGAGAAGGA
Aox R		AGGAACTTGACGGTCCTGTG
C-5 F	C-5 Esterol Desaturase	CCCAGTCCCTTCCTTACCAT
C-5 R		TCATATCACCGTCGTGGATG
L-14 F	Lanosterol 14 alpha-demetilase	TCCCATCCACTCGATCTACC
L-14 R		CCCTTGGGGATGATGTATTG
Mls F	Malato Sintase	AAACATGGTTCTCGGACAGG
Mls R		AGGTCGAACCAAAGCACAG

### **3.5.5. Validação por RT-PCR em tempo real de genes diferencialmente expressos**

Visando validar os dados gerados pelo microarranjo empregou-se a metodologia de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). As mesmas amostras de RNA usadas para os experimentos de microarranjo foram usadas para as análises de expressão gênica qRT-PCR utilizando o sistema de detecção por SYBR Green (Applied Biosystems). Quantidades iguais de RNA (1 µg) foram transcritos de forma reversa (Superscript II, Invitrogen) utilizando oligo(dT)<sub>12-18</sub> como iniciador. Os ensaios de amplificação foram realizados no aparelho 7900HT *Sequence Detection System* ABI PRISM (Applied Biosystems) em reações de 8 µL contendo 0,5 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM cada), 4 µL de solução completa para PCR contendo SYBR Green (2X) (Applied Biosystems) e 0,2 µL da reação síntese de cDNA como molde. Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 95°C por 15

s, 58°C por 15 s e 72°C por 20 s. Para confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação. O método utilizado na análise dos resultados foi o método do CT (Livak *et al.*, 2001), já descrito anteriormente. Para normalização e determinação do *fold-change* foi empregado o gene que codifica a proteína actina de *C. neoformans* como controle interno constitutivo. O experimento foi realizado em duplicata para todos os genes analisados. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados usando o programa *Primer 3*, disponível no endereço eletrônico <http://www-genome.wi.mit.edu>, e estão listados na tabela 2.

### **3.5.6. Infecção de *Galleria mellonella* com linhagens de *C. neoformans***

Com o objetivo de avaliar a importância de alguns genes na patogenia de *C. neoformans*, foi realizada uma busca na biblioteca de mutantes, previamente disponível no laboratório, de linhagens depletadas em genes cuja a expressão foi aumentada após interação de *C. neoformans* com a ameoba, conforme mostrado nos nossos experimentos de microarranjo. Essa biblioteca de mutantes foi construída por Liu *et al.* (2008) e está disponível no *Fungal Genetic Stock Center* ([www.fgsc.org](http://www.fgsc.org)) ou na *ATCC* ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). A linhagem parental de *C. neoformans* utilizada para a confecção dessa biblioteca de mutantes foi a mesma utilizada nesse trabalho, a linhagem clínica H99, sendo a biblioteca composta por 1201 linhagens mutantes de *C. neoformans* que correspondem a 1180 diferentes genes com função deletada. Inicialmente, selecionamos o isolado mutante de *C. neoformans* para um gene que codifica um transportador de açúcar, de função precisa desconhecida, o qual foi denominado M1. A capacidade de crescimento em meio YPD a 37°C do mutante selecionado e da linhagem parental H99 foi verificada pela medida da variação da densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) por 62 h, utilizando-se o aparelho *Bioscreen C* (Growth Curves, USA).

A verificação do potencial virulento da linhagem mutante quando comparada com a linhagem parental de *C. neoformans* foi realizada empregando-se o modelo de infecção descrito por Mylonakis *et al.* (2005), o qual utiliza a fase final larval do bicho-da-seda (*Galleria mellonella*) como hospedeiro invertebrado do fungo. Para tanto, a linhagem em estudo foi cultivada 24h em meio líquido YPD a 30°C sob agitação (150 rpm). Posteriormente as leveduras foram coletadas por centrifugação (1800 x g por 10 min), lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS 1X. Com uma seringa Hamilton de 10 µL, 10<sup>4</sup> células fúngicas foram injetadas na hemocele de cada larva. Um total de 16 larvas, randomicamente escolhidas, foram utilizadas por grupo experimental. Um grupo de

larvas, o qual foi inoculado com PBS 1X para monitorar mortes causadas por injúrias físicas ou infecção com patógenos contaminantes, e um segundo grupo, o qual não foi inoculado com qualquer solução, foram mantidos como controle do experimento. Após a infecção, as larvas foram incubadas em recipientes plásticos no escuro a 37°C, e o número de larvas viáveis foi contado diariamente. As larvas foram consideradas mortas quando elas não apresentavam nenhum movimento em resposta ao toque. A curva de sobrevivência foi quotada e as análises estatísticas foram realizadas pelos métodos *Log-rank (Mantel-Cox)* e *Gahan-Breslow-Wilcoxon* utilizando o programa *GraphPad Prism*. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes.

### **3.5.7. Infecção intratraqueal de camundongos com *C. neoformans***

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c foram obtidos do *National Cancer Institute* e utilizados nos experimentos após 6 a 8 semanas de vida. A infecção intratraqueal foi realizada conforme descrito previamente por Feldmesser & Casadevall (1997). Brevemente, as linhagens de *C. neoformans* foram cultivadas 24h em meio líquido YPD a 30°C sob agitação (150 rpm), coletadas por centrifugação (1800 x g por 10 min), lavadas e ressuspendidas em PBS 1X para uma concentração final de células de  $2 \times 10^7$  cel/mL. Os camundongos foram anestesiados com 100 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina, intraperitonealmente. A traquéia foi então exposta e inoculou-se 50 µL da suspensão de células fúngicas ( $10^6$  células totais) intratraquealmente. O número de camundongos viáveis foi contado diariamente e os resultados analisados estatisticamente pelos métodos *Log-rank (Mantel-Cox)* e *Gahan-Breslow-Wilcoxon*. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Todos os experimentos realizados com animais seguiram as normas estabelecidas pelo Instituto de Estudos Animais do *Albert Einstein College of Medicine*, sendo previamente aprovado pelo *Institute of Animal Care*.

### **3.5.8. Coloração *India ink* para mensuração de tamanho de cápsula**

Culturas de *C. neoformans* foram diluídas em PBS 1X e uma alíquota foi misturada a uma gota de *India ink* (BD Biosciences, NJ, USA). As análises foram feitas no microscópio invertido *Axiovert 200 M* (Carl Zeiss Micro Imaging, NY). O tamanho da cápsula foi mensurado no *ImageJ 1.39g software* (National Institute of Health, NIH, Bethesda, MD) como sendo a distância entre a borda da cápsula e a parede celular,

correspondendo a zona de exclusão do corante *India ink*. O tamanho do corpo celular foi também calculado. Ao menos 100 leveduras de *C. neoformans* foram avaliadas para cada condição experimental.

### **3.5.9. Curva de crescimento de linhagens de *C. neoformans* em diferentes fontes de carbono**

A linhagem parental H99 de *C. neoformans* e uma linhagem mutante foram cultivadas 24h em meio líquido YPD a 30°C sob agitação (150 rpm), coletadas por centrifugação (1800 x g por 10 min) e lavadas duas vezes com PBS 1X. Uma suspensão de células de cada linhagem para uma concentração final de  $2 \times 10^6$  cel/mL foi preparada em uma solução de sais 2X (Solução 1X: MgSO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 29.3 mM; Glicina 13 mM; Tiamina 3 mM; pH 5,5). Para um volume final de 30 mL de cultura adicionou-se 15 mL da suspensão celular e 15 mL de uma solução de carboidrato 2%. As fontes de carbono testadas foram glicose, manose, frutose, sacarose, galactose, xilose, lactose, manitol ou sorbitol. Posteriormente o mesmo experimento foi repetido para os seguintes polióis como fontes de carbono: manitol, sorbitol, dulcitol, ribitol, arabitol, xilitol, maltitol e glicerol. As culturas foram crescidas por 48 h a 30°C e o crescimento foi verificado pela medição a cada 12 h na variação da densidade óptica a 630 nm (OD<sub>630</sub>). Alternativamente, diferentes diluições de uma cultura das linhagens em estudo de *C. neoformans* foram cultivadas em meio mínimo sólido (MgSO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 29.3 mM; Glicina 13 mM; Tiamina 3 mM; Ágar bacteriológico 1,5%; pH 5,5) contendo como única fonte de carbono 1% de glicose, xilose ou manitol. As placas foram mantidas a 37°C por 48 h.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 4. Resultados e Discussão

Este tópico será subdividido em 3 capítulos. No primeiro capítulo (item 4.1) serão apresentados e discutidos os resultados referentes a avaliação do efeito antimicrobiano de farnesol, uma molécula de *quorum-sensing* de *C. albicans*, no fungo dimórfico *P. brasiliensis*. O segundo capítulo (item 4.2) será composto pela apresentação e discussão dos resultados obtidos das análises realizadas quanto aos efeitos do propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, na morfogênese e formação de biofilmes por *C. albicans*. No terceiro e último capítulo (item 4.3) serão relatados e interpretados os resultados resultantes da comparação do transcrito do fungo *C. neoformans* após interação com amebas e macrófagos.

### **4.1. Efeito do farnesol, uma molécula de *quorum-sensing* de *Candida albicans*, no crescimento e na morfogênese de *Paracoccidioides brasiliensis***

Estudos recentes vêm mostrando que, assim como bactérias, fungos produzem moléculas sinalizadoras que coordenam o comportamento celular. O farnesol, por exemplo, produzido por *C. albicans*, inibe a transição desse fungo de levedura para micélio e compromete a formação do biofilme (Hornby *et al.*, 2001, Ramage *et al.*, 2002). Essa molécula parece também conferir vantagem competitiva a *C. albicans* em relação a outros microrganismos, já que o farnesol induz apoptose no fungo filamentoso *A. nidulans* (Semighini *et al.*, 2006), além de inibir a formação de biofilme de outras espécies de *Candida* (Jabra-Rizk *et al.*, 2006b, Rossignol *et al.*, 2007). Adicionalmente, alguns trabalhos vêm relatando o papel do farnesol na inibição do crescimento de bactérias, como os patógenos humanos *Staphylococcus aureus* (Jabra-Rizk *et al.*, 2006a) e *Streptococcus mutans* (Koo *et al.*, 2002), e de fungos, como o fitopatógeno *Fusarium graminearum* (Semighini *et al.*, 2008), sinalizando o potencial uso desse composto como agente antimicrobiano. Nesse contexto, esse trabalho avaliou o efeito microbicida do farnesol no fungo dimórfico e patogênico *P. brasiliensis*.

*P. brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose humana sistêmica de ocorrência restrita à América Latina (Franco, 1987). Os

antifúngicos comumente utilizados no tratamento da PCM são sulfonamidas, azóis e anfotericina B (Hahn *et al.*, 2002). E apesar da boa eficácia desses antifúngicos contra *P. brasiliensis*, alguns desses compostos, como a anfotericina B, possuem baixa toxicidade seletiva, podendo danificar também as células do hospedeiro (Kauffman, 2006). Adicionalmente, Hahn *et al.* (2003) identificaram isolados clínicos de *P. brasiliensis* resistentes a cetoconazol e trimetoprim. Paralelamente, o projeto transcrito de *P. brasiliensis*, desenvolvido em nosso laboratório (Felipe *et al.*, 2003), revelou a existência de vários genes ortólogos relacionados a proteínas transmembranas que podem atuar como bomba de efluxo de drogas (Costa *et al.*, 2005). A existência de tais genes prevê a possível emergência de linhagens resistentes aos antifúngicos atuais, enfatizando a importância do estudo de agentes antimicrobianos alternativos.

#### **4.1.1. Efeito do farnesol no crescimento e na viabilidade de *P. brasiliensis***

Inicialmente foi avaliado o efeito do farnesol sobre o crescimento de *P. brasiliensis*. Os resultados revelaram que concentrações superiores a 25  $\mu\text{M}$  de farnesol resultam na completa inibição do crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 4A). Resultados similares foram obtidos para a fase miceliana (dados não mostrados). Dessa forma, a concentração inibitória mínima (CIM) de farnesol para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foi definida como sendo de 25  $\mu\text{M}$ , revelando mais de 80% de redução do crescimento celular. Com o objetivo de verificar se o efeito inibitório do farnesol no crescimento de *P. brasiliensis* deve-se a um aumento na taxa de mortalidade, ensaios de viabilidade baseados no metabolismo celular (MTT) e na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foram realizados. Esses experimentos mostraram que o aumento no percentual de células fúngicas inviáveis é proporcional à concentração de farnesol exógeno adicionado à cultura (Figure 4B e 4C), sugerindo que o farnesol é um potente agente fungicida contra *P. brasiliensis*. Entretanto, embora a concentração de 25  $\mu\text{M}$  de farnesol seja suficiente para inibir completamente o crescimento do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* (Figura 4A e 4C), o metabolismo do fungo é completamente cessado apenas quando *P. brasiliensis* é cultivado em concentrações superiores a 30  $\mu\text{M}$  de farnesol (Figura 4B). De acordo com esses resultados, foi definido que o CIM de farnesol para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* é de 25  $\mu\text{M}$ , enquanto que a concentração letal mínima (CLM) é de 30  $\mu\text{M}$ .

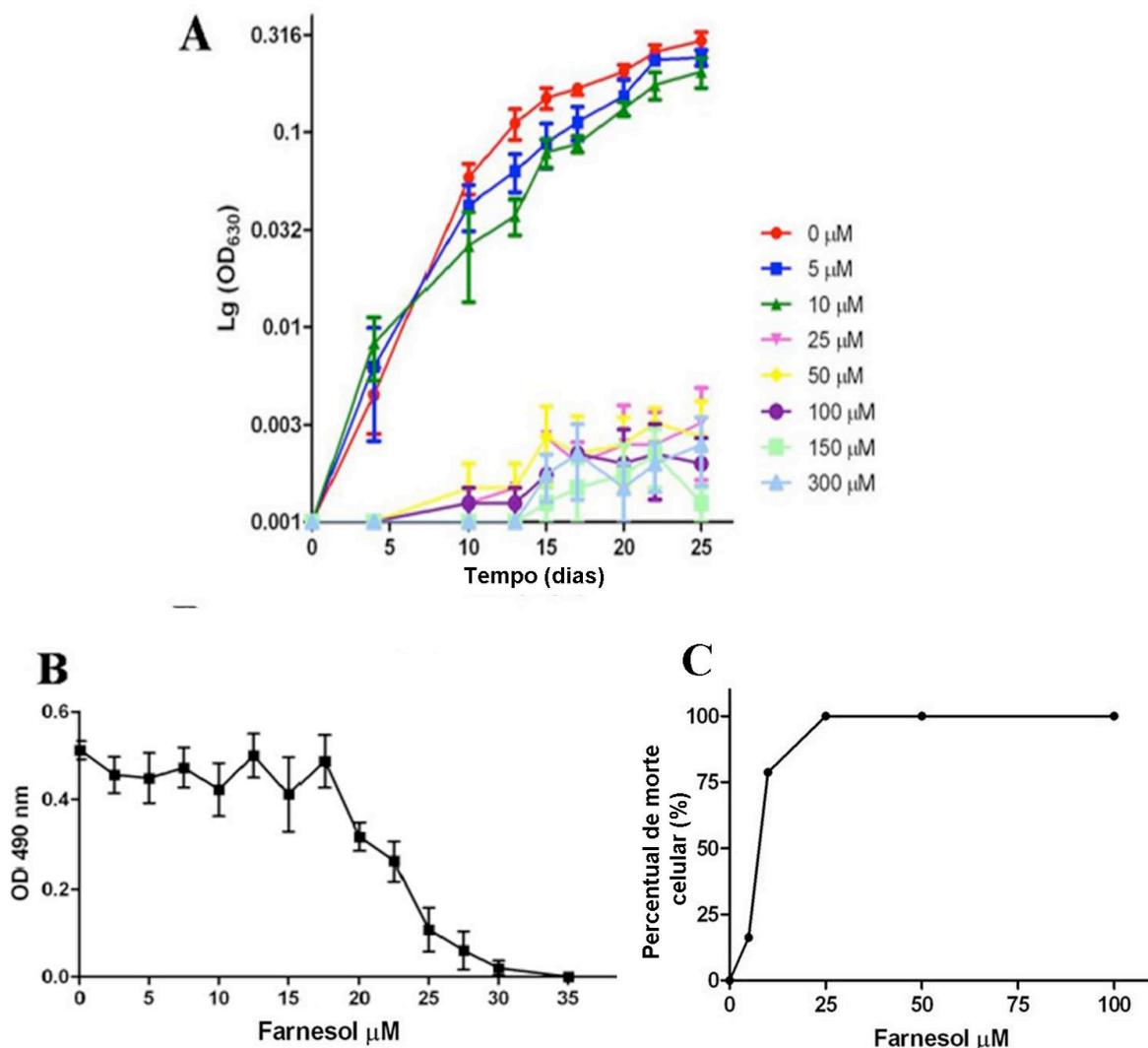


Figura 4. **Farnesol exerce efeito fungicida em *P. brasiliensis*.** (A) Curva de crescimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (isolado Pb18) incubadas na presença de diferentes concentrações de farnesol. O número de células foi determinado pela medida da densidade óptica a 630 nm, após vigorosa agitação da cultura em vortex. (B) Viabilidade das leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas por 15 dias na presença de diferentes concentrações de farnesol (2,5 – 35 µM). A verificação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT, sendo quantificado por espectrofotometria a 490 nm. (C) Porcentagem de células mortas após tratamento com diferentes concentrações de farnesol. Após 4 dias de cultivo na ausência (0 µM) ou na presença (5 a 100 µM) de farnesol, células de *P. brasiliensis* foram coletadas por centrifugação, lavadas e plaqueadas em meio BHI ágar. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) em cada placa foi contada e a porcentagem de células mortas calculada como descrito na metodologia.

Vale ressaltar que um trabalho comparativo dos efeitos do farnesol em outros isolados de *P. brasiliensis*, também realizado por nosso grupo de pesquisa, mostrou que o CIM de farnesol para os isolados Pb01 e Pb3 é de 20  $\mu\text{M}$ , enquanto o CLM é de 30  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Silva, 2009). Assim, embora os isolados Pb18 e Pb3 pertençam a espécies crípticas diferentes de *P. brasiliensis* (Matute *et al.*, 2006), e o isolado Pb01 seja representante do grupo “Pb01-like”, sugerido recentemente como uma nova espécie (Teixeira *et al.*, 2009), os resultados mostram que farnesol possui uma atividade antimicrobiana eficaz contra diferentes isolados de *P. brasiliensis*.

O papel antimicrobiano de farnesol também foi descrito para outros microrganismos, como mencionado anteriormente (Dionigi *et al.*, 1991; Jabra-Risk *et al.*, 2006a; Semighini *et al.*, 2008; Uppuluri *et al.*, 2007). Entretanto, nossos resultados mostraram que *P. brasiliensis* é extremamente mais sensível ao farnesol que outros patógenos. Enquanto o CLM de farnesol para *P. brasiliensis* varia entre 30 a 40  $\mu\text{M}$ , para as bactérias *S. aureus* e *S. tendae* é de 200  $\mu\text{M}$  (Dionigi *et al.*, 1991; Jabra-Risk *et al.*, 2006a). A bactérias *S. mutans* e o fungo *Candida dubliniensis* são ainda mais tolerantes ao farnesol, possuindo CLM de 300 e 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Koo *et al.*, 2002; Jabra-Risk *et al.*, 2006b).

#### **4.1.2. Efeito do farnesol na morfogênese de *P. brasiliensis***

Uma vez que a transição dimórfica é fundamental para o estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis*, o efeito do farnesol nesse processo foi avaliado. Para tanto, células leveduriformes foram cultivadas a 25°C na presença de concentrações de farnesol menores ou iguais a 25  $\mu\text{M}$ . Os resultados mostraram que na presença de 25  $\mu\text{M}$  de farnesol (CIM) há a inibição completa da morfogênese devido ao efeito fungistático verificado anteriormente (Figura 4C). Entretanto, o cultivo de *P. brasiliensis* em presença de concentrações de farnesol inferiores a 25  $\mu\text{M}$ , as quais não afetam o crescimento do fungo (Figura 4A), prejudicam a transição de levedura para micélio, como observado por microscopia óptica após 24 e 48 h de incubação a 25°C (Figura 5A). Quando cultivadas na ausência de farnesol, todas as células desenvolveram tubos germinativos após 24 h, enquanto que o cultivo em concentrações crescentes de farnesol foi inversamente proporcional a filimentação de *P. brasiliensis* (Figura 5B). Após 24 h, cerca de 85% das leveduras crescidas em 15  $\mu\text{M}$  de farnesol não possuem tubos germinativos (Figura 5B) e, quando possuem, estes são significativamente menores quando comparados aos das células controle (Figura 5C). É possível notar que

os efeitos de concentrações inferiores a 15  $\mu\text{M}$  de farnesol são de retardo do processo de morfogênese, já que após 48 h de cultivo houve um aumento tanto no número de células com tubos germinativos, quanto no tamanho dessas estruturas, quando comparado aos resultados em 24 h (Figura 5B e 5C). A capacidade de *P. brasiliensis* em aumentar em quantidade e em tamanho os tubos germinativos ao longo do tempo na presença de concentrações de farnesol inferiores a 15  $\mu\text{M}$  reforçam que as células estão viáveis nessas condições, como anteriormente mostrado na figura 4.

Resultados similares foram obtidos para a transição de micélio para levedura de *P. brasiliensis*, como verificado após 4 dias de incubação do micélio a 36°C. O cultivo de *P. brasiliensis* em concentrações baixas de farnesol (5 e 10  $\mu\text{M}$ ) retarda o processo de transição dimórfica desse patógeno (Figura 6), enquanto 25  $\mu\text{M}$  de farnesol abole completamente a transição por comprometer a viabilidade celular.

A atividade de farnesol na morfogênese de fungos também foi descrita para *C. albicans* (Hornby *et al.*, 2001; Mosel *et al.*, 2005). *C. albicans* produz e secreta farnesol, o qual se acumula no meio de cultura e promove a inibição da filamentação desse patógeno (Hornby *et al.*, 2001). Os mesmos autores mostraram que a adição exógena de farnesol comercial possui o mesmo efeito que o sobrenadante de uma cultura crescida de *C. albicans* (meio condicionado) no dimorfismo desse fungo. Entretanto, esse efeito do farnesol não é observado na transição dimórfica do fungo *Cerastocystis ulmi*, agente etiológico doença de Dutch. Hornby *et al.* (2003) mostraram que tanto a adição de farnesol comercial até uma concentração de 100  $\mu\text{M}$ , quanto a suplementação da cultura de *C. ulmi* com o meio condicionado (CM) de *C. albicans* não influenciam na transição desse patógeno de levedura para micélio. Em contrapartida, o co-cultivo de *C. albicans* com o fungo *Aspergillus nidulans* revelou uma inibição do crescimento e do desenvolvimento de *A. nidulans* dependente da produção de farnesol por *C. albicans* (Semighini *et al.*, 2006). A co-cultura de *C. albicans* e *P. aeruginosa* também promove redução nos níveis da molécula de *quorum-sensing* quinolona (PQS) e do fator de virulência piocianina da bactéria, sendo sugerido que essa alteração seja causada pelo farnesol secretado por *C. albicans* (Cugini *et al.*, 2007). Dessa forma, sabendo-se que o farnesol é uma QSM secretada por *C. albicans*, e que essa molécula parece mediar interações interespecífica, como relatado para outros microrganismos, verificamos o efeito do sobrenadante de uma cultura de *C. albicans* crescida até atingir a fase estacionária (CM) no dimorfismo de *P. brasiliensis*.

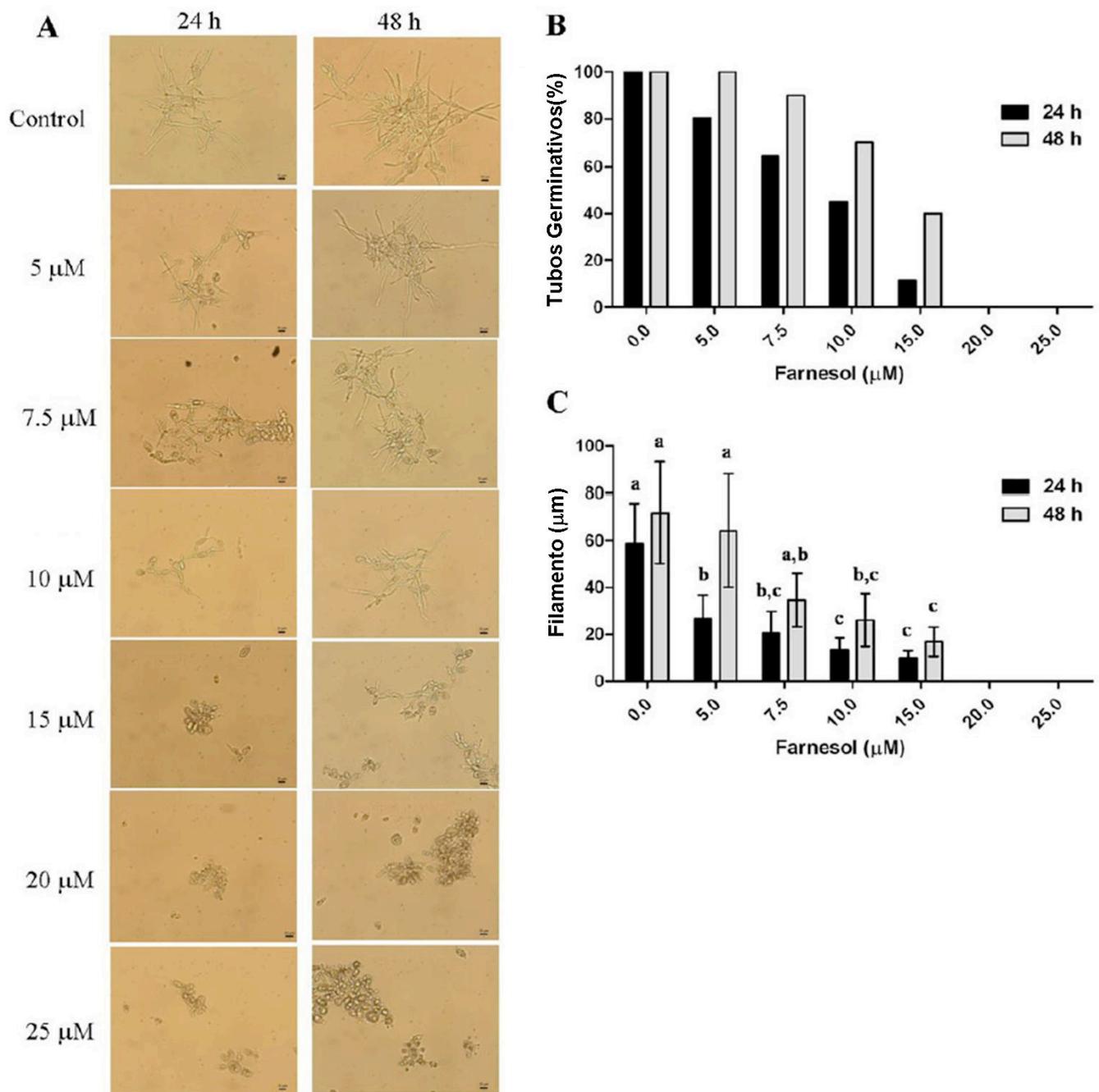


Figura 5. **Efeito do farnesol na filamentação de *P. brasiliensis*.** Leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas por 24 e 48 h a 25°C em diferentes concentrações de farnesol. (A) Morfologia das células de *P. brasiliensis* avaliadas por microscopia óptica após serem cultivadas na presença de diferentes concentrações de farnesol. (B) Porcentagem de células com tubo germinativo após 24 e 48 h de cultivo na presença ou na ausência de farnesol. (C) Tamanho médio dos tubos germinativos formados em resposta a diferentes concentrações de farnesol. As barras representam o erro padrão e letras diferentes apontam para diferença estatística ( $P \leq 0,001$ ).

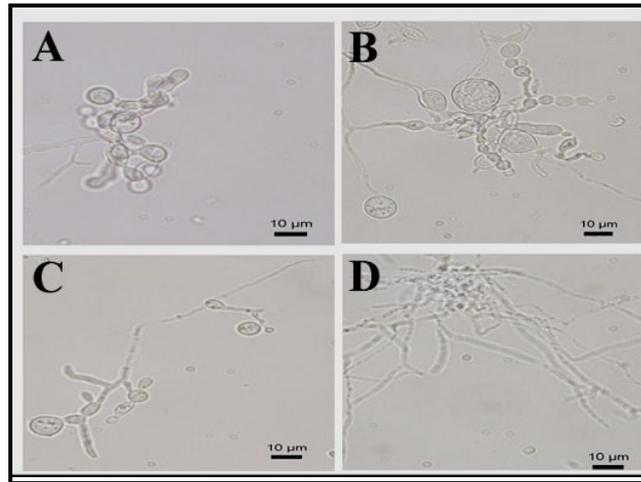


Figura 6. **Efeito do farnesol no processo de transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*.** *P. brasiliensis* (forma miceliana) foi incubado por 4 dias a 36°C na presença de diferentes concentrações de farnesol. (A) Controle (sem farnesol); (B) 5  $\mu\text{M}$  farnesol; (C) 10  $\mu\text{M}$  farnesol; (D) 25  $\mu\text{M}$  farnesol.

Os resultados obtidos demonstraram que o CM de *C. albicans* afeta a filamentação de células de *P. brasiliensis*. Concentrações superiores a 40% de CM de *C. albicans* inibem bruscamente a transição de levedura para micélio em *P. brasiliensis*, sugerindo que a formação de tubos germinativos nesse fungo é controlada por algum fator solúvel presente no CM de *C. albicans* (Figura 7). Ainda, a inibição da filamentação de *P. brasiliensis* foi mantida mesmo após tratamento do CM de *C. albicans* com proteinase K, ou após exposição a altas temperaturas, sugerindo que o fator responsável pela inibição é termoestável e não apresenta característica protéica (dados não mostrados). O efeito inibitório do CM de *C. albicans* também é verificado no crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* (dados não mostrados).

Com base nesses resultados e em relatos da literatura, propõe-se que fungos patogênicos, como *C. albicans*, provavelmente secretam fatores solúveis que atuam inibindo o desenvolvimento de outros microrganismos. No caso de *C. albicans*, é sabido que esse patógeno secreta duas moléculas de QS: o farnesol e o tirosol. Como mostrado anteriormente, o farnesol possui efeito similar ao CM de *C. albicans* em *P. brasiliensis*, uma vez que inibe o dimorfismo e o crescimento deste último. Adicionalmente, verificamos que concentrações iguais ou inferiores a 300  $\mu\text{M}$  de tirosol, a outra QSM de *C. albicans*, não possuem nenhum efeito na morfogênese e no crescimento de *P.*

*brasiliensis* (dados não mostrados). Esses resultados indicam um possível envolvimento do farnesol em interações interespecíficas entre *C. albicans* e *P. brasiliensis*.

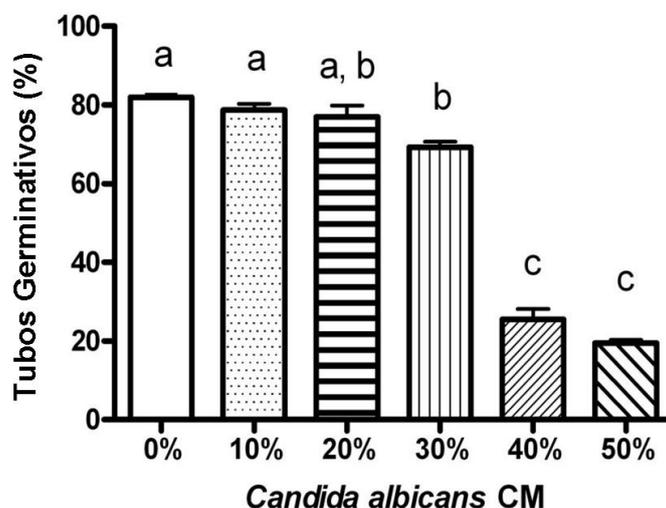


Figura 7. Efeito de diferentes concentrações do meio condicionado (CM) de *C. albicans* no dimorfismo de *P. brasiliensis*. Leveduras de *P. brasiliensis* foram crescidas por 24 h a 25°C em presença de diferentes concentrações de CM de *C. albicans*. O percentual de células de *P. brasiliensis* que apresentaram formação de tubos germinativos nesse período na presença de diferentes concentrações de CM de *C. albicans* foi calculado. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos. Letras diferentes apontam para diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.3. Efeito do farnesol na integridade de estruturas celulares de *P. brasiliensis*

Embora o papel do farnesol como um potente antimicrobiano venha sendo amplamente mostrado, o mecanismo de ação desse agente ainda não é completamente compreendido. Alguns estudos têm indicado uma possível interação do farnesol com a membrana celular de certos microrganismos, incluindo as bactérias *S. mutans*, *S. aureus* e *Escherichia coli* (Inoue *et al.*, 2004; Jabra-Rizk *et al.*, 2006a; Koo *et al.*, 2002; Akiyama *et al.*, 2002; Brehm-Stecher & Johnson, 2003), e os fungos *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Jabra-Rizk *et al.*, 2006b). Uma hipótese é que a característica hidrofóbica do farnesol favorece seu acúmulo na membrana, comprometendo sua integridade. Nesse contexto, com o objetivo de verificar uma possível interferência do farnesol na permeabilidade celular de *P. brasiliensis*, leveduras tratadas com farnesol por 24 h

foram coradas com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio (Figura 8). Células de *P. brasiliensis* tratadas com 50 mM de peróxido de hidrogênio foram utilizadas como controle positivo do experimento. Ainda, para uma maior validação experimental, foram utilizadas células de *C. albicans* tratadas ou não com peróxido de hidrogênio. Após o ensaio, não foram verificadas diferenças significativas entre as células de *P. brasiliensis* incubadas na presença ou na ausência de farnesol (Figure 8). Esse resultado foi confirmado utilizando-se o corante vital Verde Janus, descrito por Gohman-Yahr *et al.* (1980) (dado não mostrado), sugerindo que o efeito do farnesol na viabilidade de *P. brasiliensis* não se deve a mudanças significativas na permeabilidade celular. Resultados similares foram obtidos após 48 h de tratamento e cultivando-se as células de *P. brasiliensis* com concentrações maiores de farnesol (dados não mostrados).

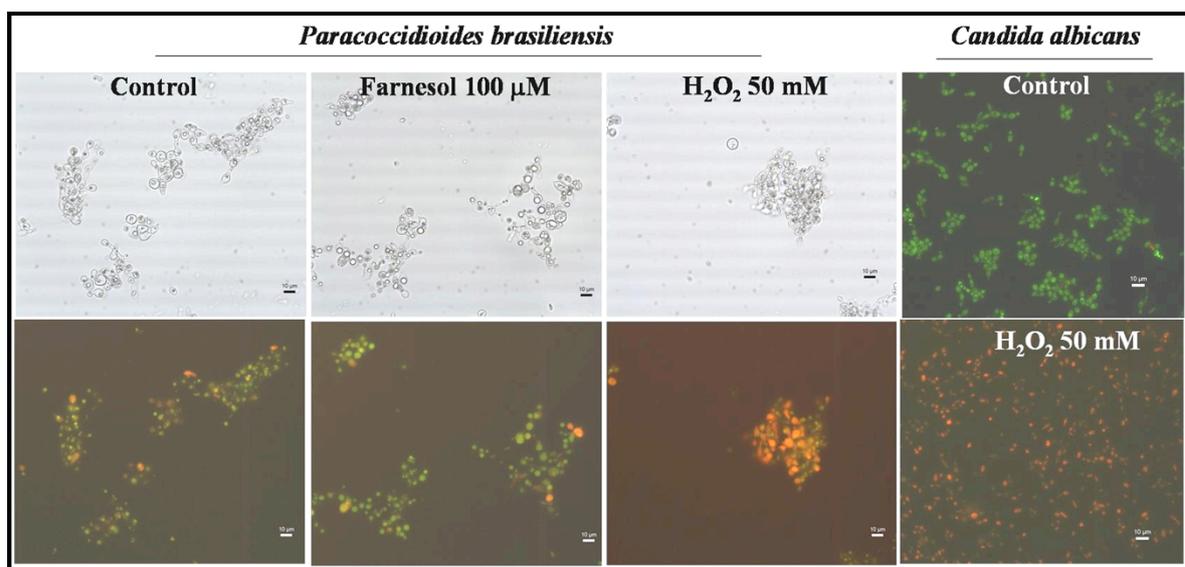


Figura 8. **Microscopia de fluorescência de leveduras de *P. brasiliensis* e *C. albicans* coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio.** Células de *P. brasiliensis* foram cultivadas na ausência (controle) ou na presença de 100 μM de farnesol por 24 h. Como controle positivo do experimento, leveduras de *P. brasiliensis* foram incubadas com 50 mM de peróxido de hidrogênio por 24 h. Os quadros superiores representam a microscopia de contraste de fase, e os quadros inferiores mostram a correspondente microscopia de fluorescência. A metodologia foi também controlada tratando-se células de *C. albicans* com 0 mM (controle) ou 50 mM de peróxido de hidrogênio por 24 h. Barra = 10 μm.

Buscando melhor compreender o mecanismo de ação do farnesol em células de *P. brasiliensis*, leveduras cultivadas por 3 dias em diferentes concentrações desse composto (0, 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ) foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Como observado nas figuras 9A e A', células de *P. brasiliensis* cultivadas em ausência de farnesol apresentam morfologia típica. Organelas citoplasmáticas de *P. brasiliensis*, como mitocôndrias (M), lisossomos (L), e retículo endoplasmático (ER), podem ser facilmente distinguidas (figura 9A). As estruturas da parede celular (CW) e da membrana plasmática (PM) também se apresentam intactas (figura 9A'). Essas imagens demonstram claramente que o uso de 2% de metanol como diluente do farnesol não afeta a morfologia celular de *P. brasiliensis*, assim como o crescimento e a transição dimórfica.

Em contraste, um extensivo dano citoplasmático foi observado em células de *P. brasiliensis* cultivadas com farnesol. Mudanças significativas, resultante da total degeneração das estruturas citoplasmáticas, foram verificadas em células de *P. brasiliensis* cultivadas na presença de 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$  de farnesol (Figuras 9B – D). Foi possível observar vários estágios de degradação, variando de células com o conteúdo citoplasmático parcialmente degenerado, a células cuja única estrutura intacta remanescente era a parede celular. Corroborando os resultados observados na MET, células de *P. brasiliensis* incubadas com 50  $\mu\text{M}$  de farnesol e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) não apresentaram alterações na estrutura da parede celular (Figura 9E). A morfologia externa de células tratadas com diferentes concentrações de farnesol não mostrou diferença significativa quando comparada à estrutura de células não tratadas com farnesol (dados não mostrados), sugerindo que o farnesol não afeta a estrutura da parede celular do fungo.

Resultados similares aos aqui obtidos por MET foram mostrados por San-Blas *et al.* (1989) ao analisarem a atividade antifúngica do ajoeno em *P. brasiliensis*, o qual bloqueia o crescimento fúngico por inibir a síntese de fosfatidilcolina (San-Blas *et al.*, 1997). Curiosamente, farnesol induz apoptose em células neoplásicas atuando do mesmo modo ao descrito para o ajoeno (Voziyan *et al.*, 1993; Miquel *et al.*, 1998), sugerindo que ambos compostos possuem mecanismos de ação similar.

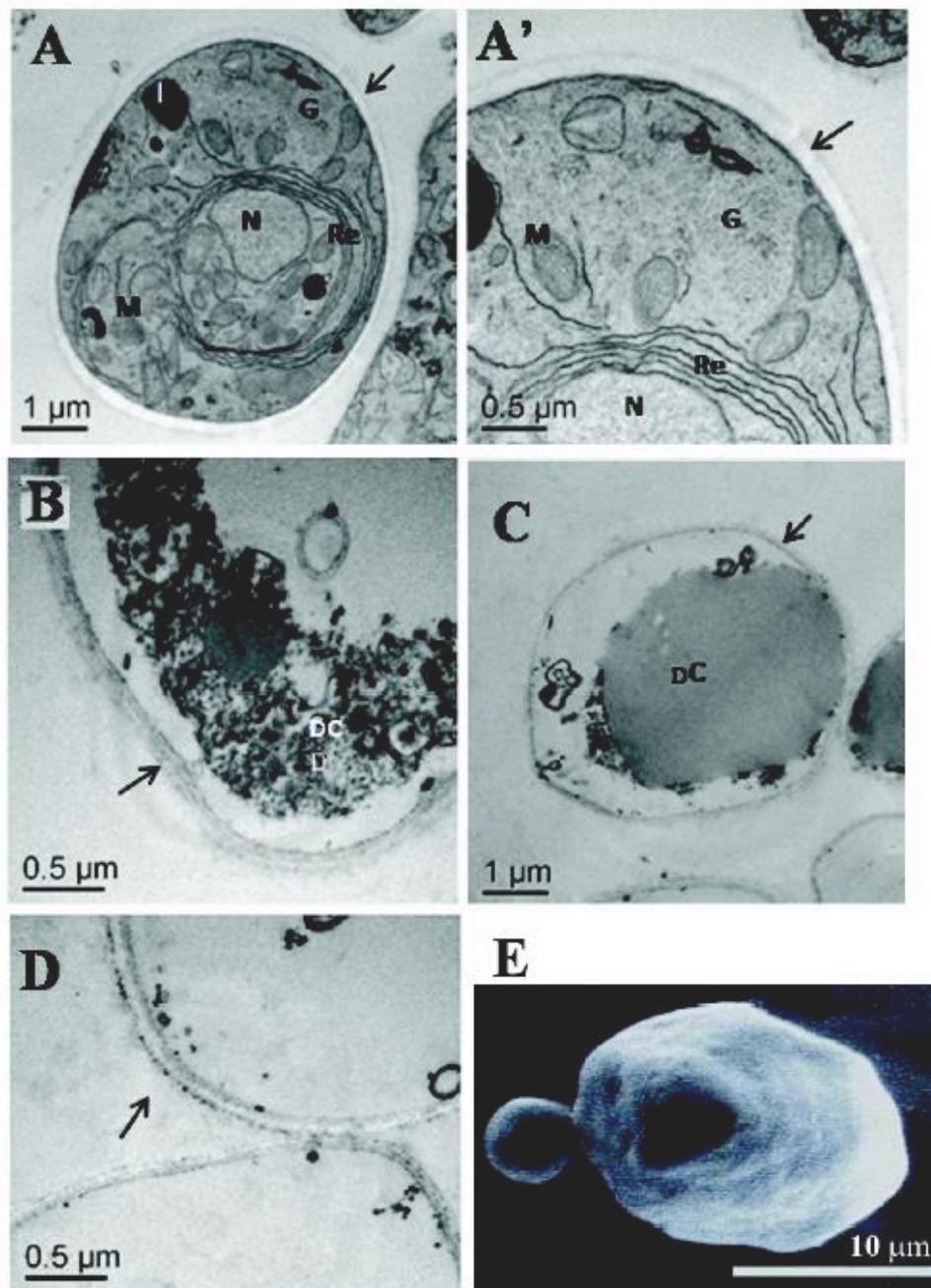


Figura 9. Ultraestrutura de células de *P. brasiliensis* tratadas com diferentes concentrações de farnesol. Células cultivadas na ausência de farnesol apresentam estruturas citoplasmáticas íntegras (A, A'). Nas células controle é possível diferenciar muitas organelas citoplasmáticas, tais como núcleo (N), mitocôndria (M), retículo endoplasmático (Re), lisossomo (L), além da membrana plasmática e parede celular (setas). Células cultivadas em 25  $\mu$ M (B), 50  $\mu$ M (C) e 100  $\mu$ M (D) de farnesol mostram completa degradação citoplasmática (DC), porém a parede celular permanece intacta (setas). Em (E) é mostrada a micrografia eletrônica de varredura de leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas em 50 mM de farnesol por 24 h. Não foram observadas mudanças na morfologia externa das leveduras cultivadas em presença de farnesol. Barra = 10  $\mu$ m.

De um modo geral, nossos resultados indicam que a mortalidade do fungo *P. brasiliensis*, quando tratado com farnesol, está associada à desintegração das estruturas internas. Uma degeneração de organelas citoplasmáticas similar ocorre após leveduras de *P. brasiliensis* serem fagocitadas por macrófagos murinos ativados (Brummer *et al.*, 1990), sugerindo que esse processo degenerativo ocorra em resposta a uma condição de estresse. Duas principais condições extremas de estresse são enfrentadas pelo microrganismo após ser fagocitado: o estresse nutricional, devido a carência de fontes complexas de carbono no interior de fagócitos, e o estresse oxidativo, devido às altas concentrações de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio presentes no fagossomo (Schnappinger *et al.*, 2003). Coincidentemente, foi sugerido que um dos efeitos antagônicos do farnesol é a indução de dano oxidativo nas células devido ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como mostrado para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Machida *et al.*, 1998; Machida *et al.*, 1999). Entretanto, visando a maior compreensão dos mecanismos de ação do farnesol em *P. brasiliensis*, ensaios que avaliem a ativação de vias de morte celular em resposta ao farnesol, como apoptose e autofagia, devem ser ainda realizados. Nesse sentido, a análise do nível de expressão de genes relacionados a essas vias foi realizada em outro trabalho de nosso grupo (Silva, 2009), porém os resultados obtidos não foram conclusivos.

#### **4.1.4. Conclusão**

Em resumo, esse trabalho revelou que o farnesol possui uma potente ação antimicrobiana contra *P. brasiliensis*, o qual é bastante sensível a esse composto. A atividade fungicida do farnesol em *P. brasiliensis*, observada quando do tratamento desse patógeno com concentrações superiores a 25  $\mu\text{M}$ , está provavelmente associada a uma degeneração completa das organelas citoplasmáticas sem afetar a parede celular. Já concentrações de farnesol inferiores a 25  $\mu\text{M}$ , que não comprometem a viabilidade celular, afetam a morfogênese ao retardar o processo de transição dimórfica de *P. brasiliensis*, fato particularmente relevante uma vez que o dimorfismo é fundamental para o estabelecimento da infecção por esse fungo. Entretanto, embora o efeito antimicrobiano de farnesol venha sendo claramente mostrado para inúmeros microrganismos, a realização de estudos adicionais que envolvam modelos experimentais de infecção é necessária para melhor determinar os efeitos desse composto *in vivo*. Vale enfatizar que a toxicidade causada pela administração exógena de farnesol em camundongos é negligenciável, como mostrado por Navarathna *et al.*

(2007a). Esses autores verificaram que a administração oral (farnesol 20 mM em água) ou intraperitoneal (1 mL de uma solução de farnesol 20 mM) de farnesol parece não causar nenhum tipo de dano aos animais, uma vez que não foram observadas diferenças significativas quanto ao peso e ingestão de água ou alimento por camundongos tratados ou não com farnesol.

Nesse contexto, as propriedades antagônicas do farnesol contra *P. brasiliensis* mostradas nesse trabalho, em adição à aparente baixa toxicidade desse composto a células animais saudáveis (Adany *et al.*, 1994; Rioja *et al.*, 2000; Navarathna *et al.*, 2007a) indicam para uma possível aplicação futura dessa molécula como agente antimicrobiano no combate à PCM.

## **4.2. Efeito do propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, na morfogênese e formação de biofilmes por *Candida albicans*.**

Nos últimos anos a capacidade de *C. albicans* em formar biofilmes vêm sendo reconhecida como um importante fator de virulência desse patógeno. O desenvolvimento de biofilmes por bactérias é comumente coordenado por mecanismos de comunicação celular (*quorum-sensing*), envolvendo a modulação da expressão de genes específicos em resposta à densidade populacional (Miller & Bassler, 2001). No fungo *C. albicans* foi verificado algo similar ao descrito para bactérias, já que ambas as QSMs (o farnesol e o tirosol) atuam no desenvolvimento do biofilme (Ramage *et al.*, 2002, Alem *et al.*, 2006). Alem *et al.* (2006) mostraram que o tirosol promove o crescimento de tubos germinativos durante as fases iniciais de desenvolvimento do biofilme, enquanto o acúmulo de farnesol inibe a formação dessa comunidade microbiana, atuando possivelmente como um sinal para a dispersão celular nas fases mais tardias do desenvolvimento de biofilme por *C. albicans* (Ramage *et al.*, 2002).

Biofilmes formados por *C. albicans* têm sido relacionados a profundas implicações clínicas, pois promovem o aumento da resistência do fungo a inúmeros agentes antimicrobianos (Baillie & Douglas, 2000; Chandra *et al.*, 2001). A dificuldade de se tratar infecções associadas a biofilmes enfatiza a importância de se estudar drogas eficazes contra o desenvolvimento dessas comunidades. Nesse contexto, avaliamos o efeito do propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, na morfogênese e formação de biofilmes por *C. albicans*.

### **4.2.1. Efeito do propranolol na morfogênese de *C. albicans***

O efeito do propranolol sobre a morfogênese de células planctônicas de *C. albicans* foi primeiramente relatado por Baker *et al.* (2002). Esses autores mostraram que a formação de tubos germinativos por culturas de *C. albicans* crescidas em meio indutor de filamentação contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) era inibida de maneira dose-dependente por propranolol. Esses resultados foram confirmados por nós. Inicialmente observamos que o cultivo de *C. albicans* em meio contendo 20% de SFB induz a filamentação, conferindo à colônia um aspecto rugoso, como mostrado na figura 10A. No entanto, a adição de 0,75 mM de propranolol ao meio de cultivo contendo SFB

ocasiona o surgimento de colônias de *C. albicans* com aspecto liso. Conforme verificado por microscopia óptica, esse fato deve-se à inibição do desenvolvimento de hifas por propranolol (Figura 10B). O efeito inibitório do propranolol na filamentação de *C. albicans* parece ser conseqüente da interação direta entre essa droga e o ácido fosfatídico (PA), bloqueando assim a formação de diacilglicerol (DAG) (Baker *et al.*, 2002). Tendo em vista que as moléculas de PA e DAG podem atuar como sinalizadores importantes para o processo de transição morfológica de *C. albicans* (Hube *et al.*, 2001), a interação destas com o propranolol teria, conseqüentemente, efeito na morfogênese desse fungo.

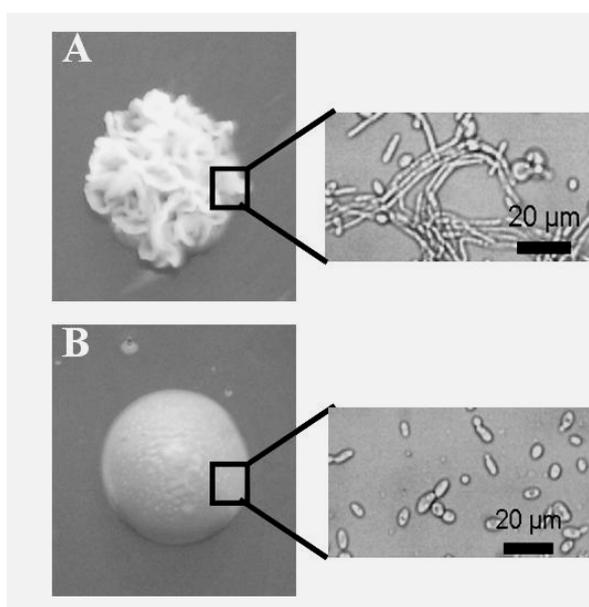


Figura 10. **Morfologia de colônias de *C. albicans* crescidas em meio YPD ágar suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB 20%) na ausência (A) ou na presença (B) de 750  $\mu$ M de propranolol.** O cultivo de *C. albicans* em presença de 20% de SFB induz a filamentação (A). Entretanto, a adição de propranolol reverte esse efeito (B).

#### **4.2.2. Efeito do propranolol na formação de biofilmes de *C. albicans***

Sabendo-se que o propranolol inibe o desenvolvimento de tubos germinativos em *C. albicans* (Figura 10), e que o biofilme maduro é composto por uma mistura de formas morfológicas, o que inclui leveduras, pseudohifas e hifas, (Kojic & Darouiche, 2004), iniciamos experimentos visando avaliar o papel do propranolol na formação de biofilme de *C. albicans*. Nossos resultados mostraram que a adição de SFB induz a formação de biofilme, como era esperado. Entretanto, a adição de propranolol reverte o

efeito do SFB, inibindo significativamente o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, como mostrado em ensaios com MTT (Figura 11). Vale ressaltar que as concentrações de propranolol utilizadas não afetam o crescimento de *C. albicans* (dados não mostrados). Esses resultados foram corroborados por experimentos de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os quais evidenciaram que a adição de propranolol diminui, de maneira dose-dependente, a formação de biofilmes em catéteres (Figura 12). Como observado na figura 12, a adição de propranolol altera a estrutura tridimensional do biofilme, o qual, com o aumento na concentração de propranolol, apresenta camadas reduzidas formadas por poucas leveduras e células alongadas.

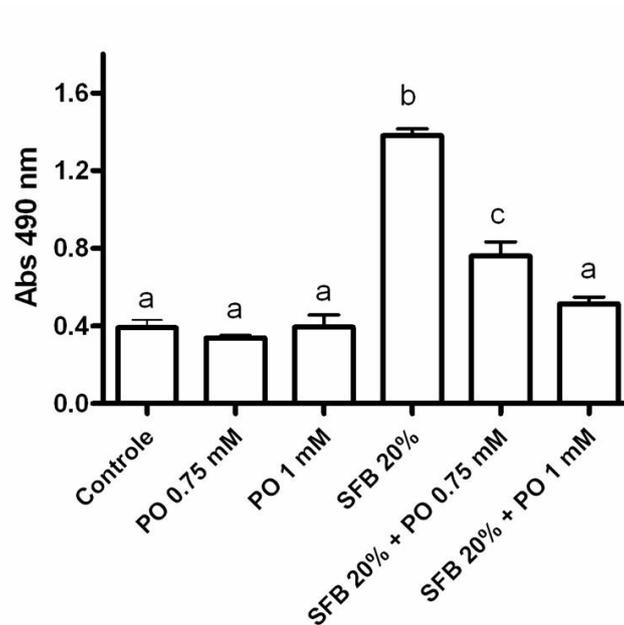


Figura 11. **Efeito do propranolol na formação de biofilme de *C. albicans*.** A avaliação do efeito do propranolol na formação do biofilme foi realizada pelo ensaio de MTT. *C. albicans* foi cultivada em placas de 96 poços em diferentes condições por 24 h a 36°C para a formação de biofilme. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas para a realização o ensaio de MTT, conforme descrito previamente. SFB: Soro Fetal Bovino. PO: Propranolol. Letras diferentes apontam para diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ).

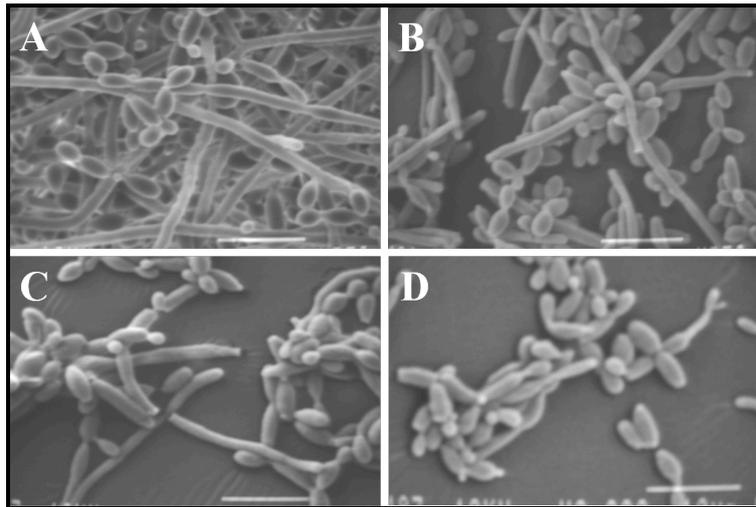


Figura 12. **Inibição da formação de biofilme por células de *C. albicans* cultivadas em diferentes concentrações de propranolol por 24h.** (A) SFB 20%; (B) SFB 20% + Propranolol 500  $\mu$ M; (C) SFB 20% + Propranolol 750  $\mu$ M; (D) SFB 20% + Propranolol 1 mM.

O efeito do propranolol ao longo do processo de formação do biofilme de *C. albicans* também foi avaliado. Os resultados mostraram que a adição de 1mM de propranolol mesmo após 4h do início da formação do biofilme inibe fortemente o desenvolvimento dessa comunidade microbiana, assemelhando-se à inibição observada com a adição de propranolol concomitante ao início de sua formação. Prejuízos significativos ao desenvolvimento do biofilme também foram verificados com a adição de propranolol após 5 e 6h do início de sua formação (Figura 13). No entanto, o efeito inibitório do propranolol torna-se menos evidente, porém estatisticamente significativo, quando da adição desse composto a um biofilme pré-formado por 24h (Figura 14). Estes resultados sugerem que o propranolol interfere, principalmente, nos estágios iniciais da formação do biofilme de *C. albicans*.

Além da adição de SFB ao meio de cultura, muitas outras condições, como cultivo na presença de N-acetilglicosamina (GlcNAc) e L-prolina (Simonetti *et al.*, 1974; Dabrowa *et al.*, 1976), são indutoras de filamentação em *C. albicans* e, conseqüentemente, facilitam o desenvolvimento de biofilme. Dessa forma, o efeito do propranolol no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* mediado por GlcNAc também foi analisado. Embora a formação do biofilme na presença de GlcNAc não tenha sido completamente inibida com a adição de 1 mM de propranolol, como observado para o SFB, a atividade do biofilme mensurada pelo ensaio de MTT foi reduzida em cerca de 25% quando comparado ao controle (sem propranolol), sendo o

resultado estatisticamente significativo (dados não mostrados). Esses dados sugerem que o propranolol tem um potente efeito inibitório no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* formado em resposta a diferentes sinais.

Além dos efeitos do propranolol na formação do biofilme, foi avaliada a ação de um segundo beta-bloqueador adrenérgico, o metoprolol. A diferença principal entre esses dois compostos está relacionada à seletividade do receptor beta-adrenérgico. Isso porque existem três diferentes subtipos de receptores  $\beta$ :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (Che *et al.*, 2009). O propranolol é um beta-bloqueador não seletivo, ou seja, ele bloqueia tanto os receptores adrenérgicos  $\beta_1$ , encontrados principalmente no miocárdio, quanto os receptores  $\beta_2$ , encontrados principalmente no músculo liso de alguns órgãos e em vasos sanguíneos. Já o metoprolol é um beta-bloqueador cardiosseletivo, por atuar apenas nos receptores adrenérgicos  $\beta_1$  (Che *et al.*, 2009). Além disso, o propranolol é mais lipossolúvel que o metoprolol (Dimsdale *et al.*, 1989).

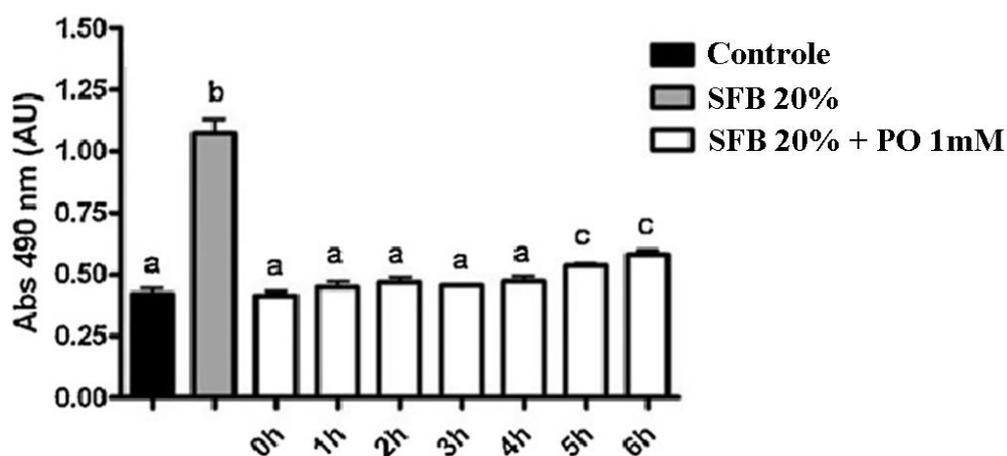


Figura 13. Efeito do propranolol ao longo do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. Leveduras de *C. albicans* foram cultivadas em placas de 96 poços nas diferentes condições experimentais por 24 h a 36°C. Propranolol para uma concentração final de 1 mM foi adicionado após diferentes intervalos de tempo do início da formação do biofilme de *C. albicans* (0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6h). Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas para a realização o ensaio de MTT, conforme descrito previamente. SFB: Soro Fetal Bovino. PO: Propranolol. Letras diferentes apontam para diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ).

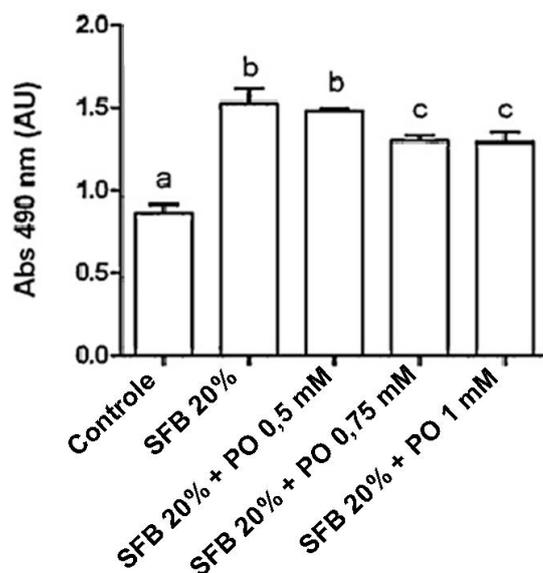


Figura 14. **Efeito do propranolol no biofilme maduro de *C. albicans*.** Leveduras de *C. albicans* foram cultivada em placas de 96 poços por 24 h a 36°C. Ao biofilme pré-formado por 24h foi adicionado propranolol para uma concentração final de 0,5, 0,75 ou 1 mM. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas para a realização o ensaio de MTT, conforme descrito previamente. SFB: Soro Fetal Bovino. PO: Propranolol. Letras diferentes apontam para diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ).

Os resultados demonstram que, assim como o propranolol, o metoprolol exerce um efeito inibitório na formação de biofilme por *C. albicans* (Figura 15A). A concentração de 1 mM de metoprolol é suficiente para inibir completamente o desenvolvimento do biofilme, como mostrado na figura 15A. Adicionalmente, o propranolol e o metoprolol atuam de forma sinérgica na inibição do biofilme de *C. albicans*, embora o propranolol pareça ser mais efetivo que o metoprolol quando a ação individual de cada composto é comparada (Figura 15B). Esse maior efeito inibitório do propranolol, observado para concentração de 0,5 mM, deve-se possivelmente a sua maior lipossolubilidade (Dimsdale *et al.*, 1989), o que permite uma melhor penetrabilidade nas células fúngicas.

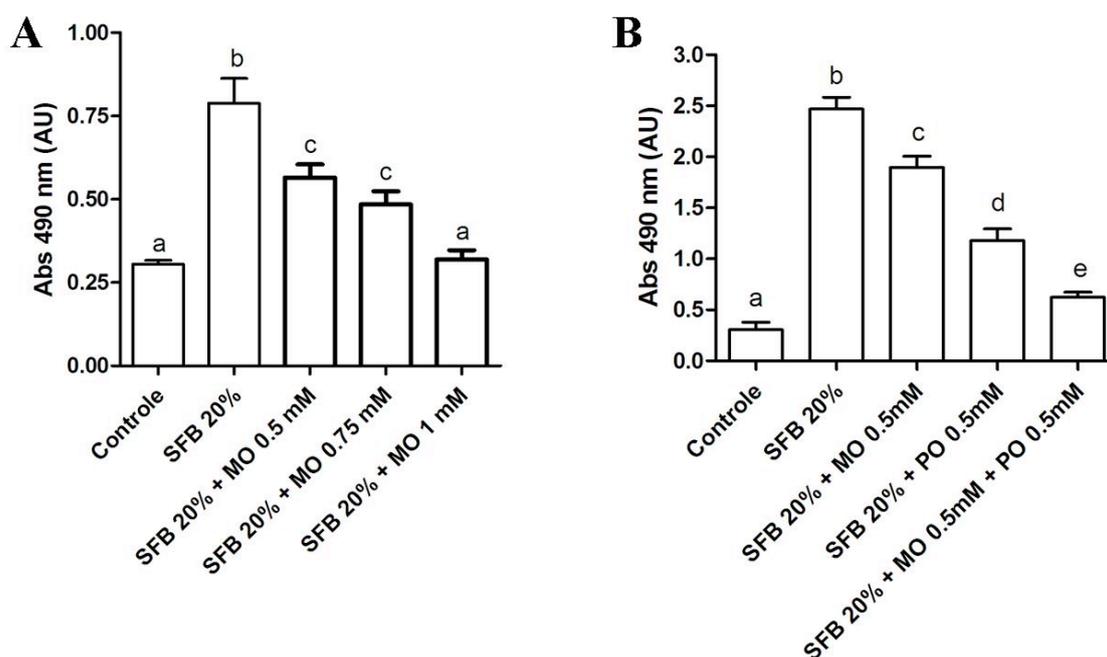


Figura 15. **Efeito do metoprolol na formação de biofilme de *C. albicans*.** A avaliação do efeito do metoprolol na formação do biofilme foi realizada pelo ensaio de MTT. *C. albicans* foi cultivada em placas de 96 poços em diferentes condições por 24 h a 36°C para a formação de biofilme. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas para a realização o ensaio de MTT, conforme descrito previamente. Tanto a ação individual de diferentes concentrações do metoprolol (A), quanto a ação conjunta de propranolol e metoprolol para a concentração de 0,5 mM cada (B), foi analisada. SFB: Soro Fetal Bovino. MO: Metoprolol. PO: Propranolol. Letras diferentes apontam para diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.3. Efeito do propranolol na adesão de *C. albicans* a superfícies abióticas e bióticas

O primeiro passo para a formação de biofilmes por microrganismos é a adesão a uma superfície, que pode ser tanto abiótica, como catéteres e sondas, quanto biótica, como a superfície das células do hospedeiro. Nesse sentido, avaliamos se o efeito do propranolol na formação do biofilme de *C. albicans* está relacionado à inibição no processo de adesão das células fúngicas a superfícies. Para tanto, leveduras de *C. albicans* foram crescidas em microplacas de cultivo por 24h em diferentes condições experimentais. Posteriormente, as células não aderidas a placa foram descartadas e as

remanescentes foram coradas com cristal violeta, visando mensurar a quantidade de células aderidas à superfície abiótica. Os testes realizados mostraram que SFB ativa o processo de adesão de *C. albicans*. Já a adição de propranolol diminui a aderência das células fúngicas quando há indução por SFB, sendo 1 mM de propranolol suficiente para reverter todo efeito indutor do SFB (Figura 16). Resultados similares foram observados quando avaliado o efeito do propranolol na adesão de *C. albicans* a células epiteliais. Para tanto, leveduras foram co-cultivadas com células HeLa por 1h a 36°C na presença ou na ausência de propranolol. Os resultados mostraram que o propranolol diminui significativamente o número de células fúngicas aderidas às células epiteliais, sendo que 0,5 mM desse composto reduz em 75% a adesão de *C. albicans* a células HeLa (Figura 17). Assim, nossos dados revelam que o propranolol interfere tanto na adesão de *C. albicans* a superfícies abióticas (Figura 16), quanto à superfície de células hospedeiras (Figura 17). Esses resultados, em adição ao efeito do propranolol na filamentação de *C. albicans* (Figura 10), podem explicar o potente papel inibitório exercido por esse antagonista beta-adrenérgico no desenvolvimento do biofilme.

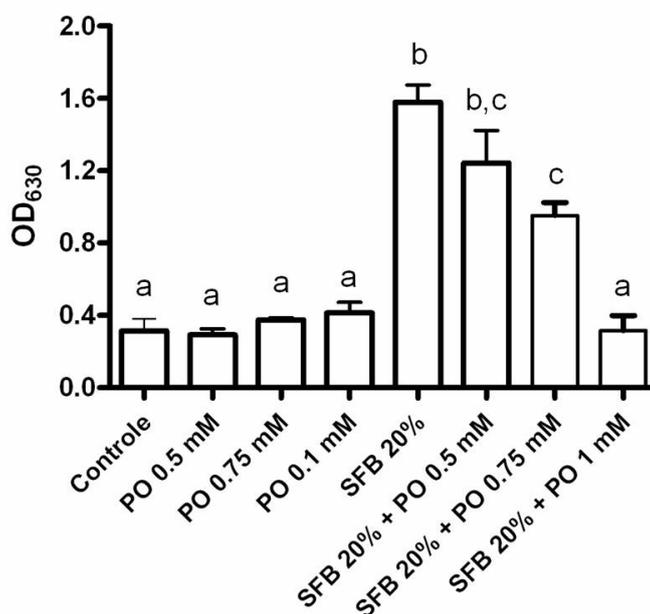


Figura 16. **Propranolol inibe a adesão de células de *C. albicans* a superfícies abióticas.** O teste de adesão foi realizado em placas de 24 poços cultivando-se leveduras de *C. albicans* por 24h a 36°C em diferentes condições. As células aderidas foram coradas com cristal violeta e o número de células foi determinado pela medida da densidade óptica a 630 nm. SFB: Soro Fetal Bovino. PO: Propranolol. Letras diferentes apontam para diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ).

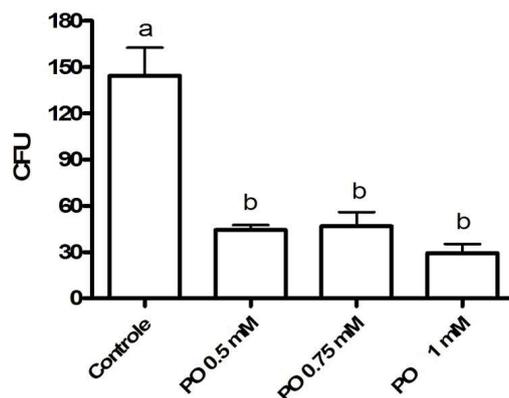


Figura 17. **Propranolol inibe a adesão de *C. albicans* a células epiteliais.** Células epiteliais HeLa aderidas em placas de cultura de célula de 24 poços foram co-cultivadas com células de *C. albicans* por 1 h a 36°C na ausência ou presença de propranolol (PO). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados e as células epiteliais foram lisadas adicionando-se água MilliQ. O fungo foi recuperado, plaqueado em meio YPD ágar, incubado por 24 h a 36°C e o número de colônias por placa foi contado. Letras diferentes apontam para diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.4. Efeito do propranolol na modulação da expressão de genes que codificam adesinas de *C. albicans*

Sabendo-se que a adesão de *C. albicans* a superfícies, etapa inicial para a formação do biofilme, é mediada tanto por fatores inespecíficos, como forças hidrofóbicas e eletrostáticas, quanto por adesinas específicas (Ramage *et al.*, 2005), avaliamos o efeito do propranolol nos níveis de expressão dos genes que codificam as adesinas HWP1, ALS1 e ALS3. O papel dessas proteínas no desenvolvimento de biofilmes por *C. albicans* vem sendo relatado por alguns autores. Análises funcionais têm mostrado, por exemplo, que a proteína HWP1 é requerida para a adesão de células fúngicas a células epiteliais (Staab *et al.*, 1999) e para a formação do biofilme por *C. albicans in vitro* e *in vivo* (Nobile *et al.*, 2006a e 2006b). Do mesmo modo, Nobile *et al.* (2008) sugerem que as proteínas ALS1 e ALS3 são cruciais para o biofilme de *C. albicans*. Em adição, os níveis de expressão do gene *Als3* aumentam durante os estágios iniciais de formação do biofilme (Nailis *et al.*, 2009), reforçando ainda mais o papel desta proteína no desenvolvimento de comunidades microbianas por *C. albicans*.

Nesse contexto, os níveis de expressão dos genes *Hwp1*, *Als1* e *Als3* foram quantificados em experimentos de PCR em tempo real. Como verificado na tabela 3, a

adição de SFB a uma cultura de *C. albicans*, condição essa que induz a filamentação e a formação de biofilme (Figura 11), eleva significativamente os níveis de expressão dos genes que codificam as três adesinas estudadas. Esses resultados estão de acordo com trabalhos prévios que mostram que a expressão dos genes *Als3* e *Hwp1* é drasticamente aumentada durante a fase de micélio de *C. albicans* (Hoyer *et al.*, 1998; Sundstrom, 2002). Em contrapartida, a adição de 0,75 mM de propranolol reverte o efeito indutor mediado pelo SFB, resultando em um decréscimo no acúmulo dos transcritos *Als1*, *Als3* e *Hwp1* em 82,4%, 94,1% e 97,1%, respectivamente (Tabela 3). Esse resultado indica que o efeito do propranolol no processo de adesão de *C. albicans* a superfícies, e, por conseguinte, o efeito do propranolol na formação do biofilme por esse fungo, deve-se, ao menos em parte, à diminuição da expressão de adesinas específicas.

A inibição da expressão do gene *Als3* por propranolol foi também descrita recentemente por Ueno *et al.* (2009). Esses autores mostraram ainda que 1 mM de propranolol reprime a expressão do gene que codifica a adesina ALS8. A expressão de ambas as adesinas (ALS3 e ALS8), assim como das outras adesinas aqui analisadas (ALS1 e HWP1), é regulada pelo fator de transcrição EFG1 de *C. albicans* (Zhao *et al.*, 2004; Stoldt *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 2002; Sharkey *et al.*, 1999). A proteína EFG1 é um importante regulador de processos morfogenéticos em *C. albicans* (Ernst, 2000) e a expressão relativa do gene que codifica esse fator transcricional também é diminuída em resposta ao propranolol (Ueno *et al.*, 2009). Contudo, nossos resultados corroboram a hipótese formulada por Ueno *et al.* (2009) de que o propranolol atua reprimindo a via cAMP-EFG1, a qual regula a expressão de genes específicos da fase miceliana de *C. albicans*.

Tabela 3. Efeito do propranolol nos níveis de expressão de genes que codificam as adesinas ALS1, ALS3 e HWP1 de *C. albicans*. SFB: Soro Fetal Bovino. PO: Propranolol.

Gene	Fold Change		
	Controle	SFB 20%	SFB 20% + PO 0,75 mM
Als1	1,0	1,7	0,3
Als3	1,0	8,5	0,5
Hwp1	1,0	368,2	10,8

#### 4.2.5. Conclusão

Em suma, nossos resultados mostraram que o propranolol tem um potente efeito inibitório na formação de biofilme por *C. albicans in vitro*. O mecanismo de ação do propranolol no desenvolvimento do biofilme está fortemente relacionado com seu efeito na filimentação de *C. albicans*. Propranolol inibe a formação de tubos germinativos como consequência da repressão da via cAMP-EFG1 de *C. albicans* (Ueno *et al.*, 2009). A ativação dessa via em resposta a alguns sinais externos, como presença de SFB e GlcNAc, leva ao acúmulo do fator transcricional EFG1, o qual induz a expressão de genes específicos da fase miceliana de *C. albicans*. O resultado é a filimentação desse fungo (Ernst, 2000). Adicionalmente, Baker *et al.* (2002) propuseram que o propranolol inibe a morfogênese de *C. albicans* por seqüestrar o ácido fosfatídico (PA), impedindo a formação de diacilglicerol (DAG). Conjuntamente, esses estudos sugerem que o fator de transcrição EFG1 possa ser regulado via sinalização das moléculas PA e/ou DAG. Assim, propranolol atuaria inibindo a expressão de EFG1, como mostrado por Ueno *et al.* (2009), e, por consequência, diminuiria a expressão de genes induzidos por esse fator transcricional, como os genes que codificam as adesinas ALS1, ALS3, e HWP1. Como consequência, a ação do propranolol teria efeito negativo na adesão de células de *C. albicans* a superfícies. Portanto, com base nos resultados apresentados nesse trabalho e em trabalhos relatados na literatura, concluimos que o propranolol atua em ao menos duas etapas fundamentais para o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*: (I) o propranolol inibe o processo de adesão de células fúngicas, o qual representa a etapa inicial de formação do biofilme; (II) o propranolol inibe a filimentação de *C. albicans*, processo requerido para o desenvolvimento e estruturação de um biofilme maduro.

Em adição às contribuições para o entendimento do mecanismo de formação de biofilmes por *C. albicans*, nossos resultados podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias alternativas para a prevenção da formação dessas microcomunidades. Embora o uso de propranolol no tratamento de infecções por *Candida* possa não ser recomendado devido sua atividade em células de mamífero, especula-se o uso desse composto visando recobrir a superfície de catéteres e outros instrumentos médicos, e assim prevenir a colonização das células fúngicas e consequente formação de biofilmes.

### **4.3. Comparação do transcrito de *C. neoformans* quando na interação com amebas e macrófagos murinos**

*C. neoformans* é um patógeno oportunista frequentemente encontrado em solos contaminados com excreta de aves (Ellis & Pfeiffer, 1990). A infecção por *C. neoformans*, que ocorre pela inalação de propágulos do ambiente pelo hospedeiro, parece ocorrer de forma acidental, já que *C. neoformans* é um fungo de vida livre que independe de um hospedeiro animal para sua propagação (Hogan *et al.*, 1996). Caso ocorra a exposição ao fungo, o estabelecimento da infecção e o conseqüente desenvolvimento da criptococose vai depender da resultante entre a resposta imunológica do hospedeiro e a virulência de *C. neoformans*. Uma das primeiras linhas de defesa da resposta imune inata do hospedeiro é desempenhada pelos macrófagos alveolares, os quais são capazes de fagocitar eficientemente *C. neoformans* (Fan *et al.*, 2005). Entretanto, a fagocitose não resulta sempre na morte das células fúngicas, que podem sobreviver e se replicar no interior de fagócitos *in vivo*, como mostrado por Feldmesser *et al.* (2000). Essa habilidade de *C. neoformans* de se comportar como um patógeno intracelular facultativo, o qual requer estratégias sofisticadas que permitam sua sobrevivência no ambiente hostil de fagossomos, torna-se particularmente curiosa por este ser um fungo saprofítico que não necessita de hospedeiro animal para sua replicação. Uma hipótese para essa questão é que tal capacidade de *C. neoformans* foi inicialmente desenvolvida para conferir vantagem em seu ambiente natural, sendo posteriormente favorável durante a infecção de hospedeiros mamíferos. Nesse sentido, Steenbergen *et al.* (2001) sugeriram que a capacidade de *C. neoformans* em sobreviver e se replicar no interior de macrófagos é uma conseqüência adaptativa conferida por fatores que propiciam ao fungo vantagens contra predadores ambientais. Essa hipótese foi testada investigando-se as interações entre *C. neoformans* e a ameba *A. castellanii*. Os resultados mostraram que *A. castellanii* rapidamente internaliza as leveduras de *C. neoformans*, as quais são capazes de se replicar no ambiente intracelular. Além disso, isolados mutantes de *C. neoformans* para dois importantes determinantes de virulência em hospedeiro mamífero (cápsula e fosfolipase) são incapazes de sobreviver no interior da ameba, sugerindo que fatores de virulência requeridos para a persistência do fungo em animais são também requeridos para a persistência em amebas (Steenbergen *et al.*

2001). Com base nesses dados, foi proposto que *C. neoformans* tenha sofrido pressão evolutiva em seu ambiente natural decorrente da predação por protozoários do solo, o que promoveu a seleção de estratégias que permitiram sua sobrevivência intracelular em macrófagos de mamíferos. Este resultado provavelmente advém da semelhança entre o ambiente intracelular dos macrófago e das amebas, os quais constituem tanto uma condição de estresse nutricional como oxidativo. Nesse contexto, visando avaliar a resposta do fungo a esses ambientes intracelulares, propusemos comparar o perfil transcritômico de leveduras de *C. neoformans* quando na interação com a ameba *A. castellanii* e macrófagos murinos.

#### **4.3.1. Cinética da internalização de leveduras de *C. neoformans* por amebas e macrófagos murinos**

Inicialmente, uma análise da cinética de internalização do fungo *C. neoformans* por macrófagos murinos da linhagem J774.1 e por células da ameba *A. castellanii* foi realizada, visando definir o tempo de interação fungo-fagócito para os experimentos seguintes. Quando do co-cultivo de *C. neoformans* com macrófagos, verificamos que em 4 h mais de 90% dos fagócitos continham leveduras internalizadas (Figura 18C). Essa porcentagem diminuiu após 6 h de co-cultivo (cerca de 80% dos macrófagos contém leveduras internalizadas), possivelmente devido a processos de exocitose do fungo pelo macrófago, que podem ocorrer com ou sem lise da célula hospedeira (Ma *et al.*, 2006; Alvarez & Casadevall, 2006). Em contrapartida, a porcentagem de fagocitose de *C. neoformans* por amebas aumentou progressivamente ao longo do período de co-cultura avaliado, sendo que após 6 h aproximadamente 30% das amebas continham leveduras internalizadas (Figura 18C). A diferença na porcentagem de internalização entre amebas e macrófagos pode ser explicada pela opsonização das células fúngicas com anticorpo IgG1 Mab 18B7 antes da incubação com os macrófagos. Tal anticorpo se liga à GXM e promove uma maior eficácia no processo de fagocitose. O mesmo não é observado da interação de *C. neoformans* com ameba na presença do anticorpo. Ao contrário, a ligação do anticorpo 18B7 à cápsula do fungo inibe a fagocitose por *D. discoideum* (Steenbergen *et al.*, 2003). Sendo assim, para a interação de *C. neoformans* com a ameba, as leveduras não foram opsonizadas.

Tendo em vista a baixa eficiência de fagocitose por *A. castellanii in vitro*, foi escolhido o ponto de 6 h pós-infecção para análise do perfil de expressão gênica de *C. neoformans*, buscando assim maximizar o número de células fúngicas recuperadas após

interação com ameba. Nas figuras 18A e 18B são mostradas microfotografias representativas de macrófagos e amebas, respectivamente, após 6 h de infecção com *C. neoformans* na proporção fungo:fagócito de 5:1. É possível distinguir claramente as leveduras internalizadas devido à não coloração da cápsula de *C. neoformans*, o que forma uma espécie de halo ao redor da célula fúngica (setas).

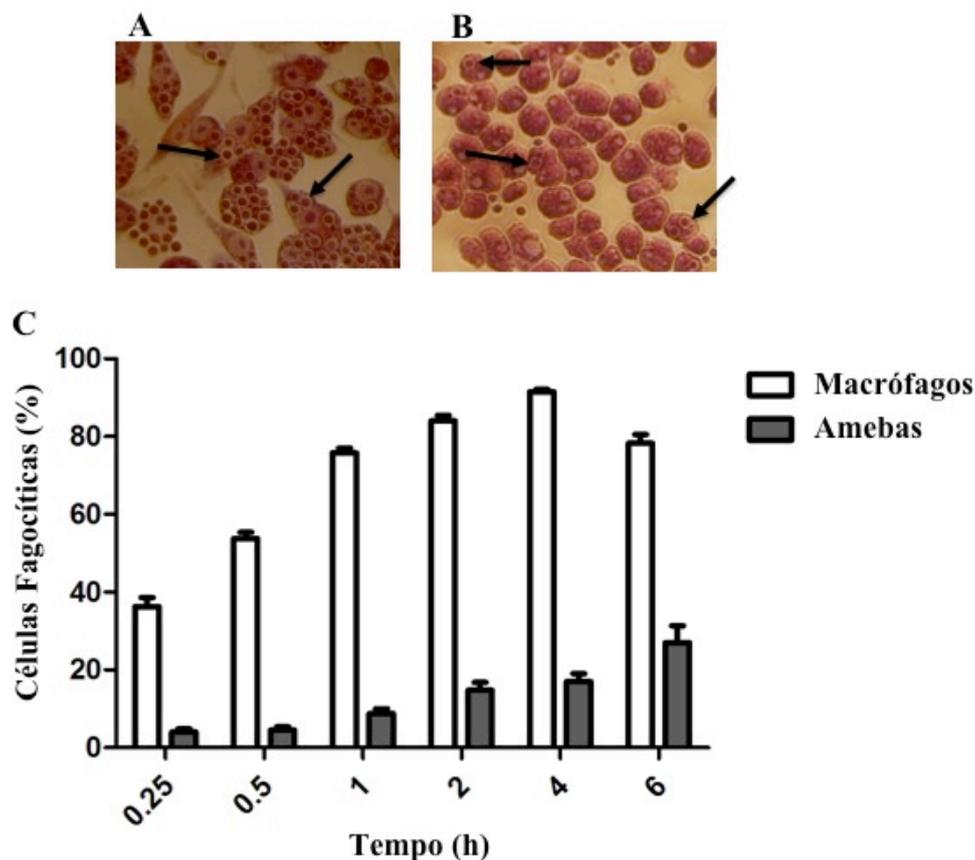


Figura 18. **Ensaio de fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos murinos e amebas.** Macrófagos ou amebas e leveduras foram incubados obedecendo a uma razão de levedura/fagócito de 5:1. A cinética de interação macrófago-*C. neoformans* e ameba-*C. neoformans* foi realizada a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> ou a 28°C, respectivamente. Microfotografia (40 x) representativa do ponto de 6 h pós-infecção de macrófagos (A) e amebas (B) com *C. neoformans*. As setas apontam para leveduras internalizadas. (C) Porcentagem de macrófagos (barras brancas) e amebas (barras cinzas) contendo leveduras de *C. neoformans* internalizadas ao longo de 6 h de infecção *ex vivo*. Estes experimentos foram realizados em quadruplicata (média ± SEM).

#### 4.3.2. Extração de RNA total de *C. neoformans* internalizado por amebas e macrófagos

Após definição do tempo de co-cultivo de *C. neoformans* com ameba ou macrófago para avaliação do perfil transcritômico do fungo internalizado, iniciamos procedimentos visando a extração do RNA total de *C. neoformans* a ser empregado nos experimentos de microarranjo de DNA. Para tal procedimento utilizamos um protocolo de lise diferencial baseado em uma solução de 25 mM de deoxicolato, a fim de evitar contaminação de RNA das células fagocitárias, o que pode interferir durante a metodologia de microarranjo. Tal solução promove a lise de macrófagos e amebas sem lisar as leveduras, que eram recuperadas por centrifugação e submetidas à extração de RNA. As células de *C. neoformans* recuperadas após co-cultivo com amebas ou macrófagos tiveram seu RNA total extraído, quantificado por espectrofotometria e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em condições livres de RNAses. Na figura 19 está mostrado o perfil eletroforético do RNA total de *C. neoformans* extraído após co-cultivo por 6h com *A. castellanii*, sendo compatível ao perfil de uma preparação de RNAs intactos. Resultados similares foram observados para a extração de RNA total de *C. neoformans* após co-cultivo com macrófagos murinos J774.1 (dados não mostrados).

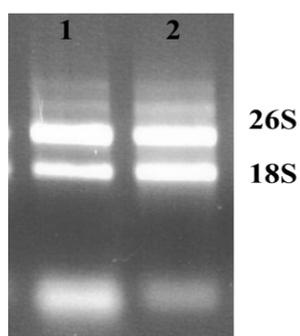


Figura 19. Perfil eletroforético do RNA total extraído do fungo *C. neoformans* após ser co-cultivado com amebas *A. castellanii* por 6 h. Uma alíquota de RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, em condições livres de RNase. Poço 1: RNA total de *C. neoformans* co-cultivado com amebas por 6 h a 28°C em meio PYG. Poço 2: RNA total de *C. neoformans* cultivado *in vitro* por 6 h a 28°C em meio PYG.

### **4.3.3. Identificação e categorização dos genes de *C. neoformans* cuja a expressão foi modulada após internalização por amebas e macrófagos murinos**

Após análise do experimento de microarranjo de DNA, realizado em triplicata experimental, foi verificado que, dos 7775 genes de *C. neoformans* representados por seqüências no microarranjo utilizado, 656 genes apresentaram modulação de sua expressão de pelo menos duas vezes em resposta ao ambiente intracelular da ameba (Anexos 1 e 2). Dentre os 322 genes cuja expressão foi induzida após fagocitose de *C. neoformans* por *A. castellanii* estão genes envolvidos no transporte de nutrientes, na resposta ao estresse oxidativo, no metabolismo, no reparo de DNA, na síntese de proteínas peroxissomais e no processo de ubiquitinação de proteínas (Figura 20A). Já grande parte dos genes cuja expressão foi diminuída após a internalização de *C. neoformans* por amebas estão relacionados à maquinaria de transcrição e tradução. Genes envolvidos na replicação, na biossíntese de ergosterol e síntese de parede celular também tiveram sua expressão reprimida (Figura 20B).

Análises similares foram realizadas visando avaliar o perfil transcritômico de *C. neoformans* quando da interação com macrófagos murinos por 6 h. Os resultados mostraram um total de 293 genes cuja expressão foi alterada ao menos duas vezes em resposta ao ambiente intracelular do macrófago (Anexos 3 e 4), dos quais 222 genes foram induzidos e 71 genes foram reprimidos. Dentre os genes cuja expressão foi aumentada destacam-se genes que codificam para transportadores, chaperonas, proteínas envolvidas no estresse oxidativo e no metabolismo (Figura 21A). Genes envolvidos na biossíntese de ergosterol e na fosforilação oxidativa foram reprimidos, conforme mostrado na figura 21B. Um trabalho anterior havia também avaliado as alterações transcricionais de *C. neoformans* em resposta à fagocitose por macrófagos murinos (Fan *et al.*, 2005). Entretanto, diferente do que foi realizado no presente trabalho, Fan *et al.* (2005) utilizaram macrófagos previamente ativados por LPS (lipopolissacarídeo) e INF- $\gamma$  nos ensaios de interação com *C. neoformans*. Além disso, o co-cultivo fungo-macrófago foi realizado por 2 h e 24 h. Os autores observaram um total de 280 genes modulados em resposta ao ambiente intracelular do macrófago em ao menos um dos tempos analisados, sendo que genes envolvidos no transporte de nutrientes e na resposta ao estresse nutricional e oxidativo foram induzidos, enquanto genes que codificam proteínas da maquinaria de transcrição e tradução foram reprimidos. Esses resultados são bastante similares aos obtidos em nossos experimentos (Figuras 20 e 21).

Visando avaliar o perfil transcritômico de *C. neoformans* em resposta aos ambientes intracelulares de amebas e macrófagos, os resultados dos dois experimentos de microarranjo foram comparados. Dos 293 genes de *C. neoformans* modulados em resposta à interação com macrófagos murinos, 111 genes (38%) também tiveram sua expressão alterada quando da interação com amebas. Destes, 63,1% foram induzidos em ambos os nichos enquanto 20,7% foram reprimidos. Dentre os genes cuja expressão foi aumentada tanto em macrófagos quanto em amebas destacam-se genes envolvidos com transporte de nutrientes, ciclo do glioxalato, estresse oxidativo e metabolismo. Esses resultados, que serão melhor discutidos posteriormente, sugerem um ambiente nutricionalmente pobre e repleto de espécies reativas de oxigênio no interior de macrófagos e amebas. Em contrapartida, genes envolvidos na biossíntese do ergosterol e na fosforilação oxidativa foram reprimidos quando da interação de *C. neoformans* com ambas células fagocíticas. (Tabela 4).

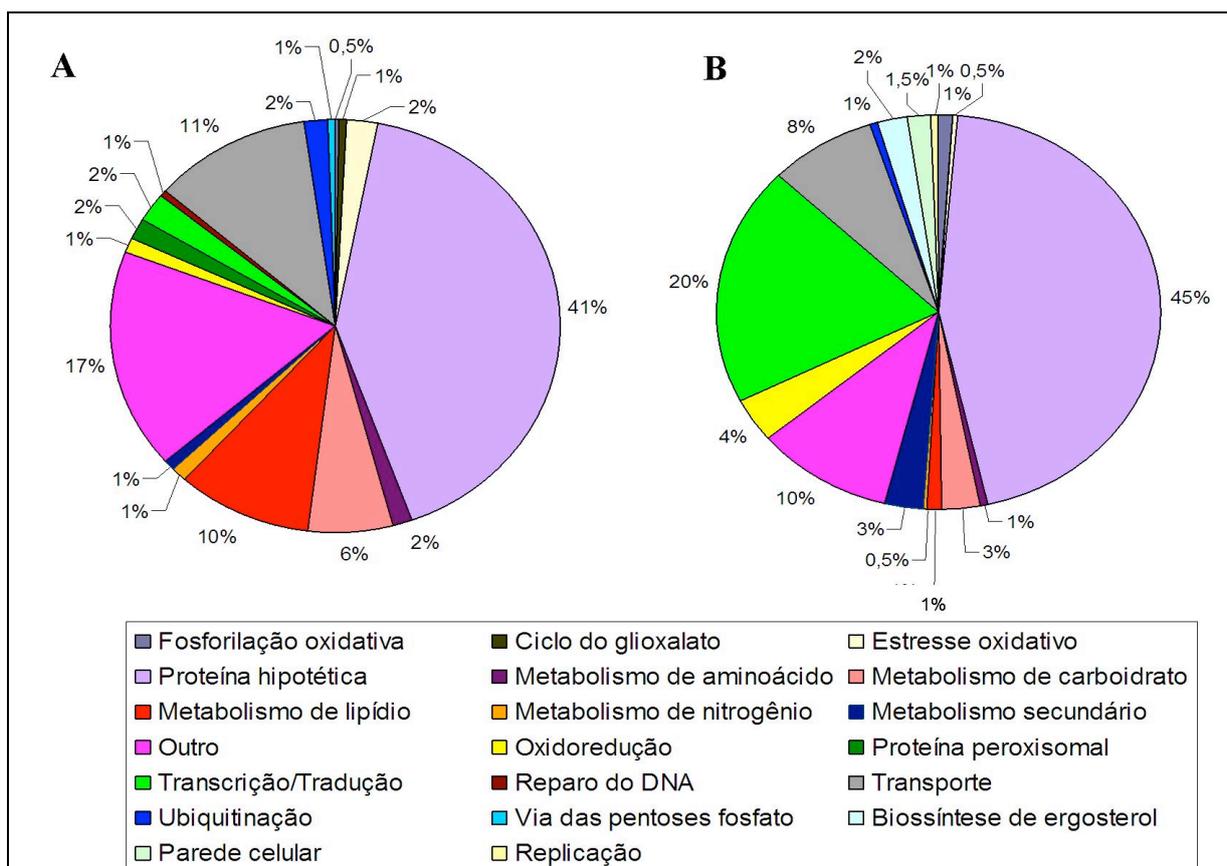


Figura 20. **Categorização dos genes de *C. neoformans* cuja expressão foi modulada quando do co-cultivo com ameba *A. castellanii* por 6 h.** (A) Genes de *C. neoformans* induzidos duas ou mais vezes após internalização por *A. castellanii*. (B) Genes de *C. neoformans* reprimidos duas ou mais vezes após internalização por *A. castellanii*.

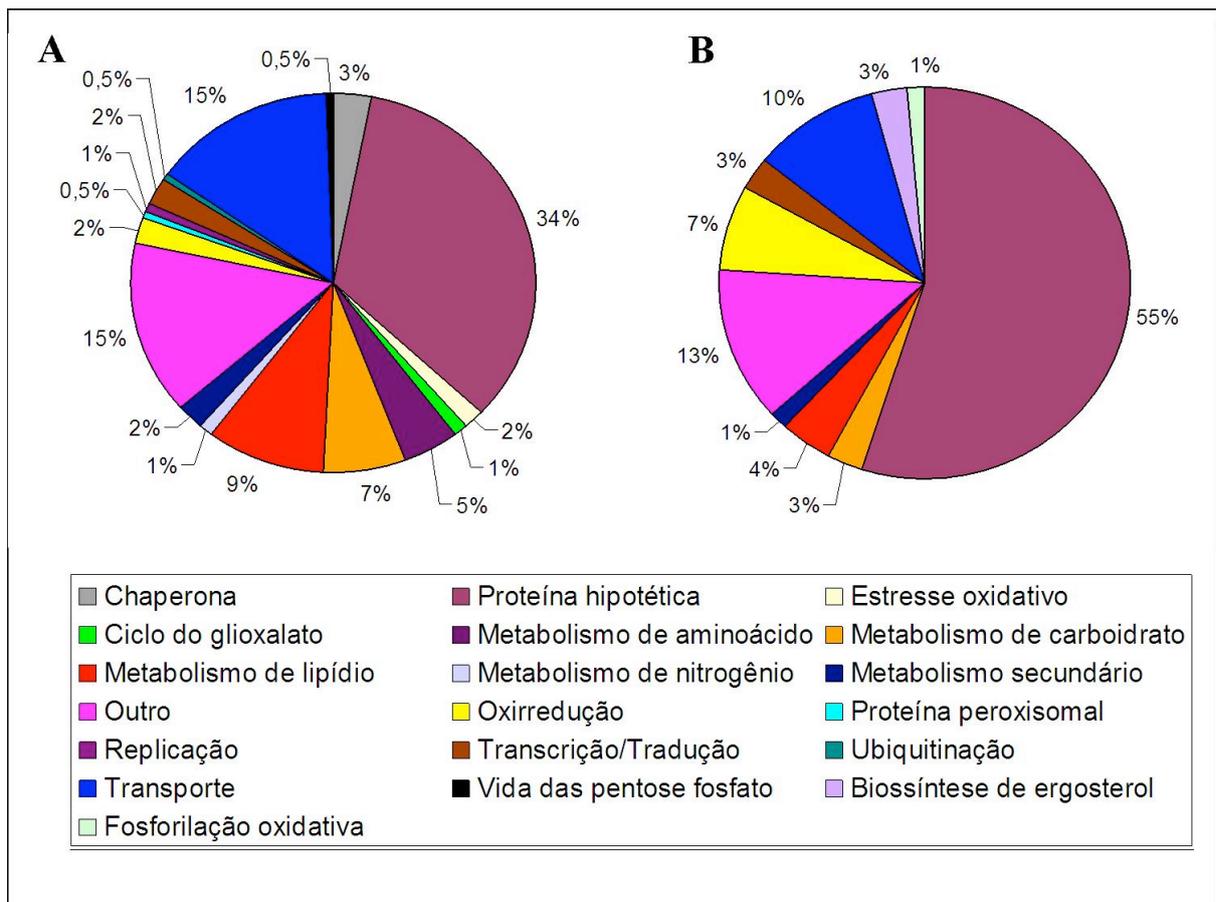


Figura 21. **Categorização dos genes de *C. neoformans* cuja expressão foi modulada quando do co-cultivo com macrófagos murinos por 6 h.** (A) Genes de *C. neoformans* induzidos duas ou mais vezes após internalização por macrófagos. (B) Genes de *C. neoformans* reprimidos duas ou mais vezes após internalização por macrófagos.

Embora a grande maioria dos genes de *C. neoformans* (83,8%) comumente expressos durante interação com ambos fagócitos apresentaram modulação similar, sugerindo que o ambiente intracelular destes dois tipos celulares apresentam características semelhantes, 16,2% dos genes identificados foram diferentemente modulados (Tabela 5). Dentre estes, cerca de 39% das sequências correspondiam a genes que possivelmente codificam proteínas hipotéticas, 22,2% a genes envolvidos no transporte de substâncias e 11,1% a genes envolvidos no metabolismo, o que indica a existência de possíveis diferenças na disponibilidade de nutrientes no meio intracelular destes fagócitos

Tabela 4. Genes de *C. neoformans* cuja modulação foi similar quando da interação do fungo com macrófagos murinos e amebas.

Categoria	Nº de Acesso*	Função predita	Variação da expressão	
			Ameba	Macrófago
Biossíntese de Ergosterol	CNAG_04687	Etearoil-CoA 9-dessaturase	-2,82949	-2,5887
	CNAG_01737	C-4 metil esterol oxidase	-5,10666	-2,1578
Fosforilação Oxidativa	CNAG_05626	h-sco1	-3,39215	-2,02884
Ciclo do Glioxalato	CNAG_05303	Isocitrato liase	3,32005	12,9474
	CNAG_05653	Malato sintase	2,09609	2,26303
Estresse Oxidativo	CNAG_02147	Citocromo-c peroxidase	3,59838	5,1284
	CNAG_01846	Flavoproteína	3,11961	2,0610
	CNAG_05169	Citocromo b2	2,68905	2,7162
Transcrição	CNAG_04345	Fator transcricional da RNA polimerase II	2,59053	2,40314
Transporte	CNAG_05662	Transportador de açúcar	17,4444	16,8462
	CNAG_01384	bodown198	8,88579	4,86666
	CNAG_01936	Transportador de açúcar	6,84072	7,29332
	CNAG_03772	Transportador de glicose	6,70411	11,1359
	CNAG_03910	Transportador de D-xilose	6,64142	2,84406
	CNAG_03060	Transportador MDR	6,03422	2,11251
	CNAG_01925	Transportador de açúcar	4,10947	2,45472
	CNAG_05685	Transportador de aminoácido	3,44863	2,77709
	CNAG_05929	Transportador de açúcar	2,95817	3,30233
	CNAG_02288	Transportador antiporte succinato:fumarato	2,68543	4,94611
	CNAG_07367	Transportador de aminoácido	2,42433	3,12233
	CNAG_04795	Transportador do nucleotídeo adenina	2,26578	2,83099
	CNAG_07387	Transportador de ferro Str3	-2,04064	-2,56502
	CNAG_03438	Transportador de hexose	-3,94741	-2,56777
Via das Pentose Fosfato	CNAG_00827	Ribose 5-fosfato isomerase	3,00641	7,41447
Metabolismo de Aminoácido	CNAG_03128	Proteína lmbA	2,27524	2,19625
Metabolismo de Carboidrato	CNAG_04621	Glicogênio Sintase	5,22439	2,17416
	CNAG_03067	Piruvato carboxiltransferase 1,4-alfa-glucana-branching enzima	3,79568	2,66549
	CNAG_00393	enzima	3,33816	2,70596
	CNAG_04659	Piruvato decarboxilase	-3,97919	-2,58975
Metabolismo de Lipídio	CNAG_03019	Ácido graxo de cadeia longa-CoA ligase	5,87013	2,70475
	CNAG_06431	Acil-CoA oxidase	5,64239	6,20667
	CNAG_00490	Acetil-CoA C-aciltransferase	5,09895	5,5079
	CNAG_03666	Acil-CoA deidrogenase	5,08676	5,62055
	CNAG_06551	Carnitina O-acetiltransferase	4,5781	5,56428

	CNAG_07747	Acil-coenzima A oxidase I Acil-Coenzime A	4,54934	2,41408
	CNAG_02562	deidrogenase	4,19328	2,79301
	CNAG_02045	Acetoacil-CoA sintetase	3,65055	2,95075
	CNAG_03393	Acil-CoA tiolesterase	3,56595	2,11571
	CNAG_05721	Peroxisomal hidratase- deidrogenase-epimerase	3,16504	3,29229
	CNAG_01116	Beta-cetoacil redutase	3,06954	2,80628
	CNAG_04392	Proteína de ligação a estero	2,83953	3,82553
	CNAG_00537	Carnitina acetiltransferase	2,7752	3,02984
	CNAG_04238	2,4-dienoil-CoA redutase	2,71898	2,7285
	CNAG_00371	Enoil-CoA hidratase 3-hidroxiacil-CoA	2,34604	3,14993
	CNAG_04308	deidrogenase	2,32894	2,66174
	CNAG_01671	Acetil/propionil CoA carboxilase	2,12004	3,93367
	CNAG_00499	Carnitina/acil carnitina carreador	2,10977	3,88855
	CNAG_06628	Aldeido deidrogenase	2,74167	6,49193
	CNAG_02087	Esfingosina N- aciltransferase	-7,58831	-3,75872
Metabolismo de Nitrogênio	CNAG_03243	2-nitropropano dioxigenase	3,40319	3,0279
	CNAG_05644	2-nitropropano dioxigenase	2,16675	4,29356
Metabolismo Secundário	CNAG_06623	Mio-inositol oxigenase	2,52692	2,13304
Oxidorredução	CNAG_05299	Oxidoredutase Dimetilnilina	3,16418	3,35935
	CNAG_00541	monooxigenase	-3,47134	-2,62673
	CNAG_01939	fmHP	-5,14025	-2,08856
	CNAG_02577	Oxidoredutase	-5,33935	-2,63942
Outro	CNAG_01702	Proteína integral de membrana	11,4333	3,68741
	CNAG_05229	Proteína da família da estomatina	5,47933	2,29192
	CNAG_02295	Fosfotransferase	4,64925	2,60426
	CNAG_07862	Fumarato redutase	3,94316	9,98097
	CNAG_01252	Tiosulfato sulfurtransferase	3,08677	2,65488
	CNAG_01794	2-hidroxiacido dehidrogenase	2,68166	2,99315
	CNAG_04096	Racemase	2,09515	2,30145
	CNAG_02674	dJ347H13.4	2,05302	2,52509
	CNAG_04103	Proteína de membrana DUF895	2,02542	2,75068
	CNAG_02264	ATPase da família AFG1	-2,25762	-2,26571
	CNAG_05370	Proteína integral de membrana	-4,69223	-2,34957
Proteína Hipotética	CNAG_07869	-	24,5501	5,20518
	CNAG_04837	-	7,15172	6,35904
	CNAG_03394	-	4,22103	2,59575
	CNAG_02405	-	3,51154	3,46188
	CNAG_02978	-	3,17452	3,07828
	CNAG_01847	-	3,06055	2,00546
	CNAG_06583	-	2,76876	2,92177

CNAG_04394	-	2,75153	2,64509
CNAG_00079	-	2,74434	2,5312
CNAG_05784	-	2,67849	2,69336
CNAG_06355	-	2,65531	2,26161
CNAG_02044	-	2,3962	4,54104
CNAG_07708	-	2,33125	2,78776
CNAG_07912	-	2,01817	3,91411
CNAG_00315	-	2,00838	2,82288
CNAG_03857	-	-2,04111	-2,09241
CNAG_00349	-	-2,05716	-2,90138
CNAG_07568	-	-2,19254	-2,23732
CNAG_02910	-	-2,45926	-2,39798
CNAG_00814	-	-4,9423	-2,36478
CNAG_07920	-	-5,37886	-3,4471
CNAG_04891	-	-5,38601	-2,13027
CNAG_01803	-	-5,56394	-2,8793
CNAG_05741	-	-5,82377	-2,40385
CNAG_01369	-	-8,89767	-2,03519
CNAG_06590	-	-11,3003	-3,06825

\* Número de acesso dos genes relacionados no projeto genoma de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* realizado pelo *Broad Institute* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans)).

Tabela 5. Genes de *C. neoformans* que apresentaram modulação diferente em resposta à interação do fungo com macrófagos murinos e amebas.

Categoria	Nº de Acesso*	Função predita	Variação da expressão	
			Ameba	Macrófago
Metabolismo de Aminoácido	CNAG_05676	Tirosina aminotransferase	-3,30706	3,31586
Metabolismo de Lipídio	CNAG_00984	Glicose e ribitol dehidrogenase	3,2289	-2,10481
Oxirredução	CNAG_04085	Oxidoreductase	-4,76438	3,27837
	CNAG_00876	Redutase	-2,39397	2,68318
Tradução	CNAG_03563	Aspartato-tRNA ligase	2,02203	-2,59223
Transporte	CNAG_04758	Transportador de amônia	2,41737	-2,39166
	CNAG_04210	Transportador de açúcar	-2,3879	2,78891
	CNAG_03426	Transportador de GDP-manose	-2,94678	3,16533
	CNAG_00895	Transportador de zinco	-4,53653	2,67154
Outro	CNAG_03759	Proteína específica de conidiação 6	5,73768	-4,86503
	CNAG_06576	Alergeno	2,38555	-2,92608
Proteína Hipotética	CNAG_03068	-	9,56139	-2,24987
	CNAG_02694	-	4,11009	-2,25959
	CNAG_00848	-	3,1508	-2,19634
	CNAG_02362	-	2,74084	-2,04115
	CNAG_06396	-	2,15314	-2,57459
	CNAG_01865	-	-2,36364	4,66234
	CNAG_00813	-	-5,87379	4,67373

\* Número de acesso dos genes relacionados no projeto genoma de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* realizado pelo *Broad Institute* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans)).

Curiosamente, o gene alérgeno 1 (*All1*) de *C. neoformans* também apresentou modulação diferente em resposta à fagocitose por macrófagos e amebas (Tabela 5). Esse gene codifica uma pequena proteína citoplasmática envolvida na formação da cápsula de *C. neoformans*, sendo que sua deleção confere aumento capsular e aumento da virulência do fungo em modelo de infecção animal (Jain *et al.*, 2009). Além disso, Jain *et al.* (2009) mostraram que a expressão do gene *All1* é reprimida durante o crescimento intracelular de isolados hipervirulentos em macrófagos. Esses resultados são similares aos obtidos no presente estudo, onde foi verificado que o acúmulo do mensageiro *All1* é diminuído em cerca de 3 vezes quando *C. neoformans* é fagocitado por macrófagos murinos (Tabela 5). Em contrapartida, a expressão de *All1* é aumentada durante interação com ameba (Tabela 5), sugerindo que esse gene possivelmente desempenhe funções distintas quando da interação de *C. neoformans* com diferentes fagócitos.

#### **4.3.4. Validação dos dados do microarranjo por PCR em tempo real**

Com o objetivo de validar os dados gerados pelos experimentos de análise de expressão gênica em larga escala, foi empregada a técnica de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) para genes de *C. neoformans* previamente selecionados e que apresentaram aumento ou diminuição no acúmulo de seus respectivos mRNAs conforme observado pelos resultados de microarranjo. Dentre os genes de *C. neoformans* que foram induzidos em resposta à internalização por *A. castellanii*, selecionamos os que codificam para as seguintes enzimas: trealose sintase (*Ths*), catalase 3 (*Cat3*), enzima de ramificação da 1,4- $\alpha$ -glucana (*a-Gbe*), inositol fosforil-esfingolípido-fosfolipase C (*Plc*) e malato sintase (*Mls*), e uma proteína transportadora de açúcar (*Stp*). Outros três genes que apresentaram menores níveis de transcrito quando da internalização de *C. neoformans* por amebas também foram selecionados: lanosterol 14  $\alpha$ -demetilase (L-14), C-5 esterol dessaturase (C-5) e oxidase alternativa (*Aox*). Para a validação dos resultados do experimento de microarranjo quando da interação fungo-macrófago foi verificado o nível de expressão gênica da enzima de ramificação da 1,4- $\alpha$ -glucana (*a-Gbe*), da malato sintase (*Mls*), e da proteína transportadora de açúcar (*Stp*).

A variação da expressão (*fold-change*) de cada gene de interesse quando da interação do fungo com amebas e macrófagos está mostrada nas figuras 22A e 22B, respectivamente. Foi observado que os perfis de indução e repressão de todos os genes

avaliados foram os mesmos verificados por microarranjo, validando assim os resultados obtidos pela análise transcritômica em larga escala.

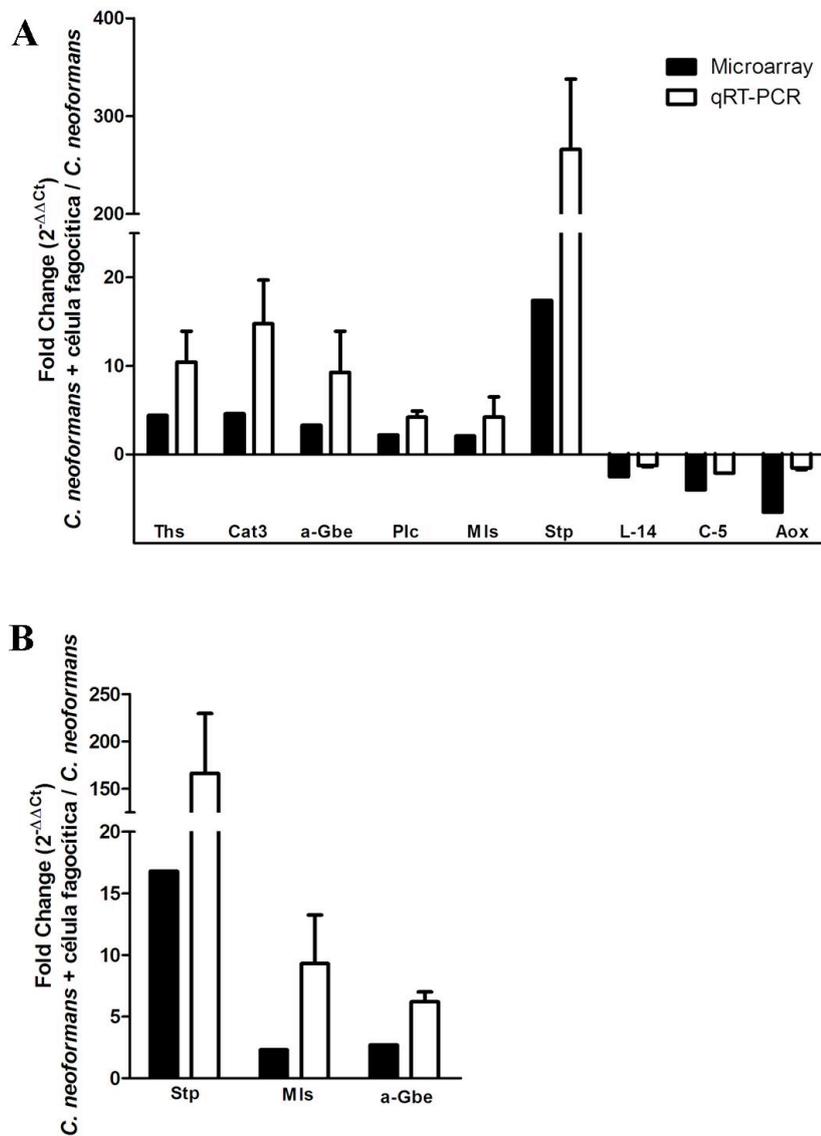


Figura 22. **Validação por PCR em tempo real dos dados do microarranjo.** (A) Validação dos resultados da interação entre *C. neoformans* e *A. castellanii*. (B) Validação dos resultados da interação entre *C. neoformans* e macrófagos murinos. Ths: trealose sintase, Cat3: catalase 3, *a-Gbe*: enzima de ramificação da 1,4- $\alpha$ -glucana, Plc: inositol fosforil-esfingolipídio-fosfolipase C, Mls: malato sintase, Stp: proteína transportadora de açúcar, L-14: lanosterol 14  $\alpha$ -demetilase, C-5: C-5 esteroide desaturase e Aox: oxidase alternativa.

#### 4.3.5. Discussão dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjo

##### a) Genes relacionados ao transporte de íons e pequenas moléculas

Embora pouco seja conhecido a respeito da composição nutricional do fagossomo, presume-se que esta organela seja pobre tanto em fontes de carbono, como glicose e outros açúcares, quanto de aminoácidos (Schnappinger *et al.*, 2003; Lorenz & Fink, 2001). Tal estresse nutricional induz uma resposta adaptativa em patógenos intracelulares a fim de permitir a sobrevivência destes no interior de fagócitos (Amer *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2007). O primeiro reflexo dessa resposta adaptativa visando à assimilação mais efetiva de nutrientes disponíveis é, provavelmente, a modulação da expressão de genes que codificam proteínas transportadoras que atuam na importação de moléculas através da membrana plasmática. Em concordância com esta proposição, nossos resultados mostraram que aproximadamente 10% dos genes de *C. neoformans* cuja expressão foi modulada após internalização do fungo por amebas estão relacionados ao transporte de substâncias, sendo que 60% destes foram induzidos quando do co-cultivo desses dois microrganismos. Da mesma forma, 13,7% dos genes de *C. neoformans* modulados em resposta a macrófagos também estão envolvidos no transporte de moléculas pela célula fúngica. Destes, 82,5% tiveram a expressão aumentada após interação com o fagócito. Fan *et al.* (2005) também descreveram a indução de uma variedade de transportadores de *C. neoformans* induzidos após 2 h e 24 h do co-cultivo do fungo com macrófagos ativados. Além disso, Hu *et al.* (2008) identificaram uma grande quantidade de transportadores prováveis aparentemente importantes para o crescimento de *C. neoformans* no pulmão de camundongos infectados por via intratraqueal. Esses dados mostram que a adaptação de *C. neoformans* a diferentes nichos envolve a regulação de transportadores específicos provavelmente importantes para a aquisição de nutrientes necessários à sobrevivência da levedura nos mais diversos ambientes.

Dentre os transportadores cuja expressão foi regulada em resposta à internalização de *C. neoformans* tanto por macrófagos quanto por amebas destacam-se transportadores para vários açúcares (glicose, galactose, manose, xilose, maltose) e para aminoácidos (Anexos 1 a 4). Já transportadores importantes na aquisição de metais, como cobre, zinco e cádmio, foram induzidos apenas quando da interação do fungo com macrófagos, o que pode indicar uma importante diferença entre os ambientes intracelulares de macrófagos e amebas (Anexo 3). Curiosamente, o ortólogo do gene *Str3* de *Schizosaccharomyces pombe*, que codifica para um sideróforo, foi reprimido

quando da interação de *C. neoformans* com ambos fagócitos (Tabela 4). Embora uma grande variedade de patógenos sintetizem e secretem sideróforos durante o processo infeccioso visando melhor assimilar ferro a partir do ambiente do hospedeiro (Haas, 2003), o mesmo não parece ocorrer para *C. neoformans*. De fato a correlação entre virulência e utilização de sideróforos para captação de ferro por este fungo ainda não está bem estabelecida. Isso porque mutantes depletados para o gene *Sit1*, que codifica o sideróforo ferrioxamina B, além de não apresentarem alteração na capacidade de estabelecer infecção em modelo animal quando comparados com a linhagem selvagem, mostram aumento na produção de melanina, um dos principais fatores de virulência descrito para *C. neoformans* (Tangen *et al.*, 2007). Entretanto vale salientar a existência de outros genes que codificam sideróforos em *C. neoformans* e cujos níveis de transcritos não foram alterados com a internalização do fungo por amebas e macrófagos, o que poderia garantir uma relativa captação de ferro por esse patógeno. Ademais, vários outros níveis de regulação gênica devem ser considerados, tais como regulação pós-transcricional e traducional.

Além dos transportadores importantes para a aquisição de nutrientes pelo patógeno no ambiente hostil do interior de fagócitos, uma outra classe de transportadores foi induzida pelo cultivo de *C. neoformans* com macrófagos e/ou amebas: os transportadores ABC (do inglês “ATP-binding Cassete”). Os membros dessa superfamília, que incluem os transportadores MDR (do inglês “Multidrug Resistance”), estão envolvidos no transporte ativo de uma variedade de substratos através da membrana celular, inclusive substâncias tóxicas e drogas. Para *C. neoformans* foi mostrado que a resistência a fluconazol tanto *in vitro* quanto *in vivo* está relacionada à expressão do gene *Afr1*, que codifica um transportador do tipo ABC (Posteraro *et al.*, 2003; Sanguinetti *et al.*, 2006). Além disso, AFR1 parece desempenhar importante papel na virulência de *C. neoformans*, uma vez que isolados que superexpressam o gene *Afr1* (CnAFR1+) são significativamente mais virulentos em modelo murino de infecção que o isolado selvagem (Sanguinetti *et al.*, 2006). O mecanismo pelo qual AFR1 influencia na virulência de *C. neoformans* deve-se provavelmente a uma maior capacidade de isolados CnAFR1+ em sobreviver dentro de macrófagos quando comparado ao isolado selvagem (Sanguinetti *et al.*, 2006). A superexpressão do gene *Afr1* também promove resistência de *C. neoformans* à atividade antimicrobiana de células da microglia devido à redução na acidificação e à maturação tardia do fagossomo (Orsi *et al.*, 2009). Dessa forma os transportadores ABC, além de serem

importantes no efluxo de drogas, podem contribuir para o mecanismo de escape de *C. neoformans* quando no interior de fagócitos. Alternativamente, tais transportadores podem fornecer ainda uma forma de defesa para o patógeno contra substâncias antimicrobianas produzidas pelas células fagocíticas, como foi mostrado para *C. albicans* (Theiss *et al.*, 2002). Esses dados auxiliam no entendimento do porque da indução de genes que codificam para transportadores da superfamília ABC/MDR quando *C. neoformans* encontra-se no ambiente intracelular de amebas ou macrófagos (Anexos 1 e 3).

#### **b) Genes relacionados ao metabolismo adaptado às condições de estresse nutricional**

Como relatado anteriormente, após fagocitose os parasitas intracelulares são submetidos a um ambiente carente em fontes de carbono, o que, além de alterar a expressão de transportadores, modula vias de assimilação de carbono visando uma melhor adaptação à disponibilidade de nutrientes existentes no meio. Nesse sentido, imediatamente após a fagocitose por macrófagos, leveduras de *C. albicans* modificam seu metabolismo em prol da utilização de fontes alternativas de carbono, o que é refletido pela indução do ciclo do glioxalato, da gliconeogênese e da  $\beta$ -oxidação (Lorenz *et al.*, 2004). Além disso, os fungos *C. albicans* e *P. brasiliensis*, e a bactéria gram-positiva *Listeria monocytogenes* mostram forte redução na expressão de genes envolvidos na glicólise como resposta à escassez de glicose no fagossomo (Lorenz *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2007). A modulação da expressão de genes relacionados a essas vias metabólicas também foi observada para *C. neoformans* em resposta à interação tanto com macrófagos quanto com amebas (Figura 23). De modo geral, nossos resultados indicam uma possível alternância metabólica da glicólise para a gliconeogênese, e a degradação de ácidos graxos para a conversão à glicose via o ciclo do glioxalato.

A conversão da via glicolítica para a gliconeogênese desencadeada pela fagocitose de *C. neoformans* por amebas pode ser verificada mais claramente pela indução da enzima frutose-1,6 bisfosfatase (FBP1). Já na interação do fungo com macrófagos a indução da gliconeogênese está representada pelo aumento no acúmulo de mRNA da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK1) em cerca de seis vezes no ambiente intracelular (Figura 23). A importância da enzima PCK1 para a sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro já havia sido relatada por Panepinto *et al.* (2005), que

mostraram que linhagens de *C. neoformans* mutantes para o gene *Pck1* são incapazes de desenvolver criptococose em modelo de infecção animal. Ambas as proteínas FBP1 e PCK1 são enzimas chave regulatórias da gliconeogênese por atuarem apenas em um único sentido da via, promovendo a mobilização de oxalacetato para síntese de glicose. Várias enzimas intermediárias da via, porém, atuam tanto na glicólise quanto da gliconeogênese, não desempenhando papel regulatório. Nossos resultados mostraram que, em contraste com o observado para *C. albicans* e *P. brasiliensis* (Lorenz *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2007), algumas enzimas que catalizam reações intermediárias dessas duas vias tiveram seus transcritos aumentados após interação de *C. neoformans* com as células fagocíticas (Figura 23). Esses resultados são difíceis de discutir devido ao caráter funcional dessas enzimas tanto na glicólise quanto na gliconeogênese.

Outra importante adaptação de patógenos intracelulares ao microambiente pobre em glicose do fagossomo é a ativação do ciclo do glioxalato, como mostrado para *M. tuberculosis*, *C. albicans* e *P. brasiliensis* (Schnappinger *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004; Derengowski *et al.*, 2008). O ciclo do glioxalato consiste num desvio do ciclo do ácido cítrico que permite a utilização de compostos de dois carbonos como fonte para síntese de glicose, disponibilizando substratos para as reações biossintéticas (Lorenz & Fink, 2001). As enzimas reguladoras do ciclo do glioxalato são a isocitrato liase (ICL), que catalisa a clivagem do isocitrato em succinato e glioxalato, e a malato sintase (MLS), que catalisa a reação de condensação do glioxalato com acetil-CoA para a formação de malato (Lehninger *et al.*, 2000). Nossos resultados mostram uma forte ativação da expressão destes genes de *C. neoformans* em resposta à fagocitose por amebas e macrófagos, indicada pelo aumento nos níveis de mRNA de ambas enzimas ICL e MLS (Figura 23). A indução da expressão do gene *Icl1* de *C. neoformans* mediada pela interação do fungo com macrófagos já tinha sido observada por Fan *et al.* (2005). A importância do ciclo do glioxalato para o crescimento de parasitas intracelulares e sua ausência no metabolismo de animais vem indicando as enzimas ICL e MLS como promissores alvos para drogas (Lorenz & Fink, 2001; Selitrennikoff & Nakata, 2003). Entretanto, diferente do que foi mostrado para *C. albicans* (Lorenz & Fink, 2001) e *M. tuberculosis* (McKinney *et al.*, 2000), ICL não é requerida para a patogênese de *C. neoformans* (Rude *et al.*, 2002), o que torna questionável a eficácia de drogas que atuem inibindo essa enzima no combate à criptococose.

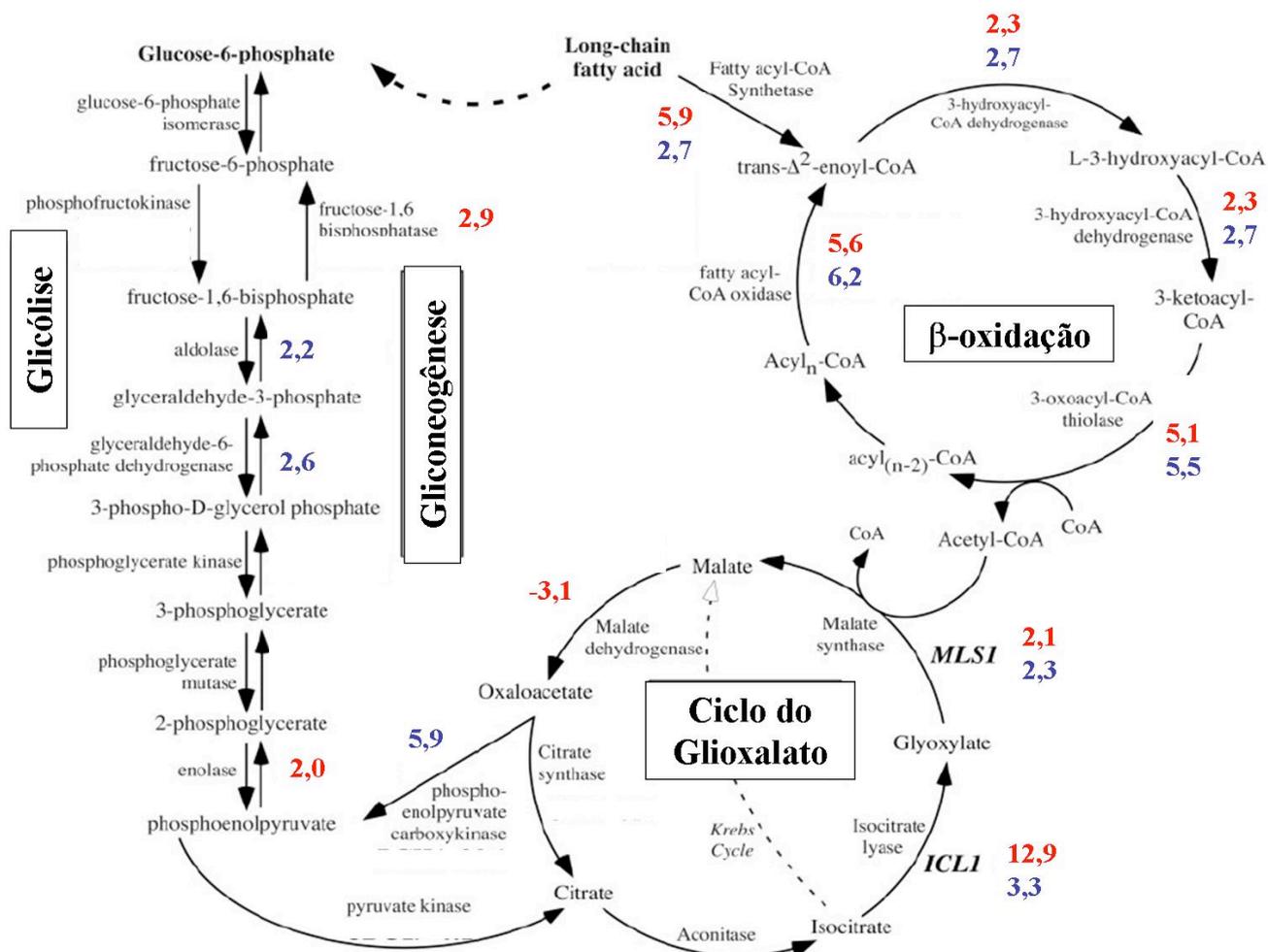


Figura 23. **Modulação de vias metabólicas de *C. neoformans* após interação com células fagocíticas.** Os níveis de transcritos de genes de *C. neoformans* que codificam para enzimas das vias da glicólise, neoglicogênese, ciclo do gioxalato e β-oxidação, e que sofreram alteração em resposta à internalização por amebas e macrófagos estão sinalizados em vermelho e azul, respectivamente. Esta figura foi adaptada de Lorenz *et al.* (2004).

Além da ICL e da MLS, outras três enzimas do ciclo do ácido cítrico integram o ciclo do gioxalato: aconitase (ACO), citrato sintase (CIT) e malato desidrogenase (MDH). Curiosamente, nossos dados mostraram diminuição no acúmulo de transcritos da MDH quando *C. neoformans* interagiu com *A. castellanii* (Figura 23). Esse resultado pode ser explicado pela existência de diferentes isoformas da enzima MDH, como ocorre em *C. albicans* (Lorenz *et al.*, 2004). Uma rápida análise do genoma de *C. neoformans* (disponível em <http://www.broadinstitute.org>) permitiu a identificação de quatro genes presentes em três cromossomos distintos que codificam para enzimas

prováveis com atividade similar à malato desidrogenase (dados não mostrados). Essa redundância no genoma pode permitir uma regulação transcricional distinta para cada isoforma e, assim, estas podem ser induzidas ou reprimidas diferentemente em resposta à sinais específicos. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de analisar a regulação da expressão gênica das isoformas de MDH de *C. neoformans* de modo a corroborar ou refutar a hipótese aqui proposta. Outra enzima do ciclo do ácido cítrico, porém que não corresponde ao ciclo do glioxalato, e que teve seus níveis de transcritos diminuídos após fagocitose de *C. neoformans* por amebas foi a succinato desidrogenase (Anexo 2). A repressão de genes que codificam enzimas unicamente funcionais no ciclo do ácido cítrico também foi observada em *C. albicans* ao parasitar macrófagos (Lorenz *et al.*, 2004).

Para que ocorra síntese de oxaloacetato a partir do ciclo do glioxalato, é preciso que haja acetil-CoA disponível no meio, o qual é utilizado como substrato da reação catalisada pela ICL. Nesse contexto, nossos resultados fortemente sugerem que o ciclo do glioxalato é impulsionado pelo acetil-CoA gerado a partir da oxidação de ácidos graxos. Como mostrado na figura 23, todos os passos da via de  $\beta$ -oxidação parecem ser induzidos quando *C. neoformans* é fagocitado por amebas e macrófagos. Essa aparente indução é um reflexo da abundância de transcritos de todos os genes do fungo envolvidos na degradação de ácidos graxos em resposta à fagocitose. Esse resultado é bastante similar ao verificado para outros microrganismos após internalização por macrófagos, como *C. albicans* (Lorenz *et al.*, 2004), e para o próprio *C. neoformans* encontrado em pulmões de camundongos infectados (Hu *et al.*, 2008). Somados, nossos resultados evidenciam que *C. neoformans* responde de modo bastante similar ao estresse nutricional ao qual é submetido no interior de amebas e macrófagos, ativando as vias metabólicas da gliconeogênese, do ciclo do glioxalato e da  $\beta$ -oxidação. Resumidamente, a degradação de ácidos graxos por *C. neoformans* via  $\beta$ -oxidação resulta na geração de acetil-CoA que será utilizado como substrato do ciclo do glioxalato para a síntese de oxaloacetato, o qual, por fim, servirá como fonte de carbono para a gliconeogênese.

Além dos genes envolvidos diretamente com a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, inúmeros outros genes relacionados ao metabolismo de lipídios foram induzidos por *C. neoformans* em resposta à interação com amebas e macrófagos (Figuras 20A e 21A; Anexos 1 e 3), reforçando a importância da utilização desta fonte de carbono no

ambiente intracelular. Dentre estes genes podemos citar àqueles que codificam proteínas ligadoras e carreadoras de lipídios e lipases (Anexos 1 e 3, Tabela 4). Adicionalmente, genes relacionados à biogênese do peroxissomo tiveram sua expressão aumentada após internalização de *C. neoformans* por amebas e macrófagos (Figuras 20 e 21). Sabidamente, peroxissomos são organelas associadas a um conjunto de funções celulares, que incluem a detoxificação de peróxido de hidrogênio e a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Idnurm *et al.*, 2007). Como será visto a seguir, genes de *C. neoformans* que codificam enzimas responsáveis pela detoxificação de peróxido de hidrogênio também tiveram a expressão modulada em resposta às células fagocíticas. Além dos processos de detoxificação de espécies reativas de oxigênio e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, em algumas plantas e fungos o ciclo do glioxalato também ocorre no peroxissomo (Olsen *et al.*, 1993; Zimmerman & Neupert, 1980). Entretanto, Idnurm *et al.* (2007) mostraram que, em *C. neoformans*, o peroxissomo não é requerido para a ocorrência do ciclo do glioxalato.

Além da modulação das vias metabólicas, a degradação e reciclagem de componentes celulares (autofagia) representa outra estratégia de adaptação da célula ao estresse nutricional. Nesse sentido, a mobilização de recursos via autofagia viabiliza a sobrevivência de *Candida glabrata* no interior do fagossomo de células do sistema imune (Roetzer *et al.*, 2010). Ainda, Fan *et al.* (2005) haviam previamente relatado a indução de dois genes envolvidos no processo de autofagia após a fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos. O papel da autofagia na criptococose foi reforçado pela verificação do aumento da expressão do gene *Atg8* durante infecção de *C. neoformans* em cérebro humano, e pela demonstração de que isolados que tiveram este gene silenciado por RNAi apresentaram virulência atenuada em modelo de infecção animal (Hu *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram aumento nos níveis de transcrito do gene *Atg22B*, o qual está relacionado com o processo de autofagia, em resposta à internalização de *C. neoformans* por *A. castellanii* (Anexo 1), evidenciando mais um aspecto similar das interações fungo-ameba e fungo-hospedeiro mamífero.

Outro mecanismo importante para a reciclagem de componentes intracelulares e manutenção da homeostase ocorre via um processo denominado ubiquitinação. Basicamente, proteínas alvos de destruição são marcadas com homopolímeros de uma pequena proteína denominada ubiquitina (processo de ubiquitinação), o que sinaliza para a degradação de proteínas via proteassoma 26S. Os oligopeptídeos gerados são liberados no citoplasma, onde podem ser degradados a aminoácidos por peptidases

solúveis, e reutilizados em processos metabólicos (Korolchuk *et al.*, 2010). Mais recentemente, evidências vêm sugerindo uma ligação entre os processos de ubiquitinação e autofagia. Isso porque durante processos seletivos de autofagia, alguns substratos são ubiquitinados, sugerindo que a ubiquitinação coordena também o catabolismo via autofagia. Além disso, prejuízos na atividade do proteassoma são compensados pela ativação da autofagia (Ding *et al.*, 2007; Korolchuk *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que genes relacionados ao processo de ubiquitinação de *C. neoformans* são modulados após o fungo ser fagocitado por amebas e macrófagos (Anexos 1 e 3), sugerindo um possível envolvimento desse processo na adaptação do fungo ao ambiente do fagossomo. Vale ressaltar que a ubiquitinação de proteínas apresenta ainda importante papel em processos como sinalização celular, transcrição, tradução, reparo de DNA, e ciclo celular, por sinalizar para a degradação de elementos regulatórios (Korolchuk *et al.*, 2010).

#### **c) Genes relacionados ao estresse oxidativo e à cadeia de transporte de elétrons**

Inúmeras evidências vêm mostrando que o fagossomo, além de ser um ambiente de carência nutricional, apresenta condições extremas de estresse oxidativo devido às altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que exige mecanismos de adaptação dos patógenos intracelulares (Graham & Clark-Curtiss, 1999; Schnappinger *et al.*, 2003). Nesse sentido, os microrganismos devem sintetizar enzimas que auxiliem no processo de detoxificação dos radicais reativos liberados pela célula fagocítica. Em concordância com esse fato, identificamos o aumento na expressão de 7 genes de *C. neoformans* diretamente envolvidos na resposta ao estresse oxidativo após fagocitose por *A. castellanii*, e 4 genes após fagocitose por macrófagos murinos (Anexos 1 e 3). Dentre estes genes destacam-se os que codificam para catalases (*Cat1* e *Cat3*), citocromo-*c* peroxidase e tiorredoxina redutase (*GlT*).

A catalase é uma enzima detoxificadora de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e parece desempenhar um importante papel na proteção de bactérias e fungos contra o estresse oxidativo gerado por células fagocitárias (Kawasaki *et al.*, 1997; Wysong *et al.*, 1998; Basu *et al.*, 2004). Para *C. albicans*, por exemplo, isolados mutantes para o gene *Cat1* são mais sensíveis a ação de neutrófilos humanos e possuem virulência atenuada em modelo murino de infecção (Wysong *et al.*, 1998). Em *C. neoformans* foram identificados 4 genes que codificam para catalases distintas (*Cat1* a *Cat4*), as quais

pertencem a três diferentes clados. Curiosamente, os genes *Cat1* e *Cat3* que tiveram a expressão aumentada em 3,7 e 4,6 vezes, respectivamente, em resposta a fagocitose por amebas, pertencem ao clado A, o qual compreende catalases específicas de conídios (Giles *et al.*, 2006). Adicionalmente, o gene de *C. neoformans* que codifica uma proteína cuja função provável está relacionada ao processo de conidiação (Proteína específica de conidiação 6) foi induzida em 5,7 vezes no ambiente intracelular da ameba, enquanto que no interior do macrófago este mesmo gene foi reprimido em quase 5 vezes (Tabela 5). Esses resultados sugerem uma possível indução da conidiação de *C. neoformans* mediada pela ameba *A. castellanii*. Por fim, embora a atividade da catalase possa vir a desempenhar importante papel na adaptação de microrganismos ao ambiente intracelular de fagócitos, nenhuma das quatro enzimas identificadas é requerida para o estabelecimento da infecção por *C. neoformans* em modelo animal (Giles *et al.*, 2006). Esse fato deve-se possivelmente à redundância do sistema antioxidante neste fungo, que dispõe de inúmeras proteínas cuja função é a detoxificação de EROs.

Em concordância com a atividade redundante de algumas enzimas do sistema antioxidante, a citocromo-*c* peroxidase também atua detoxificando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. E, assim como a catalase, a deleção do gene que codifica essa enzima não altera a virulência de *C. neoformans* em modelo de infecção animal, embora sua atividade contribua para a resistência ao estresse oxidativo *in vitro* (Giles *et al.*, 2004). No presente trabalho, o aumento no acúmulo de mRNA relativo ao gene da citocromo-*c* peroxidase foi verificado após internalização de *C. neoformans* tanto por amebas quanto por macrófagos (Tabela 4).

Além do estresse oxidativo sofrido por microrganismos quando no interior de fagócitos, o estresse nitrossativo também atua como um mecanismo antimicrobiano crucial no combate aos parasitas intracelulares. A produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) representa, por exemplo, o principal mecanismo fungicida de macrófagos ativados no combate ao fungo *P. brasiliensis*. (Brummer *et al.*, 1989; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994; Bocca *et al.*, 1998). Nascimento *et al.* (2002) mostraram que camundongos geneticamente deficientes para o gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico intracelular, são mais susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis*, confirmando a importância da síntese de ERNs pelo hospedeiro no combate à Pbmicose. Em *C. neoformans*, a enzima tiorredoxina redutase (TRR1) parece desempenhar um importante papel na defesa contra o estresse gerado por óxido nítrico, já que a expressão do gene *Trr1* é aumentada

em mais de oito vezes em resposta ao estresse nitrosativo (Missall & Lodge, 2005). Nossos resultados indicaram um aumento de 5,2 vezes no acúmulo do mRNA *Trr1* de *C. neoformans* após fagocitose por *A. castellanii* (Anexo 1), sugerindo que o fungo seja possivelmente submetido tanto a um estresse oxidativo, quanto a um estresse nitrosativo no ambiente intracelular da ameba, assim como descrito para o ambiente intracelular de macrófagos. Vale ressaltar que o estresse mediado por óxido nítrico por si só acarreta uma ampla reprogramação genética em *C. neoformans*, que consiste na modulação da expressão de genes envolvidos nos mais variados processos, dos quais podemos destacar transporte, biossíntese de aminoácidos, respiração celular e biogênese de parede celular (Missall *et al.*, 2005).

Curiosamente, o gene *Aox1*, que codifica a enzima oxidase alternativa, foi reprimido em cerca de 6,5 vezes quando da interação *C. neoformans*-ameba (Anexo 2). A oxidase alternativa atua como uma via respiratória complementar que recebe elétrons diretamente da ubiquinona, e produz aproximadamente um terço (1/3) do ATP gerado pelo funcionamento completo da cadeia de transporte de elétrons. Seu papel antioxidante é postulado uma vez que o óxido nítrico atua como um potente inibidor da citocromo-*c* oxidase, mas não atua sobre a oxidase alternativa, permitindo assim a manutenção do fluxo de elétrons na membrana mitocondrial (Missall *et al.*, 2004). Akhter *et al.* (2003) mostraram que isolados de *C. neoformans* mutantes para o gene *Aox1* apresentaram maior susceptibilidade ao estresse oxidativo *in vitro* e menor taxa de mortalidade em modelo murino de infecção via inalação. Além disso, os mesmo autores mostraram que a regulação da expressão do gene *Aox1* é dependente da temperatura, sendo induzido em resposta ao estresse térmico. Sendo assim, a diminuição da expressão do gene *Aox1* de *C. neoformans* em resposta à interação com *A. castellanii* pode ser a resultante de uma regulação mediada por vários fatores presentes no ambiente complexo do interior das células amebóides, dentre eles a própria temperatura.

Outros genes relacionados à cadeia respiratória também foram modulados tanto no ambiente intracelular da ameba, quanto do macrófago. O gene que codifica a citocromo-*c* oxidase (COX1) teve sua expressão diminuída, por exemplo, em resposta à interação de *C. neoformans* com *A. castellanii* (Anexo 2). COX1 corresponde ao complexo IV da cadeia de transporte de elétrons, reduzindo oxigênio em água. Esse processo é essencial para a produção de energia celular, porém necessita de oxigênio comoceptor final dos elétrons. Uma vez que o ambiente intracelular oferece baixa disponibilidade de oxigênio a *C. neoformans*, esse parece regular a transcrição do gene

*Cox1* negativamente. A constatação que os níveis de transcrição do gene *Cox1* diminuem quando as células estão em um ambiente de hipoxia foi feita anteriormente para *S. cerevisiae* (Dagsgaard *et al.*, 2001). Curiosamente, não foi observada diminuição no acúmulo de transcrito do gene *Cox1* em resposta a fagocitose por macrófagos que, teoricamente, também confere a *C. neoformans* um estado de hipoxia. Esse fato pode ser explicado pela indução do gene *Cox1* de *C. neoformans* em resposta ao cultivo à temperatura de 37°C (Toffaletti *et al.*, 2003), sugerindo que a regulação da expressão desse gene é multifatorial.

O indício de que ambos ambientes intracelulares de amebas e macrófagos são carentes de oxigênio foi reforçado com o aumento no acúmulo do transcrito do gene *Frd* de *C. neoformans*, que codifica a enzima fumarato redutase (Tabela 4). Essa enzima converte fumarato em succinato, em uma reação oposta à catalizada pelo complexo II da cadeia respiratória, tendo como acceptor final de elétrons o fumarato. Em suma, a respiração via fumarato redutase é um meio alternativo para aquisição de energia na ausência de oxigênio (Li *et al.*, 2008). Em *M. tuberculosis*, o complexo fumarato redutase é composto por quatro subunidades (FRD A, B, C e D). Estudos avaliando a regulação da expressão dos genes do complexo fumarato redutase nessa bactéria mostraram que *FrdA* é induzido em resposta à interação com macrófagos (Schnappinger *et al.*, 2003). Adicionalmente, *Mycobacterium phlei* aumenta em quatro vezes a atividade do complexo FRD quando essa bactéria é cultivada em condições de limitação de oxigênio (Gillespie *et al.*, 1988).

De modo geral, nossos resultados indicam que o fungo *C. neoformans* responde à internalização por células fagocíticas modulando a expressão de genes que auxiliem na sua adaptação à um ambiente de hipoxia e à condições de estresse oxidativo e nitrossativo.

#### **d) Genes relacionados ao estresse térmico**

A importância da via de biossíntese da trealose na termotolerância de várias espécies de fungo tem sido amplamente relatada (Gancedo & Flores, 2004). E, tendo em vista que a termotolerância é um importante fator de virulência de patógenos humanos, a via de síntese de trealose tem se mostrado criticamente necessária para a infectividade de fungos patogênicos, como *C. albicans* (Zaragoza *et al.*, 2002) e *C. neoformans* (Petzold *et al.*, 2006). A trealose é um dissacarídeo de glicose que tem por característica aumentar a resistência ao calor provavelmente por atuar em conjunto com

proteínas de choque térmico impedindo a desnaturação e agregação de proteínas (Crowe, 2007). Em *C. neoformans*, o gene que codifica a enzima trealose sintase é induzido em resposta ao cultivo a 37°C quando comparado aos níveis de expressão a 25°C (Kraus *et al.*, 2004). Adicionalmente, isolados mutantes de *C. neoformans* para os genes *Tps1* e *Tps2*, que codificam as enzimas trealose-fosfato sintase e trealose-fosfato fosfatase, respectivamente, não são aptos a crescerem a 37°C, além de serem avirulentos em modelo de infecção animal (Petzold *et al.*, 2006). Mutantes para o gene *Tps1* também tiveram sua virulência atenuada em modelo de infecção no nematóide *Caenorhabditis elegans* a 25°C, sugerindo que essa enzima possui um papel na virulência de *C. neoformans* que não se deve unicamente ao aumento de resistência a elevadas temperaturas (Petzold *et al.*, 2006). Em concordância com esses dados, nossos resultados mostraram que o gene *Tps1* é induzido quando da interação de *C. neoformans* com amebas a 25°C (Anexo 1). Tais resultados fortemente sugerem que a trealose está envolvida não somente na resposta ao estresse térmico em *C. neoformans*, mas também em outras condições de estresse. Em *S. cerevisiae*, por exemplo, a trealose desempenha importante papel na tolerância à desidratação (Hottiger *et al.*, 1987); já em *Drosophila melanogaster*, esse dissacarídeo atua na proteção à hipóxia (Chen & Haddad, 2004). Nossos resultados mostraram também o aumento nos níveis de transcrito da trealase, enzima que decompõe a trealose em glicose, quando *C. neoformans* foi internalizado por *A. castellanii*. Aparentemente contraditório, esse resultado pode ser explicado pela carência nutricional no interior do fagócito, sendo necessário a utilização da trealose, induzida em resposta ao estresse celular, como fonte de carbono para os processos metabólicos.

Curiosamente, não detectamos em nossos experimentos de microarranjo a indução da via de biossíntese de trealose em resposta à fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos murinos. Entretanto, pudemos identificar nessa condição o aumento no acúmulo de mRNA de 7 prováveis chaperonas (Anexo 3). As chaperonas são moléculas que pertencem a uma família altamente conservada de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSPs, do inglês “Heat Shock Protein”). Especificamente, as chaperonas moleculares são essenciais para os seres vivos, sendo responsáveis pela translocação e enovelamento de proteínas. Dentre as chaperonas cuja expressão gênica foi induzida após interação entre leveduras e macrófagos J774.1 está a HSP90. Similar aos nossos resultados, um trabalho recente mostrou um maior acúmulo do transcrito de duas proteínas prováveis da família HSP90 após *C. neoformans* infectar macrófagos

peritoniais murinos (Goulart *et al.*, 2010). A função da HSP90 em *C. neoformans* ainda não foi bem elucidada, sabendo-se apenas que o aumento nos níveis de expressão é ditado pelo aumento de temperatura (Steen *et al.*, 2002). Entretanto, em *C. albicans* foi mostrado que, além do papel da HSP90 na termotolerância, essa proteína atua na morfogênese (Shapiro *et al.*, 2009) e na resistência à drogas (Cowen, 2009), sendo atualmente considerada um promissor alvo para ação de agentes terapêuticos.

#### **e) Genes relacionados à maquinaria de transcrição/tradução**

A modulação do perfil transcricional de *C. albicans* em resposta ao processo de fagocitose por macrófagos tem como característica uma dramática repressão do aparato de tradução nas primeiras horas da interação patógeno-hospedeiro (Lorenz *et al.*, 2004). Após 1 h do início da interação entre leveduras e macrófagos, 108 genes de *C. albicans* cuja função predita está relacionada ao processo de tradução apresentam diminuição no acúmulo de transcritos em resposta à internalização por macrófagos. Entretanto, após 6 h de co-cultivo *C. albicans*-macrófagos, os níveis de expressão de genes envolvidos na maquinaria de tradução são essencialmente os mesmos dos de leveduras que nunca foram expostas às células fagocíticas (Lorenz *et al.*, 2004). Resultados opostos foram observados para *C. neoformans*. Fan *et al.* (2005) verificaram que a diminuição da expressão de genes relacionados ao aparato de tradução ocorre em uma etapa mais tardia da fagocitose por macrófagos, já que após 2 h de interação apenas 4 genes de *C. neoformans* (2,5%) tiveram seus níveis de mRNA diminuídos, enquanto que com 24 h de interação esse número subiu para 34 genes (21,7%). Nossos resultados mostraram que com 6 h de co-cultivo apenas 3% dos genes de *C. neoformans* que tiveram diminuição no acúmulo de mensageiro estão relacionados à tradução (Figura 21), o que se assemelha bastante aos resultados obtidos por Fan *et al.* (2005) para o tempo de 2 h de interação. Ademais, foi possível identificar genes relacionados aos processos de transcrição/tradução e replicação cuja expressão foi induzida com 6 h de interação, sugerindo que, apesar do ambiente hostil do interior do fagossomo, *C. neoformans* ainda mantém-se viável e se replica. Esses resultados sugerem que somente em uma etapa mais tardia da interação de *C. neoformans* com macrófagos o fungo passa a reprimir os processos de transcrição e tradução, possivelmente como uma forma de poupar energia. Em contrapartida, 20% dos genes cuja expressão foi diminuída após 6 h de co-cultivo de *C. neoformans* com a ameba *A. castellanii* estão relacionados aos aparatos de transcrição ou tradução (Figura 20B), sendo que grande parte destes estão envolvidos na

biogênese de ribossomos (Anexo 2). Assim, em adição aos dados da literatura, nossos resultados indicam que a cinética de diminuição nos níveis de transcritos relacionados às maquinarias de transcrição/tradução em resposta à interação hospedeiro-patógeno depende tanto do parasita intracelular em estudo, quanto da célula fagocítica.

Alguns genes de *C. neoformans* envolvidos no processo de transcrição e cuja a expressão foi aumentada em presença das células amebóides apresentam particular interesse por estarem relacionados à resposta ao estresse. O fator de transcrição *Rim101*, ortólogo ao gene *PacC* de fungos filamentosos, teve, por exemplo, os níveis de transcritos ampliados em cerca de 2,4 vezes quando as leveduras foram internalizadas por *A. castellanii*. As proteínas da família PACC/RIM101 controlam a expressão de genes regulados em resposta ao pH extracelular e desempenham importante papel na patogenicidade dos fungos *Aspergillus nidulans* (Bignell *et al.*, 2005) e *C. albicans* (Davis *et al.*, 2000). Além do envolvimento na resposta ao pH, em *C. neoformans* RIM101 controla a expressão de genes relacionados com a síntese da cápsula polissacarídica e com a homeostase de metais (O'Meara *et al.*, 2010). Entretanto, o gene *Rim101* não é necessário para a sobrevivência de *C. neoformans* em macrófagos e mutantes para esse gene parecem ser hipervirulentos em modelo de criptococose murina (O'Meara *et al.*, 2010).

Outro fator de transcrição cujos os níveis de transcritos foram aumentados em aproximadamente 5 vezes após a internalização de *C. neoformans* pelas amebas corresponde ao homólogo do gene *Rds1* de *S. cerevisiae*. Arkache & Turcotte (2002) mostraram que RDS1 de *S. cerevisiae* está envolvido na resistência à cicloheximida e isolados mutantes para esse gene apresentam diminuição nos níveis de transcritos de transportadores ABC, os quais são importantes para a resistência de microrganismos a drogas. Embora a função desse gene em *C. neoformans* ainda não tenha sido elucidada, é possível especular seu envolvimento na eliminação de substâncias tóxicas presentes no ambiente intracelular. Vale mencionar novamente a grande quantidade de genes que codificam transportadores ABC cuja expressão foi aumentada após a fagocitose de *C. neoformans* por amebas (Anexo 1), os quais podem estar sendo regulados positivamente pelo fator de transcrição RDS1. Entretanto, estudos futuros devem ser feitos buscando a validação desta hipótese.

Ao comparar os resultados dos microarranjos quando da interação de *C. neoformans* com amebas e macrófagos, identificamos a indução em resposta a ambos os fagócitos de um gene de um provável fator de transcrição associado à RNA polimerase

II (Tabela 4). Esses resultados sugerem um possível papel desse fator transcricional na resposta ao ambiente intracelular de células fagocitárias. Porém, estudos adicionais devem ser realizados visando avaliar a regulação da expressão desse gene em diferentes condições experimentais, seu papel na sobrevivência de *C. neoformans* como um parasita intracelular, e a importância desse fator de transcrição na virulência desse fungo.

#### **f) Genes relacionados à biossíntese de ergosterol e síntese de parede celular**

A biossíntese de uma única molécula de ergosterol a partir do escaleno consome 12 moléculas de oxigênio, o que representa cerca de 25% do consumo do oxigênio que não é utilizado como aceptor final na cadeia respiratória em *S. cerevisiae* (Rosenfeld & Beauvoit, 2003). Consistente com isso, é de se esperar que a concentração de oxigênio no ambiente afete o processo de biossíntese de ergosterol pelos fungos. Em condição de hipóxia a concentração de ergosterol em *S. cerevisiae* pode cair em até um quarto ( $\frac{1}{4}$ ) da concentração original presente em condição de normóxia (Shobayashi *et al.*, 2005). Com base nesses dados, a baixa concentração de oxigênio disponível no ambiente intracelular de fagócitos pode explicar a diminuição no acúmulo de sete transcritos correspondentes a genes envolvidos na biossíntese de ergosterol de *C. neoformans* quando da interação com amebas (Anexo 2), dos quais dois também apresentaram diminuição em seus níveis em resposta ao contato do fungo com macrófagos (Anexo 4 e Tabela 4).

Na levedura *Schizosaccharomyces pombe* foi descrito um regulador transcricional denominado SRE1 importante na adaptação a condições de hipóxia. Na presença de oxigênio, SRE1 encontra-se ligado à membrana celular, sendo liberado por proteólise quando, em resposta a uma condição de hipóxia, há uma diminuição da concentração intracelular de esteróis. Após a liberação de SRE1, este irá ativar no núcleo a expressão de genes envolvidos em uma variedade de processos, como biossíntese de ergosterol e de esfingolipídios, e captação de ferro e cobre (Bien & Espenshade, 2010). A via de biossíntese de ergosterol em *C. neoformans* também é regulada por um ortólogo do fator transcricional SRE1, o qual é requerido para a virulência desse patógeno (Chang *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2007). O mecanismo de ação de SRE1 em *C. neoformans* é bastante similar ao descrito para *S. pombe* (Bien & Espenshade, 2010). Uma vez que nossos resultados mostraram baixas quantidades de mRNAs correspondentes a genes da via biossintética do ergosterol após 6 h de co-

cultivo entre *C. neoformans* e fagócitos, supõe-se que este período de interação não seja suficiente para a indução de genes envolvidos na síntese de ergosterol via ativação do regulador SRE1. Dessa forma, sugere-se a realização de uma cinética de interação fungo-célula fagocítica visando melhor compreender a regulação transcricional de genes da via de biossíntese de ergosterol em resposta ao parasitismo intracelular de *C. neoformans*.

Genes envolvidos na síntese de parede celular de *C. neoformans* também apresentaram diminuição nos níveis de seus transcritos após 6 h de interação com ameba (Anexo 2). É postulado que a parede celular de fungos seja uma estrutura dinâmica, cuja composição e organização estrutural é regulada em resposta às alterações nas condições do ambiente (Klis *et al.*, 2006). Os principais componentes da parede celular de *C. neoformans* são quitina, glucana e proteínas glicosiladas. A quitina é um polímero linear de  $\beta$ 1,4-N-acetilglicosamina sintetizado pela enzima quitina sintase (CHS). A desacetilação da quitina pela quitina desacetilase (CDA) produz quitosana, um polímero mais solúvel e flexível também presente na parede celular de *C. neoformans* (Doering, 2009). Dos oito genes que codificam prováveis quitinas sintases encontrados no genoma de *C. neoformans*, dois (*Chs6* e *Chs7*) apresentaram diminuição no acúmulo de seus mRNAs após 6 h da interação do fungo com *A. castellanii*. A existência de oito genes *Chs* pode refletir o requerimento de diferentes quitinas sintases durante as várias condições em que *C. neoformans* é submetido ao longo de seu desenvolvimento. No crescimento vegetativo, por exemplo, o gene *Chs3* parece ser o mais importante dentre as quitinas sintases de *C. neoformans*, já que este é transcrito mais abundantemente e o isolado *Chs3-* é o único dos mutantes para os genes *Chs* incapaz de crescer a 37°C. Porém, muito pouco se sabe a respeito da regulação transcricional de quitinas sintases em fungos. Em *P. brasiliensis*, um trabalho recente mostrou que os níveis de transcrição dos genes *Chs4* e *Chs5* podem ser alterados em resposta à osmolaridade, concentrações de glicose e estresse oxidativo, sugerindo uma regulação multifatorial desses genes (Niño-Vega *et al.*, 2009).

Além da diminuição na expressão dos genes *Chs6* e *Chs7*, a interação entre *C. neoformans* e *A. castellanii* resultou também na diminuição dos níveis dos transcritos de mais três genes envolvidos na síntese da parede celular: uma quitina deacetilase, a proteína SKN1, envolvida na síntese de  $\beta$ (1,6)-glicana (Gilbert *et al.*, 2010), e a enzima  $\beta$ (1,3)-glicanase, que hidrolisa ligações  $\beta$ (1,3)-glicosídicas de glicanas lineares a partir

da extremidade não redutora do polímero. A enzima  $\beta(1,3)$ -glicanase de fungos tem como uma de suas funções auxiliar na degradação da parede celular permitindo a separação das células durante o processo de divisão celular (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Como mostrado para *S. pombe*, os níveis de mRNA do gene *Eng1*, que codifica uma  $\beta(1,3)$ -glicanase, variam durante o ciclo celular, sendo seu acúmulo máximo observado minutos antes da separação das células durante a divisão celular (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Nesse sentido, a diminuição nos níveis de transcritos correspondentes à  $\beta(1,3)$ -glicanase observada após internalização de *C. neoformans* por amebas pode ser reflexo de uma parada no ciclo celular em resposta a uma situação de estresse.

#### **g) Genes relacionados à virulência**

Dentre os fatores de virulência clássicos descritos para *C. neoformans* por desempenharem importante função no estabelecimento da infecção em hospedeiro mamífero estão a presença da cápsula polissacarídica, a produção de melanina e a produção de fosfolipases. Steenbergen *et al.* (2001) haviam mostrado que isolados mutantes de *C. neoformans* defectivos na síntese de cápsula e fosfolipase B são incapazes de sobreviver no interior da ameba, sugerindo que tais fatores de virulência sejam requeridos tanto para a persistência do fungo em animais quanto em amebas. Em nossos experimentos, verificamos a indução dos genes *Isc1* e o gene *Cap64*, que codificam respectivamente, a enzima inositol fosfoesfingolípido-fosfolipase C e uma proteína necessária para a síntese da cápsula polissacarídica, em resposta à internalização do fungo por *A. castellanii* (Anexo 1).

A enzima ISC1 hidrolisa esfingolípídios e desempenha importante papel para a sobrevivência de *C. neoformans* no interior de macrófagos por proteger o fungo contra o estresse nitrosativo e oxidativo, e contra o pH ácido do ambiente do fagolisossomo. Além disso, ISC1 é crucial para a disseminação de *C. neoformans* para o sistema nervoso central e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de meningoencefalite (Shea *et al.*, 2006). O aumento de 2,2 vezes nos níveis de transcritos do gene *Isc1* em resposta à fagocitose de *C. neoformans* por *A. castellanii* (Anexo 1) evidencia uma possível função dessa enzima na sobrevivência do fungo no ambiente intracelular desse fagócito, sugerindo uma convergência adaptativa dos mecanismos empregados por *C. neoformans* para sua persistência no ambiente hostil do fagossomo de amebas e macrófagos.

Já o gene *Cap64* teve sua expressão aumentada em aproximadamente 2,6 vezes quando do contato de *C. neoformans* com amebas (Anexo 1). Embora a função precisa de CAP64 ainda não tenha sido elucidada, a importância dessa proteína na formação da cápsula foi claramente mostrada por Chang *et al.* (1996). A deleção do gene *Cap64* de *C. neoformans* resulta em isolados mutantes acapsulares e avirulentos, e a complementação de isolados deficientes na síntese da cápsula com o gene a *Cap64* restaura a virulência em modelo murino de infecção pulmonar (Chang *et al.*, 1996; Wilder *et al.*, 2002). Utilizando-se ferramentas de bioinformática Moyrand *et al.* (2004) identificaram seis genes homólogos ao gene *Cap64* no genoma de *C. neoformans*, os quais foram denominados *Cas3*, *Cas31*, *Cas32*, *Cas33*, *Cas34* e *Cas35*. Embora a indução do gene *Cap64* foi detectada apenas em resposta à interação fungo-ameba, nossos resultados revelaram aumento de 2,9 vezes nos níveis de transcrito do gene *Cas3* quando da interação fungo-macrófago (Anexo 3). Entretanto, experimentos de ruptura gênica mostraram que o gene *Cas3* não é essencial à formação da cápsula de *C. neoformans*, embora esteja envolvido no processo de O-acetilação de moléculas de GXM (Moyrand *et al.*, 2004).

Outro gene de *C. neoformans* modulado em resposta à interação com *A. castellanii*, e cujo papel no estabelecimento da infecção fúngica no hospedeiro animal foi descrito, codifica a enzima glicosilceramida sintase (GCS). A GCS catalisa a síntese de glicosilceramida, um glicoesfingolípido localizado principalmente na parede celular de *C. neoformans*, o qual é capaz de elicitar a resposta por anticorpos em pacientes com criptococose (Rodrigues *et al.*, 2000). Rittershaus *et al.* (2006) mostraram que a enzima GCS é um regulador da patogenia de *C. neoformans* por garantir o crescimento do fungo em ambientes com pH neutro/alcalino e concentrações fisiológicas de CO<sub>2</sub>, os quais são tipicamente encontrados nos espaços alveolares. Entretanto, GCS não possui implicação no crescimento em pH ácido, assim como na sobrevivência de *C. neoformans* no interior de macrófagos, como verificado com a utilização de uma linhagem mutante para o gene *Gcs* (Rittershaus *et al.*, 2006). Em nossos dados do microarranjo verificamos a diminuição no acúmulo do transcrito *Gcs* após internalização de leveduras de *C. neoformans* por *A. castellanii* (Anexo 2), sugerindo que, assim como mostrado para a interação do fungo com macrófagos, este gene parece não desempenhar uma atividade crucial para a sobrevivência de *C. neoformans* no interior de amebas. Ainda, tais resultados indicam que o ambiente intracelular de *A. castellanii* apresente pH ácido, assim como descrito para o ambiente intracelular de

macrófagos. E embora os níveis de expressão do gene *Gcs* não tenham sofrido alteração significativa após internalização de *C. neoformans* por macrófagos, o gene que codifica a enzima esfingosina N-aciltransferase, outra componente da via biossintética de esfingolípido, foi drasticamente diminuído em resposta à interação do fungo com ambos fagócitos (Tabela 4), sugerindo a participação de outras enzimas desta via metabólica na adaptação de *C. neoformans* ao ambiente intracelular.

#### **4.3.6. Avaliação do papel do transportador de açúcar CNAG\_05662 na virulência de *C. neoformans***

Os resultados obtidos com a análise e comparação dos transcritomas de *C. neoformans* após internalização por amebas e macrófagos permitiram a identificação de genes potencialmente relevantes para a sobrevivência do fungo no ambiente intracelular de ambos fagócitos. A presumível importância desses genes para a adaptação de *C. neoformans* ao ambiente inóspito do fagossomo sugere um potencial papel na virulência do fungo. Nesse contexto, foram selecionados alguns genes de *C. neoformans* candidatos a fatores de virulência com base nos níveis de expressão durante a interação do fungo com as células hospedeiras para uma futura avaliação da relevância destes no estabelecimento da criptococose. Dentre os candidatos selecionados, um gene que codifica uma proteína transportadora de açúcar (CNAG\_05662) mostrou-se particularmente interessante por apresentar um drástico aumento no acúmulo de seu transcrito após *C. neoformans* ser fagocitado tanto por amebas (17,4 vezes) quanto por macrófagos (16,8 vezes), conforme mostrado na tabela 4. Os resultados do microarranjo foram validados por RT-PCR em tempo real, embora a indução desse gene observada pelo segundo método empregado foi de aproximadamente 250 e 150 vezes quando da interação do fungo com amebas e macrófagos, respectivamente (ver Figura 22, Stp). A diferença na magnitude da variação da expressão determinada pelas duas metodologias pode ser explicada pelas diferenças de sensibilidade das técnicas, normalização e análise dos dados.

Diante desses resultados, que indicam um importante papel desse gene envolvido no transporte de açúcares para a persistência de *C. neoformans* no ambiente intracelular, iniciamos alguns experimentos com o objetivo de investigar seu papel na virulência do fungo. Para tanto, utilizamos uma linhagem mutante para esse gene obtida

a partir da biblioteca construída por Liu *et al.* (2008), e disponível no *Fungal Genetic Stock Center* ([www.fgsc.org](http://www.fgsc.org)) ou na *ATCC* ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). A ausência de expressão deste gene na linhagem mutante, denominada linhagem M1, foi confirmada por qRT-PCR (dados não mostrados). Posteriormente, foi avaliado o crescimento da linhagem mutante M1 a 37°C, não sendo observadas diferenças significativas quando comparado à curva de crescimento da linhagem parental H99 (Figura 24).

A análise do papel do gene que codifica o transportador de açúcar na patogênese de *C. neoformans* foi realizada comparando-se o potencial virulento das linhagens M1 e H99 em modelo de infecção animal. Primeiramente, foi empregado o modelo de infecção descrito por Mylonakis *et al.* (2005), o qual utiliza a fase final larval do bicho-da-seda (*Galleria mellonella*) como hospedeiro invertebrado do fungo. Para tanto, larvas de *G. mellonella* foram infectadas dorsolateralmente com  $10^4$  células das linhagens M1 ou H99 de *C. neoformans*. Os resultados mostraram um retardo significativo ( $P < 0,01$ ) na mortalidade de *G. mellonella* infectadas com o mutante M1 quando comparada à infecção com a linhagem parental H99 (Figura 25). Visando validar a importância do gene para este transportador de açúcar na virulência de *C. neoformans*, camundongos da linhagem Balb/C foram infectados intratraquealmente com  $10^6$  células das linhagens M1 ou H99. Os resultados utilizando-se hospedeiro mamífero confirmaram que o gene em questão desempenha um aparente papel no estabelecimento da infecção por *C. neoformans*, uma vez que o mutante M1 possui virulência atenuada quando comparado à linhagem parental H99 (Figura 26). Entretanto, a repetição do experimento utilizando-se a linhagem mutante reconstituída faz-se necessária para a afirmação, segundo Postulado de Falkow, de que esse transportador de açúcar corresponde a um fator de virulência do fungo *C. neoformans*. Nesse sentido, a reconstituição de uma linhagem mutante para o gene de interesse será realizada em breve por nosso grupo de pesquisa, visando validar os resultados aqui mostrados.

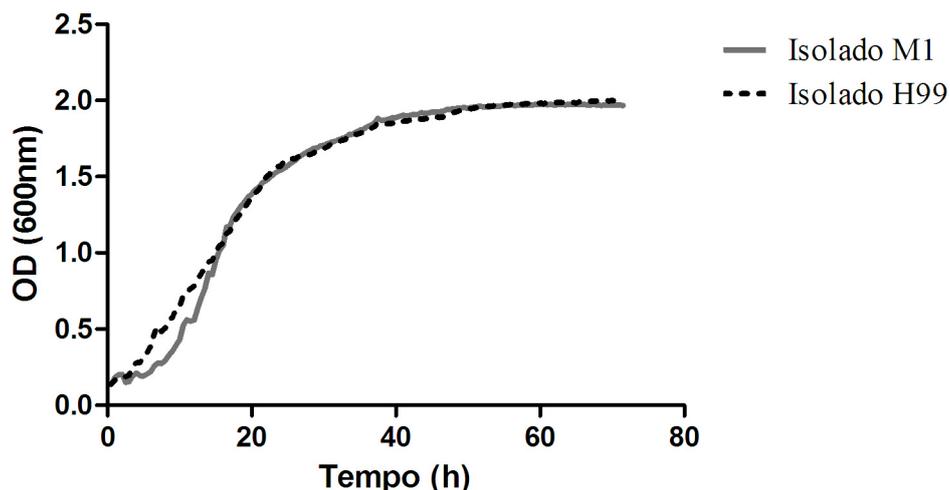


Figura 24. Curva de crescimento do isolado mutante M1 e do isolado parental H99 de *C. neoformans*. Leveduras de *C. neoformans* foram cultivadas em 100 mL de meio YPD a 37°C sob agitação (150 rpm). A cada 30 min, o crescimento dos isolados era verificado pela medição da variação da densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>), utilizando-se o aparelho *Bioscreen C* (Growth Curves, USA).

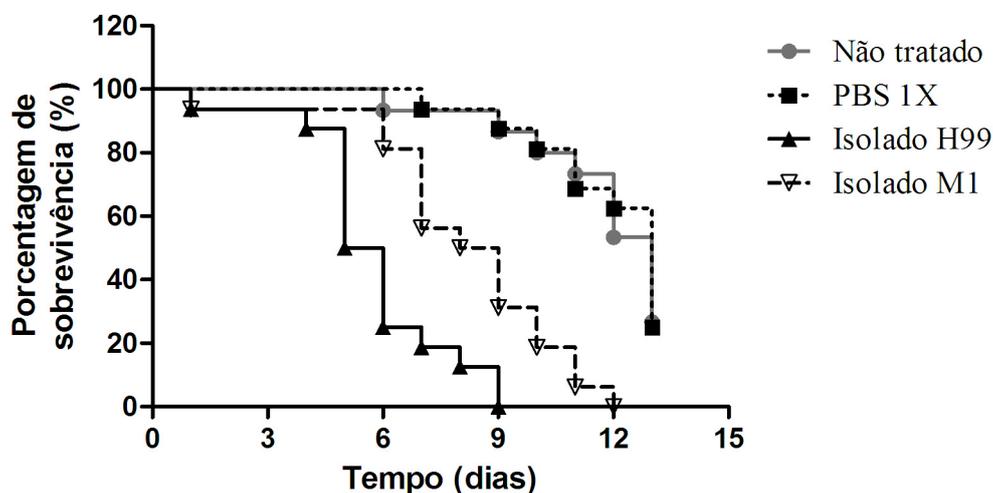


Figura 25. Curva de sobrevivência de *G. mellonella* após infecção com a linhagem mutante M1 e a linhagem parental H99 de *C. neoformans*. Larvas de *G. mellonella* foram infectadas com  $10^4$  leveduras de *C. neoformans* (linhagens M1 ou H99) e o número de sobreviventes foi verificado diariamente. Como controle foram utilizadas larvas não tratadas e larvas infectadas com PBS 1X. Diferença estatística significativa de  $P < 0,01$  comparando-se as curvas obtidas para as linhagens mutante e parental.

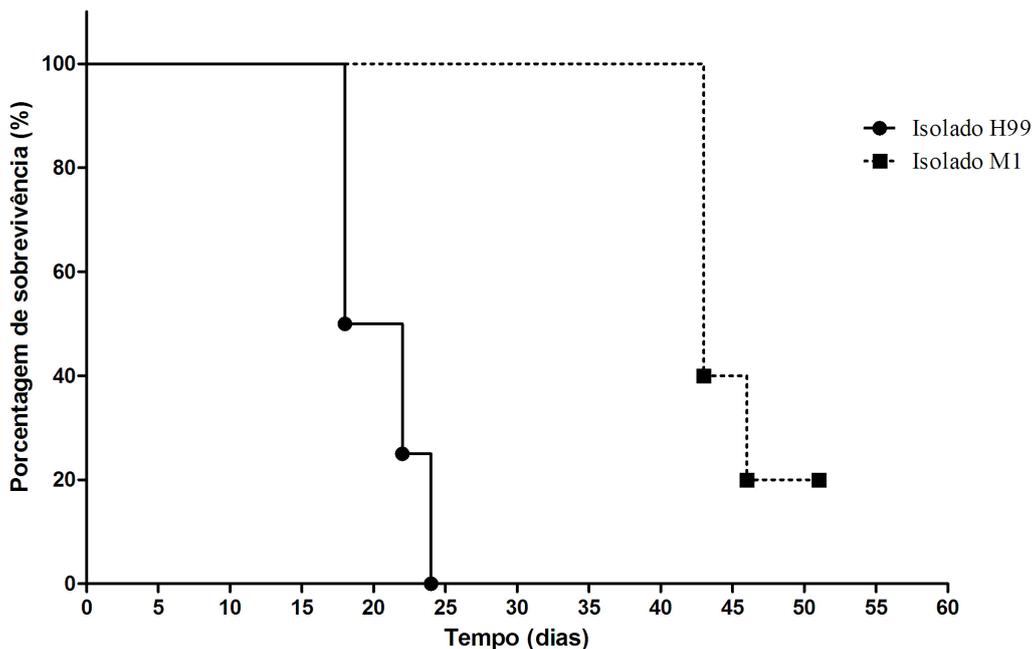


Figura 26. Curva de sobrevivência de camundongos Balb/C após infecção intratraqueal com a linhagem mutante M1 e a linhagem parental H99 de *C. neoformans*. Camundongos da linhagem Balb/C foram infectados com  $10^6$  leveduras de *C. neoformans* (linhagens M1 ou H99) e o número de sobreviventes foi verificado diariamente. Diferença estatística de  $P < 0,01$  comparando-se as curvas obtidas para as linhagens mutante e parental.

Sabendo-se que a cápsula é o principal fator de virulência descrito para *C. neoformans*, e que a linhagem M1 desenvolve uma infecção menos severa em modelo animal, avaliamos se o potencial hipovirulento de M1 deve-se a alguma disfunção na síntese da cápsula polissacarídica. Nossos resultados mostram que embora presente, o tamanho da cápsula do mutante M1 é significativamente inferior ao tamanho da cápsula da linhagem parental H99 (Figura 27). Alguns autores haviam previamente mostrado que mutantes acapsulares de *C. neoformans* apresentam virulência atenuada em modelo murino de infecção quando comparados à cepa parental e ao mutante reconstituído (Fromtling *et al.*, 1982; Chang & Know-Chung, 1994). Todavia, não é possível afirmar que a diferença entre o tamanho da cápsula das linhagens M1 e H99 esteja diretamente correlacionada com a atenuação da virulência da linhagem mutante.

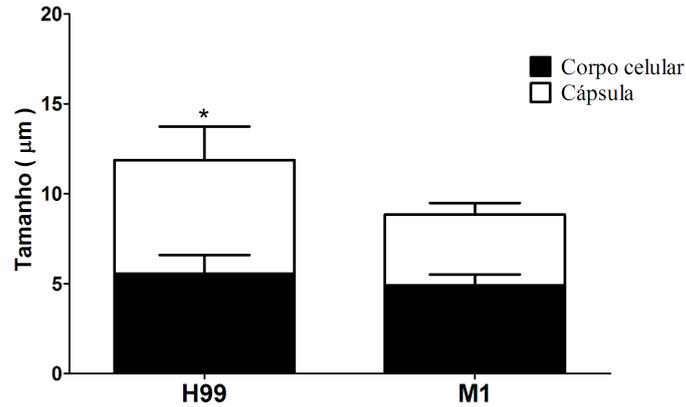


Figura 27. **Tamanho do corpo celular e da cápsula dos isolados M1 e H99 de *C. neoformans*.** Para verificação do tamanho da cápsula foi utilizado o corante *India ink*. Cerca de 100 leveduras de *C. neoformans* foram avaliadas para cada condição experimental, sendo a barra corresponde ao erro padrão. \* $P < 0,01$

Após a confirmação do potencial hipovirulento do isolado M1 iniciamos experimentos buscando identificar a função precisa do gene depletado nessa linhagem mutante, tendo em vista que o mesmo representa um potencial fator de virulência de *C. neoformans*. Resultados obtidos por meio de análises de bioinformática demonstraram que a seqüência codificadora do gene em questão inclui oito exons e sete introns, sendo constituída de 2277 nucleotídeos, dos quais 1896 correspondem à seqüência do mRNA maduro. A seqüência protéica é constituída por 632 resíduos de aminoácidos, sendo possível a identificação de um motivo na posição 232 a 257 característico àqueles presentes em famílias de transportadores de açúcares. Análises adicionais utilizando-se a ferramenta BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mostraram ainda que a referida seqüência de aminoácidos deste transportador de *C. neoformans* apresenta alta similaridade com seqüências correspondentes a transportadores de açúcares de outros microrganismos, como mostrado na tabela 6. Entretanto, a definição precisa da função do gene em estudo apenas com base em análises computacionais mostrou-se difícil, uma vez que a seqüência protéica apresenta grande similaridade com transportadores para diversos açúcares, provavelmente devido à existência de domínios bastante conservados.

Tabela 6. Análise de similaridade da sequência protéica predita para o transportador de açúcar de *C. neoformans* utilizando-se a ferramenta de bioinformática BLASTp.

Número de acesso	Descrição	Organismo	Similaridade	E-value
XP_572469.1	Transportador de açúcar	<i>Cryptococcus neoformans</i>	99%	0.0
XP_003197127.1	Transportador de açúcar	<i>Cryptococcus gattii</i>	99%	0.0
XP_002379896.1	Provável transportador de glicose	<i>Aspergillus flavus</i>	93%	0.0
EFY88052.1	Provável transportador de glicose	<i>Metarhizium acridum</i>	93%	0.0
EFY96595.1	Provável transportador de glicose	<i>Metarhizium anisopliae</i>	93%	0.0
XP_002143328.1	Provável transportador de galactose	<i>Penicillium marneffeii</i>	94%	1e-159
XP_002479628.1	Provável transportador de galactose	<i>Talaromyces stipitatus</i>	92%	5e-159
EEH20010.1	Provável transportador de D-xilose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	93%	1e-156
XP_002623405.1	Provável transportador de galactose	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	91%	2e-156
XP_003177084.1	Transportador de arabinose	<i>Arthroderma gypseum</i>	95%	4e-153

Nesse sentido, buscando definir o açúcar carregado pelo transportador em estudo, cultivamos as linhagens M1 e H99 em diferentes fontes de carbono por 48 h. Nossos resultados mostraram que, assim como a linhagem parental, o mutante M1 é capaz de crescer na presença de glicose, galactose, manose, frutose, xilose e sucrose como única fonte de carbono. Entretanto, não foi observada nenhuma variação da densidade óptica a 630 nm em decorrência do crescimento microbiano quando a linhagem M1 foi cultivada em manitol ou sorbitol (Figura 28). Já a linhagem H99 é capaz de metabolizar tanto manitol quanto sorbitol, sugerindo que a mutação presente na linhagem M1 afeta o transporte desses polióis. Curiosamente, o crescimento microbiano do isolado mutante ao ser cultivado em xilose e sucrose é significativamente melhor que o crescimento da linhagem parental, indicando uma possível compensação em virtude da mutação sofrida em um gene envolvido no transporte de açúcares.

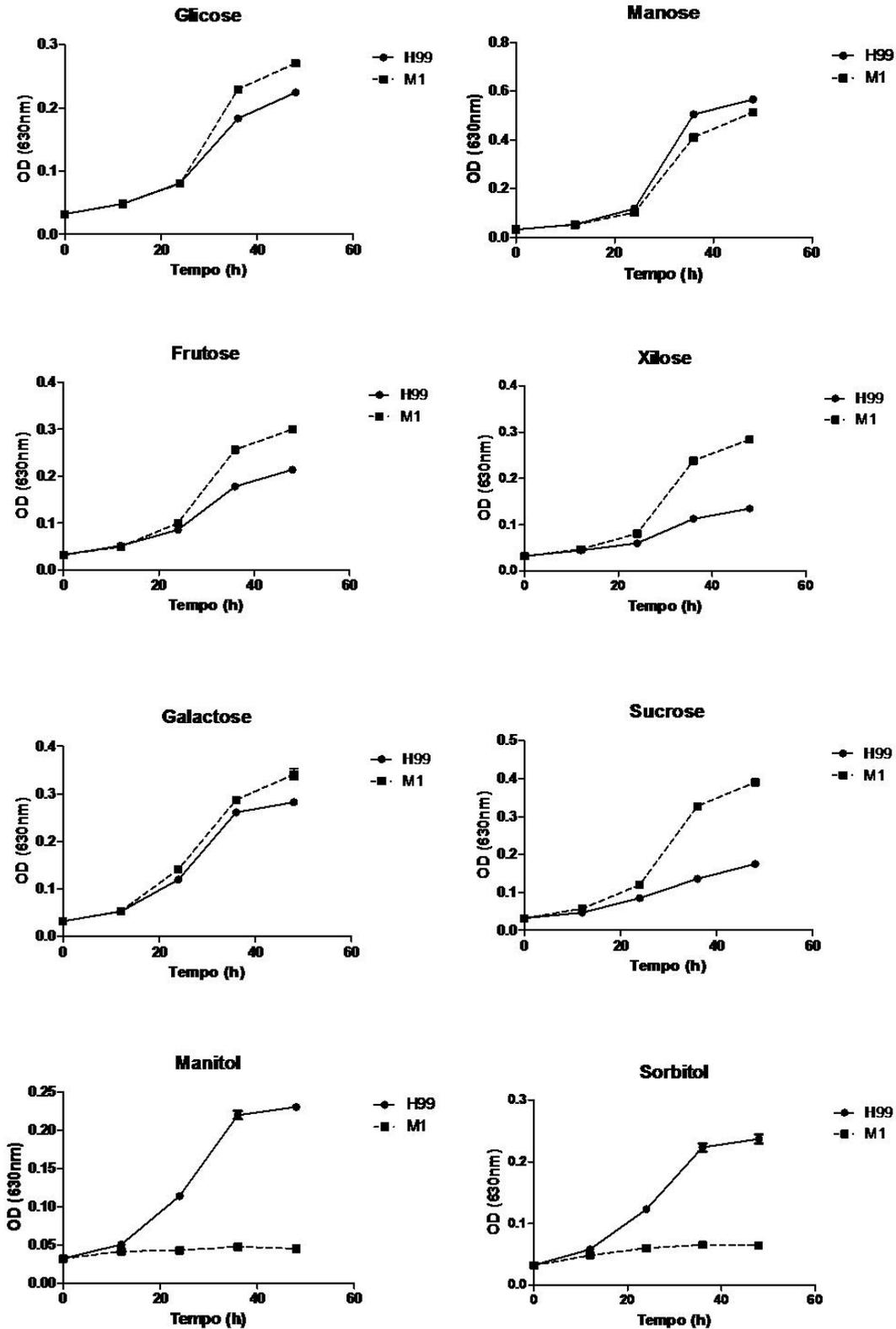


Figura 28. Curva de crescimento dos isolados M1 e H99 de *C. neoformans* em diferentes fontes de carbono. Leveduras de *C. neoformans* foram cultivadas por 48 h a 30°C e o crescimento foi verificado pela medição a cada 12 h na variação da densidade óptica a 630 nm ( $OD_{630}$ ).

Visando confirmar a deficiência de crescimento do mutante M1 na presença de manitol, diferentes diluições de uma cultura das linhagens H99 e M1 de *C. neoformans* foram cultivadas em meio mínimo sólido contendo como única fonte de carbono 1% de glicose, xilose ou manitol. O resultado desse experimento, mostrado na figura 29, corroborou os dados anteriores, já que não foi possível visualizar desenvolvimento de colônias microbianas quando do cultivo do isolado M1 em manitol como fonte única de carbono. Ademais, o crescimento mais pronunciado do mutante na presença de xilose como único açúcar no meio, quando comparado ao crescimento da linhagem H99, também foi confirmado neste ensaio.

Por fim, avaliamos a especificidade do transportador de açúcar em estudo. Anteriormente havíamos mostrado que o mesmo é crucial no transporte de manitol e sorbitol (Figura 28). Cultivando-se o isolado M1 em outros polióis como fonte única de carbono, pudemos concluir que o gene deletado nesse mutante está envolvido no transporte de polióis formados por cinco (ribitol e arabitol) e seis carbonos (manitol, sorbitol e dulcitol), mas não no transporte de maltitol, o qual compreende uma molécula de 12 carbonos (Figuras 28 e 30). Não foi detectado crescimento microbiano de ambas as linhagens M1 e H99 quando o fungo foi cultivado por 48 h em glicerol e xilitol como única fonte de carbono (dados não mostrados).

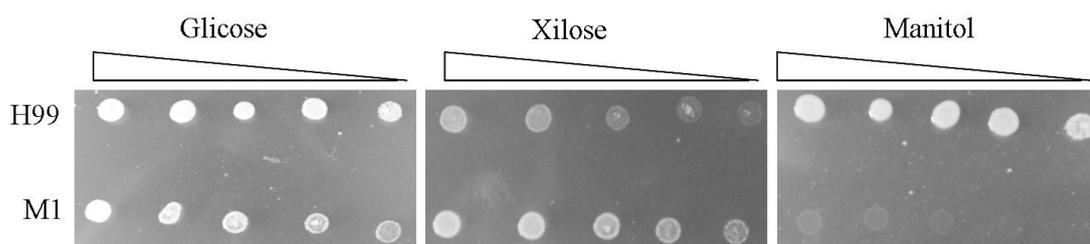


Figura 29. **Verificação do crescimento dos isolados M1 e H99 de *C. neoformans* em glicose, xilose e manitol.** Diferentes diluições de uma cultura das linhagens M1 e H99 de *C. neoformans* foram cultivadas em meio mínimo sólido por 48 h a 30°C. O crescimento foi verificado pela formação de colônias.

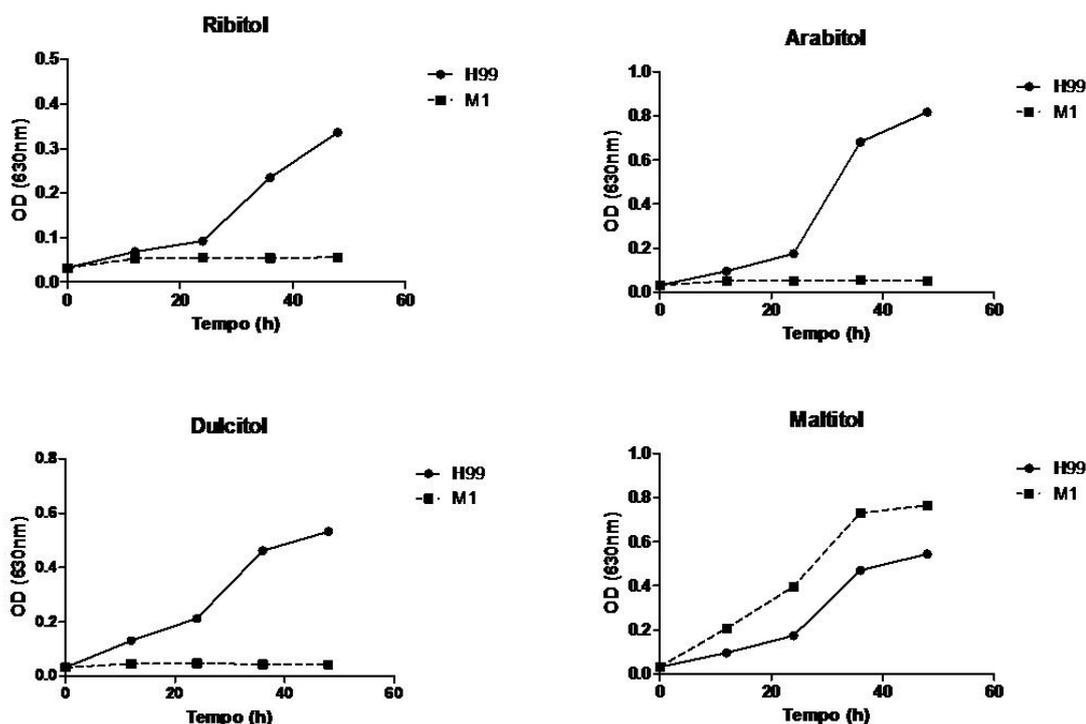


Figura 30. Curva de crescimento dos isolados M1 e H99 de *C. neoformans* em diferentes pólios como única fonte de carbono. Leveduras de *C. neoformans* foram cultivadas por 48 h a 30°C e o crescimento foi verificado pela medição a cada 12 h na variação da densidade óptica a 630 nm ( $OD_{630}$ ).

Os indícios de que o gene depletado no mutante M1 está envolvido no transporte de manitol é particularmente interessante uma vez que alguns trabalhos vêm correlacionando a capacidade de *C. neoformans* em produzir manitol com o desenvolvimento da patogenia. A produção de D-manitol por *C. neoformans* ocorre tanto *in vitro* (Onishi & Suzuki, 1968) quanto *in vivo*, sendo possível detectar grandes concentrações desse poliól no líquido cérebro-espinhal de animais infectados (Wong *et al.*, 1990). A síntese de grandes quantidade de D-manitol por *C. neoformans* parece facilitar o desenvolvimento de meningoencefalite por aumentar a pressão osmótica circundante, o que pode contribuir com a formação de edemas cerebrais no hospedeiro infectado (Wong *et al.*, 1990). O papel do manitol na patogênese de *C. neoformans* ficou ainda mais claro quando Chaturvedi *et al.* (1996a) mostraram que linhagens mutantes não produtoras desse poliól são menos virulentas que a linhagem selvagem parental, possivelmente por serem menos tolerantes ao estresse térmico e osmótico. Os

mesmos autores identificaram ainda que o manitol produzido pelo fungo pode atuar sequestrando intermediários reativos de oxigênio e, assim dificultar a ação antimicrobiana de células do sistema imunológico (Chaturvedi *et al.*, 1996b). Além disso, um trabalho recente mostrou que a presença de manitol induz aumento no tamanho da cápsula de *C. neoformans* *in vitro* e *in vivo* (Guimarães *et al.*, 2010), o que poderia influenciar na virulência e na disseminação do fungo. Como proposto anteriormente por Zaragoza *et al.* (2008), o aumento da cápsula pode também atuar na proteção do fungo ao estresse oxidativo, uma vez que mutantes acapsulares são mais susceptíveis à ação de radicais livres. Resumidamente, os dados sugerem até o momento que o manitol pode atuar na proteção de *C. neoformans* ao estresse osmótico, térmico e/ou oxidativo, sendo um importante fator de virulência desse patógeno. Assim, torna-se compreensível a indução do gene que codifica este transportador de açúcar no ambiente intracelular de fagócitos, bem como o caráter hipovirulento do mutante M1 em modelos de infecção animal.

Embora as vias pela qual *C. neoformans* sintetiza e cataboliza manitol ainda não tenham sido completamente desvendadas, acredita-se que essas envolvam a enzima manitol-1-fosfato desidrogenase (MPD). Conforme descrito para outros fungos, a enzima MPD catalisa a interconversão da frutose 6-fosfato em manitol 1-fosfato, o qual é posteriormente defosforilado pela enzima manitol-1-fosfatase (M1Pase), gerando manitol (Hult *et al.*, 1980; Jennings, 1984). Em *C. neoformans*, embora os substratos preferenciais da MPD sejam frutose 6-fosfato e manitol 1-fosfato, essa enzima pode também catalisar a interconversão entre glicose 6-fosfato e sorbitol 6-fosfato (Suvarna *et al.*, 2000). Apesar do papel do manitol no estabelecimento da infecção por *C. neoformans* estar sendo continuamente revelado na literatura, ainda não há relatos claros sobre a importância das enzimas MPD e M1Pase na virulência desse patógeno. Todavia, nossos resultados de análise de expressão gênica por microarranjo mostraram um aumento no acúmulo do transcrito do gene *Mpd* de *C. neoformans* em cerca de 3,8 vezes em resposta à fagocitose por macrófagos murinos, sugerindo um potencial papel da enzima MPD durante a interação do fungo com a célula hospedeira. Ademais, outros genes envolvidos na biogênese de polióis por *C. neoformans* foram induzidos após a internalização das leveduras pelos fagócitos, como sorbitol desidrogenase, arabinitol desidrogenase e ribitol quinase (Anexos 1 e 3).

#### 4.3.7. Considerações finais

O entendimento dos mecanismos que permitem a adaptação de patógenos intracelulares ao ambiente inóspito do interior de fagócitos mostra-se essencial para o conhecimento dos processos pelos quais esses microrganismos estabelecem a infecção em seus hospedeiros (Jenner & Young, 2005). Dentre estes mecanismo destaca-se a reprogramação transcricional do patógeno em resposta à interação com as células fagocitárias. Nesse sentido, comparamos a resposta transcritômica do fungo *C. neoformans* recuperado do interior de macrófagos ou amebas, uma vez que é sugerido na literatura que a capacidade desse fungo em sobreviver e se replicar no fagossomo de macrófagos é consequência de uma vantagem adaptativa selecionada no ambiente natural de *C. neoformans* e que lhe confere a capacidade de sobreviver no interior de predadores ambientais, como amebas (Steenbergen *et al.*, 2001). A análise transcritômica em larga escala foi realizada utilizando-se a metodologia de microarranjo de DNA, a qual permite a apreciação simultânea do acúmulo de transcritos de milhares de genes, podendo fornecer uma compreensão global da resposta do patógeno à interação com o fagócito.

Os dados descritos no presente trabalho demonstraram que 6h de interação de *C. neoformans* com a ameba *A. castellanii* e com macrófagos murinos resultaram na modulação de 656 e 293 genes, respectivamente. De um modo geral, a internalização de *C. neoformans* por ambos fagócitos resulta na reprogramação metabólica do fungo, ativando vias importantes na adaptação a ambientes privados de nutrientes e oxigênio. Além disso, genes envolvidos na resposta a diferentes tipos de estresse, tais quais estresses oxidativo/nitrossativo, térmico e osmótico, tiveram sua expressão regulada positivamente. Esses dados reforçam a idéia do fagossomo como um microambiente hostil para a sobrevivência de patógenos, cujas principais características são hipóxia, carência nutricional, e presença de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio. Em contrapartida, genes relacionados à maquinaria de transcrição e tradução foram, de um modo geral, regulados negativamente pelo fungo em resposta à fagocitose, sugerindo a repressão desses processos em resposta a situações de estresse como uma possível forma de poupar energia enquanto as células se adaptam ao ambiente intracelular (Brown *et al.* , 2007). Genes que codificam fatores de virulência de *C. neoformans* importantes para o estabelecimento da infecção em hospedeiro mamífero foram induzidos após fagocitose do fungo por amebas, corroborando a hipótese de que alguns atributos de virulência de *C. neoformans* foram selecionados e vêm sendo mantidos ao

longo da evolução. Por fim, especula-se que as diferenças observadas durante os experimentos de cinética de internalização de *C. neoformans* por amebas e macrófagos podem resultar em diferenças no perfil de modulação de alguns genes. Por exemplo, uma vez que a fagocitose mediada por macrófagos ocorre muito rapidamente quando comparada à fagocitose mediada por amebas, alguns genes de *C. neoformans* cuja expressão está sendo modulada no tempo de 6h de interação com *A. castellanii* podem ter tido sua expressão regulada mais precocemente em virtude do evento de internalização do fungo pelo macrófago já ter ocorrido mais cedo. Nesse sentido, sugerimos a relevância da análise da resposta transcritômica de *C. neoformans* após outros tempos de interação com macrófagos e amebas.

Vale notar que, dos 293 genes de *C. neoformans* cuja expressão foi modulada em resposta à interação com macrófagos, 38% também tiveram sua expressão alterada quando da interação com amebas. Partindo-se da premissa de que as diferenças nos níveis de transcritos observadas possuam significância biológica, podemos presumir que genes de *C. neoformans* que apresentaram a expressão modulada de forma similar quando da internalização por amebas e macrófagos são potencialmente importantes para a sobrevivência intracelular desse patógeno. Nesse contexto, avaliamos a importância de um gene, que codifica um transportador de açúcar cuja expressão foi drasticamente aumentada quando da interação de *C. neoformans* com ambos os fagócitos. Nossos resultados preliminares confirmam o papel desse gene, envolvido no transporte de manitol e outros polióis, na virulência de *C. neoformans*. Ainda, outros genes diferencialmente expressos identificados no presente trabalho estão potencialmente relacionados ao estabelecimento da infecção por este patógeno, sendo, dessa forma, futuros alvos de estudo.

É importante ressaltar que os dados gerados por experimentos de microarranjo de DNA apenas indicam o acúmulo de transcritos de um determinado gene em resposta a uma dada condição de estudo, devendo portanto serem interpretados com cautela. Isso porque em eucariotos existem várias etapas de regulação da expressão gênica, que variam desde as modificações na cromatina, à síntese do transcrito primário e seu processamento, até a regulação da síntese protéica e as modificações pós-traducionais (Lehninger *et al.*, 2000). Dessa forma, embora os resultados aqui obtidos forneçam uma idéia aproximada do estado metabólico de *C. neoformans* em resposta à fagocitose por amebas e macrófagos, para alguns genes é possível que não haja uma correlação direta entre níveis de transcrito e níveis protéicos. Para a levedura *S. cerevisiae* foi mostrado,

por exemplo, que a relação entre transcrição e tradução nem sempre é linear, podendo variar de acordo com o processo biológico em questão (Ideker *et al.*, 2001; Griffin *et al.* 2002; Beyer *et al.* 2004). As melhores correlações quanto ao acúmulo de mRNAs e proteínas foram verificadas para genes envolvidos no metabolismo e na síntese protéica, indicando que os mesmos são preferencialmente regulados em nível transcricional (Beyer *et al.* 2004).

Em suma, o presente trabalho forneceu dados importantes para o melhor entendimento dos mecanismos de origem e manutenção de fatores de virulência por patógenos oportunistas de vida livre. Esses estudos possibilitam ainda a definição de potenciais alvos terapêuticos e poderão contribuir no desenho de novas estratégias para o tratamento da criptococose.

## **PERSPECTIVAS**

---

Como perspectivas futuras desse trabalho podemos citar:

1. Analisar os principais efeitos do farnesol na expressão diferencial de genes de *P. brasiliensis*.
2. Avaliar a ação do farnesol no combate à PCM em modelo murino de infecção.
3. Verificar a ação do propranolol na formação de biofilmes de *C. albicans in vivo* em modelo murino de infecção .
4. Verificar a ação do propranolol na formação de biofilmes de outros patógenos.
5. Analisar a resposta transcricional de *C. neoformans* em outros tempos de interação com amebas e macrófagos.
6. Repetir os experimentos de infecção animal com a linhagem mutante M1 de *C. neoformans*, utilizando também a linhagem mutante reconstituída.
7. Avaliar o papel de outros genes de *C. neoformans* cuja expressão foi modulada quando da interação do fungo com amebas e/ou macrófagos no estabelecimento da infecção em hospedeiro animal.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Adany, I, Yazlovitskaya EM, Haug, JS, Voziyan, PA, Melnykovych, G. 1994. Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically- and non-neoplastically-derived cells in culture. *Cancer Lett.* May 16;79(2):175-9.
- Akache, B, Turcotte, B. 2002. New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *J Biol Chem.* Jun 14;277(24):21254-60. Epub 2002 Apr 9.
- Akada, JK, Shirai, M, Takeuchi, H, Tsuda, M, Nakazawa, T. 2000. Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol.* Jun;36(5):1071-84.
- Akhter, S, McDade, HC, Gorch, JM, Heinrich, G, Cox, GM, Perfect, JR. 2003. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* Oct;71(10):5794-802.
- Akiyama, H, Oono, T, Huh, WK, Yamasaki, O, Ogawa, S, Katsuyama, M et al. 2002. Actions of farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*;48(3):122-8.
- Aksenov, SI, Babyeva, IP, Golubev, VI. 1973. On the mechanism of adaptation of microorganisms to conditions of extreme low humidity. *Life Sci Space Res.* 11:55-61.
- Alem, MA, Oteef, MD, Flowers, TH, Douglas, LJ. 2006. Production of Tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell.* 5(10):1770-1779.
- Al-Fattani, MA, Douglas, LJ. 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* Aug;55(Pt 8):999-1008.
- Almeida, SR. 2008. *Micologia*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
- Alspaugh, JA, Cavallo, LM, Perfect, JR, Heitman, J. 2000. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* Apr;36(2):352-65.
- Alvarez, M, Casadevall, A. 2006. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol.* Nov 7;16(21):2161-5.
- Amer, AO, Swanson, MS. 2002. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol.* Feb;5(1):56-61.
- Aristizabal, BH, Karl, VC, David, AS, Restrepo, A. 1998. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect. Immun.* 66: 5587-5591.
- Arruda, D, Andre, C, Vaz, CA, Burger, E, Calich, VL. 2000. Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 68:352-359.
- Baillie, GS, Douglas, LJ. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*;48(7):671-9.

- Baillie, GS, Douglas, LJ. 2000. Matrix polymers of *Candida biofilms* and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*;46(3):397-403.
- Baker, CA, Desrosiers, K, Dolan, JW. 2002. Propranolol inhibits hyphal development in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. Nov;46(11):3617-20.
- Barnett, JA. 2008. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast*. Jun;25(6):385-417.
- Bassler, BL. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*. 2(6):582-587.
- Basu, M, Czinn, SJ, Blanchard, TG. 2004. Absence of catalase reduces long-term survival of *Helicobacter pylori* in macrophage phagosomes. *Helicobacter*. Jun;9(3):211-6.
- Bauernfeind, A, Bertele, RM, Harms, K, Hörl, G, Jungwirth, R, Petermüller, C, Przyklenk, B, Weisslein-Pfister, C. 1987. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection*. Jul-Aug;15(4):270-7.
- Berman, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. 2006. *Curr Opin Microbiol*. Dec;9(6):595-601.
- Beyer, A, Hollunder, J, Nasheuer, HP, Wilhelm, T. 2004. Post-transcriptional expression regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a genomic scale. *Mol. Cell Proteomics*. 3:1083-1092.
- Bialek, R, Ibricevic, A, Fothergill, A, Begerow, D. 2000. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J. Clin. Microbiol*. 38:3190-3193.
- Bien, CM, Espenshade, PJ. 2010. Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryot Cell*. Mar;9(3):352-9. Review.
- Bignell, E, Negrete-Urtasun, S, Calcagno, AM, Haynes, K, Arst, HN Jr, Rogers, T. 2005. The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol Microbiol*. Feb;55(4):1072-84.
- Blankenship, JR, Mitchell, AP. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. Dec;9(6):588-94. Epub 2006 Oct 20.
- Bocca, AL, Hayashi, EE, Pinheiro, AG, Furlanetto, AB, Campanelli, AP, Cunha, FQ, Figueiredo F. 1998. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol*. 161:3056-3063.
- Borges-Walmsley, MI, Chen, D, Shu, X, Walmsley, AR. 2002. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*. Feb;10(2):80-7.
- Brehm-Stecher, BF, Johnson, EA. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother*;47(10):3357-60.

- Brieland, JK, Fantone, JC, Remick, DG, LeGendre, M, McClain, M, Engleberg, NC. 1997. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect Immun.* Dec;65(12):5330-3.
- Brown, SM, Campbell, LT, Lodge, JK. 2007. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Curr Opin Microbiol.* Aug;10(4):320-5.
- Brummer, E, Castaneda, E; Restrepo, A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 89-117.
- Brummer, E, Hanson, LH, Restrepo, A, Stevens, DA. 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* 57:2289-2294.
- Brummer, E, Sun, SH, Harrison, JL, Perlman, AM, Philpott, DE, Stevens, DA. 1990. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. *Infect Immun*;58(8):2628-36.
- Brummer, E. 1999. Human defenses against *Cryptococcus neoformans*: an update. *Mycopathologia*.;143(3):121-5.
- Calderone, R. 2002. *Candida* and Candidiasis. American Society of Microbiology. ASM Press 1752 N St. NW, Whashington DC. USA.
- Cano, LE, Brummer, E, Stevens, DA, Restrepo, A. 1992. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect. Immun.* 60:2096-2100.
- Cano, LE, Kashino, SS, Arruda, C, Andre, D, Xidieh, CF, Singer-Vermes, LM, Vaz, CA, Burger, E, Calich, VL. 1998. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 66:800-806.
- Cao, YY, Cao, YB, Xu, Z, Ying, K, Li, Y, Xie, Y, Zhu, ZY, Chen, WS, Jiang, YY. 2005. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(2):584-589.
- Carbonell, LM. 1969. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 100:1076-1082.
- Casadevall, A, Perfect, JR. 1998. *Cryptococcus neoformans*: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. ASM Press.
- Casadevall, A, Pirofski, L. 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis.* Aug 1;184(3):337-44.
- Casadevall, A, Pirofski, LA. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* Aug;67(8):3703-13.
- Casadevall, A, Steenbergen, JN, Nosanchuk, JD. 2003. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol.* Aug;6(4):332-7.

- Cegelski, L, Marshall, GR, Eldridge, GR, Hultgren, SJ. 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol.* Jan;6(1):17-27. Review.
- Chaffin, WL, López-Ribot, JL, Casanova, M, Gozalbo, D, Martínez, JP. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar;62(1):130-80. Review.
- Chandra, J, Kuhn, DM, Mukherjee, PK, Hoyer, LL, McCormick, T, Ghannoum, MA. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*;183(18):5385-94.
- Chang, YC, Bien, CM, Lee, H, Espenshade, PJ, Kwon-Chung, KJ. 2007. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* May;64(3):614-29.
- Chang, YC, Kwon-Chung, KJ. 1994. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol.* Jul;14(7):4912-9.
- Chang, YC, Penoyer, LA, Kwon-Chung, KJ. 1996. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun.* Jun;64(6):1977-83.
- Chatterjee, SS, Hossain, H, Otten, S, Kuenne, C, Kuchmina, K, Machata, S, Domann, E, Chakraborty, T, Hain, T. 2006. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* Feb;74(2):1323-38.
- Chaturvedi, V, Flynn, T, Niehaus, WG, Wong, B. 1996a. Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* Apr;142 ( Pt 4):937-43.
- Chaturvedi, V, Wong, B, Newman, SL. 1996b. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *J Immunol.* May 15;156(10):3836-40.
- Chayakulkeeree, M, Perfect, JR. 2006. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* Sep;20(3):507-44, v-vi.
- Chayakulkeeree, M, Sorrell, TC, Siafakas, AR, Wilson, CF, Pantarat, N, Gerik, KJ, Boadle, R, Djordjevic, JT. 2008. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* Aug;69(4):809-26.
- Che, Q, Schreiber, MJ, Rafey, MA. 2009. Beta-blockers for hypertension: are they going out of style? *Cleveland Clin J Med.*;76:533-42
- Chen, H, Fink, GR. 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* May 1;20(9):1150-61.
- Chen, H, Fujita, M, Feng, Q, Clardy, J, Fink, GR. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci.* 101(14):5048-5052.

- Chen, Q, Haddad, GG. 2004. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J Exp Biol.* Aug;207(Pt 18):3125-9. Review.
- Chen, SC, Wright, LC, Santangelo, RT, Muller, M, Moran, VR, Kuchel, PW, Sorrell, TC. 1997. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* Feb;65(2):405-11.
- Chun, CD, Liu, OW, Madhani, HD. 2007. A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* Feb;3(2):e22.
- Cirillo, JD, Falkow, S, Tompkins, LS, Bermudez, LE. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun.* Sep;65(9):3759-67.
- Costa, AK, Sidrim, JJ, Cordeiro, RA, Brilhante, RS, Monteiro, AJ, Rocha, MF. 2010. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia.* Mar;169(3):207-13.
- Costa, CS, Albuquerque, FC, Andrade, RV, Oliveira, GC, Almeida, MF, Brigido, MM et al. 2005. Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance. *Genet Mol Res*;30;4(2):390-408.
- Cowen, LE. 2009. Hsp90 orchestrates stress response signaling governing fungal drug resistance. *PLoS Pathog.* Aug;5(8):e1000471.
- Cox, GM, McDade, HC, Chen, SC, Tucker, SC, Gottfredsson, M, Wright, LC, Sorrell, TC, Leidich, SD, Casadevall, A, Ghannoum, MA, Perfect, JR. 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* Jan;39(1):166-75.
- Cox, GM, Mukherjee, J, Cole, GT, Casadevall, A, Perfect, JR. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun.* Feb;68(2):443-8.
- Crowe, JH. 2007. Trehalose as a "chemical chaperone": fact and fantasy. *Adv Exp Med Biol.*;594:143-58. Review.
- Cugini, C, Calfee, MW, Farrow, JM, Morales, DK, Pesci, EC, Hogan, DA. 2007. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* Aug;65(4):896-906.
- Dabrowa, N, Taxer, SS, Howard, DH. 1976. Germination of *Candida albicans* induced by proline. *Infect Immun.*;13(3):830-5.
- Dagsgaard, C, Taylor, LE, O'Brien, KM, Poyton, RO. 2001. Effects of anoxia and the mitochondrion on expression of aerobic nuclear COX genes in yeast: evidence for a signaling pathway from the mitochondrial genome to the nucleus. *J Biol Chem.* Mar 9;276(10):7593-601.

- Davis, D, Edwards, JE Jr, Mitchell, AP, Ibrahim, AS. 2000. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun.* Oct;68(10):5953-9.
- de Kievit, TR, Iglewski, BH. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* 68(9):4839-4849.
- Derengowski, LS, Tavares, AH, Silva, S, Procópio, LS, Felipe, MS, Silva-Pereira, I. 2008. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol.* Mar;46(2):125-34.
- Deveau, A, Hogan, DA. 2011. Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. *Methods Mol Biol.*;692:219-33.
- Dimsdale, JE, Newton, RP, Joist, T. 1989. Neuropsychological side effects of beta-blockers. *Arch Intern Med.*;149:514-25.
- Ding, WX, Ni, HM, Gao, W, Yoshimori, T, Stolz, DB, Ron, D, Yin, XM. 2007. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol.* Aug;171(2):513-24.
- Dionigi, CP, Millie, DF, Johnsen, PB. 1991. Effects of farnesol and the off-flavor derivative geosmin on *Streptomyces tendae*. *Appl Environ Microbiol.*;57(12):3429-32.
- Doering, TL. 2009. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol.*;63:223-47. Review.
- Douglas, LJ. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*;11(1):30-6.
- Eaton, KA, Krakowka, S. 1994. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* Sep;62(9):3604-7.
- El-Azizi, MA, Starks, SE, Khardori, N. 2004. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol.* 96(5):1067-73.
- Ellis, DH, Pfeiffer, TJ. 1990. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet.* Oct 13;336(8720):923-5. Review.
- Enjalbert, B, Whiteway, M. 2005. Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. *Eukaryot Cell.* 4(7):1203-1210.
- Ernst, JF. 2000. Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology*;146 (Pt 8):1763-74.
- Falagas, ME, Betsi, GI, Athanasiou, S. 2006. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.* Aug;58(2):266-72. Review.
- Falkow, S. 2004. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity--a personal recollection 15 years later. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:67-72.
- Fan, W, Kraus, PR, Boily, MJ, Heitman, J. 2005. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryot. Cell.* 4:1420-1433.

- Feldmesser, M, Casadevall, A. 1997. Effect of serum IgG1 to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan on murine pulmonary infection. *J Immunol.* Jan 15;158(2):790-9.
- Feldmesser, M, Kress, Y, Novikoff, P, Casadevall, A. 2000. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun.* Jul;68(7):4225-37.
- Feldmesser, M, Tucker, S, Casadevall, A. 2001. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* Jun;9(6):273-8.
- Felipe, MS, Andrade, RV, Arraes FB, Nicola, AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho M.J, Brígido MM. *PbGenome Network.* 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem.* 280:24706-24714.
- Felipe, MS, Andrade, RV, Petrofeza, SS, Maranhão, AQ, Torres, FA, Albuquerque, P, Arraes, FB, Arruda, M, Azevedo, MO, Baptista, AJ, Bataus, LA, Borges, CL, Campos, EG, Cruz, MR, Daher, BS, Dantas, A, Ferreira, MA, Ghil, GV, Jesuino, RS, Kyaw, CM, Leitão, L, Martins, CR, Moraes, LM, Neves, EO, Nicola, AM, Alves, ES, Parente, JA, Pereira, M, Poças-Fonseca, MJ, Resende, R, Ribeiro, BM, Saldanha, RR, Santos, SC, Silva-Pereira, I, Silva, MA, Silveira, E, Simões, IC, Soares, RB, Souza, DP, De-Souza, MT, Andrade, EV, Xavier, MA, Veiga, HP, Venâncio, EJ, Carvalho, MJ, Oliveira, AG, Inoue, MK, Almeida, NF, Walter, ME, Soares, CM, Brígido, MM. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* Feb;20(3):263-71.
- Filler, SG. 2006. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol.* Aug;9(4):333-9.
- Finkel, JS, Mitchell, AP. 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* Feb;9(2):109-18. Epub 2010 Dec 29.
- Franco, M, Lacaz, CS, Restrepo, A, Del Negro, G. 1994. *Paracoccidioidomycosis.* CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Franco, M, Peracoli, MT, Soares, A, Montenegro, R, Mendes, RP, Meira, DA. 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.* 5:115- 149.
- Franco, M. 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol;*25(1):5-18. Review.
- Franzot, SP, Salkin, IF, Casadevall, A. 1999. *Cryptococcus neoformans var. grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol.* Mar;37(3):838-40.

- Fromtling, RA, Shadomy, HJ, Jacobson, ES. 1982. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia. Jul 23;79(1):23-9.
- Fu, Y, Ibrahim, AS, Sheppard, DC, Chen, YC, French, SW, Cutler, JE, et al. 2002. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. Mol Microbiol.;44(1):61-72.
- Gancedo, C, Flores, CL. 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. FEMS Yeast Res. Jan;4(4-5):351-9. Review.
- Ghannoum, MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 13:122-143.
- Gibson, J, Sood, A, Hogan, DA. 2009. *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. Appl Environ Microbiol. Jan;75(2):504-13. Epub 2008 Nov 14.
- Gilbert, NM, Donlin, MJ, Gerik, KJ, Specht, CA, Djordjevic, JT, Wilson, CF, Sorrell, TC, Lodge, JK. 2010. KRE genes are required for beta-1,6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol. Apr;76(2):517-34.
- Giles, SS, Perfect, JR, Cox, GM. 2005. Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genet Biol. Jan;42(1):20-9.
- Giles, SS, Stajich, JE, Nichols, C, Gerrald, QD, Alspaugh, JA, Dietrich, F, Perfect, JR. 2006. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. Eukaryot Cell. Sep;5(9):1447-59.
- Gillespie, J, Barton, LL, Rypka, EW. 1988. Influence of oxygen tension on the respiratory activity of *Mycobacterium phlei*. J Gen Microbiol. Jan;134(1):247-52.
- Goihman-Yahr, M, Pine, L, Albornoz, MC, Yarzabal, L, de Gomez, MH, San Martin, B, et al. 1980. Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. Mycopathologia;71(2):73-83.
- Gómez, BL, Nosanchuk, JD, Diez, S, Youngchim, S, Aisen, P, Cano, LE, Restrepo, A, Casadevall, A, Hamilton, AJ. 2001. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. Infect Immun. Sep;69(9):5760-7.
- Gonzalez, A, de Gregori, W, Velez, D, Restrepo, A, Cano, LE. 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Infect. Immun. 68:2546-2552.
- Goulart, L, Rosa e Silva, LK, Chiapello, L, Silveira, C, Crestani, J, Masih, D, Vainstein, MH. 2010. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genes preferentially expressed during rat macrophage infection. Med Mycol. Nov;48(7):932-41.

- Graham, JE, Clark-Curtiss, JE. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 28;96(20):11554-9.
- Granados, DP, Castañeda, E. 2005. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb Ecol*. Feb;49(2):282-90.
- Griffin, TJ, Gygi, SP, Ideker, T. 2002. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Proteomics*. 1:323–333.
- Guarro, J, Gene, J, Stchigel, AM.. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:454-500.
- Guimarães, AJ, Frases, S, Cordero, RJ, Nimrichter, L, Casadevall, A, Nosanchuk, JD. 2010. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size *in vitro* and *in vivo*. *Cell Microbiol*. Jun;12(6):740-53.
- Haas, H. 2003. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol*. Sep;62(4):316-30. Epub 2003 May 21. Review.
- Hahn, RC, Fontes, CJ, Batista, RD, Hamdan, JS. 2002. In vitro comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*;40(8):2828-31.
- Hahn, RC, Morato-Conceição, YT, Santos, NL, Ferreira, JF, Hamdan, JS. 2003. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*;46(8):342-7.
- Hawser, SP, Douglas, LJ. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*;62(3):915-21.
- Hermann, C, Hermann, J, Munzel, U, Rüchel, R. 1999. Bacterial flora accompanying *Candida* yeasts in clinical specimens. *Mycoses*. 42(11-12):619-27.
- Hogan, DA, Vik, A, Kolter, R. 2004. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol*. Dec;54(5):1212-23.
- Hogan, DA. 2006. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*. 5(4):613-619.
- Hogan, LH, Klein, BS, Levitz, SM. 1996. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*. Oct;9(4):469-88.
- Høiby, N, Bjarnsholt, T, Givskov, M, Molin, S, Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. Apr;35(4):322-32. Review.

- Hornby, JM, Jensen, E., Lisec, AD, Tasto, JJ, Jahnke, B, Shoemaker, R, Dussault, P, Nickerson, KW. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 67(7):2982-2992.
- Hornby, JM, Kebaara, BW, Nickerson, KW. 2003. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob. Agents Chemother*;47(7):2366-9.
- Hottiger, T, Boller, T, Wiemken, A. 1987. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.* Aug 10;220(1):113-5.
- Hoyer, LL, Payne, TL, Bell, M, Myers, AM, Scherer, S. 1998. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet*;33(6):451-9.
- Hu, G, Cheng, PY, Sham, A, Perfect, JR, Kronstad, JW. 2008. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. *Mol Microbiol.* Sep;69(6):1456-75. Epub 2008 Jul 30.
- Hube, B, Hess, D, Baker, CA, Schaller, M, Schäfer, W, Dolan, JW. 2001. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology.*;147(Pt 4):879-89.
- Hughes, DT, Sperandio, V. 2008. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol.* Feb;6(2):111-20. Review.
- Hull, CM, Heitman, J. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet*;36:557-615. Epub 2002 Jun 11. Review.
- Hult, K, Veide, A, Gatenbeck, S. 1980. The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Arch Microbiol.* Dec;128(2):253-5.
- Ibrahim, AS, Mirbod, F, Filler, SG, Banno, Y, Cole, GT, Kitajima, Y, Edwards, JE, Nozawa, Y, Ghannoum, MA. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63:1993-1998.
- Ideker, T, Thorsson, V, Ranish, JA. 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science.* 292:929-934.
- Idnurm, A, Giles, SS, Perfect, JR, Heitman, J. 2007. Peroxisome function regulates growth on glucose in the basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* Jan;6(1):60-72. Epub 2006 Oct 13.
- Inoue, Y, Shiraishi, A, Hada, T, Hirose, K, Hamashima, H, Shimada, J. 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol Lett*;237(2):325-31.
- Jabra-Rizk, MA, Falkler, WA, Meiller, TF. 2004. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis*;10(1):14-9.

- Jabra-Rizk, MA, Meiller, TF, James, CE, Shirliff, ME. 2006a. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicro. Agents Chemother.* Apr;50(4):1463-9.
- Jabra-Rizk, MA, Shirliff, M, James, C, Meiller, T. 2006b. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res.* Nov;6(7):1063-73.
- Jain, N, Li, L, Hsueh, YP, Guerrero, A, Heitman, J, Goldman, DL, Fries, BC. 2009. Loss of allergen 1 confers a hypervirulent phenotype that resembles mucoid switch variants of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* Jan;77(1):128-40. Epub 2008 Oct 27.
- Jenner, RG, Young, RA. 2005. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:281-94.
- Jennings, DH. 1984. Polyol metabolism in fungi. *Adv Microb Physiol*;25:149-93.
- Karkowska-Kuleta, J, Rapala-Kozik, M, Kozik, A. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*;56(2):211-24. Epub 2009 Jun 18. Review.
- Kauffman, CA. 2006. Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc*;3(1):35-40.
- Kawasaki, L, Wysong, D, Diamond, R, Aguirre, J. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol.* May;179(10):3284-92.
- Kiertiburanakul, S, Wirojtananugoon, S, Prachartam, R, Sungkanuparph, S. 2006. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. *Int J Infect Dis.* Jan;10(1):72-8.
- Klein, BS, Tebbets, B. 2007. Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol.* Aug;10(4):314-9. Epub 2007 Aug 23.
- Klis, FM, Boorsma, A, De Groot, PW. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* Feb;23(3):185-202. Review.
- Kojic, EM, Darouiche, RO. 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev.*;17(2):255-67.
- Koo, H, Rosalen, PL, Cury, JA, Park, YK, Bowen, WH. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother.* May;46(5):1302-9.
- Korolchuk, VI, Menzies, FM, Rubinsztein, DC. 2009. A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy.* Aug;5(6):862-3.
- Korolchuk, VI, Menzies, FM, Rubinsztein, DC. 2010. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* Apr 2;584(7):1393-8. Epub 2009 Dec 28. Review.
- Kozel, TR, Pfrommer, GS, Guerlain, AS, Highison, BA, Highison, GJ. 1988. Role of the

- capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *ev Infect Dis*. Jul-Aug;10 Suppl 2:S436-9.
- Kraus, PR, Boily, MJ, Giles, SS, Stajich, JE, Allen, A, Cox, GM, Dietrich, FS, Perfect, JR, Heitman, J. 2004. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryot Cell*. Oct;3(5):1249-60.
- Kügler, S, Schurtz-Sebghati, T, Groppe-Eissenberg, L, Goldman, WE. 2000. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. *Proc Natl Acad Sci*. Aug 1;97(16):8794-8. Review.
- Laín, A, Elguezabal, N, Amutio, E, Fernández de Larrinoa, I, Moragues, MD, Pontón, J. 2008. Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Dev Immunol*; 2008:721950. Review.
- Langfelder, K, Streibel, M, Jahn, B, Haase, G, Brakhage, AA. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. Mar;38(2):143-58.
- Leclerc, MC, Philippe, H, Gueho, E. 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol*. 32:331–341.
- Lee, A, Fox, J, Hazell, S. 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Immun*. May;61(5):1601-10. Review.
- Lehninger, AL, Nelson, DL, Cox, MM. 2000. *Princípios de Bioquímica*. Editora Savier. Ed. 2ª. Segunda reimpressão. São Paulo, S.P. Brasil.
- Leidich, SD, Ibrahim, AS, Fu, Y, Koul, A, Jessup, C, Vitullo, J, Fonzi, W, Mirbod, F, Nakashima, S, Nozawa, Y, Ghannoum, MA. 1998. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem*. 273:26078-26086.
- Levitz, SM, Nong, SH, Seetoo, KF, Harrison, TS, Speizer, RA, Simons, ER. 1999. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun*. Feb;67(2):885-90.
- Li, AH, Lam, WL, Stokes, RW. 2008. Characterization of genes differentially expressed within macrophages by virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis* identifies candidate genes involved in intracellular growth. *Microbiology*. Aug;154(Pt 8):2291-303.
- Liu, OW, Chun, CD, Chow, ED, Chen, C, Madhani, HD, Noble, SM. 2008. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell*. Oct 3;135(1):174-88.
- Livak, KJ, Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. Dec;25(4):402-8.

- Lo, HJ, Köhler, JR, DiDomenico, B, Loebenberg, D, Cacciapuoti, A, Fink, GR. 1997. Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell. Sep* 5;90(5):939-49.
- Lorenz, MC, Bender, JA, Fink, GR. 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot. Cell.* 3:1076-1087.
- Lorenz, MC, Fink, GR. 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature.* Jul 5;412(6842):83-6.
- Lorenz, MC, Fink, GR. 2002. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell.* Oct;1(5):657-62.
- Ma, H, Croudace, JE, Lammas, DA, May, RC. 2006. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol.* Nov 7;16(21):2156-60.
- Machida, K, Tanaka, T, Fujita, K, Taniguchi, M. 1998. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* Sep;180(17):4460-5.
- Machida, K, Tanaka, T, Yano, Y, Otani, S, Taniguchi, M. 1999. Farnesol induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism. *Microbiology.* Feb;145 ( Pt 2):293-9.
- Martín-Cuadrado, AB, Dueñas, E, Sipiczki, M, Vázquez de Aldana, CR, del Rey, F. 2003. The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* May 1;116(Pt 9):1689-98.
- Martinez, LR, Garcia-Rivera, J, Casadevall, A. 2001. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. *J Clin Microbiol.* Sep;39(9):3365-7.
- Matute, DR, McEwen, JG, Puccia, R, Montes, BA, San-Blas, G, Bagagli, E, Rauscher, JT, Restrepo, A, Morais, F, Nino-Veja, G, Taylor, JW. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 23:65-73.
- McEwen, JG, Garcia, AM, Ortiz, BL, Botero, S., Restrepo, A. 1995. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* 26: 305-306.
- McFadden, DC, Casadevall, A. 2001. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*;39 Suppl 1:19-30. Review.
- McKinney, JD, Höner zu Bentrup, K, Muñoz-Elías, EJ, Miczak, A, Chen, B, Chan, WT, Swenson, D, Sacchetti, JC, Jacobs, WR Jr, Russell, DG. 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature.* Aug 17;406(6797):735-8.
- Mednick, AJ, Nosanchuk, JD, Casadevall, A. 2005. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect Immun.* Apr;73(4):2012-9.

- Mera, SL. 1995. Peptic ulcers and gastric cancer. *Br J Biomed Sci.* Dec;52(4):271-81. Review.
- Miller, MB, Bassler, BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 55:165-99. *Mol Biol Evol.* Jan;23(1):65-73.
- Miquel, K, Pradines, A, Tercé, F, Selmi, S, Favre, G. 1998. Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J Biol Chem*;273(40):26179-86.
- Mishra, NN, Prasad, T, Sharma, N, Payasi, A, Prasad, R, Gupta, DK, Singh, R. 2007. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung.* Sep;54(3):201-35. Review.
- Missall, TA, Lodge, JK, McEwen, JE. 2004. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell.* Aug;3(4):835-46. Review.
- Missall, TA, Lodge, JK. 2005. Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* Feb;4(2):487-9.
- Missall, TA, Moran, JM, Corbett, JA, Lodge, JK. 2005. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryot Cell.* Jan;4(1):202-8.
- Molinari-Madlum, EE, Felipe, MS, Soares, CM. 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* Aug;37(4):269-76.
- Monari, C, Bistoni, F, Vecchiarelli, A. 2006. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Res.* Jun;6(4):537-42.
- Morris-Jones, R, Youngchim, S, Gomez, BL, Aisen, P, Hay, RJ, Nosanchuk, JD, Casadevall, A, Hamilton, AJ. 2003. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *in vitro* and during mammalian infection. *Infect Immun.* Jul;71(7):4026-33.
- Moscardi-Bacchi, M, Brummer, E, Stevens, DA. 1994. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J. Med. Microbiol.* 40:159-164.
- Mosel, DD, Dumitru, R, Hornby, JM, Atkin, AL, Nickerson, KW. 2005. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl. Environ. Microbiol*;71(8):4938-40.
- Moyrand, F, Chang, YC, Himmelreich, U, Kwon-Chung, KJ, Janbon, G. 2004. Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. *Eukaryot Cell.* Dec;3(6):1513-24.

- Mylonakis, E, Moreno, R, El Khoury, JB, Idnurm, A, Heitman, J, Calderwood, SB, Ausubel, FM, Diener, A. 2005. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun.* Jul;73(7):3842-50.
- Naglik, JR, Challacombe, SJ, Hube, B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* Sep;67(3):400-28.
- Nailis, H, Vandenbroucke, R, Tilleman, K, Deforce, D, Nelis, H, Coenye, T. 2009. Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia*;167(1):9-17.
- Nascimento, FR, Calich, VL, Rodríguez, D, Russo, M. 2002. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol.* May 1;168(9):4593-600.
- Navarathna, DH, Hornby, JM, Krishnan, N, Parkhurst, A, Duhamel, GE, Nickerson, KW. 2007a. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 75(4):1609-1618.
- Navarathna, DH, Nickerson, KW, Duhamel, GE, Jerrels, TR, Petro, TM. 2007b. Exogenous farnesol interferes with the normal progression of cytokine expression during candidiasis in a mouse model. *Infect Immun.* Aug;75(8):4006-11.
- Nigam, S, Ciccoli, R, Ivanov, I, Sczepanski, M, Deva, R. 2011. On mechanism of quorum sensing in *Candida albicans* by 3(R)-hydroxy-tetradecaenoic acid. *Curr Microbiol.* Jan;62(1):55-63. Epub 2010 May 28.
- Niño-Vega, GA, Sorais, F, San-Blas, G. 2009. Transcription levels of CHS5 and CHS4 genes in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial phase, respond to alterations in external osmolarity, oxidative stress and glucose concentration. *Mycol Res.* Oct;113(Pt 10):1091-6.
- Nobile, CJ, Andes, DR, Nett, JE, Smith, FJ, Yue, F, Phan, QT, Mitchell, AP. 2006a. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog*;2(7):e63.
- Nobile, CJ, Nett, JE, Andes, DR, Mitchell, AP. 2006b. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell*;5(10):1604-10.
- Nobile, CJ, Schneider, HA, Nett, JE, Sheppard, DC, Filler, SG, Andes, DR, et al. 2008. Complementary adhesin function in *Candida albicans* biofilm formation. *Curr Biol.*;18(14):1017-24.
- Nosanchuk, JD, Casadevall, A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* Apr;5(4):203-23.
- Nosanchuk, JD, Gómez, BL, Youngchim, S, Díez, S, Aisen, P, Zancopé-Oliveira, RM, Restrepo, A, Casadevall, A, Hamilton, AJ. 2002. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* Sep;70(9):5124-31.

- Nosanchuk, JD, Ovalle, R, Casadevall, A. 2001. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *J Infect Dis.* Apr 1;183(7):1093-9.
- Noverr, MC, Cox, GM, Perfect, JR, Huffnagle, GB. 2003. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infect Immun.* Mar;71(3):1538-47.
- Nseir, S, Jozefowicz, E, Cavestri, B, Sendid, B, Di Pompeo, C, Dewavrin, F, Favory, R, Roussel-Delvallez, M, Durocher, A. 2007. Impact of antifungal treatment on *Candida-Pseudomonas* interaction: a preliminary retrospective case-control study. *Intensive Care Med.* Jan;33(1):137-42. Epub 2006 Nov 8.
- Odds, FC, Brown, AJ, Gow, NA. 2004. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biol.*;5(7):230. Epub 2004 Jun 11. Review.
- Odom, A, Muir, S, Lim, E, Toffaletti, DL, Perfect, J, Heitman, J. 1997. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* 16:2576-2589.
- Oh, KB, Miyazawa, H, Naito, T, Matsuoka, H. 2001. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 10;98(8):4664-8. Epub 2001 Mar 27.
- Olsen, LJ, Ettinger, WF, Damsz, B, Matsudaira, K, Webb, MA, Harada, JJ. 1993. Targeting of glyoxysomal proteins to peroxisomes in leaves and roots of a higher plant. *Plant Cell.* Aug;5(8):941-52.
- O'Meara, TR, Norton, D, Price, MS, Hay, C, Clements, MF, Nichols, CB, Alspaugh, JA. 2010. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. *PLoS Pathog.* Feb 19;6(2):e1000776.
- Onishi, H, Suzuki, T. 1968. Production of D-mannitol and glycerol by yeasts. *Appl Microbiol.* Dec;16(12):1847-52.
- Orsi, CF, Colombari, B, Ardizzoni, A, Peppoloni, S, Neglia, R, Posteraro, B, Morace, G, Fadda, G, Blasi, E. 2009. The ABC transporter-encoding gene AFR1 affects the resistance of *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal maturation. *FEMS Yeast Res.* Mar;9(2):301-10.
- Palmer, GE, Askew, DS, Williamson, PR. 2008. The diverse roles of autophagy in medically important fungi. *Autophagy.* Nov 16;4(8):982-8. Epub 2008 Nov 29. Review.
- Panepinto, J, Liu, L, Ramos, J, Zhu, X, Valyi-Nagy, T, Eksi, S, Fu, J, Jaffe, HA, Wickes, B, Williamson, PR. 2005. The DEAD-box RNA helicase Vad1 regulates multiple virulence-associated genes in *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest.* Mar;115(3):632-41.
- Park, BJ, Wannemuehler, KA, Marston, BJ, Govender, N, Pappas, PG, Chiller, TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS.* Feb 20;23(4):525-30.
- Perfect, JR, Casadevall, A. 2002. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* Dec;16(4):837-74,

- Perfect, JR, Wong, B, Chang, YC, Kwon-Chung, KJ, Williamson, PR. 1998. *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. *Med Mycol*;36 Suppl 1:79-86.
- Perfect, JR. 2006. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res.* Jun;6(4):463-8.
- Petzold, EW, Himmelreich, U, Mylonakis, E, Rude, T, Toffaletti, D, Cox, GM, Miller, JL, Perfect, JR. 2006. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* Oct;74(10):5877-87.
- Pflock, M, Kennard, S, Delany, I, Scarlato, V, Beier, D. 2005. Acid-induced activation of the urease promoters is mediated directly by the ArsRS two-component system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* Oct;73(10):6437-45.
- Posteraro, B, Sanguinetti, M, Sanglard, D, La Sorda, M, Boccia, S, Romano, L, Morace, G, Fadda, G. 2003. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Mol Microbiol.* Jan;47(2):357-71.
- Prado, M, Silva, MB, Laurenti, R, Travassos, LR, Taborda, CP. 209. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: review from 1996 to 2006. *Mem Inst swaldo ruz*, io e Janeiro, ol. 104 (33): 13-5521.
- Qazzafi, Z, Thiruchunapalli, D, Birkenhead, D, Bell, D, Sandoe, JA. 2007. Invasive *Cryptococcus neoformans* infection in an asplenic patient. *J Infect.* Dec;55(6):566-8.
- Ramage, G, Martínez, JP, López-Ribot, JL. 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* Nov;6(7):979-86. Review.
- Ramage, G, Saville, SP, Thomas, DP, López-Ribot, JL. 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*;4(4):633-8.
- Ramage, G, Saville, SP, Wickes, BL, Lopez-Ribot, JL. 2002. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*;68(11):5459-63.
- Ramage, G, Vandewalle, K, Wickes, BL, López-Ribot, JL. 2001. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*;18(4):163-70.
- Restrepo, A, Mcewen, JG, Castaneda, E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 39:233-241.
- Restrepo, A, Salazar, ME, Cano, LE, Stover, EP, Feldman, D, Stevens, DA. 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 46: 346-353.

- Ribeiro, MA, Miranda, AE, Gambale, W, Paula, CR. 2004. Prevalence and exoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosae of HIV-infected women. *Mycopathologia*. Apr;157(3):255-61.
- Rioja, A, Pizzey, AR, Marson, CM, Thomas, NS. 2000. Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. *FEBS Lett*. Feb 11;467(2-3):291-5.
- Rittershaus, PC, Kechichian, TB, Allegood, JC, Merrill, AH Jr, Hennig, M, Luberto, C, Del Poeta, M. 2006. Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest*. Jun;116(6):1651-9.
- Rodrigues, ML, Travassos, LR, Miranda, KR, Franzen, AJ, Rozental, S, de Souza, W, Alviano, CS, Barreto-Bergter, E. 2000. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect Immun*. Dec;68(12):7049-60.
- Roetzer, A, Gratz, N, Kovarik, P, Schüller, C. 2010. Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol*. Feb;12(2):199-216.
- Romanini L. 2004. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol*. 4:1-23.
- Rooney, PJ, Klein, BS. 2002. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol*. 4:127-137.
- Rosas, AL, Nosanchuk, JD, Feldmesser, M, Cox, GM, McDade, HC, Casadevall, A. 2000. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infect Immun*. May;68(5):2845-53.
- Rosenfeld, E, Beauvoit, B. 2003. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. Oct 15;20(13):1115-44. Review.
- Rossignol, T, Logue, ME, Reynolds, K, Grenon, M, Lowndes, NF, Butler, G. 2007. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*;51(7):2304-12.
- Rude, TH, Toffaletti, DL, Cox, GM, Perfect, JR. 2002. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 70(10):5684-94.
- Rumbley, CA, Phillips, SM. 1999. The schistosome granuloma: an immunoregulatory organelle. *Microbes Infect*. Jun;1(7):499-504.
- Rupp, S. 2007. Interactions of the fungal pathogen *Candida albicans* with the host. *Future Microbiol*. Apr;2(2):141-51.
- Salas, SD, Bennett, JE, Kwon-Chung, KJ, Perfect, JR, Williamson, PR. 1996. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*. Aug 1;184(2):377-86.
- Sambrook, J, Russel, DW. 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. ed. 3. Cold Spring Harbor, New York.
- San-Blas, G, Urbina, JA, Marchán, E, Contreras, LM, Sorais, F, San-Blas, F. 1997. Inhibition

- of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology*;143 ( Pt 5):1583-6.
- San-Blas, G, Niño-Vega, G, Iturriaga, T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol. Jun*;40(3):225-42.
- San-Blas, G, San-Blas, F, Gil, F, Mariño, L, Apitz-Castro, R. 1989. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. *Antimicrob Agents Chemother*;33(9):1641-4.
- Sanguinetti, M, Posteraro, B, La Sorda, M, Torelli, R, Fiori, B, Santangelo, R, Delogu, G, Fadda, G. 2006. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun. Feb*;74(2):1352-9.
- Scheckelhoff, MR, Telford, SR, Wesley, M, Hu, LT. 2007. *Borrelia burgdorferi* intercepts host hormonal signals to regulate expression of outer surface protein A. *Proc Natl Acad Sci USA. Apr 24*;104(17):7247-52.
- Schnappinger, D, Ehrt, S, Voskuil, MI, Liu, Y, Mangan, J.A, Monahan, IM, Dolganov, G, Efron, B, Butcher, PD, Natha, C, Schoolnik, GK. 2003. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J. Exp. Med.* 198:693-704.
- Selitrennikoff, CP, Nakata, M. 2003. New cell wall targets for antifungal drugs. *Current Opinion in Investigational Drugs.* 4 (2).
- Semighini, CP, Hornby, JM, Dumitru, R, Nickerson, KW, Harris, SD. 2006. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol.* 59(3):753-64.
- Semighini, CP, Murray, N, Harris, SD. 2008. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS Microbiol Lett*;279(2):259-64.
- Shapiro, RS, Uppuluri, P, Zaas, AK, Collins, C, Senn, H, Perfect, JR, Heitman, J, Cowen, LE. 2009. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Curr Biol.* Apr 28;19(8):621-9. Epub 2009 Mar 26.
- Sharkey, LL, McNemar, MD, Saporito-Irwin, SM, Sypherd, PS, Fonzi, WA. 1999. HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J Bacteriol.*;181(17):5273-9.
- Shea, JM, Kechichian, TB, Luberto, C, Del Poeta, M. 2006. The cryptococcal enzyme inositol phosphosphingolipid-phospholipase C confers resistance to the antifungal effects of macrophages and promotes fungal dissemination to the central nervous system. *Infect Immun.* Oct;74(10):5977-88.

- Shobayashi, M, Mitsueda, S, Ago, M, Fujii, T, Iwashita, K, Iefuji, H. 2005. Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* Dec;69(12):2381-8.
- Sidrim, JJ, Costa, AK, Cordeiro, RA, Brilhante, RS, Moura, FE, Castelo-Branco, DS, Neto, MP, Rocha, MF. 2010. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can J Microbiol.* Jun;56(6):445-58.
- Silva, CMS. 2009. Efeitos do farnesol, uma molécula de quorum-sensing de *Candida albicans*, em diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* 81 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília.
- Simonetti, N, Strippoli, V, Cassone, A. 1974. Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature*;250(464):344-6.
- Singer-Vermes, LM, Burger, E, Franco, MF, Di-Bacchi, MM, Mendes-Giannini, MJ, Calich, VL. 1989. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol*;27(2):71-82.
- Smith, RS, Harris, SG, Phipps, R, Iglewski, B. 2002. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol.* Feb;184(4):1132-9.
- Souto, JT, Figueiredo, F, Furlanetto, A, Pfeffer, K, Rossi, MA, Silva, JS. 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* 156:1811-1820
- Sperandio, V, Torres, AG, Jarvis, B, Nataro, JP, Kaper, JB. 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jul 22;100(15):8951-6.
- Splendore, A. 1912. Zymonematosi con localizzazione nella cavita della bocca, osservata in Brasile. *Bull. Soc. Path. Exot.* 5: 313-319.
- Staab, JB, Bradway, SD, Fidel, PL, Sundstrom, P. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Hwp1. *Science* 283:1535-1538.
- Steen, BR, Lian, T, Zuyderduyn, S, MacDonald, WK, Marra, M, Jones, SJ, Kronstad, JW. 2002. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res.* Sep;12(9):1386-400.
- Steenbergen, JN, Casadevall, A. 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* Jun;5(7):667-75.
- Steenbergen, JN, Nosanchuk, JD, Malliaris, SD, Casadevall, A. 2003. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun.* Sep;71(9):4862-72.
- Steenbergen, JN, Nosanchuk, JD, Malliaris, SD, Casadevall, A. 2004. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun.* Jun;72(6):3478-88.

- Steenbergen, JN, Shuman, HA, Casadevall, A. 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 18;98(26):15245-50. Epub 2001 Dec 11.
- Stoldt, VR, Sonneborn, A, Leuker, CE, Ernst, JF. 1997. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. EMBO J. 16(8):1982-91.
- Sudbery, P, Gow, N, Berman, J. 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. Jul;12(7):317-24. Review.
- Sundstrom, P. 2002. Adhesion in *Candida* spp. Cell Microbiol.;4(8):461-9.
- Suvarna, K, Bartiss, A, Wong, B. 2000. Mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans* is a zinc-containing long-chain alcohol/polyol dehydrogenase. Microbiology. Oct;146 ( Pt 10):2705-13.
- Swanson, MS, Hammer, BK. 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. Annu Rev Microbiol.;54:567-613.
- Tangen, KL, Jung, WH, Sham, AP, Lian, T, Kronstad, JW. 2007. The iron- and cAMP-regulated gene SIT1 influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. Jan;153(Pt 1):29-41.
- Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Campos EG, Andrade RV, Maranhão AQ, Brígido MM, Passos-Silva DG, Fachin AL, Teixeira SM, Passos GA, Soares CM, Bocca AL, Carvalho MJ, Silva-Pereira I, Felipe MS. 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. Microbes Infect. Apr;9(5):583-90.
- Teixeira, MM, Theodoro, RC, de Carvalho, MJ, Fernandes, L, Paes, HC, Hahn, RC, Mendoza, L, Bagagli, E, San-Blas, G, Felipe, MS. 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol Phylogenet Evol. Aug;52(2):273-83.
- Telford, G, Wheeler, D, Williams, P, Tomkins, PT, Appleby, P, Sewell, H, Stewart, GS, Bycroft, BW, Pritchard, DI. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. Infect Immun. Jan;66(1):36-42.
- Theiss, S, Kretschmar, M, Nichterlein, T, Hof, H, Agabian, N, Hacker, J, Köhler, GA. 2002. Functional analysis of a vacuolar ABC transporter in wild-type *Candida albicans* reveals its involvement in virulence. Mol Microbiol. Feb;43(3):571-84.
- Toffaletti, DL, Del Poeta, M, Rude, TH, Dietrich, F, Perfect, JR. 2003. Regulation of cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) expression in *Cryptococcus neoformans* by temperature and host environment. Microbiology. Apr;149(Pt 4):1041-9.

- Torres, I, García, AM, Hernández, O, González, A, McEwen, JG, Restrepo, A, Arango, M. 2010. Presence and expression of the mating type locus in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Fungal Genet Biol.* Apr;47(4):373-80. Epub 2009 Nov 20.
- Tsuda, M, Karita, M, Morshed, MG, Okita, K, Nakazawa, T. 1994. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun.* Aug;62(8):3586-9.
- Ueno, Y, Maruyama, N, Kanno, M, Watanabe, T, Ogasawara, A, Mikami, T, Matsumoto, T. 2009. Effect of propranolol on hyphae formation signal in *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull*;32(1):129-31.
- Uppuluri, P, Mekala, S, Chaffin, WL. 2007. Farnesol-mediated inhibition of *Candida albicans* yeast growth and rescue by a diacylglycerol analogue. *Yeast*;24(8):681-93.
- Vecchiarelli, A. 2000. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* Dec;38(6):407-17.
- Vediyappan, G, Rossignol, T, d'Enfert, C. 2010. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother.* May;54(5):2096-111. Epub 2010 Mar 1.
- Vistica, DT, Skehan, P, Scudiero, D, Monks, A, Pittman, A, Boyd, MR. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* May 15;51(10):2515-20.
- Voziyan, PA, Goldner, CM, Melnykovych, G. 1993. Farnesol inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in cultured cells by decreasing cholinephosphotransferase activity. *Biochem J*;1;295 ( Pt 3):757-62.
- Wang, Y, Casadevall, A. 1994. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* Nov;38(11):2648-50.
- Waugh, MS, Nichols, CB, DeCesare, CM, Cox, GM, Heitman, J, Alspaugh, JA. 2002. Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* Jan;148(Pt 1):191-201.
- Westwater, C, Balish, E, Schofield, DA. 2005. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot Cell.* 4(10):1654-1661.
- Whiteway, M, Bachewich, C. 2007. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*;61:529-53. Review.
- Whittle, CH, Gresham, GA. 1960. *Candida in vitro* and *in vivo*. *Mycopathologia.* Mar 31;12:207-15.
- Wilbur, L, Heyborne, R. 2009. Transient loss of consciousness caused by cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient: a case report. *Cases J.* Jan 15;2(1):60.

- Wilder, JA, Olson, GK, Chang, YC, Kwon-Chung, KJ, Lipscomb, MF. 2002. Complementation of a capsule deficient *Cryptococcus neoformans* with CAP64 restores virulence in a murine lung infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Mar;26(3):306-14.
- Wong, B, Perfect, JR, Beggs, S, Wright, KA. 1990. Production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* *in vitro* and in rabbits with experimental meningitis. *Infect Immun*. Jun;58(6):1664-70.
- Wysong, DR, Christin, L, Sugar, AM, Robbins, PW, Diamond, RD. 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun*. May;66(5):1953-61.
- Yang, YL. 2003. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*. Dec;36(4):223-8. Review.
- Zacharias, D, Ueda, A, Moscardi-Bacchi, M, Franco, M, San-Blas, GA. 1986. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J. Med. Vet. Mycol*. 24:445-454.
- Zaragoza, O, Chrisman, CJ, Castelli, MV, Frases, S, Cuenca-Estrella, M, Rodríguez-Tudela, JL, Casadevall, A. 2008. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol*. Oct;10(10):2043-57.
- Zaragoza, O, de Virgilio, C, Pontón, J, Gancedo, C. 2002. Disruption in *Candida albicans* of the TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology*. May;148(Pt 5):1281-90.
- Zaragoza, O, Rodrigues, ML, De Jesus, M, Frases, S, Dadachova, E, Casadevall, A. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 68:133-216.
- Zhang, LH. 2003. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci*. 8(5):238-244.
- Zhao, X, Oh, SH, Cheng, G, Green, CB, Nuessen, JA, Yeater, K, et al. 2004. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology*;150(Pt 7):2415-28.
- Zimmermann, R, Neupert, W. 1980. Biogenesis of glyoxysomes. Synthesis and intracellular transfer of isocitrate lyase. *Eur J Biochem*. Nov;112(2):225-33.

## **ANEXOS**

---

**ANEXO 1 – Genes de *C. neoformans* cujo acúmulo de transcrito foi aumentado após internalização do fungo pela ameba *A. castellanii*.**

<b>Categoria</b>	<b>Número de Acesso *</b>	<b>p-value</b>	<b>Variacão da expressão</b>	<b>Produto do Gene</b>
<b>Ciclo do Gioxilato</b>	CNAG_05303	0,000610466	3,32005	Isocitrato liase
	CNAG_05653	0,0169472	2,09609	Malato Sintase
<b>Estresse Oxidativo</b>	CNAG_00575	0,000520484	4,63835	Catalase 3
	CNAG_04981	7,85E-06	3,71313	Catalase A
	CNAG_02147	4,15E-05	3,59838	Citocrome-c peroxidase
	CNAG_02592	0,000193662	5,22607	Tioredoxina redutase GliT
	CNAG_01846	0,000365123	3,11961	Flavoproteína
	CNAG_05671	0,0139208	2,06446	Proteína de resistência a oxidação
	CNAG_05169	0,000136537	2,68905	Citocromo b2 / FMN-dependente citocromo c oxidoreductase
<b>Fosforilação Oxidativa</b>	CNAG_03517	0,00170691	2,0406	NADH dehidrogenase mitocondrial
<b>Metabolismo de Aminoácido</b>	CNAG_03128	0,000120654	2,27524	Lincomicina lmbA
	CNAG_02993	0,00149661	2,13978	Imidazoleglicerol-fosfato desidratase
	CNAG_00237	0,000170056	6,54568	3-isopropilmalato desidratase
	CNAG_05802	0,0317881	2,02098	D-aspartato oxidase
	CNAG_05602	0,000329701	2,19722	1-pirrolina-5-carboxilato dehidrogenase
<b>Metabolismo de Carboidrato</b>	CNAG_04879	1,46E-06	2,51315	Enzima desramificadora de glicogênio
	CNAG_00601	0,000678516	2,35682	Glicosil hidrolase
	CNAG_05077	0,00110354	2,02408	Glicosil hidrolase
	CNAG_00057	0,00249878	2,90687	Frutose-bisfosfatase
	CNAG_05658	9,61E-06	4,59109	L-arabinitol 4-dehidrogenase
	CNAG_04744.2	0,000654842	2,8487	Manose-6-fosfato isomerase
	CNAG_06190	0,0311868	2,34571	N-acetilglicosamina-6-fosfato deacetilase
	CNAG_00393	4,98E-05	3,33816	Enzima de ramificação da 1,4-alfa-glucana
	CNAG_04631	8,60E-05	4,05191	Ribitol quinase
	CNAG_03067	0,000118304	3,79568	Piruvato carboxiltransferase
	CNAG_06868	0,0313553	2,00456	Enolase 1
	CNAG_06977.2	0,000342525	2,67457	L-arabinitol 4-dehidrogenase
	CNAG_04621	2,45E-07	5,22439	Glicogênio sintase
	CNAG_02599	0,0392784	2,19458	Aldolase
		0,000171328	4,90791	Precursor da trealase
	CNAG_03113	6,13E-05	4,432	Trealose sintase
	CNAG_03525	5,99E-06	3,68565	Trealase
CNAG_05292	0,0086909	2,10566	Alfa,alfa-trealose-fosfate sintase	
CNAG_03436	0,00127347	2,19231	Transaminase	
<b>Metabolismo de Lipídio</b>	CNAG_00834	6,26E-06	3,40458	Fosfatidilserina decarboxilase
	CNAG_02892	0,00131096	2,20307	GPI manosiltransferase 3
	CNAG_06759	0,00161717	3,44518	Dehidrogenase
	CNAG_00984	7,62E-06	3,2289	Glicose e ribitol dehidrogenase
	CNAG_03019	2,76E-05	5,87013	CoA ligase de ácido graxo de cadeia longa
	CNAG_06431	6,57E-06	5,64239	Acil-CoA oxidase
	CNAG_03393	4,84E-06	3,56595	Acil-CoA tiolesterase
	CNAG_04392	0,000982754	2,83953	Proteína de ligação a esterol
	CNAG_04238	0,000291386	2,71898	2,4-dienoil-CoA redutase
	CNAG_00524	0,0241264	2,578	Acetil-Coenzima A aciltransferase 2
	CNAG_02139	4,91E-06	2,4718	Proteína de ligação a oxisterol
	CNAG_00371	4,89E-05	2,34604	Enoil-CoA hidratase
	CNAG_00554	0,000418631	2,20906	Inositol fosforilesfingolipidio-fosfolipase C
	CNAG_00537	6,15E-05	2,7752	Carnitina acetiltransferase
	CNAG_05031	0,00397178	2,04064	Succinil-CoA:3-cetoacido-coenzima A transferase
	CNAG_00490	1,30E-05	5,09895	Acetil-CoA C-aciltransferase
	CNAG_03666	0,00139759	5,08676	Acil-CoA dehidrogenase
CNAG_07747	1,13E-05	4,54934	Acil-coenzima A oxidase I	
CNAG_02562	7,88E-06	4,19328	Acil-Coenzima A dehidrogenase	
CNAG_02045	0,000716591	3,65055	Acetoacil-CoA sintetase	
CNAG_05721.2	0,000238056	3,16504	Peroxisomal hidratase-dehidrogenase-	

				epimerase
	CNAG_01116	0,0001426	3,06954	Beta-cetoacil redutase
	CNAG_03555	0,00033875	2,49091	Acilglicerona-fosfato redutase
	CNAG_04308	0,00999522	2,32894	3-hidroxiacil-CoA dehidrogenase
	CNAG_02834	0,00173536	2,20587	UDP-glicose:esterol glicosiltransferase
	CNAG_01671	0,00873689	2,12004	Acetil/propionil CoA carboxilase
	CNAG_00499	0,00383187	2,10977	Carnitina/acil carnitina carreador
	CNAG_06783	0,00982405	2,07159	Enoil redutase
	CNAG_02815	3,18E-06	2,30824	Glicerol-3-fosfato dehidrogenase
	CNAG_05860	0,00187865	2,09731	Esterol O-aciltransferase
	CNAG_06628	0,000278041	2,74167	Aldeido dehidrogenase
	CNAG_06251	0,0282662	2,16432	Serina/Treonina fosfatase
	CNAG_06551	0,00014847	4,5781	Carnitina O-acetiltransferase
<b>Metabolismo de Nitrogênio</b>	CNAG_00710	0,00311582	2,92601	Glutamina sintetase
	CNAG_03243	9,00E-05	3,40319	2-nitropropano dioxigenase
	CNAG_05644	0,00287507	2,16675	2-nitropropano dioxigenase
<b>Metabolismo Secundário</b>	CNAG_06169	0,000437468	3,29424	(R,R)-butanodiol dehidrogenase
	CNAG_06873	0,0286634	3,15452	5-oxoprolinase
	CNAG_06623	0,020747	2,52692	Mio-inositol oxigenase
<b>Outro</b>	CNAG_04815	0,000382811	2,31854	Proteína envolvida na citocinese
	CNAG_02282	0,00628449	2,00433	Carboxipeptidase A4
	CNAG_00638	0,000301859	3,2758	GTPase
	CNAG_03232	0,00136534	2,03696	Lactamase B
	CNAG_00130	6,68E-05	3,21444	CAMK/CAMK1 proteina quinase
	CNAG_03759	0,00043251	5,73768	Proteína 6 específica da conidiação
	CNAG_02295	1,11E-06	4,64925	Fosfotransferase
	CNAG_06494	8,31E-05	4,53906	Proteína com domínio tioredoxina
	CNAG_05310	0,00012115	4,46241	Nipsnap proteina
	CNAG_03729	9,03E-05	3,91647	Proteína de ligação à sequencia alvo do peroxissomo
	CNAG_02006	0,000203607	3,20689	Deamidase
	CNAG_03794	6,19E-06	3,13723	Proteína do retículo endoplasmático
	CNAG_02751	3,57E-05	3,09297	Dehidrogenase
	CNAG_03771	3,54E-06	2,83837	Proteína Ncp1 de ligação ao DNA
	CNAG_02298	0,000859447	2,78276	Proteína da membrana vacuolar
	CNAG_01794	0,00269011	2,68166	2-hidroxiacido dehidrogenase
	CNAG_07765	0,000906904	2,67708	Proteína bli-3
	CNAG_00745	0,00185734	2,58257	Outra/HAL proteina quinase
	CNAG_06220	8,78E-05	2,36958	Alergeno
	CNAG_03519	0,0289536	2,31873	Proteína citoplasmática
	CNAG_04188	0,00192116	2,31615	O-metiltransferase
		0,0329078	2,08285	SXI2
	CNAG_00500	0,000684417	2,01259	PP2Cp proteina fosfatase
	CNAG_06576	0,000245904	2,38555	Alergeno
	CNAG_01252	0,000164882	3,08677	Tiosulfato sulfurtransferase
	CNAG_04096	0,002713	2,09515	Racemase
		0,00158031	2,0117	CAP64
	CNAG_05549	0,00095165	2,13907	CMGC/CDK proteina quinase
	CNAG_00466	0,00480855	2,10482	Adaptina
	CNAG_00923	0,00835961	2,55906	Proteína de membrana
	CNAG_02165	5,40E-05	2,54274	Proteína citoplasmática
	CNAG_02000	0,0054527	2,36741	Dehidrogenase
	CNAG_02335	0,00107181	2,26727	Proteína UPF0364
	CNAG_00403	0,000630868	2,21176	Proteína mitocondrial
	CNAG_01540	0,0143437	2,16453	Dehidrogenase
	CNAG_06399	0,000768922	2,14808	Proteína com domínio SH#
	CNAG_04108	0,000693567	2,12568	Quinase
	CNAG_06074	0,00102321	2,08764	Proteína citoplasmática
	CNAG_06232	9,34E-08	2,07662	TFC7
	CNAG_05889	0,0127154	2,06832	Proteína SH3YL1
	CNAG_07625	0,00467896	2,05702	Proteína da membrana plasmática
	CNAG_02674	0,00163776	2,05302	dJ347H13.4

	CNAG_05097	0,00175191	2,05025	Proteína citoplasmática
	CNAG_03100	0,00437699	2,04373	Proteína citoplasmática
	CNAG_02568	1,64E-05	2,03762	Proteína com domínio UBA/TS-N
	CNAG_02943	0,00288759	2,02573	Proteína citoplasmática
	CNAG_04103	0,00120062	2,02542	Proteína com domínio DUF895
	CNAG_03236	0,0268932	2,01994	Proteína homóloga à AMME síndrome
	CNAG_02444	0,000511863	2,57594	Proteína UPF0103
	CNAG_05229	1,50E-06	5,47933	Proteína da família estomatina
	CNAG_04735	0,0167886	2,14194	Metaloproteinase elastinolítica extracelular
	CNAG_01702	8,85E-07	11,4333	Proteína integral de membrana
	CNAG_07862	8,06E-06	3,94316	Fumarato redutase
<b>Processo Oxidação/Redução</b>	CNAG_01257	0,00235276	2,16239	Aldo-ceto redutase
	CNAG_05299	0,000313627	3,16418	Oxidoreductase
	CNAG_01102	6,76E-05	2,69684	Oxidoreductase
	CNAG_04415	0,0035897	2,04908	Oxidoreductase
<b>Proteína Peroxissomal</b>	CNAG_02939	0,00317801	2,01597	Proteína peroxissomal Pex3p
	CNAG_02728	0,0115602	2,27902	Proteína peroxissomal pex13
	CNAG_01926	0,000114549	2,71449	Proteína peroxissomal pex5
	CNAG_02096	0,000136223	2,00305	Proteína peroxissomal pex16
	CNAG_04324	0,0275087	2,0353	Proteína Atg22B-1p
	CNAG_00171	0,00173406	2,17066	Proteína peroxissomal
<b>Reparo de DNA</b>	CNAG_05468	0,012355	2,08199	DNA-(apurinica ou apirimidinica) liase
	CNAG_03213	5,13E-07	2,72419	UV-endonuclease UVE-1
<b>Transcrição/Tradução</b>	CNAG_04345	0,000560826	2,59053	Fator transcricional específico da RNA polimerase II
	CNAG_04359	5,08E-05	2,45035	Proteína prib
	CNAG_05290	0,0481456	2,1349	Cofator transcricional
	CNAG_03345	0,00113808	2,12449	Proteína SSD1
	CNAG_06267	1,84E-06	4,92199	Proteína Rds1
	CNAG_05431	7,92E-05	2,35788	Fator transcricional PacC
	CNAG_03563	0,00150918	2,02203	Aspartato-tRNA ligase
<b>Transporte</b>	CNAG_02288	8,65E-06	2,68543	Transportador succinato:fumarato antiporter
	CNAG_00869	1,69E-06	9,18377	Transportador ABC
	CNAG_04142	0,000269583	4,06551	Transportador de tartrato
	CNAG_01384	5,58E-06	8,88579	bodown198
	CNAG_00284	0,000564434	5,29626	Proteína de efluxo
	CNAG_04632	0,00197619	3,02186	Uracil permease
	CNAG_02764	6,01E-05	2,98599	Proteína adrenoleucodistrofia
	CNAG_02355	0,000127573	2,6483	Transportador de UDP-N-acetilglicosamina
	CNAG_07368	0,0242273	2,45839	Canal de calcio
	CNAG_04098	0,0177936	2,09019	Transportador de xenobioticos - ATPase
	CNAG_00531	6,72E-08	5,12058	ENA P-type ATPase 1
	CNAG_03565	4,42E-07	4,00889	Exportador de hidrogenio- ATPase
	CNAG_05616	0,000246196	2,30503	Transportador ABC
	CNAG_05929	0,000350612	2,95817	MFS maltose permease MalP
	CNAG_01690	0,000493515	3,79863	Transportador MFS
	CNAG_06290	0,000136305	2,44559	Transportador de açúcar
	CNAG_07641	5,30E-07	2,30379	Transportador de monosacarideo
	CNAG_05914	0,00231023	2,04672	MFS maltose permease MalP
	CNAG_07874	0,00131276	20,5012	Transportador de açúcar
	CNAG_05662	2,31E-07	17,4444	Transportador de açúcar
	CNAG_02733	1,71E-05	7,06364	Transportador de monosacarideo
	CNAG_01936	0,00386505	6,84072	Transportador de açúcar
	CNAG_03772	1,71E-05	6,70411	Transportador de glicose
	CNAG_03910	6,77E-07	6,64142	Transportador D-xilose-proton symporter
	CNAG_04795	0,000288945	2,26578	Transportador de adenina
	CNAG_01742	0,00178248	3,15867	Canal de água
	CNAG_07367	0,00284469	2,42433	Transportador de aminoacido
	CNAG_00597	1,23E-05	2,02331	Transportador de aminoacido
	CNAG_05685	0,000276745	3,44863	Transportador de aminoacido neutro
	CNAG_04758	0,000293247	2,41737	Transportador de amonia
	CNAG_01232	0,00173962	2,39953	Transportador de calcio- ATPase

	CNAG_00749	0,000330376	4,50067	Transportador de enxofre alternativo
	CNAG_03051	1,25E-06	3,38077	Transportador de poliamina
	CNAG_04276	0,0123845	2,0176	Citosina-purina permease
	CNAG_03060	1,07E-07	6,03422	Transportador MDR
	CNAG_02527	0,00010829	2,41855	Transportador MDR
	CNAG_05994	0,00679695	2,30937	Transportador MDR
	CNAG_00003	0,0379744	2,27497	Transportador MDR
<b>Ubiquitinação</b>	CNAG_05896	0,0105548	2,82669	Uba2
	CNAG_01732	1,05E-05	2,50643	NPL4
	CNAG_02214	0,0154259	2,31002	Enzima de conjugação da ubiquitina
	CNAG_04668	0,00494819	2,09943	E2 enzima de conjugação da ubiquitina
	CNAG_04724	0,000177319	2,01822	Proteína Ube3c
<b>Via das Pentose Fosfato</b>	CNAG_00827	0,0234927	3,00641	Ribose 5-fosfato isomerase
	CNAG_02230	0,000331045	2,71872	Fosfocetolase
<b>Proteína Hipotética</b>	CNAG_00844	0,00610033	31,2176	-----
	CNAG_07869	0,00395521	24,5501	-----
	CNAG_03068	0,000122451	9,56139	-----
	CNAG_05430	5,67E-07	8,71464	-----
	CNAG_02347	0,00023042	7,71169	-----
	CNAG_04837	6,71E-06	7,15172	-----
	CNAG_03692	3,98E-07	5,22475	-----
	CNAG_00129	2,16E-05	5,03713	-----
	CNAG_04585	0,000160756	4,90267	-----
	CNAG_02591	3,95E-06	4,70709	-----
	CNAG_04663	7,04E-05	4,52665	-----
	CNAG_01354	7,48E-05	4,42214	-----
	CNAG_03873	5,34E-05	4,27881	-----
	CNAG_00542	3,40E-05	4,23335	-----
	CNAG_03394	9,78E-06	4,22103	-----
	CNAG_02694	0,00069985	4,11009	-----
	CNAG_01925	3,13E-06	4,10947	-----
	CNAG_04163	9,30E-06	4,05104	-----
	CNAG_02129	0,000115764	3,97405	-----
	CNAG_01417	0,000324077	3,96613	-----
	CNAG_03495	6,69E-05	3,954	-----
	CNAG_02102	0,0294522	3,79045	-----
	CNAG_00559	0,000137306	3,79036	-----
	CNAG_05508	0,00805239	3,77346	-----
	CNAG_00522	1,22E-05	3,72809	-----
	CNAG_04185	0,000159698	3,65504	-----
	CNAG_05309	2,02E-05	3,63044	-----
	CNAG_00052	1,23E-06	3,61369	-----
	CNAG_05161	0,000767847	3,54407	-----
	CNAG_02405	5,31E-05	3,51154	-----
	CNAG_00961	0,000228944	3,51059	-----
	CNAG_05449	2,32E-05	3,4937	-----
	CNAG_00871	0,000470255	3,48129	-----
	CNAG_06238	0,000209149	3,37153	-----
	CNAG_05130	0,000515467	3,37024	-----
	CNAG_04675	0,000312242	3,33447	-----
	CNAG_01419	0,000922921	3,33087	-----
	CNAG_06532	0,000143712	3,21981	-----
	CNAG_02978	0,00170345	3,17452	-----
	CNAG_01031	0,000317717	3,17006	-----
	CNAG_00848	0,000282833	3,1508	-----
	CNAG_01082	4,62E-05	3,06121	-----
	CNAG_01847	0,00031019	3,06055	-----
	CNAG_06233	0,0113149	3,01821	-----
	CNAG_00091	3,70E-05	2,97804	-----
	CNAG_00306	0,000256238	2,91647	-----
	CNAG_03425	0,00193166	2,90318	-----
	CNAG_03082	4,28E-05	2,90137	-----

---

CNAG_07512	0,000240509	2,88777	-----
CNAG_03719	0,00573449	2,88752	-----
CNAG_04106	6,09E-07	2,8102	-----
CNAG_04885	0,0423974	2,80732	-----
CNAG_07813	0,0321048	2,79109	-----
CNAG_06583	0,000178131	2,76876	-----
CNAG_04394	0,00295206	2,75153	-----
CNAG_00079	0,000172574	2,74434	-----
CNAG_02362	6,87E-05	2,74084	-----
CNAG_07308	3,26E-05	2,70691	-----
CNAG_05784	0,000171094	2,67849	-----
CNAG_01052	0,000121223	2,67104	-----
CNAG_07631	0,000887002	2,66615	-----
CNAG_02942	7,78E-06	2,66037	-----
CNAG_06355	4,69E-05	2,65531	-----
CNAG_03046	0,000238592	2,64275	-----
CNAG_06877	0,000239642	2,64012	-----
CNAG_03059	0,000497704	2,63398	-----
CNAG_01751	0,000107808	2,63338	-----
CNAG_04361	1,62E-05	2,60014	-----
CNAG_02595	0,00673302	2,58029	-----
CNAG_02593	0,000127253	2,57649	-----
CNAG_02423	0,000228777	2,57478	-----
CNAG_04937	5,19E-05	2,52338	-----
CNAG_07777	0,0462592	2,49779	-----
CNAG_02026	0,042751	2,49749	-----
CNAG_07659	0,0438406	2,4733	-----
CNAG_00093	0,00930787	2,40346	-----
CNAG_02044	0,00982139	2,3962	-----
CNAG_01387	4,86E-05	2,39258	-----
CNAG_04789	0,00324083	2,38094	-----
CNAG_05482	0,000113239	2,37133	-----
CNAG_04353	0,000257922	2,37076	-----
CNAG_03114	0,00414193	2,35028	-----
CNAG_00595	0,00108203	2,33983	-----
CNAG_02757	0,000879458	2,33631	-----
CNAG_03561	7,92E-05	2,33456	-----
CNAG_03705	0,00918168	2,32415	-----
CNAG_04901	0,0101644	2,31596	-----
CNAG_00555	0,00338116	2,31196	-----
CNAG_02047	0,0026923	2,30115	-----
CNAG_05383	0,00885372	2,29353	-----
CNAG_00766	4,62E-06	2,29265	-----
CNAG_00765	0,0114651	2,287	-----
CNAG_06493	0,00113771	2,27932	-----
CNAG_03727	0,00449105	2,26653	-----
CNAG_05939	0,000855718	2,26348	-----
CNAG_03881	0,000190813	2,26169	-----
CNAG_06109	2,51E-05	2,26084	-----
CNAG_05339	0,0116159	2,25311	-----
CNAG_03679	0,00179002	2,24876	-----
CNAG_01892	0,000181275	2,23841	-----
CNAG_03408	1,50E-05	2,23787	-----
CNAG_00995	0,000270227	2,22924	-----
CNAG_03595	0,000245959	2,21447	-----
CNAG_06453	0,001583	2,20403	-----
CNAG_01753	0,000406698	2,20122	-----
CNAG_02146	0,0106326	2,19541	-----
CNAG_03667	0,000220072	2,18953	-----
CNAG_02398	5,56E-05	2,18581	-----
CNAG_00756	0,0104219	2,17695	-----
CNAG_03872	0,00350764	2,17439	-----

---

---

CNAG_07541	0,00493361	2,17265	-----
CNAG_03178	0,0022565	2,16793	-----
CNAG_01010	0,0139943	2,15643	-----
CNAG_06396	0,0232856	2,15314	-----
CNAG_05466	0,0302886	2,14873	-----
CNAG_02655	0,000155153	2,14473	-----
CNAG_02351	0,00236168	2,14243	-----
CNAG_04412	1,75E-05	2,12592	-----
CNAG_00497	0,000147951	2,11658	-----
CNAG_06918	0,0444964	2,11153	-----
CNAG_05410	0,000536892	2,10176	-----
CNAG_06791	0,000899306	2,0958	-----
CNAG_07542	0,000855546	2,08124	-----
CNAG_07775	0,00112943	2,07361	-----
CNAG_00374	0,00113131	2,07294	-----
CNAG_04459	0,00332924	2,07193	-----
CNAG_01011	0,002369	2,05885	-----
CNAG_05178	0,00138308	2,05042	-----
CNAG_05639	0,00171479	2,03289	-----
CNAG_07912	0,0119823	2,01817	-----
CNAG_02877	0,000119003	2,0102	-----
CNAG_07661	0,00432955	2,00897	-----
CNAG_00315	0,00120539	2,00838	-----

---

\* Número de acesso dos genes relacionados no projeto genoma de *Cryptococcus neoformans var. grubii* realizado pelo *Broad Institute* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans))

**ANEXO 2** – Genes de *C. neoformans* cujo acúmulo de transcrito foi diminuído após internalização do fungo pela ameba *A. castellanii*.

<b>Categoria</b>	<b>Número de Acesso *</b>	<b>p-value</b>	<b>Varição da Expressão</b>	<b>Produto do Gene</b>	
<b>Biossíntese de ergosterol</b>	CNAG_00854	0,00220454	-2,31973	C-8 esterol isomerase	
	CNAG_00040	0,000484401	-2,56624	Lanosterol 14 alfa-demetilase	
	CNAG_04687	0,00212764	-2,82949	Estearoil-CoA 9-desaturase	
	CNAG_06644	0,000273909	-2,96076	C-22 esterol desaturase	
	CNAG_06829	4,45E-05	-3,34867	Esqualeno monooxigenase	
	CNAG_00519	3,49E-06	-3,97719	C-5 esterol desaturase	
	CNAG_01737	5,35E-05	-5,10666	C-4 metil esterol oxidase	
<b>Fosforilação Oxidativa</b>	CNAG_05842	3,24E-05	-2,30706	Citocromo P450	
	CNAG_04000	0,0101756	-2,45956	Citocromo c oxidase COX11	
	CNAG_04313	0,000176193	-2,47421	NADPH dehidrogenase 2	
	CNAG_05626	0,000184796	-3,39215	h-sco1	
<b>Estresse oxidativo</b>	CNAG_00162	0,000713511	-6,48446	Oxidase alternativa	
	CNAG_01464	0,000535206	-3,22744	Flavo-hemoglobina	
<b>Metabolismo de aminoácido</b>	CNAG_05676	0,000200462	-3,30706	Tirosina aminotransferase	
	CNAG_05755	0,000168726	-2,51315	Glutaciona S-transferase 6	
<b>Metabolismo de carboidrato</b>	CNAG_06052	0,000332768	-2,11506	Galactose-1-fosfato uridililtransferase	
	CNAG_01940	0,0129353	-2,12787	Alfa-amilase A	
	CNAG_06050	0,00813017	-2,8211	Uge2p	
	CNAG_06924	2,35E-05	-2,9659	Beta-frutofuranosidase	
	CNAG_06638	0,000499208	-3,10175	Malato dehidrogenase	
	CNAG_04659	1,38E-06	-3,97919	Piruvato decarboxilase	
	CNAG_05695	7,36E-06	-2,47046	Glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferase	
	CNAG_00407	7,76E-05	-2,14987	Glioxal oxidase	
	CNAG_03226	7,73E-05	-2,29559	Succinato dehidrogenase	
	<b>Metabolismo de lipídio</b>	CNAG_06922	0,00820362	-2,0771	Proteína anon-23 Da
CNAG_05583		0,00197023	-2,15532	Glucosilceramida sintase	
CNAG_02087		9,30E-06	-7,58831	Esfingosina N-aciltransferase	
CNAG_03822		0,00240778	-3,07453	Tafazzin exon 5 e exon 9	
<b>Metabolismo de nitrogênio</b>	CNAG_01231	0,00041336	-3,88312	Arginase	
<b>Metabolismo secundário</b>	CNAG_03311	0,0243414	-2,22329	Hidroximetilglutaril-CoA sintase	
	CNAG_00590	0,00103138	-2,24817	4-amino-4-deoxicorismato sintase	
	CNAG_02870	0,00653757	-2,51297	Tetrahidrofolilpoliglutamato sintase	
	CNAG_01539	7,66E-06	-2,58216	Inositol-3-fosfato sintase	
	CNAG_04417	0,00238021	-2,58554	2,4-diclorofenoxiacetato alfa-cetoglutarato dioxigenase	
	CNAG_02896	0,0025516	-2,59425	Hidroximetilglutaril-CoA sintase	
	CNAG_02181	0,000233298	-2,78777	Dihidrocaempferol 4-redutase	
	CNAG_02542	0,000216341	-2,41848	Frutosamina quinase	
	CNAG_01542	0,000135902	-2,11763	Taurina catabolismo dioxigenase TauD	
	<b>Outros</b>	CNAG_03806	0,000126316	-2,01364	Aciltransferase
		CNAG_03124	0,0110875	-2,14287	Proteína com domínio WD repetitivo
		CNAG_03589	0,0089481	-2,17043	Adrenodoxina-type ferredoxina
CNAG_06649		0,000866838	-2,21614	Haloacido dehalogenase	
CNAG_03302		0,0220466	-2,22074	Proteína citoplasmática	
CNAG_05109		3,49E-05	-2,25363	Proteína com domínio CBS and PB1	
CNAG_02264		8,16E-06	-2,25762	AFG1- ATPase	
CNAG_06082		0,0114974	-2,44566	Antígeno de hipersensibilidade tardia	
CNAG_03079		2,41E-06	-2,78897	Proteína CAB2	
CNAG_01298		3,08E-05	-2,85907	Hidrolase	
CNAG_00259	0,0052244	-3,02969	Proteína bud site selection		

	CNAG_05968	0,0052236	-3,15465	Cdc42
	CNAG_02122	0,00664836	-2,009	Proteína mitocondrial
	CNAG_01379	0,00169513	-2,03348	Proteína UPF0390
	CNAG_01310	0,00135276	-2,03371	Proteína nucleolar
	CNAG_05672	0,00113497	-2,05028	Proteína nucleolar
	CNAG_02286	0,00979569	-2,14743	Proteína citoplasmática
	CNAG_06295	0,0471026	-2,14865	Proteína citoplasmática
	CNAG_01914	0,0051638	-2,15316	Proteína mitocondrial
	CNAG_06698	1,19E-05	-2,17279	Fosfatase
	CNAG_07735	0,0066927	-2,96598	Proteína de interação daxx MSP58/p78
	CNAG_00486	0,000904896	-3,2135	Proteína mitocondrial
	CNAG_05239	0,00129774	-3,30685	Proteína citoplasmática
	CNAG_04757	1,82E-05	-3,6245	Proteína mitocondrial
	CNAG_03964	0,00131172	-3,65258	Proteína da família zinc knuckle
	CNAG_03695	0,00448334	-4,03877	Cas41p
	CNAG_05370	1,03E-05	-4,69223	Proteína integral de membrana
	CNAG_00453	5,51E-05	-5,03991	Proteína mitocondrial
	CNAG_02011	7,01E-05	-2,45357	Enzima com domínio PQQ repetitivo
	CNAG_04899	0,0305125	-2,11659	Proteína citoplasmática
	CNAG_04514	0,000227332	-2,20017	Proteína quinase CMGC/MAPK/ERK Subunidade alfa da proteína heterotrimerica G
	CNAG_00179	0,00997069	-2,72609	
	CNAG_00727	0,000683352	-2,04875	Proteína mitocondrial
<b>Parede celular</b>	CNAG_01239	3,70E-05	-2,06701	Chitina deacetilase
	CNAG_06835	0,00212224	-2,12221	Glicosidase
	CNAG_06336	0,000601657	-2,13151	Glucana 1,3 beta-glicosidase
	CNAG_06487	0,0387532	-2,32409	Chitin sintase 6
	CNAG_02217	0,00134202	-2,56894	Chitina sintase 7
<b>Processo oxidação/redução</b>	CNAG_04521	0,00879234	-2,16539	Oxidoreductase
	CNAG_05875	0,000797144	-2,25301	Citocromo c heme liase
	CNAG_06081	1,55E-06	-3,35611	Glucose oxidase
	CNAG_00413	6,97E-06	-3,37838	Proteína nuclear
	CNAG_00541	7,26E-05	-3,47134	Dimetilnilina monooxigenase
	CNAG_04085	7,84E-05	-4,76438	Oxidoreductase
	CNAG_01939	6,15E-07	-5,14025	fmHP
	CNAG_02460	4,78E-06	-5,20368	Coproporfirinogeno oxidase
	CNAG_02577	8,51E-06	-5,33935	Oxidoreductase
	CNAG_00876	0,000597734	-2,39397	Redutase quelante de ferro
	CNAG_06554	0,00112391	-2,05885	FAD dependente oxidoreductase
	CNAG_07782	0,000536655	-2,14219	Oxidoreductase
<b>Replicação</b>	CNAG_05145	0,0157926	-2,03212	DNA helicase
	CNAG_02583	0,00819014	-2,51264	Proteína Trmt11
<b>Transcrição/Tradução</b>	CNAG_05085	0,0318142	-2,20007	Deoxihipusina hidroxilase
	CNAG_04072	0,0255046	-2,0384	Proteína da subunidade ribossomal maior
	CNAG_04571	0,00121114	-2,09541	rRNA (adenina-N6,N6-)-dimetiltransferase
	CNAG_07535	0,000883274	-2,10052	Proteína ribossomal mitocondrial s24
	CNAG_03634	0,0398437	-2,10097	Subunidade alfa da RNA polimerase I
	CNAG_03001	0,00586523	-2,21847	Proteína de ligação ao transcrito primário da rRNA
	CNAG_06441	0,000650576	-2,05407	Isoleucil-tRNA sintetase
	CNAG_05920	0,000232476	-2,05457	tRNA específico adenosina deaminase
	CNAG_06495	0,00205972	-2,00016	Ribonuclease H
	CNAG_00793	0,000154614	-2,01068	Polipeptídeo de 24 Kda da RNA polymerase II dependente de DNA
	CNAG_01141	0,0355563	-2,0284	3'-5'-exoribonuclease
	CNAG_02936	0,00231689	-2,12962	3'-5' exoribonuclease

CNAG_04513	0,00104947	-2,13376	RNA polimerase dependente de DNA
CNAG_01788	0,00187954	-2,15357	tRNA guanililtransferase
CNAG_04387	0,00224432	-2,15415	Fator de splicing de pre-mRNA
CNAG_05597	0,0133099	-2,15993	Fator FAP7 de ativação de POS9
CNAG_02672	0,00335148	-2,20982	Proteína de ligação ao RNA
CNAG_00147	0,000236167	-2,23502	Fator de splicing Prp8
CNAG_05485	0,0108622	-2,25053	tRNA metiltransferase subunidade Cpd1
CNAG_00706	0,0156515	-2,32168	Proteína de ligação ao RNA rnp24
CNAG_06446	0,000994339	-2,46202	Supressor de splicing mitocondrial
CNAG_02166	0,00828741	-2,5052	Subunidade maior da RNA polimerase II
CNAG_0757	0,0121023	-2,62746	Fator transcricional de elongação da pol II
CNAG_02090	0,00935668	-2,6347	Subunidade alfa-2 da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina
CNAG_06774	0,00362604	-2,66686	tRNA (guanina-N7-)-metiltransferase
CNAG_01296	0,00416309	-2,69059	Fator de transcrição da RNA polimerase I
CNAG_00603	0,00187667	-2,73816	Proteína PNO1 de processamento do pre-rRNA
CNAG_03246	0,00159689	-2,76791	RNA-3'-fosfato ciclase
CNAG_03636	0,00139515	-3,27325	RNA polimerase dependente de DNA
CNAG_03129	9,69E-05	-3,31053	Fator de transcrição iiii
CNAG_05392	0,000773591	-3,33577	Fator de transcrição específico da RNA polimerase II
CNAG_03205	0,00993519	-3,33787	RNA helicase ROK1 dependente de ATP
CNAG_03902	0,000660164	-3,37318	Proteína regulatória da transcrição
CNAG_07609	0,00124454	-3,37582	RNA helicase dependente de ATP
CNAG_01179	0,00660727	-3,50448	RPA42
CNAG_03521	4,01E-05	-3,72446	Subunidade menor da RNA polimerase III
CNAG_06756	6,14E-05	-3,82185	Proteína ESF2 de processamento do pre-rRNA
CNAG_01810	0,00458911	-4,06344	RNA polimerase I dependente de DNA
CNAG_00292	0,0023273	-2,0004	Proteína ZPR1 com domínio dedo-de-zinco
CNAG_01236	0,0122198	-2,05048	Ebp2p
CNAG_03986	0,00145119	-2,09123	Proteína NAM9
CNAG_04298	0,0203282	-2,18906	AD24
CNAG_07466	0,00258837	-2,22537	Proteína com domínio WD repetitivo
CNAG_01345	0,000720187	-2,24279	Proteína mitocondrial ribossomal da subunidade S2
CNAG_02382	0,0196089	-2,25852	Proteína BRX1 de biogênese do ribossomo
CNAG_03953	0,00137875	-2,26128	Proteína da família SUA5/yciO/yrdC
CNAG_00449	0,00783719	-2,32443	Proteína art-4
CNAG_07864	0,0047612	-2,33254	Ribonucleoproteína IMP3
CNAG_07657	0,0262745	-2,36746	Proteína 4 do complexo nucleolar
CNAG_02162	0,00765439	-2,40181	ORF 111 do cromossomo 14
CNAG_01432	0,00403944	-2,42964	Proteína com domínio WD repetitivo
CNAG_03789	0,0225031	-2,45118	ORF 33 do cromossomo 1
CNAG_04044	0,00202825	-2,47172	Proteína U3 snoRNP
CNAG_00775	0,0448084	-2,49547	Proteína com domínio trp-asp repetitivo
CNAG_01687	0,00434552	-2,52106	Proteína quinase atípica/RIO
CNAG_07413	0,00415551	-2,52648	Proteína nucleolar de ligação ao GTP
CNAG_02960	0,000259546	-2,53934	MipD
CNAG_02185	0,00837758	-2,55554	Proteína nuclear
CNAG_03300	0,00361336	-2,57986	Proteína RRP1B
CNAG_01812	0,00721867	-2,58048	Proteína RLP24 de biogênese do ribossomo
CNAG_05004	0,0226063	-2,67862	Proteína LepA de ligação ao GTP
CNAG_06468	0,0143881	-2,69118	Proteína nucleolar 1 de ligação a GTP
CNAG_03603	0,00820064	-2,75089	RNA helicase HAS1 dependente de ATP
CNAG_06589	8,34E-05	-3,04049	Endorribonuclease L-PSP

	CNAG_06363	0,000978854	-3,24752	Proteína nucleolar
	CNAG_01791	0,00152218	-3,44965	Proteína coiled-coil
<b>Transporte</b>	CNAG_03101	0,000498993	-2,18668	Proteína de efluxo EncT
	CNAG_01003	0,000311006	-2,20529	Transportador de electron
	CNAG_05075	0,0452857	-2,22692	Transportadorsimporte de sodio:fosfato inorganico
	CNAG_02539	0,00431376	-2,24107	Transportador de aminoacido
	CNAG_07917	0,0121579	-2,24493	Transportador uracil FurD
	CNAG_07799	0,000730043	-2,35743	Transportador ABC
	CNAG_04210	2,21E-05	-2,3879	Transportador de açúcar
	CNAG_04712	2,61E-05	-2,56291	Transportador de ácido dicarboxílico
	CNAG_06610	0,000642663	-2,57432	Transportador MSF
	CNAG_03713	0,000595369	-2,57971	Proteína de efluxo EncT
	CNAG_06034	0,000136963	-2,77689	Alantoina permease
	CNAG_03426	0,000375495	-2,94678	Transportador de GDP-manose
	CNAG_06119	0,000392572	-3,37743	Transportador de espermina
	CNAG_01288	0,000664348	-3,53547	Proteína mitocondrial carreador rim2
	CNAG_00539	8,24E-06	-3,69448	Proteína transmembrânica
	CNAG_07695	4,44E-05	-3,72641	Transportador de gama-ácido aminobutirico
	CNAG_03438	4,57E-05	-3,94741	Transportador de hexose
	CNAG_02104	0,000169598	-4,14466	Transportador de fosfatidilinositol
		0,00174064	-4,4277	Transportador de hexose
	CNAG_00895	0,00199728	-4,53653	Transportador de zinco
	CNAG_01946	0,000619793	-4,59667	Alantoato permease
	CNAG_02361	0,000346243	-4,90012	Transportador transmembrana Liz1p
	CNAG_04794	5,06E-06	-5,40549	Transportador de espermina
	CNAG_03140	2,79E-06	-6,42825	Transportador de açúcar
	CNAG_06537	0,00577483	-2,1689	Transportador de ácido monocarboxílico
	CNAG_07387	6,30E-05	-2,04064	Transportador de ferro/sideroforo Str3
<b>Ubiquitinação</b>	CNAG_01279	0,00290532	-2,10615	Enzima de conjugação da ubiquitina E2S
	CNAG_00928	0,0419505	-2,80835	Peptidase
<b>Proteína hipotética</b>	CNAG_04998	0,0418074	-2,0117	-----
	CNAG_06245	0,014106	-2,01182	-----
	CNAG_01718	0,00231561	-2,01279	-----
	CNAG_02952	0,000391274	-2,01359	-----
	CNAG_04237	0,00608204	-2,01431	-----
	CNAG_01950	9,20E-05	-2,02548	-----
	CNAG_05438	0,00364577	-2,03115	-----
	CNAG_06005	0,00176823	-2,03192	-----
	CNAG_02025	0,0018318	-2,03291	-----
	CNAG_03952	0,0115786	-2,04036	-----
	CNAG_04292	0,0263063	-2,04036	-----
	CNAG_03857	0,00183331	-2,04111	-----
	CNAG_03233	0,0144108	-2,04372	-----
	CNAG_02515	0,00121691	-2,04487	-----
	CNAG_07518	0,0213306	-2,04521	-----
	CNAG_02791	7,47E-05	-2,05572	-----
	CNAG_00349	0,00552052	-2,05716	-----
	CNAG_02299	4,33E-05	-2,0617	-----
	CNAG_03878	0,00470049	-2,06434	-----
	CNAG_00195	0,00396017	-2,06644	-----
	CNAG_04646	0,00446608	-2,07006	-----
	CNAG_00941	1,17E-05	-2,07216	-----
	CNAG_00444	0,00032162	-2,0723	-----
	CNAG_00157	0,00245664	-2,07259	-----

CNAG_00844	0,0390912	-2,07352	-----
CNAG_01796	0,00424844	-2,07593	-----
CNAG_01132	0,000279764	-2,0762	-----
CNAG_06916	0,0437744	-2,07732	-----
CNAG_02105	0,00808659	-2,07937	-----
CNAG_07884	8,18E-05	-2,08003	-----
CNAG_03227	0,00246419	-2,0809	-----
CNAG_02220	0,0267209	-2,08541	-----
CNAG_05032	0,000551951	-2,08631	-----
CNAG_01757	0,0197181	-2,08776	-----
CNAG_03951	0,00602203	-2,08832	-----
CNAG_02190	0,000934288	-2,10241	-----
CNAG_00456	5,54E-06	-2,10565	-----
CNAG_03954	0,00218325	-2,11031	-----
CNAG_02145	0,0263249	-2,11907	-----
CNAG_00513	0,0408953	-2,12178	-----
CNAG_06319	0,00201177	-2,12239	-----
CNAG_03230	0,00734096	-2,13082	-----
CNAG_00577	0,00641823	-2,13275	-----
CNAG_07758	5,97E-05	-2,13465	-----
CNAG_04037	0,00409282	-2,14148	-----
CNAG_06520	0,00354324	-2,14249	-----
CNAG_05530	0,000269004	-2,14341	-----
CNAG_07594	0,000395915	-2,14589	-----
CNAG_02386	0,0232401	-2,15097	-----
CNAG_01367	0,00250817	-2,16924	-----
CNAG_02454	0,0268211	-2,17564	-----
CNAG_00628	0,00742267	-2,17723	-----
CNAG_02520	0,00920469	-2,18003	-----
CNAG_05698	0,00104332	-2,18125	-----
CNAG_03098	0,00186821	-2,18785	-----
CNAG_05888	0,000246749	-2,19168	-----
CNAG_07568	0,00213992	-2,19254	-----
CNAG_04817	0,000512386	-2,20826	-----
CNAG_04395	0,00499919	-2,22774	-----
CNAG_02393	0,000358584	-2,22955	-----
CNAG_02555	0,0391792	-2,23412	-----
CNAG_00378	0,00870568	-2,23937	-----
CNAG_07305	0,000478003	-2,25225	-----
CNAG_05801	9,19E-05	-2,25674	-----
CNAG_00786	0,000644903	-2,25815	-----
CNAG_07672	0,00290938	-2,26479	-----
CNAG_03921	0,00216441	-2,26628	-----
CNAG_02821	0,000366012	-2,27736	-----
CNAG_01874	0,00823144	-2,28227	-----
CNAG_04367	0,000332133	-2,28278	-----
CNAG_06535	0,0209475	-2,29737	-----
CNAG_01098	0,00893893	-2,30007	-----
CNAG_04102	0,000455644	-2,30998	-----
CNAG_03653	0,00728722	-2,32698	-----
CNAG_05245	0,00292112	-2,34276	-----
CNAG_03513	0,00317999	-2,35109	-----
CNAG_03414	0,00489349	-2,35172	-----
CNAG_03064	0,000410075	-2,35849	-----

CNAG_07536	0,0167984	-2,36017	-----
CNAG_01865	0,00552216	-2,36364	-----
CNAG_03284	0,00489084	-2,37526	-----
CNAG_00980	5,49E-05	-2,37567	-----
CNAG_06955	0,000533515	-2,37812	-----
CNAG_03293	0,000987887	-2,40581	-----
CNAG_07787	0,0144672	-2,41502	-----
CNAG_00899	0,00228226	-2,42548	-----
CNAG_02910	0,0301735	-2,45926	-----
CNAG_00903	4,18E-06	-2,46071	-----
CNAG_01781	0,0113249	-2,46139	-----
CNAG_07533	0,00761439	-2,47047	-----
CNAG_01629	0,00228501	-2,49239	-----
CNAG_01716	0,00204724	-2,49279	-----
CNAG_03312	0,000372465	-2,49347	-----
CNAG_06729	0,00682057	-2,51989	-----
CNAG_06156	0,00551573	-2,53303	-----
CNAG_01171	0,00327453	-2,55117	-----
CNAG_04060	0,00692771	-2,59301	-----
CNAG_02054	0,0198888	-2,5962	-----
CNAG_07519	0,0137114	-2,61764	-----
CNAG_04053	0,0211123	-2,61937	-----
CNAG_03645	0,00274837	-2,62113	-----
CNAG_00669	7,70E-05	-2,63828	-----
CNAG_07465	0,000684535	-2,68751	-----
CNAG_04804	0,00116857	-2,71975	-----
CNAG_06340	0,00175243	-2,72387	-----
CNAG_03647	0,000310374	-2,7314	-----
CNAG_05853	0,000659997	-2,76055	-----
CNAG_00454	0,000568784	-2,7729	-----
CNAG_04355	0,00313975	-2,79659	-----
CNAG_06087	0,0203019	-2,80496	-----
CNAG_05473	0,000274249	-2,83606	-----
CNAG_01621	3,00E-05	-2,83657	-----
CNAG_04027	1,64E-06	-2,87039	-----
CNAG_03625	0,000586157	-2,93943	-----
CNAG_01034	0,0313066	-2,98459	-----
CNAG_04818	5,27E-05	-3,00388	-----
CNAG_05911	1,62E-05	-3,01497	-----
CNAG_02101	0,00108633	-3,10593	-----
CNAG_01619	0,00221862	-3,12124	-----
CNAG_01761	0,000631903	-3,13888	-----
CNAG_05452	0,000270176	-3,18466	-----
CNAG_06126	7,48E-05	-3,22175	-----
CNAG_00488	0,00764884	-3,23917	-----
CNAG_05757	7,93E-06	-3,28037	-----
CNAG_03223	0,00097521	-3,39145	-----
CNAG_02804	0,00126748	-3,44863	-----
CNAG_06378	0,000280793	-3,46912	-----
CNAG_05854	0,000693653	-3,47466	-----
CNAG_00887	0,042695	-3,61709	-----
CNAG_01945	0,00625975	-3,64708	-----
CNAG_04086	0,0162546	-3,69404	-----
CNAG_05228	0,000121596	-3,76924	-----

CNAG_03716	0,000123302	-3,7713	-----
CNAG_06491	0,0136094	-3,98538	-----
CNAG_06297	2,37E-06	-4,60561	-----
CNAG_06341	8,80E-06	-4,90376	-----
CNAG_00814	5,17E-07	-4,9423	-----
CNAG_07920	1,07E-06	-5,37886	-----
CNAG_04891	0,000125362	-5,38601	-----
CNAG_00582	2,30E-05	-5,55713	-----
CNAG_01803	8,01E-08	-5,56394	-----
CNAG_05741	1,00E-05	-5,82377	-----
CNAG_00813	2,17E-05	-5,87379	-----
CNAG_05855	1,46E-06	-5,88634	-----
CNAG_06346	0,000688591	-7,61411	-----
CNAG_01369	3,73E-07	-8,89767	-----
CNAG_06298	2,43E-06	-11,0197	-----
CNAG_06590	2,50E-07	-11,3003	-----
CNAG_06388	1,44E-06	-11,352	-----
CNAG_06207	4,71E-07	-13,9945	-----

---

\* Número de acesso dos genes relacionados no projeto genoma de *Cryptococcus neoformans var. grubii* realizado pelo *Broad Institute* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans))

**ANEXO 3** – Genes de *C. neoformans* cujo acúmulo de transcrito foi aumentado após internalização do fungo por macrófagos murinos J774.1.

<b>Categoria</b>	<b>Número de acesso *</b>	<b>p-value</b>	<b>Varição da expressão</b>	<b>Produto do gene</b>	
<b>Chaperona</b>	CNAG_03487	0,00780918	2,95589	Proteína com domínio DNAJ	
	CNAG_00100	0,00108508	2,68923	Chaperona	
	CNAG_06150	0,0055467	2,59543	Proteína de choque térmico 90	
	CNAG_05932	0,0019177	2,59122	Peptidil-prolil cis-trans isomerase D	
	CNAG_01750	0,0014441	2,24239	Chaperona	
	CNAG_07347	0,00391226	2,06539	Proteína de choque térmico	
	CNAG_03891	0,00205013	2,03814	Proteína de choque térmico	
<b>Ciclo do glioxalato</b>	CNAG_05303	0,00275546	12,9474	Isocitrato liase	
	CNAG_05653	0,0330593	2,26303	Malato sintase	
<b>Estresse oxidativo</b>	CNAG_02147	0,00236176	5,1284	Citocromo-c peroxidase	
	CNAG_01138	0,00257265	3,04602	Citocromo-c peroxidase	
	CNAG_05169	0,00243643	2,7162	Citocromo b2 / FMN-dependente citocrome c oxidoreductase	
<b>Metabolismo de aminoácido</b>	CNAG_01846	0,00681227	2,06099	Flavoproteína	
	CNAG_01680	0,00783168	5,19107	Metilcrotonoil-Coenzima A carboxilase 1	
	CNAG_00452	0,00171571	3,99965	Isovaleril-CoA dehidrogenase 2	
	CNAG_05676	0,0021966	3,31586	Tirosina aminotransferase	
	CNAG_07944	0,0069824	2,49966	Alofanato hidrolase subunidade 2	
	CNAG_03128	0,0134976	2,19625	Lincomicina lmbA	
	CNAG_02849	0,0030642	24,4245	Glutationa transferase	
	CNAG_02532	0,00696403	2,73127	D-aminoacido oxidase	
	CNAG_06913	0,0260545	2,26914	L-serina amonia-liase	
	CNAG_04351	0,00830332	2,10395	Metilmalonato-semialdeido dehidrogenase	
	CNAG_01075	0,0150654	2,10336	Metilmalonato-semialdeido dehidrogenase	
	<b>Metabolismo de carboidrato</b>	CNAG_04217	0,00390645	5,89723	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
		CNAG_04753	0,00116362	4,53707	Lactonohidrolase
CNAG_02489		0,0158317	3,7867	Manitol-1-fosfato dehidrogenase	
CNAG_00269		0,00589579	3,75665	Sorbitol dehidrogenase	
CNAG_00393		0,0148125	2,70596	Enzima de ramificação da 1,4-alfa-glucana	
CNAG_03067		0,00119683	2,66549	Piruvato carboxiltransferase	
CNAG_04523		0,0170267	2,57603	Gliceraldeido 3-fosfato dehidrogenase	
CNAG_05337		0,0141495	2,40879	Alfa-L-arabinofuranosidase	
CNAG_01776		0,00416885	2,20306	HpcH/HpaI aldolase/citrato liase	
CNAG_04621		0,00355985	2,17416	Glicogênio sintase	
CNAG_04291		0,018534	2,136	Glicosil hidrolase	
CNAG_02925		0,0202256	2,08781	D-arabinitol 2-dehidrogenase	
CNAG_00797		0,0127299	2,07355	Acetato-CoA ligase	
CNAG_06672		0,0160251	3,78186	Formato dehidrogenase	
CNAG_00397		0,00576425	2,47014	Piruvato dehidrogenase	
<b>Metabolismo de lipídio</b>		CNAG_06431	0,00240349	6,20667	Acil-CoA oxidase
		CNAG_03666	0,00178095	5,62055	Acil-CoA dehidrogenase
	CNAG_00490	0,0277902	5,5079	Acetil-CoA C-aciltransferase	
	CNAG_01671	0,00204117	3,93367	Acetil/propionil CoA carboxilase	
	CNAG_00499	0,00316801	3,88855	Carnitina/acil carnitina carreador	
	CNAG_04392	0,00279382	3,82553	Proteína de ligação ao esterol	
	CNAG_00371	0,00214543	3,14993	Enoil-CoA hidratase	
	CNAG_02045	0,00563036	2,95075	Acetoacil-CoA sintetase	
	CNAG_01116	0,00810678	2,80628	Beta-cetoacil redutase	
	CNAG_02562	0,00275705	2,79301	Acil-Coenzima A dehidrogenase	
	CNAG_04238	0,00211345	2,7285	2,4-dienoil-CoA redutase	
	CNAG_03019	0,00633765	2,70475	CoA ligase de ácido graxo de cadeia longa	

	CNAG_04308	0,00338679	2,66174	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase
	CNAG_04531	0,00715228	2,64279	Enoil-CoA hidratase
	CNAG_00826	0,0056818	2,54455	Glicerona quinase
	CNAG_07747	0,0101095	2,41408	Acil-coenzima A oxidase I
	CNAG_03393	0,00894429	2,11571	Acil-CoA tiolesterase
	CNAG_06628	0,00404663	6,49193	Aldeído desidrogenase
	CNAG_06551	0,00173232	5,56428	Carnitina O-acetiltransferase
	CNAG_05125	0,0148693	2,27182	Difosfomevalonato decarboxilase
<b>Metabolismo de nitrogênio</b>	CNAG_05644	0,00346599	4,29356	2-nitropropano dioxigenase
	CNAG_03243	0,00335021	3,0279	2-nitropropano dioxigenase
<b>Metabolismo secundário</b>	CNAG_03134	0,00400356	2,73889	3-hidroxiubutiril-CoA desidrogenase
	CNAG_06534	0,00620997	2,46148	Hidroxiimetilglutaril-CoA redutase
	CNAG_04346	0,00446325	2,10708	Dihidrodipicolinato sintase
	CNAG_04869	0,00278797	6,65243	Carboxilesterase
	CNAG_06623	0,0139338	2,13304	Mio-inositol oxigenase
<b>Outros</b>	CNAG_02553	0,00187571	8,22541	Desidrogenase
	CNAG_01040	0,00273278	4,78924	Carboxipeptidase D
	CNAG_02548	0,00306455	3,9755	Proteína envolvida na síntese de cobalamina
	CNAG_00094	0,00659321	3,73884	NAD-dependente epimerase/dehidratase
	CNAG_00537	0,00203514	3,02984	Carnitina acetiltransferase
	CNAG_01794	0,0013189	2,99315	2-hidroxiacido desidrogenase
	CNAG_04103	0,00135042	2,75068	Proteína de membrana
	CNAG_03993	0,00434375	2,61014	Proteína com domínio EB1
	CNAG_02295	0,00360882	2,60426	Fosfofotransferase
	CNAG_04096	0,00187781	2,30145	Racemase
	CNAG_03599	0,0204002	2,07114	Mandelato racemase
	CNAG_05329	0,00210984	2,18121	NAD-binding Rossmann fold oxidoreductase
	CNAG_01252	0,00501485	2,65488	Tioossulfato sulfurtransferase
	CNAG_02924	0,0156847	2,3946	Histona H1
	CNAG_04540	0,0144808	2,01113	Receptor do retículo endoplasmático
	CNAG_03644	0,00907646	2,86015	CAS3p
	CNAG_00828	0,0295319	3,70954	Regulador de nitrogênio
	CNAG_07862	0,00154736	9,98097	Fumarato redutase
	CNAG_00442	0,00139662	5,72864	Ciclina
	CNAG_06517	0,0044366	4,56583	Proteína citoplasmática
	CNAG_01702	0,0157699	3,68741	Proteína integral de membrana
	CNAG_06433	0,00400072	3,57363	Proteína de ligação à AMP
	CNAG_03454	0,0173298	3,44366	Proteína priá
	CNAG_07779	0,00384509	2,54649	D-glicerato 3-quinase
	CNAG_02674	0,00447727	2,52509	dJ347H13.4
	CNAG_00699	0,00548871	2,52213	Receptor transmembrana
	CNAG_07796	0,00381205	2,36057	Uroporfirina-III C-metiltransferase
	CNAG_06186	0,0148917	2,27395	Proteína de membrana
	CNAG_03698	0,00169173	2,24892	Proteína Mlo2 dedo-de-zinco
	CNAG_00150	0,0206452	2,22758	Peptidase
	CNAG_04698	0,00244405	2,46602	Proteína citoplasmática
	CNAG_05229	0,00216669	2,29192	Proteína da família estomatina
	CNAG_06606	0,00458723	2,01814	GTPase Rho monomérica
	CNAG_02255	0,0029798	2,16244	Proteína com domínio BNR/Asp-box repetitivo
<b>Processo oxidação/redução</b>	CNAG_05299	0,0126504	3,35935	Oxidoreductase
	CNAG_04085	0,00729674	3,27837	Oxidoreductase
	CNAG_07334	0,00177626	2,84599	Redutase ferrica
	CNAG_00876	0,00292632	2,68318	Redutase quelante de ferro
	CNAG_01954	0,0170209	2,19641	Aldo/ceto redutase
<b>Proteína peroxissomal</b>	CNAG_05721	0,0042511	3,29229	Peroxisomal hidratase-dehidrogenase-

				epimerase
<b>replicação</b>	CNAG_02385	0,0177539	2,08833	Subunidade menor da DNA primase
	CNAG_07686	0,0029253	2,29756	Fator de associação à topoisomerase 1
<b>Transcrição/Tradução</b>	CNAG_03968	0,0132405	2,12226	Proteína de ligação à poli(A)
	CNAG_03116	0,00654111	3,17627	Fator de transcrição forkhead 3
	CNAG_04345	0,00776112	2,40314	Fator de transcrição específico da RNA polimerase II
	CNAG_00068	0,00193279	2,14659	Fator de transcrição específico da RNA polimerase II
<b>Transporte</b>	CNAG_05662	0,00605544	16,8462	Transportador de açúcar
	CNAG_00979	0,00149283	12,6112	Transportador de cobre
	CNAG_03772	0,00432694	11,1359	Transportador de glicose
	CNAG_01936	0,00191627	7,29332	Transportador de açúcar
	CNAG_02288	0,00238351	4,94611	Transportador antiporte de succinato:fumarato
	CNAG_01384	0,00272396	4,86666	Bodown198
	CNAG_00598	0,00478198	4,49851	Nicotinamida mononucleotídeo permease
	CNAG_06204	0,00599583	4,05835	Transportador de alta afinidade de ácido nicotínico
	CNAG_05387	0,00332914	4,01275	Transportador de galactose
	CNAG_02777	0,0487682	3,36456	Transportador de fosfato
	CNAG_04920	0,00861644	3,35444	Transportador de galactose
	CNAG_05929	0,00540534	3,30233	MFS maltose permease MalP
	CNAG_06521	0,00503493	3,2338	Receptor
	CNAG_03426	0,00270786	3,16533	Transportador de GDP-manose
	CNAG_07367	0,00956034	3,12233	Transportador de aminoácido
	CNAG_00597	0,0441299	3,02046	Transportador de aminoácido
	CNAG_03910	0,00565065	2,84406	Transportador simporte de D-xilose-proton
	CNAG_04795	0,0103165	2,83099	Transportador de nucleotídeo adenina
	CNAG_04210	0,0026478	2,78891	Transportador de açúcar
	CNAG_05685	0,00377233	2,77709	Transportador de aminoácido neutro
	CNAG_00895	0,00404456	2,67154	Transportador de zinco
	CNAG_04546	0,0231113	2,5732	Transportador MDR
	CNAG_01119	0,0117536	2,3848	Transportador de peptídeo
	CNAG_00864	0,00187937	2,37921	Transportador de mio-inositol
	CNAG_02254	0,0044993	2,33371	Quinato permease
	CNAG_04704	0,00638429	2,21753	Transportador de ácido carboxílico
	CNAG_00823	0,0023895	2,18184	Transportador de cádmium
	CNAG_03060	0,019105	2,11251	Transportador MDR
	CNAG_02554	0,00211025	2,03548	Transportador de açúcar
	CNAG_07557	0,00128398	2,02864	Transportador ABC
	CNAG_07335	0,00293307	2,82426	Transportador de L-cistina
	CNAG_06932	0,0042575	2,00499	Transportador de açúcar
	CNAG_05266	0,00160665	8,05642	Transportador de acetato
	CNAG_05678	0,0114377	2,85347	Transportador de acetato
<b>Ubiquitinação</b>	CNAG_03103	0,00331404	4,26343	Ubiquitina-proteína ligase
<b>Via das pentose fosfato</b>	CNAG_00827	0,00335566	7,41447	Ribose 5-fosfato isomerase
<b>Proteína hipotética</b>	CNAG_06312	0,00251296	13,5087	-----
	CNAG_04837	0,00366645	10,6954	-----
	CNAG_02691	0,00430173	8,69176	-----
	CNAG_02253	0,00182859	8,56564	-----
	CNAG_02701	0,00283818	8,54993	-----
	CNAG_06805	0,00273405	8,0944	-----
	CNAG_02775	0,00273424	6,35535	-----
	CNAG_00679	0,00589545	6,04065	-----
	CNAG_00262	0,00154509	5,88054	-----
	CNAG_05312	0,00499661	5,49706	-----
	CNAG_07869	0,00795968	5,20518	-----

CNAG_00813	0,00713642	4,67373	-----
CNAG_01865	0,0028909	4,66234	-----
CNAG_05079	0,0136983	4,54399	-----
CNAG_02044	0,00250658	4,54104	-----
CNAG_04138	0,011029	4,43222	-----
CNAG_04877	0,00351875	3,98469	-----
CNAG_07912	0,00302687	3,91411	-----
CNAG_02405	0,00554288	3,46188	-----
CNAG_03145	0,0138059	3,29041	-----
CNAG_02558	0,0116438	3,27724	-----
CNAG_04759	0,00191025	3,23535	-----
CNAG_06390	0,00385718	3,22687	-----
CNAG_05265	0,00802893	3,17295	-----
CNAG_02978	0,00454437	3,07828	-----
CNAG_03479	0,00199642	3,05867	-----
CNAG_03516	0,00146898	3,05107	-----
CNAG_00433	0,00486157	2,99856	-----
CNAG_03894	0,0155182	2,99392	-----
CNAG_03842	0,00783084	2,95196	-----
CNAG_06583	0,0156795	2,92177	-----
CNAG_06953	0,0104498	2,83058	-----
CNAG_00315	0,0184749	2,82288	-----
CNAG_07708	0,0034917	2,78776	-----
CNAG_03678	0,00361404	2,78251	-----
CNAG_00680	0,00628522	2,73987	-----
CNAG_05873	0,00720087	2,70248	-----
CNAG_07176	0,00100991	2,69543	-----
CNAG_05784	0,00197765	2,69336	-----
CNAG_05599	0,00253698	2,68379	-----
CNAG_01368	0,00487195	2,65855	-----
CNAG_00791	0,0104991	2,65196	-----
CNAG_04394	0,00364054	2,64509	-----
CNAG_00327	0,0310685	2,631	-----
CNAG_07549	0,00792651	2,61687	-----
CNAG_07341	0,00742364	2,60987	-----
CNAG_03394	0,0100666	2,59575	-----
CNAG_05087	0,00328143	2,59222	-----
CNAG_01921	0,00898877	2,56153	-----
CNAG_00079	0,00474401	2,5312	-----
CNAG_07701	0,008061	2,47309	-----
CNAG_04979	0,00661154	2,45797	-----
CNAG_01925	0,00497256	2,45472	-----
CNAG_01406	0,00373013	2,44601	-----
CNAG_07522	0,00432583	2,44526	-----
CNAG_02776	0,00972132	2,43961	-----
CNAG_02184	0,00577785	2,43276	-----
CNAG_01452	0,00249742	2,39199	-----
CNAG_07042	0,00724177	2,37284	-----
CNAG_06104	0,00280812	2,34285	-----
CNAG_00503	0,016863	2,33952	-----
CNAG_03649	0,00262089	2,32102	-----
CNAG_00798	0,00663393	2,27432	-----
CNAG_01848	0,00401233	2,26806	-----
CNAG_06355	0,00244132	2,26161	-----
CNAG_01695	0,00889244	2,26052	-----

CNAG_03118	0,00825943	2,22792	-----
CNAG_06188	0,00163185	2,13934	-----
CNAG_07312	0,00311414	2,13746	-----
CNAG_02872	0,00145475	2,08306	-----
CNAG_03085	0,00512082	2,06982	-----
CNAG_04993	0,00823592	2,06892	-----
CNAG_01965	0,0123453	2,044	-----
CNAG_01847	0,00272859	2,00546	-----
CNAG_01541	0,00596715	2,00524	-----

---

\* Número de acesso dos genes relacionados no projeto genoma de *Cryptococcus neoformans var. grubii* realizado pelo *Broad Institute* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans)).

**ANEXO 4 – Genes de *C. neoformans* cujo acúmulo de transcrito foi diminuído após internalização do fungo por macrófagos murinos J774.1.**

<b>Categoria</b>	<b>Número de acesso *</b>	<b>p-value</b>	<b>Varição da expressão</b>	<b>Produto do gene</b>	
<b>Biossíntese de ergosterol</b>	CNAG_01737	0,00548862	-2,1578	C-4 metil esterol oxidase	
	CNAG_04687	0,00534619	-2,58867	Estearoil-CoA 9-desaturase	
<b>Fosforilação oxidativa</b>	CNAG_05626	0,0125822	-2,02884	h-sco1	
<b>Metabolismo de carboidrato</b>	CNAG_04659	0,0119658	-2,58975	Piruvato decarboxilase	
	CNAG_04326	0,00734125	-2,06814	Enzima málica dependente de NAD	
<b>Metabolismo de lipídio</b>	CNAG_00984	0,00415894	-2,10481	Glicose e ribitol desidrogenase	
	CNAG_02814	0,00395706	-2,25477	Glicerol-3-fosfato desidrogenase	
	CNAG_02087	0,00105875	-3,75872	Esfingosina N-aciltransferase	
<b>Metabolismo secundário</b>	CNAG_02986	0,00460027	-2,3904	Fosforibosil-ATP difosfatase	
<b>Outros</b>	CNAG_01881	0,00854078	-2,10807	Proteína grpe	
	CNAG_01498	0,00420636	-2,14127	Arilsulfatase	
	CNAG_02264	0,0012574	-2,26571	AFG1- ATPase	
	CNAG_05370	0,00209096	-2,34957	Proteína integral de membrana	
	CNAG_06576	0,0217185	-2,92608	Alergeno	
	CNAG_06302	0,00400916	-3,14367	PEP2	
	CNAG_03759	0,00205212	-4,86503	Proteína 6 específica da conidiação	
	CNAG_04215	0,00208331	-2,47846	Sulfato adenililtransferase	
	CNAG_03333	0,0226414	-2,08956	Proteína citoplasmática	
	<b>Processo oxidação/redução</b>	CNAG_01981	0,0023428	-2,03699	Sulfido:quinona oxidoreductase
		CNAG_01939	0,0188077	-2,08856	fmHP
		CNAG_03168	0,004225	-2,28613	Sulfito reductase
		CNAG_00541	0,00227631	-2,62673	Dimetilnilina monooxigenase
		CNAG_02577	0,00592889	-2,63942	Oxidoreductase
	<b>Transcrição/tradução</b>	CNAG_05166	0,0107034	-2,07958	Helicase SWR1
		CNAG_03563	0,00534099	-2,59223	Aspartato-tRNA ligase
	<b>Transporte</b>	CNAG_06890	0,0443357	-2,04244	Transportador de membrana
CNAG_06817		0,0311024	-2,06605	UAPI	
CNAG_03901		0,0160784	-2,13304	Transportador de magnésio	
CNAG_04758		0,00408569	-2,39166	Transportador de amônia	
CNAG_07387		0,00325506	-2,56502	Transportador de ferro / sideroforo Str3	
CNAG_03438		0,00198769	-2,56777	Transportador de hexose	
CNAG_00077		0,00442595	-2,95292	Transportador de enxofre	
<b>Proteína hipotética</b>		CNAG_03142	0,00917105	-2,00849	-----
		CNAG_02683	0,0129413	-2,01193	-----
	CNAG_07763	0,0149188	-2,01912	-----	
	CNAG_05573	0,0136237	-2,02922	-----	
	CNAG_01369	0,00285492	-2,03519	-----	
	CNAG_02362	0,00813984	-2,04115	-----	
	CNAG_00932	0,00281915	-2,06074	-----	
	CNAG_03857	0,0170714	-2,09241	-----	
	CNAG_02070	0,00597518	-2,09881	-----	
	CNAG_06732	0,00538555	-2,10516	-----	
	CNAG_05463	0,00929957	-2,10581	-----	
	CNAG_01585	0,007743	-2,11382	-----	
	CNAG_04891	0,00196709	-2,13027	-----	
	CNAG_00654	0,00181623	-2,1525	-----	
	CNAG_07451	0,0129132	-2,15311	-----	
	CNAG_01272	0,0276898	-2,15499	-----	
	CNAG_04680	0,0066829	-2,17528	-----	
	CNAG_00848	0,01377	-2,19634	-----	
	CNAG_02305	0,00386034	-2,20063	-----	
	CNAG_01043	0,00778541	-2,23117	-----	
CNAG_07568	0,00182933	-2,23732	-----		
CNAG_03068	0,015007	-2,24987	-----		
CNAG_02694	0,00484753	-2,25959	-----		
CNAG_05915	0,0258754	-2,35781	-----		
CNAG_05724	0,00330077	-2,36024	-----		

CNAG_00814	0,00796007	-2,36478	-----
CNAG_05572	0,00757164	-2,38432	-----
CNAG_02910	0,0214922	-2,39798	-----
CNAG_05741	0,00189943	-2,40385	-----
CNAG_03346	0,00204023	-2,55996	-----
CNAG_01242	0,00251274	-2,56265	-----
CNAG_06396	0,00562543	-2,57459	-----
CNAG_01803	0,00754096	-2,8793	-----
CNAG_00349	0,00103089	-2,90138	-----
CNAG_05641	0,00754726	-3,04403	-----
CNAG_06590	0,00397857	-3,06825	-----
CNAG_06802	0,00300596	-3,37713	-----
CNAG_07920	0,00137148	-3,4471	-----
CNAG_03492	0,00179233	-4,12056	-----

---

\* Número de acesso dos genes relacionados no projeto genoma de *Cryptococcus neoformans var. grubii* realizado pelo *Broad Institute* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans)).

Research

Open Access

## Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis

Lorena S Derengowski<sup>1</sup>, Calliandra De-Souza-Silva<sup>1</sup>, Shélida V Braz<sup>2</sup>,  
Thiago M Mello-De-Sousa<sup>1</sup>, Sônia N Bão<sup>2</sup>, Cynthia M Kyaw<sup>3</sup> and  
Ildinete Silva-Pereira\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular, CEL/IB, Universidade de Brasília – Brasília-DF, 70910-900, Brasil, <sup>2</sup>Laboratório de Microscopia Eletrônica, CEL/IB, Universidade de Brasília – Brasília-DF, 70910-900, Brasil and <sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia, CEL/IB, Universidade de Brasília – Brasília-DF, 70910-900, Brasil

Email: Lorena S Derengowski - lorena.bio@gmail.com; Calliandra De-Souza-Silva - cdssilva@gmail.com;  
Shélida V Braz - shelidabraz@gmail.com; Thiago M Mello-De-Sousa - thiagodemello@gmail.com; Sônia N Bão - snbao@unb.br;  
Cynthia M Kyaw - malta@unb.br; Ildinete Silva-Pereira\* - xocolau@unb.br

\* Corresponding author

Published: 29 April 2009

Received: 6 October 2008

*Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2009, **8**:13 doi:10.1186/1476-0711-8-13

Accepted: 29 April 2009

This article is available from: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/8/1/13>

© 2009 Derengowski et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Farnesol is a sesquiterpene alcohol produced by many organisms, and also found in several essential oils. Its role as a quorum sensing molecule and as a virulence factor of *Candida albicans* has been well described. Studies revealed that farnesol affect the growth of a number of bacteria and fungi, pointing to a potential role as an antimicrobial agent.

**Methods:** Growth assays of *Paracoccidioides brasiliensis* cells incubated in the presence of different concentrations of farnesol were performed by measuring the optical density of the cultures. The viability of fungal cells was determined by MTT assay and by counting the colony forming units, after each farnesol treatment. The effects of farnesol on *P. brasiliensis* dimorphism were also evaluated by optical microscopy. The ultrastructural morphology of farnesol-treated *P. brasiliensis* yeast cells was evaluated by transmission and scanning electron microscopy.

**Results:** In this study, the effects of farnesol on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and dimorphism were described. Concentrations of this isoprenoid ranging from 25 to 300  $\mu$ M strongly inhibited *P. brasiliensis* growth. We have estimated that the MIC of farnesol for *P. brasiliensis* is 25  $\mu$ M, while the MLC is around 30  $\mu$ M. When employing levels which don't compromise cell viability (5 to 15  $\mu$ M), it was shown that farnesol also affected the morphogenesis of this fungus. We observed about 60% of inhibition in hyphal development following *P. brasiliensis* yeast cells treatment with 15  $\mu$ M of farnesol for 48 h. At these farnesol concentrations we also observed a significant hyphal shortening. Electron microscopy experiments showed that, despite of a remaining intact cell wall, *P. brasiliensis* cells treated with farnesol concentrations above 25  $\mu$ M exhibited a fully cytoplasmic degeneration.

**Conclusion:** Our data indicate that farnesol acts as a potent antimicrobial agent against *P. brasiliensis*. The fungicide activity of farnesol against this pathogen is probably associated to cytoplasmic degeneration. In concentrations that do not affect fungal viability, farnesol retards the germ-tube formation of *P. brasiliensis*, suggesting that the morphogenesis of this fungal is controlled by environmental conditions.

## Background

Essential oils are complex mixes of hydrophobic liquids containing volatile aromatic compounds, which are products of plant secondary metabolism [1]. Of all the claimed properties of essential oils, its antimicrobial activity is the one which receives special attention due to the serious threat that antibiotic resistance has become. Therefore, the study of potential antibiotic compounds found in these oils could be of interest in the development of novel antimicrobial agents.

Farnesol is a sesquiterpene alcohol present in many essential oils – e.g. from *Pluchea dioscoridis*, *Zea mays* and *Pittosporum undulatum*, possibly protecting these plants from parasitic induced damages [2-4]. Recently, this sesquiterpene alcohol has been demonstrated to inhibit the growth of some microorganisms, such as the human pathogens *Staphylococcus aureus* [5,6] and *Streptococcus mutans* [7], and the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum* [8], signaling its potential use as an antimicrobial agent. Farnesol also enhances microbial susceptibility to antibiotics, indicating a putative application as an adjuvant therapeutic agent [9,10]. Although its mechanism of action is not fully understood, it probably involves cell membrane damages and impaired ergosterol synthesis [10].

This sesquiterpenoid was also identified as a quorum-sensing molecule produced by the dimorphic fungus *Candida albicans*, where it prevents the fungal transition from yeast to mycelium, and disrupts biofilm formation [11,12]. *C. albicans* synthesizes farnesol from farnesyl pyrophosphate (FPP), a well known intermediate of the highly conserved sterol biosynthetic pathway [13]. A recent study showed that farnesol increases the virulence of *C. albicans* in a mouse infection model [14]. In another work, it appears that farnesol is employed by *C. albicans* in order to reduce competition with other microbes, since this compound mediated apoptosis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [15], and inhibited biofilm formation in other *Candida* species [10,16].

In this study, we tested the effects of farnesol on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *P. brasiliensis* is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic human mycosis geographically confined to Latin America [17,18]. This organism is a thermal dimorphic fungus, which can be found as mycelium at room temperature (25 °C) and as yeast cells at body temperature (37 °C). Although little is known about the ecology of this fungus, it is thought that infection occurs when the mycelial form releases conidia or hyphal fragments to the environment and, upon inhalation by the host, these structures differentiate to the yeast form [19]. This dimorphic transition of mycelium to yeast phase seems to be

essential to the establishment of the infective process [20]. In this context, our results revealed that farnesol reduces the viability of this pathogen and delays the dimorphism, suggesting an antimicrobial activity against *P. brasiliensis*, probably due the massive cytoplasmic organelles degeneration.

## Methods

### Fungal strain

Yeast cells of the virulent isolate 18 of *P. brasiliensis* (Pb18) were maintained by weekly passages in semi-solid Fava Neto's medium (0.3% protease peptone, 1% peptone, 0.5% beef extract, 0.5% yeast extract, 4% glucose, 0.5% NaCl, 1.6% agar, pH 7.2) at 36 °C, and were used after 6 – 9 days of growth. The fungal cells used in all experiments were suspended in complex medium YPD (yeast-peptone-dextrose), vigorously vortexed and counted in a Neubauer chamber. The cell viability was determined by vital Janus green stain [21]. *C. albicans* ATCC 10231, used as a control, was also maintained on semi-solid Fava Neto's medium at 36 °C and transferred at regular intervals. Under these conditions over 95% of *C. albicans* cells remained in the yeast form.

### *P. brasiliensis* growth assay upon farnesol treatment

In all assays, a mixture of stereoisomers of farnesol (assay ≥ 90%; GS, sum of isomers; Fluka, Sigma-Aldrich) was diluted in 100% methanol. Working concentrations were prepared in YPD medium.

For the *in vitro* growth assay,  $2 \times 10^5$  *P. brasiliensis* yeast cells per mL were inoculated in complex medium YPD supplemented with farnesol at different final concentrations (5, 10, 25, 50, 100, 150 and 300 μM), employing 96 well-plates in a final volume of 200 μL. Farnesol-free controls were supplemented with 2% methanol, the farnesol diluent. Cultures were allowed to grow at 36 °C for 25 days. The number of cells at each specific time interval was determined by measuring the OD absorption at 630 nm of vigorously vortexed cultures. The growth curve of each culture was prepared by plotting the logarithmic values of OD<sub>630</sub> vs. incubation time. All experiments were carried out in triplicate. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for farnesol was defined as the lowest concentration that resulted in 90% of inhibition of cell growth when compared to the farnesol-free control cells.

### Effect of farnesol on *P. brasiliensis* cell viability

The analysis of cell viability was performed using the tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma) in a colorimetric assay that measures mitochondrial activity. To determine the MLC (Minimal Lethal Concentration) of farnesol for *P. brasiliensis*,  $2 \times 10^5$  yeast cells/mL were incubated in YPD medium with farnesol at the final concentrations of

2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 50, 75, 100, 150 and 300  $\mu\text{M}$ . After 15 days of incubation with different concentrations of farnesol at 36°C (150 rpm) in 96-well tissue culture plates, a solution containing 5 mg of MTT per mL of 0.15 M phosphate-buffered saline (PBS) was added to each well to reach a final concentration of 0.5 mg/mL. After incubation for 4 h at 36°C, the medium containing MTT was partially removed, and dimethyl sulfoxide (100  $\mu\text{L}$ ) was added to solubilize the MTT formazan product. MTT formazan formation was measured at 490 nm by using a spectrophotometer. Control wells contained medium plus MTT to determine background formazan values. All assays were done in triplicate. The MLC for farnesol was defined as the lowest concentration that resulted in 90% of cell death when compared to the farnesol-free control cells.

The effect of farnesol on cell viability was also estimated by colony counting. Yeast cells of *P. brasiliensis* were suspended in YPD medium at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL, and farnesol was added to final concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$ . Farnesol-free controls were supplemented with 2% methanol. After incubation at 36°C for 4 days in an orbital shaker (150 rpm), cells were harvested by centrifugation ( $4000 \times g/5$  min), washed and plated on brain heart infusion agar (BHI) supplemented with 4% fetal calf serum (FCS), for at least 12 days to determine their viability, expressed as colony forming units (CFU). The survival rate of these cultures was compared to farnesol-free cultures. The number of single colonies on each plate was counted and the percentage of cell killing calculated as  $(1 - N1/N2) \times 100$ , where N1 is the mean of the number of colonies from farnesol-treated *P. brasiliensis* cells, and N2 is the mean of the number of colonies from *P. brasiliensis* non-treated cells. The experiments were carried out in triplicate.

#### **Effect of farnesol on *P. brasiliensis* dimorphic transition**

To evaluate the effects of farnesol on *P. brasiliensis* dimorphism,  $2 \times 10^5$  yeast cells/mL were inoculated in YPD medium and farnesol was added to final concentrations of 5, 7.5, 10, 15, 20 and 25  $\mu\text{M}$ . Cultures were incubated for 48 h at 25°C in an orbital shaker (150 rpm). Farnesol-free controls were supplemented with 2% methanol, the farnesol diluent. Cell morphology was assessed by light microscopy. The percentage of cells showing germ-tubes after 24 h and 48 h of incubation was calculated. Additionally, the average size of the germ tubes was measured after the same period of time. All experiments were carried out in triplicate. The *P. brasiliensis* dimorphism from mycelium to yeast cells was also evaluated by the treatment of the mycelial form with farnesol at different final concentrations (5, 10, and 25  $\mu\text{M}$ ), for 4 days at 36°C, following exactly the same conditions described above for the transition in the opposite direction.

#### **Transmission and Scanning electron microscopy**

Transmission electron microscopy (TEM) was performed according to the following standard procedure. Briefly, *P. brasiliensis* yeast cells were cultivated at 36°C for 3 days in YPD medium without (control supplemented with 2% methanol) or with farnesol (25, 50 and 150  $\mu\text{M}$ ). Cells were harvested by centrifugation at  $4000 \times g$  for 5 min, washed four times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and fixed overnight at 4°C (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, with 3% sucrose and 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ). After fixation, cells were harvested by centrifugation ( $4000 \times g/5$  min), and the pellet was washed four times in 0.1 M sodium cacodylate buffer ( $4000 \times g/15$  min). Samples were post-fixed for 1 hour (1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferrocyanide in the same buffer), contrasted *en bloc* with 0.5% uranyl acetate, dehydrated through an ascending acetone series and embedded in Spurr resin. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate/lead citrate and observed in a TEM Jeol 1011 at 80 kV.

In order to prepare samples to scanning electron microscopy analysis, *P. brasiliensis* yeast cells treated with different concentrations of farnesol (25 and 50  $\mu\text{M}$ ) for 5, 10 and 24 h, were fixed overnight at 4°C (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, with 3% sucrose and 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ), harvested by centrifugation ( $4000 \times g/5$  min), and the pellet was washed four times in 0.1 M sodium cacodylate buffer ( $4000 \times g/15$  min). Samples were post-fixed for 1 hour (1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferrocyanide in the same buffer), and then applied on a polylysine-coated coverslip and serially dehydrated in acetone. The samples were dried in a critical point drier (BAL-TEC CPD-030 – Electron Microscopy Sciences, USA), coated with gold-palladium (Balzers Union SCD-040 – Electron Microscopy Sciences, USA) and viewed using a JEOL (Tokyo, Japan) JEM 840A electron microscope.

#### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using the software "Mynova", version 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). The statistical test applied was Student's *t* test. A *P* value  $\leq 0.001$  was considered significant.

#### **Results and discussion**

##### **Farnesol affects *P. brasiliensis* growth and viability**

The incidence of fungal infections has dramatically increased in the last two decades [22,23]. Simultaneously, the resistance to antifungal agents has become an important problem in several fungal diseases. In addition to the drug resistance problem, the current antifungal therapies are limited due to the high toxicity of the agents and their low efficacy rates [24].

PCM is commonly treated with sulfonamides, azoles and amphotericin B [25]. In spite of the good efficacy of these antifungal agents against *P. brasiliensis*, some of these compounds, like amphotericin B, can also damage the host cells [26]. Furthermore, Hanh et al. [27] described the occurrence of ketoconazole resistant isolates of *P. brasiliensis* in PCM patients. The *P. brasiliensis* transcriptome analysis revealed several ortholog genes related to transmembrane proteins that can function as efflux pumps [28]. The existence of such genes augurs the possible emergency of resistant isolates, emphasizing the importance of novel antimicrobial agent development.

In this context, the interest in studying the antimicrobial activity of plant extracts and essential oils has increased in recent years. San-Blas et al. [29] demonstrated that ajoene, a compound from *Allium sativum*, inhibits the growth of *P. brasiliensis*. These authors suggested that the integrity of the fungal cytoplasmic membrane could probably be the target of this garlic-derived compound, since ajoene promotes changes in the phospholipid and fatty acid proportions [30]. Furthermore, the association of ajoene and chemotherapeutic drugs show a positive additive effect in the treatment of mice infected with *P. brasiliensis* [31].

In this work we evaluated the role of farnesol, a sesquiterpene alcohol present in many essential oils [2-4,32], and also produced as a quorum sensing molecule by *C. albicans*, in *P. brasiliensis* growth and morphogenesis.

First, the effect of farnesol on *P. brasiliensis* growth was evaluated. We verified that farnesol concentrations ranging from 25 to 300  $\mu\text{M}$  strongly inhibited *P. brasiliensis* yeast cells growth, since the results obtained with three different growth curves were equivalent (Figure 1A). Similar patterns were observed with the mycelial form growth curves (data not shown).

In order to evaluate if the effects of farnesol on *P. brasiliensis* growth were caused by an increase in mortality, a viability assay based on metabolism (Figure 1B) was performed (MTT assay). This test showed that the percentage of non-viable fungal cells increased proportionally with farnesol concentrations, suggesting that farnesol has a potent fungicide activity against *P. brasiliensis*. The same behavior of farnesol on *P. brasiliensis* viability was observed when we performed experiments based on CFU counts (data not shown). The Figure 1A reveals that farnesol concentrations of 25  $\mu\text{M}$  or higher have an inhibitory effect on *P. brasiliensis* growth, while *P. brasiliensis* metabolism completely ceased at the farnesol concentration of 30  $\mu\text{M}$  (Figure 1B). According to these data we have determined that the MIC of farnesol for *P. brasiliensis* is 25  $\mu\text{M}$ , while the MLC is 30  $\mu\text{M}$ .

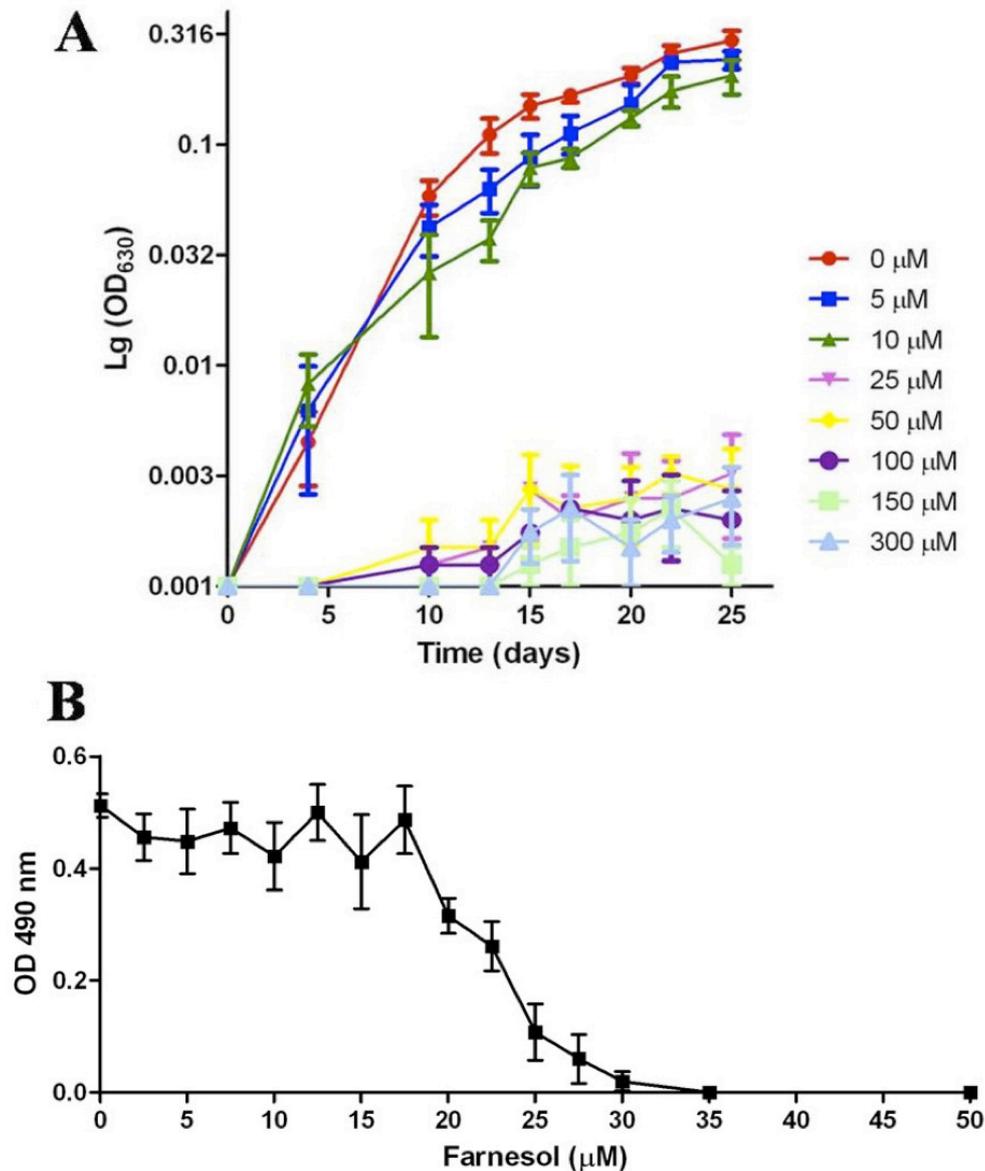
This role of farnesol in the inhibition of *P. brasiliensis* growth and viability has also been verified in other microorganisms [6-8,33-36], suggesting that this compound also possess an effective antimicrobial activity against *P. brasiliensis*. Interestingly, our data indicate that *P. brasiliensis* is more sensitive to farnesol than other pathogens since, while for *P. brasiliensis* the MLC corresponds to 30  $\mu\text{M}$ , the MLC is of 200  $\mu\text{M}$  for the bacteria *S. aureus* and *Streptomyces tendae* [6,33]. The bacterium *S. mutans* and the fungus *Candida dubliniensis* show higher tolerances to farnesol, with an MLC of 300  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$ , respectively [7,10].

#### **Farnesol delays the dimorphic transition of *P. brasiliensis***

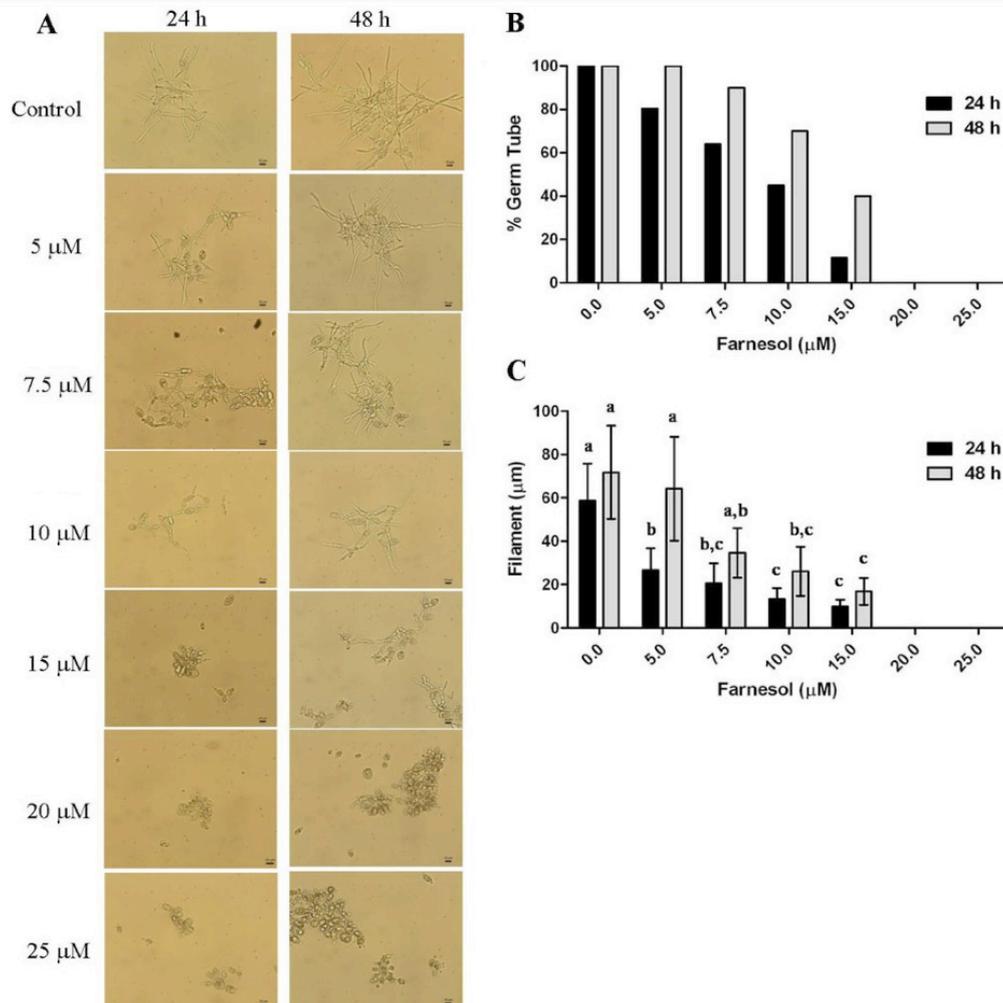
We have tested the effects of farnesol on *P. brasiliensis* morphogenesis employing farnesol concentrations up to 25  $\mu\text{M}$ , the MIC value determined for *P. brasiliensis* in this study. Noteworthy, our results revealed that the addition of exogenous farnesol at concentrations below 25  $\mu\text{M}$ , which do not affect *P. brasiliensis* growth, impaired the transition from yeast to mycelium, as observed by microscopic analyses of cellular morphology after 24 h and 48 h incubation (Figure 2A). When grown in the absence of farnesol, all cells presented germ tubes after 24 h, while when cultured in the presence of farnesol (up to 25  $\mu\text{M}$ ) we observed an increasingly lower percentage of cells with germ tubes after 24 h, with about 85% of cells without germ tubes at 15  $\mu\text{M}$  of farnesol (Figure 2B). In addition, after 24 h, the germ tubes of cells treated with up to 15  $\mu\text{M}$  of farnesol were markedly smaller when compared to those of control cells (Figure 2C). Figures 2B and 2C also reveal that, up to 15  $\mu\text{M}$ , farnesol is acting on the morphogenesis instead of the viability of *P. brasiliensis* cells since after 48 h of incubation we can observe an increase in both, the number of cells with germ tubes – 60% of cell with germ tubes at 15  $\mu\text{M}$  of farnesol (Figure 2B), and in the size of these structures (Figure 2C). These data strongly suggest that in fact the farnesol at concentrations below 15  $\mu\text{M}$  present an effect on the morphogenetic process of *P. brasiliensis* without interfering with its viability, as showed in figure 1B.

Similar concentrations of this isoprenoid also inhibited *P. brasiliensis* mycelium to yeast transition, as verified after 4 days incubation of the mycelial form at 36°C (Figure 3). The cultivation of *P. brasiliensis* in the presence of 5 and 10  $\mu\text{M}$  of farnesol resulted in the impairment of the dimorphic transition, while, as expected, 25  $\mu\text{M}$  of farnesol completely abolished the fungal dimorphic transition, probably by compromising cell viability.

Similar results were observed with *C. albicans* cells, where farnesol also prevented germ tubes formation [11,37]. Other studies revealed that farnesol is also employed by *C. albicans* to mediate antagonistic interactions with other



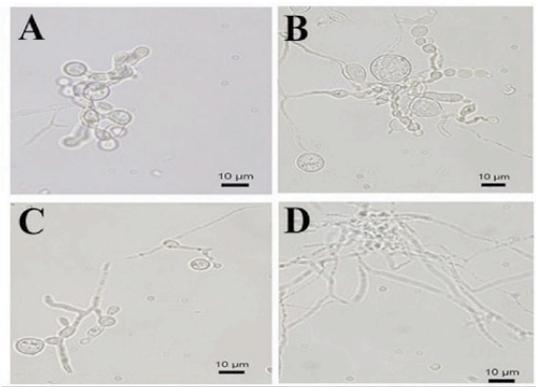
**Figure 1**  
**Effect of farnesol on the growth and viability of *P. brasiliensis* yeast cells.** (A) Growth curves of *P. brasiliensis* yeast cells incubated in the presence of different concentrations of farnesol. The number of cells at each specific time point was assessed by measuring the OD absorption at 630 nm, after vigorously shaking the cultures. The growth curve of each culture was prepared by plotting the logarithmic values of OD<sub>630</sub> vs. incubation time. (B) Viability of *P. brasiliensis* yeast cells cultivated with different concentrations of farnesol after 15 days of growth in the absence, or in the presence of farnesol (2.5 to 50  $\mu\text{M}$ ). The MTT assay was performed as described in methods section. MTT formazan formation was measured at 490 nm by using a spectrophotometer.



**Figure 2**  
**Effect of farnesol on *P. brasiliensis* morphogenesis.** *P. brasiliensis* yeast cells were grown for 24 h and 48 h at 25°C on different concentrations of farnesol. (A) Morphology of *P. brasiliensis* cells assessed by light microscopy after incubation with farnesol. (B) Percentage of cells showing germ tubes after 24 h and 48 h of cultivation in the absence, or in the presence of farnesol at different final concentrations. (C) Average size of the germ tubes formed in different concentrations of farnesol. Bars represent standard errors and different letters point to statistical relevance,  $P \leq 0.001$ .

microorganisms [10,15,16]. Semighini et al. [15] showed that exogenous farnesol triggers apoptosis in the filamentous fungus *A. nidulans*. Moreover, the possibility that farnesol produced by *C. albicans* might affect *A. nidulans* was evaluated in a co-culture model, showing that the co-cultivation inhibits the growth of *A. nidulans* in a farnesol-dependent manner [15]. A recent work reported that the

addition of farnesol to cultures of *Pseudomonas aeruginosa* leads to a decrease in the amount of *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), and of the virulence factor pyocyanin produced by this pathogen. In addition, pyocyanin and PQS levels in *P. aeruginosa*-*C. albicans* co-cultures were reduced to 42.1% relative to a control pure culture of *P. aeruginosa*. A similar decrease was verified in farnesol-



**Figure 3**  
**Effects of farnesol on *P. brasiliensis* mycelium to yeast transition.** *P. brasiliensis* (mycelium form) was incubated for 4 days at 36°C on different concentrations of farnesol. (A) Control (no farnesol); (B) 5 μM farnesol; (C) 10 μM farnesol; (D) 25 μM farnesol.

treated *P. aeruginosa* cultures, suggesting that farnesol may be involved in inter-kingdom interactions [38].

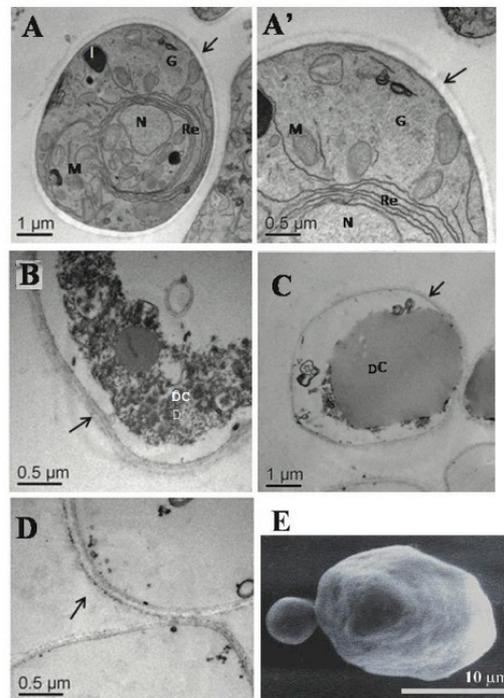
Noteworthy was the inhibition of *P. brasiliensis* hyphal development when yeast cells were grown on a conditioned medium (CM), which corresponds to the filtered supernatant of a high-density *C. albicans* culture added to a conventional culture medium (data not shown). This result suggests that *P. brasiliensis* germ tube formation could be controlled by a soluble factor present in the *C. albicans* culture supernatant [39]. In this sense, we propose that the farnesol-mediated communication between *C. albicans* and other microorganisms is probably not species-specific.

Curiously, tyrosol, another compound also identified as a quorum-sensing molecule produced by *C. albicans* [40], did not affect either *P. brasiliensis* growth or morphogenesis at concentrations up to 300 μM (data not shown).

#### **Ultrastructural morphology analysis of *P. brasiliensis* yeast cells treated with farnesol**

Although the role of farnesol as a potential antimicrobial agent has been determined in this work, its mode of action is not understood. Some studies have indicated a possible interaction of farnesol with cell membranes of certain microorganisms, including the bacteria *S. mutans*, *S. aureus* and *E. coli*, [5-7,9,41], and the fungi *C. albicans* and *C. dubliniensis* [10]. A hypothesis is that the hydrophobic property of farnesol favors its accumulation in the membrane, causing membrane disruption [6].

In order to examine the effects of farnesol on the morphology of *P. brasiliensis* at the ultrastructural level, yeast cells were cultivated for three days on different concentrations of farnesol (25, 50 and 150 μM) and examined by transmission and scanning electron microscopy. As observed in figure 4A and 4A', *P. brasiliensis* yeast cells cultivated in the absence of farnesol (control cells supplemented with 2% of methanol) showed typical cellular structures. Cytoplasmic organelles of *P. brasiliensis* cells, such as mitochondria, nucleus, lysosomes, and endoplasmatic reticulum could be clearly distinguished. Cell wall and plasma membrane were also observed as intact struc-



**Figure 4**  
**Ultrastructural morphology of *P. brasiliensis* yeast cells treated with different concentrations of farnesol.** Pannels A to D show the transmission electron micrographs of cells cultivated in the absence (A, A') and in the presence of farnesol (B to D). Cell structures like nucleus (N), mitochondria (M), endoplasmatic reticulum (Re), lysosome-like structures (L), plasma membrane and cell wall are preserved in control cells (arrows in A, A'). Cells cultivated in 25 μM (B), 50 μM (C) and 100 μM (D) of farnesol showed a degraded cytoplasm (DC) but an intact cell wall (arrows). In panel E, the scanning electron micrograph of 50 μM farnesol-treated yeast cells of *P. brasiliensis* is shown, revealing an intact fungal cell wall.

tures (Figure 4A and 4A'). These observations clearly demonstrated that the use of 2% of methanol in all experimental systems as farnesol's diluent, did not affect *P. brasiliensis* cell morphology as well as growth and dimorphic transition.

In contrast, yeast cells treated with increasing concentrations of farnesol exhibited extensive cytoplasmic organelles damages. Remarkable changes, resulting in overall degeneration of internal structures, were found in *P. brasiliensis* cells cultivated in the presence of 25, 50 and 100  $\mu$ M of farnesol (Figure 4B–D). Various stages of degradation were observed, ranging from cells with partially digested cytoplasmic organelles, to cells with only the cell wall remaining intact (Figure 4D). These results suggest that death is probably associated to the disruption of cytoplasmic structures and internal cellular disintegration.

Scanning electron microscopy was also performed employing *P. brasiliensis* yeast cells treated with farnesol, as described in material and methods. Cells treated with different concentrations of farnesol showed no major differences at their surfaces when compared to the control cells incubated without farnesol. Figure 4E shows the scanning electron micrograph of the 50  $\mu$ M farnesol-treated yeast cells of *P. brasiliensis*, revealing an intact fungal cell. This result corroborates the data obtained by transmission electron microscopy, suggesting that farnesol does not affect the cell wall structure.

Similar results were reported by San-Blas et al. [29] studying the antifungal activity of ajoene, which blocks the growth of *P. brasiliensis* by inhibiting phosphatidylcholine synthesis [30]. Curiously, farnesol induces apoptosis in tumorigenic cells by a similar mode of action [42,43], suggesting an antiproliferative mechanism shared by ajoene and farnesol.

Moreover, our findings show that the fungicidal mechanism of farnesol is probably associated to the disruption of all cytoplasmic cellular organelles. A similar cytoplasm disintegration also occurs after the ingestion of *P. brasiliensis* yeast cells by cytokine-activated murine macrophages [44], indicating that this is possibly a common event in response to a stress condition.

In order to understand the mode of action of farnesol on *P. brasiliensis*, a microarray large scale analysis of gene expression, as well as assays to evaluate the cell death pathway activated in response to farnesol, should be performed. Of major interest is the analysis of the expression of genes related to phospholipid and sterol synthesis pathways, as well as those related to the apoptotic process, which are in progress.

## Conclusion

In summary, our data indicate that farnesol acts as a potent antimicrobial agent against *P. brasiliensis*, which is very sensitive to this sesquiterpene alcohol. The fungicide activity of farnesol in this pathogen is probably associated to cytoplasmic degeneration, in spite of the apparent cell wall integrity, as observed by transmission and scanning electron micrographs. Although the antimicrobial activity of farnesol has been clearly shown, additional studies involving animal models need to be performed to assess the potential effects of farnesol *in vivo*. It must be emphasized that the toxicity of exogenously administered farnesol on mice is negligible, as shown by Navarathna *et al.* [14]. Besides the observation of no significant gross changes in control and treated mice examined at necropsy, these authors verified that the oral (20 mM in water) or intraperitoneal (1 ml of 20 mM) administration of farnesol was harmless to mice, since there were no differences in weight or water ingestion between control and farnesol-treated animals.

In this sense, the antagonistic property of farnesol against *P. brasiliensis* cells is particularly interesting, since it could be further explored in order to evaluate its possible use as an antimicrobial agent.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

LD carried out all experiments and participated in the design of the study and the data analysis. SVB and SNB coordinated the electron microscopic study. CDSS and TMMDS participated in the design of the study. CK and ISP coordinated the study and critically evaluated the paper. ISP also received the financial support. All authors have read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This work was supported by CNPq, FAP-DF and FINEP. LSD was supported by a fellowship from CNPq.

## References

1. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S: **In vitro antibacterial activity of some plant essential oils.** *BMC Complement Altern Med* 2006, **30(6)**:39.
2. Grace MH: **Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*.** *Phytother Res* 2002, **16(2)**:183-5.
3. Medeiros JR, Campos LB, Mendonça SC, Davin LB, Lewis NG: **Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pitopsis undulatum*.** *Phytochemistry* 2003, **64(2)**:561-5.
4. Schnee C, Köllner TG, Gershenzon J, Degenhardt J: **The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E, E)-farnesol after herbivore damage.** *Plant Physiol* 2002, **130(4)**:2049-60.
5. Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J: **The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus***

- aureus and their mode of action.** *FEMS Microbiol Lett* 2004, **237(2)**:325-31.
6. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME: **Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50(4)**:1463-9.
  7. Koo H, Rosales PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH: **Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46(5)**:1302-9.
  8. Semighini CP, Murray N, Harris SD: **Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol.** *FEMS Microbiol Lett* 2008, **279(2)**:259-64.
  9. Brehm-Stecher BF, Johnson EA: **Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47(10)**:3357-60.
  10. Jabra-Rizk MA, Shirtliff M, James C, Meiller T: **Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance.** *FEMS Yeast Res* 2006, **6(7)**:1063-73.
  11. Hornby JM, Jensen EC, Liseac AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW: **Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67(7)**:2982-92.
  12. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL: **Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68(11)**:5459-63.
  13. Hornby JM, Kebaara BV, Nickerson KW: **Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47(7)**:2366-9.
  14. Navarathna DH, Hornby JM, Krishnan N, Parkhurst A, Duhamel GE, Nickerson KW: **Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*.** *Infect Immun* 2007, **75(4)**:1609-18.
  15. Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, Nickerson KW, Harris SD: **Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi.** *Mol Microbiol* 2006, **59(3)**:753-64.
  16. Rossignol T, Logue ME, Reynolds K, Grenon M, Lowndes NF, Butler G: **Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51(7)**:2304-12.
  17. Franco M: **Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis.** *J Med Vet Mycol* 1987, **25(1)**:5-18. Review
  18. Restrepo A: **The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved.** *Sabouraudia* 1985, **23(5)**:323-34.
  19. Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E: **The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?** *Med Mycol* 2001, **39(3)**:233-41.
  20. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T: ***Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics.** *Med Mycol* 2002, **40(3)**:225-42.
  21. Goihman-Yahr M, Pine L, Albornoz MC, Yarzabal L, de Gomez MH, San Martin B, Ocanto A, Molina T, Convit J: **Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells.** *Mycopathologia* 1980, **71(2)**:73-83.
  22. Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G: **Antifungal agents: mode of action in yeast cells.** *Rev Esp Quimioter* 2006, **19(2)**:130-9.
  23. Chakrabarti A: **Microbiology of systemic fungal infections.** *J Postgrad Med* 2005, **51(Suppl 1)**:S16-20.
  24. Gupta AK, Tomas E: **New antifungal agents.** *Dermatol Clin* 2003, **21(3)**:565-76.
  25. Hahn RC, Fontes CJ, Batista RD, Hamdan JS: **In vitro comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*.** *J Clin Microbiol* 2002, **40(8)**:2828-31.
  26. Kauffman CA: **Fungal infections.** *Proc Am Thorac Soc* 2006, **3(1)**:35-40.
  27. Hahn RC, Morato-Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS: **Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole.** *Mycoses* 2003, **46(8)**:342-7.
  28. Costa CS, Albuquerque FC, Andrade RV, Oliveira GC, Almeida MF, Brigido MM, Maranhão AQ: **Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance.** *Genet Mol Res* 2005, **4(2)**:390-408.
  29. San-Blas G, San-Blas F, Gil F, Mariño L, Apitz-Castro R: **Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene.** *Antimicrob Agents Chemother* 1989, **33(9)**:1641-4.
  30. San-Blas G, Urbina JA, Marchán E, Contreras LM, Sorais F, San-Blas F: **Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis.** *Microbiology* 1997, **143(Pt 5)**:1583-6.
  31. Thomaz L, Apitz-Castro R, Marques AF, Travassos LR, Taborda CP: **Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim.** *Med Mycol* 2008, **46(2)**:113-8.
  32. Palá-Paúl J, Brophy JJ, Pérez-Alonso MJ, Usano J, Soria SC: **Essential oil composition of the different parts of *Eryngium corniculatum* Lam. (Apiaceae) from Spain.** *J Chromatogr A* 2007, **1175(2)**:289-93.
  33. Dionigi CP, Millie DF, Johnsen PB: **Effects of farnesol and the off-flavor derivative geosmin on *Streptomyces tendae*.** *Appl Environ Microbiol* 1991, **57(12)**:3429-32.
  34. Machida K, Tanaka T, Fujita K, Taniguchi M: **Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Bacteriol* 1998, **180(17)**:4460-5.
  35. Machida K, Tanaka T, Yano Y, Otani S, Taniguchi M: **Farnesol induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism.** *Microbiology* 1999, **145(Pt 2)**:293-9.
  36. Uppuluri P, Mekala S, Chaffin WL: **Farnesol-mediated inhibition of *Candida albicans* yeast growth and rescue by a diacylglycerol analogue.** *Yeast* 2007, **24(8)**:681-93.
  37. Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AL, Nickerson KW: **Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71(8)**:4938-40.
  38. Cugini C, Calfee MW, Farrow JM, Morales DK, Pesci EC, Hogan DA: **Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Mol Microbiol* 2007, **65(4)**:896-906.
  39. Derengowski LS, Mello-de-Sousa TM, Kyaw CM, Silva-Pereira I: **Is there molecular communication between *Candida albicans* and *Paracoccidioides brasiliensis*? [abstract].** In XXXVI Annual Meet of the Brazilian Soc for Biochem and Mol Biol Volume G-32. SBBq, Salvador, Brazil; 2007.
  40. Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR: **Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101(14)**:5048-5052.
  41. Akiyama H, Oono T, Huh WK, Yamasaki O, Ogawa S, Katsuyama M, Ichikawa H, Iwatsuki K: **Actions of farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*.** *Chemotherapy* 2002, **48(3)**:122-8.
  42. Voziyan PA, Goldner CM, Melnykovich G: **Farnesol inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in cultured cells by decreasing cholinephosphotransferase activity.** *Biochem J* 1993, **295(Pt 3)**:757-62.
  43. Miquel K, Pradines A, Tercé F, Selmi S, Favre G: **Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells.** *J Biol Chem* 1998, **273(40)**:26179-86.
  44. Brummer E, Sun SH, Harrison JL, Perlman AM, Philpott DE, Stevens DA: **Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages.** *Infect Immun* 1990, **58(8)**:2628-36.

related sequences plus a number of randomly chosen ascomycete outgroups. This showed the isolate to be within the *Pyrenochaeta romeroi* clade.

In April 2007, treatment with posaconazole 400 mg b.i.d. was started. Random posaconazole serum levels measured by bioassay were 0.9–2.1 mg/L. Following 17 months of posaconazole therapy there was nearly complete disappearance of local pain and decreased local swelling. MRI in August 2008 of the patient's foot showed extensive bony and soft tissue infection. Posaconazole was discontinued in March 2009 and further swelling was observed over the subsequent 6 months.

*Pyrenochaeta romeroi* is widely distributed worldwide, where it grows on soil and vegetation, particularly in tropical climates. It has been reported as a rare cause of mycetoma in humans [5,6].

Clinical trials have shown successful treatment of eumycetoma with ketoconazole and itraconazole [1]. However, our patient responded poorly or not at all to itraconazole, corroborating in vitro results. There are no reports on the use of voriconazole in *P. romeroi* infections. In our patient, voriconazole was minimally effective and response was best classed as a failure. The difference in voriconazole susceptibility results observed is presumably due to the change in methodology, as on both occasions the same isolate was tested.

Unresponsiveness to treatment with voriconazole in our patient corroborates the susceptibility results using the modified EUCAST method. Posaconazole has been shown to have comparable or improved in vitro activity compared with itraconazole against agents causing mycetoma [7]. A literature search revealed no reports on the clinical efficacy of posaconazole in *Pyrenochaeta* infections. A modest response at best was seen in our patient with posaconazole initially, with clinical evidence of breakthrough more recently.

Considering the fact that our patient had worked barefoot in direct contact with cotton imported from mycetoma-endemic countries with possible microscopic injuries to his feet, as well as the absence of any known preceding injuries, this seems the probable route of infection. We believe that this case is the first description of this mode of mycetoma acquisition.

**Funding:** No funding sources.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

## References

- [1] Ahmed AOA, van Leeuwen W, Fahal A, van de Sande W, Verbrugh H, van Belkum A. Mycetoma caused by *Madurella mycetomatis*: a neglected infectious burden. *Lancet Infect Dis* 2004;4:566–74.
- [2] Hay RJ, Mackenzie DW. Mycetoma (madura foot) in the United Kingdom—a survey of forty-four cases. *Clin Exp Dermatol* 1983;8:553–62.
- [3] Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. Molecular identification of black-grain mycetoma agents. *J Clin Microbiol* 2006;44:3517–23.
- [4] Denning DW, Hanson LH, Perlman AM, Stevens DA. In vitro susceptibility and synergy studies of *Aspergillus* species to conventional and new agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:21–34.
- [5] Maiti PK, Haldar PK. Mycetomas in two different trauma-prone parts of body: a study of 212 cases. *Indian J Med Microbiol* 1998;16:19–22.
- [6] Mohanty JC, Mohanty SK, Sahoo A, Ghosh SK, Pattanaik KL. Eumycetoma caused by *Pyrenochaeta romeroi*—a case report. *Indian J Dermatol* 2000;45:76–7.
- [7] Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2009–15.

Daša Cerar\*

Department of Infectious Diseases, University Medical Centre  
Ljubljana, Japljeva 2, 1525 Ljubljana, Slovenia

Yassen M. Malallah

Department of Microbiology and Immunology, Sultan Qaboos  
University, Oman

Susan J. Howard

Paul Bowyer

David W. Denning

Regional Mycology Laboratory Manchester, Manchester, and The  
University of Manchester, Manchester Academic Health Science  
Centre, Manchester, UK

\* Corresponding author. Tel.: +386 1 522 2110;  
fax: +386 1 522 2456.

E-mail address: cerar.dasa@googlegmail.com  
(D. Cerar)

doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.08.004

## Propranolol inhibits *Candida albicans* adherence and biofilm formation on biotic and abiotic surfaces

Sir,

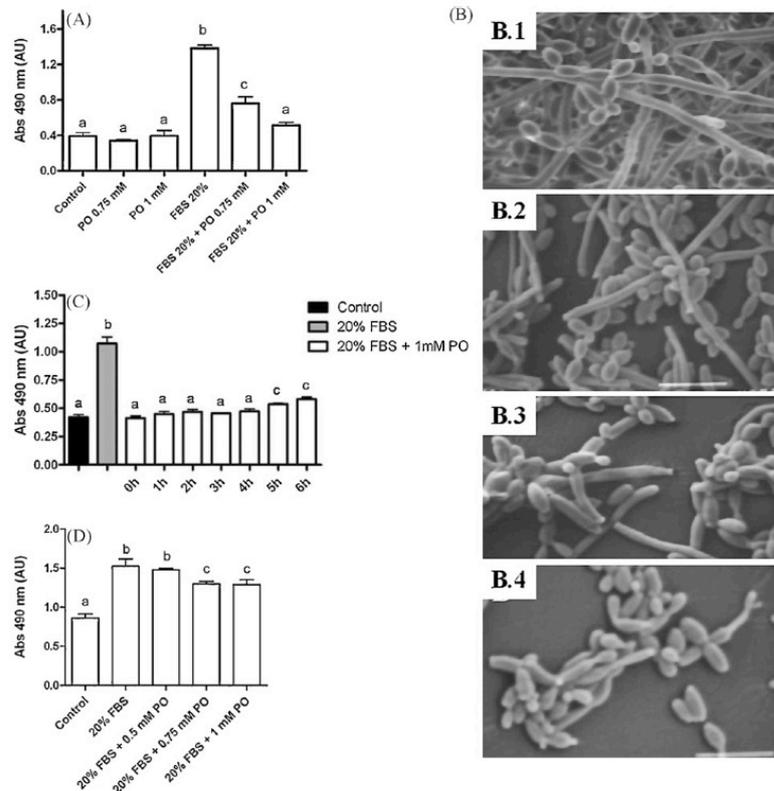
*Candida albicans* is associated with nosocomial infections partly due to its ability to adhere to a variety of biomaterials such as catheters and form biofilms. Biofilms have clinical repercussions, mainly due to their notorious resistance to antimicrobial agents and host immune defences [1]. A mature *C. albicans* biofilm is formed of a biphasic structure composed of a thin layer of yeast cells covered by hyphal elements embedded in a layer of extracellular material [2]. Hyphal formation is essential to the structural integrity of *C. albicans* biofilms [1,2]. Events that inhibit *C. albicans* filamentation probably impair biofilm formation. Here we describe the effects of propranolol on hyphae formation by planktonic *C. albicans* cells [3,4] as well as on biofilm development. Propranolol, a  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist, probably binds to phosphatidic acid (PA), blocking diacylglycerol (DAG) synthesis [3].

Propranolol (0.5–1 mM) significantly reduced *C. albicans* biofilm formation (Fig. 1A). The inhibitory effect of propranolol was also observed after the onset of biofilm development, when the addition of 1 mM propranolol at 6 h after the onset significantly inhibited biofilm formation (Fig. 1C). However, the addition of propranolol 24 h after the onset showed only a slight inhibitory effect, suggesting that propranolol acts mainly in the early stages of *C. albicans* biofilm formation (Fig. 1D). Additionally, ultrastructural analyses revealed that biofilms grown in the presence of propranolol are fragile, resulting in biofilms formed by monolayers of elongated cells (Fig. 1B).

In addition to the importance of the morphological transition in mature biofilm formation, initial attachment of cells to a substrate is crucial in the establishment of this microbial community. Thus, we also evaluated the effect of propranolol on adherence of *C. albicans* to abiotic surfaces. The attachment step, required for the formation of biofilm, is greatly affected by this compound. This result, together with the inhibitory effect on germ tube formation, may explain the effect of propranolol on *C. albicans* biofilm development.

The ability of *C. albicans* cells to attach to host epithelial and endothelial cells is also an important factor involved in the initial stages of colonisation and subsequent development of fungal infection. Consequently, we evaluated the effect of propranolol on the adherence of *C. albicans* to HeLa cells. Adhesion of fungal cells to epithelial cells was significantly affected by propranolol. Thus, propranolol could prevent the early stages of *C. albicans* colonisation and biofilm formation on biological and non-biological surfaces.

Adherence of microorganisms to surfaces involves numerous factors such as cell hydrophobicity, electrostatic forces and spe-



**Fig. 1.** Effects of propranolol (PO) on *Candida albicans* biofilms formation. (A) Assessment of the effect of PO on biofilm formation on a plastic surface by the MTT assay. *Candida albicans* was grown in 96-well plates for 24 h at 36 °C with fetal bovine serum (FBS) and PO. (B) Scanning electron microscopy of *C. albicans* biofilms induced by 20% FBS and cultivated at 36 °C in different concentrations of PO for 24 h: (B.1) 20% FBS; (B.2) 20% FBS + 0.5 mM PO; (B.3) 20% FBS + 0.75 mM PO; and (B.4) 20% FBS + 1 mM PO. (C) Evaluation of the effects of PO on the time course of *C. albicans* biofilm development. 1 mM PO was added at different time intervals after the onset of *C. albicans* serum-induced biofilm formation. The results were assessed by MTT assay following 24 h of biofilm growth at 36 °C. (D) Evaluation of the effects of PO on 24 h pre-formed *C. albicans* biofilms. Different concentrations of PO were added to *C. albicans* biofilms 24 h after the onset of its formation and were cultivated for a further 24 h at 36 °C. The results were assessed by MTT assay. Each letter indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

cific adhesins. Among the *C. albicans* adhesion molecules, the ALS (agglutinin-like sequence) gene family, which encodes cell surface glycoproteins, is of major importance [5]. The expression level of the *ALS3* gene increases in the initial stages of biofilm formation, suggesting its potential role in the development of *C. albicans* microbial communities [6]. Another well-characterised *C. albicans* adhesin is the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked cell surface protein Hwp1. Functional analyses showed that this protein is required for the adherence of fungal cells to epithelial cells as well as for normal biofilm formation [7]. Here we have provided evidence that the inhibitory effect of propranolol on *C. albicans* biofilm formation may be associated with its action on the expression of some adhesin genes. As expected, *C. albicans* filamentation induced by fetal bovine serum resulted in upregulation of *ALS1*, *ALS3* and *HWP1* adhesin genes as shown by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). However, addition of propranolol represses the upregulation of these genes, corroborating its inhibitory effect on filamentation and adherence of *Candida* cells to surfaces. Inhibition of *ALS3* gene expression by propranolol in *C. albicans* planktonic cells was recently described [4]. *ALS1*, *ALS3* and *HWP1* genes are regulated by EFG1, which is an important regulator of *C. albicans* morphogenetic processes. *Efg1* relative expression level is also repressed by propranolol [4]. Thus, our data are congru-

ent with the proposition that propranolol disrupts the cAMP-EFG1 pathway [4].

This study reveals that propranolol has a potent inhibitory effect on *C. albicans* biofilm formation in vitro. The mode of action of propranolol on biofilm development is closely related to its effect on *C. albicans* filamentation. Propranolol inhibits germ tube formation by repressing the cAMP-EFG1 pathway of *C. albicans* [4]. Moreover, propranolol inhibits morphogenesis by sequestering PA [3], suggesting that the transcription factor EFG1 can be regulated by PA and/or DAG signalling pathways. Consequently, the expression of EFG1 target genes (e.g. *ALS1*, *ALS3* and *HWP1*) is also repressed by propranolol. Thus, inhibition of *C. albicans* adherence to surfaces and hyphal development by propranolol results in abnormal biofilms. These results open a new perspective regarding the use of this compound in the treatment of implantable medical devices in order to prevent *C. albicans* biofilm formation.

**Funding:** This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). LSD was supported by a fellowship from CNPq.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

## References

- [1] Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001;18:163–70.
- [2] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183:5385–94.
- [3] Baker CA, Desrosiers K, Dolan JW. Propranolol inhibits hyphal development in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3617–20.
- [4] Ueno Y, Maruyama N, Kanno M, Watanabe T, Ogasawara A, Mikami T, et al. Effect of propranolol on hyphae formation signal in *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull* 2009;32:129–31.
- [5] Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 2005;4:633–8.
- [6] Nailis H, Vandembroucke R, Tillemans K, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Monitoring *ALS1* and *ALS3* gene expression during *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia* 2009;167:9–17.
- [7] Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* 2006;5:1604–10.

Lorena da Silveira Derengowski

Laboratório de Biologia Molecular, CEL/IB Universidade de Brasília,  
Brasília-DF, Brazil

Alex Leite Pereira

Laboratório de Microbiologia, CEL/IB Universidade de Brasília,  
Brasília-DF, Brazil

Alan Carvalho Andrade

Embrapa/CENARGEN, Brasília-DF, Brazil

Cynthia Maria Kyaw

Laboratório de Microbiologia, CEL/IB Universidade de Brasília,  
Brasília-DF, Brazil

Ildinete Silva-Pereira\*

Laboratório de Biologia Molecular, CEL/IB Universidade de Brasília,  
Brasília-DF, Brazil

\* Corresponding author. Tel.: +55 61 3307 2423;  
fax: +55 61 3349 8411.  
E-mail address: xocolau@unb.br (I. Silva-Pereira)

doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.08.010

## Antibacterial agents in patients with swine flu

Sir,

Your editorial [1] has prompted me to write about our experience with a local epidemic of swine flu in June and July 2009 in the hope that it will assist colleagues in deciding when to use antibacterials in patients with this infection. At the start of the epidemic we established criteria for hospital admission which were based on earlier experience of the epidemic from the USA and Australia. Patients were admitted if they fulfilled World Health Organisation criteria for swine flu and, additionally, were either hypoxic (on pulse oximetry) or hypotensive. Patients meeting influenza diagnostic criteria who had significant asthma, or who were pregnant or obese, were reviewed immediately by an experienced clinician who decided whether or not to admit them to hospital.

Using these criteria we admitted 50 patients in whom swine influenza was subsequently confirmed over a 3-week period, the

median age being 28 with a range from 16 to 80. Most patients were previously healthy and had no risk factors but one third were asthmatic and a quarter of the female patients were pregnant. Previously healthy non-pregnant patients recovered quickly with a median length of hospital stay of only 2 days. Six patients (12%) required assisted ventilation of whom three were asthmatic and two pregnant.

We did not give antibacterial agents routinely to our patients. Five of the 50 patients were admitted because of hypotension and they received a fluid challenge together with antibacterials in accordance with our sepsis protocol. Blood pressure in all of these patients became normal within a few hours and antibacterials were stopped within 48 h in all cases. Only one patient developed complications suggestive of bacterial superinfection. This previously healthy 40-year-old man remained pyrexial at 3 days after admission and became hypoxic on exertion and on the third day a chest X-ray showed new lobar consolidation. He was commenced on parenteral penicillin and clarithromycin but 2 days later developed a pleural effusion which proved to be an empyema when it was drained. This required decortication; he became afebrile 2 days afterwards and made an uncomplicated recovery thereafter. Bacterial cultures were negative. Several of the ventilated patients were given antibacterial agents but in none was there clear evidence of bacterial superinfection, intensive care having been required for respiratory failure at a point when X-rays showed streaky consolidation consistent with a primary viral pneumonitis.

In conclusion, our limited experience suggests that bacterial superinfection is an uncommon complication in patients infected with the current epidemic strain of swine influenza. This is in agreement with recent experience in California [2]. We do not believe that antibacterials should be administered routinely to these patients and in our single patient whom we believe to have had a bacterial superinfection there was ample time to make a considered judgement on appropriate treatment. Hypotension does appear to be a presenting feature of this infection and it is clearly prudent to manage these patients for possible bacterial sepsis but our experience suggests that rapid recovery (and negative bacterial cultures) can be taken to indicate a purely viral aetiology and antibacterial agents can safely be stopped at an early stage.

*Funding:* No funding sources.

*Competing interests:* None.

*Ethical approval:* Not required.

## References

- [1] Geddes AM. Influenza and bacterial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:293–4.
- [2] CDC. Hospitalized patients with novel influenza A (H1N1) virus – California, April–May 2009. *MMWR* 2009;58:1–5.

Christopher Ellis\*

Heart of England NHS Foundation Trust, Birmingham, B9 5SS, UK

\* Tel.: +44 0 121 424 2000.

E-mail address: christopher.ellis@heartofengland.nhs.uk

doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.09.002