

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO FUNGO
CRYPTOCOCCUS GATTII EM DIFERENTES
TEMPERATURAS**

Juliana Ferraz de Correa

Porto Alegre, novembro de 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO FUNGO
CRYPTOCOCCUS GATTHI EM DIFERENTES
TEMPERATURAS**

Monografia submetida ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Bacharel com ênfase em Biologia Molecular, Celular e Funcional do curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Juliana Ferraz de Correa

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, novembro de 2009.

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Apoio CNPq e FINEP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Marilene H. Vainstein, pela confiança e compreensão em todos os momentos difíceis e pelas palavras de ânimo ao longo desta jornada.

À minha mãe, por todo o esforço para que esta realização fosse possível e por me ensinar a ser forte, independente e encarar as dificuldades de frente.

Aos meus sogros por toda a ajuda com minha filha, paciência e agradáveis momentos de descontração em família nestes últimos anos.

À Juliana Crestani pelos ensinamentos de toda a parte prática deste trabalho e por discutir dados e acrescentar informações muito relevantes.

À Márcia, mestranda com quem tive o prazer de dividir quase três anos de iniciação científica, por me iniciar na ciência me incentivando a ler artigos, discutir resultados e principalmente pelo carinho e amizade.

Ao meu amigo Guilherme pela colaboração neste trabalho.

A muitos dos colegas dos laboratórios 220 e 217 pela ajuda sempre que precisei; em especial à Lívia e à Lucélia que estão sempre dispostas a ajudar e acrescentar informações interessantes.

E finalmente, ao Marcelo, pela paciência, o carinho, a compreensão e o amor em todas as horas.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	1
Resumo	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Aspectos Gerais	4
1.2 <i>Cryptococcus gattii</i> : um patógeno emergente	5
1.2.1 A infecção por <i>Cryptococcus gattii</i>	6
1.2.2 Fatores de Virulência de <i>Cryptococcus gattii</i>	7
1.3 Desenvolvimento a 37°C	10
1.4 O estudo proteômico comparativo	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Microrganismos e condições de cultivo	13
3.2 Extração de Proteínas Totais	13
3.3 Eletroforese Bidimensional	14
3.3.1 Primeira dimensão	14
3.3.2 Segunda dimensão	15
3.3.3 Análise dos géis bidimensionais	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Cultivos das leveduras	16
4.2 Otimização da extração/solubilização das proteínas totais de <i>Cryptococcus gattii</i>	16
4.3 Quantificações das proteínas	18
4.4 Otimização do método de precipitação do extrato protéico total de <i>Cryptococcus gattii</i>	19
4.5 Proteômica comparativa do crescimento de <i>Cryptococcus gattii</i> a 25° e 37°C	21

5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	26
7. ANEXOS	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

BCA - ácido bicinchonínico

CHAPS - 3-3[(3 colamidopropil) dimetilamônio]-propanosulfonato

cm - centímetros

CO₂ - dióxido de carbono

C. gattii - *Cryptococcus gattii*

C. neoformans - *Cryptococcus neoformans*

DNA - ácido desoxirribonucléico

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilendiaminotetracético

GXM - glicuronoxilomanana

GalXM - galactoxilomanana

h - hora

Hz - hertz

HIV - vírus da imunodeficiência humana

kDa - quilodalton

M - molar

mM - milimolar

μM - micromolar

mL - mililitros

μL - microlitros

mg/mL - miligramas por mililitros

μg - microgramas

min - minutos

μm - micrômetros

MS - espectrometria de massas

nm - nanômetros

OD - densidade óptica

PMSF - fluoreto de fenilmetil sulfonil

°C - graus Celsius

RDA - análise da Diferença Representacional

RNA - ácido ribonucléico

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

TCA - ácido tricloroacético

TPCK - N- tosil -1 fenilalanina-clorometil cetona

Vh - volts hora

2D-PAGE - eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

RESUMO

Cryptococcus gattii é uma levedura basidiomicética, considerada um patógeno primário e um dos agentes etiológicos da criptococose e foi responsável, recentemente, por uma epidemia de criptococose nas Ilhas Vancouver, Canadá. Dentre os principais fatores relacionados à patogenicidade desse microrganismo estão a cápsula polissacarídica, a produção do pigmento melanina e a capacidade de multiplicação a 37°C, que o torna capaz de estabelecer infecção no hospedeiro. A identificação de proteínas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro é de suma importância, possibilitando a compreensão dos mecanismos utilizados pelo patógeno para a infecção. Atualmente poucos trabalhos envolvendo *Cryptococcus* spp. e análises proteômicas são reportados. Neste estudo a linhagem hipervirulenta R265 de *C. gattii* foi analisada com o objetivo de evidenciar proteínas diferencialmente expressas no desenvolvimento da levedura a 25°C e 37°C. A análise proteômica comparativa por eletroforese bidimensional possibilitou evidenciar quinze proteínas com expressão aumentada a 25°C e vinte e nove proteínas com expressão aumentada a 37°C. A identificação das proteínas diferencialmente expressas verificadas neste estudo, além de contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos utilizados por *C. gattii* para colonizar o hospedeiro, garantindo seu desenvolvimento na temperatura de infecção, também são potenciais alvos para estudos de desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da criptococose ocasionada por este patógeno.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

Os estudos sobre o gênero *Cryptococcus* se iniciaram no ano de 1894, quando Sanfelice (1984) isolou uma levedura a partir de suco de pêssego e outros autores descreveram isolados clínicos de leveduras encapsuladas que foram consideradas previamente como pertencentes ao Gênero *Saccharomyces*. Em 1901 Vuillemin examinou várias dessas culturas e observou que as características de ascósporos de *Saccharomyces* não estavam presentes, classificando-as então como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Em 1970, uma linhagem atípica de *Cryptococcus neoformans* foi isolada de um paciente leucêmico (Vanbreuseghem, 1970 *apud* Bovers *et al.*, 2008). Esse isolado foi classificado inicialmente como uma variedade de *C. neoformans*, *C. neoformans* var. *gattii*, e assim permaneceu até o ano de 2002 quando foi elevado à categoria de espécie por suas diferenças acentuadas com relação às outras variedades, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubbi* (Kwon-Chung *et al.*, 2002).

As espécies *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubbi* e *C. gattii*, leveduras basidiomicéticas capazes de causar infecção ao homem e animais, estão incluídas no Complexo *Cryptococcus neoformans*. O Complexo apresenta quatro sorotipos de acordo com a natureza antigênica da cápsula polissacarídica, sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubbi*) sorotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*), sorotipos B e C (*C. gattii*) e existe ainda um sorotipo híbrido AD (Figura 1).

C. neoformans e *C. gattii* diferem quanto à epidemiologia e quanto a seus nichos ecológicos (Bovers *et al.*, 2008). *C. neoformans* é cosmopolita e considerado um patógeno oportunista por acometer preferencialmente indivíduos imunocomprometidos enquanto *C. gattii* por estar relacionado majoritariamente a indivíduos imunocompetentes é considerado patógeno primário, porém há relatos, em menor escala, de imunocomprometidos infectados por *C. gattii*, na maioria dos casos pacientes HIV - positivos (Muyembe *et al.*, 1992; Bodasing *et al.*, 2004). *C. neoformans* é cosmopolita tendo como principais fontes ambientais solos e excretas de aves, principalmente pombos (*Columba livia*) (Alves *et al.*, 2001; Horta *et al.*, 2002; Boekhout, 2003; Casali *et al.*, 2003). *C. gattii*, associado a troncos de várias espécies de árvores, especialmente eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*) (Krockenberger *et al.*, 2002) era considerado restrito a regiões de clima tropical e subtropical até a ocorrência de uma epidemia ocasionada por este patógeno nas Ilhas Vancouver no Canadá, região de clima temperado (Kidd *et al.*, 2004).

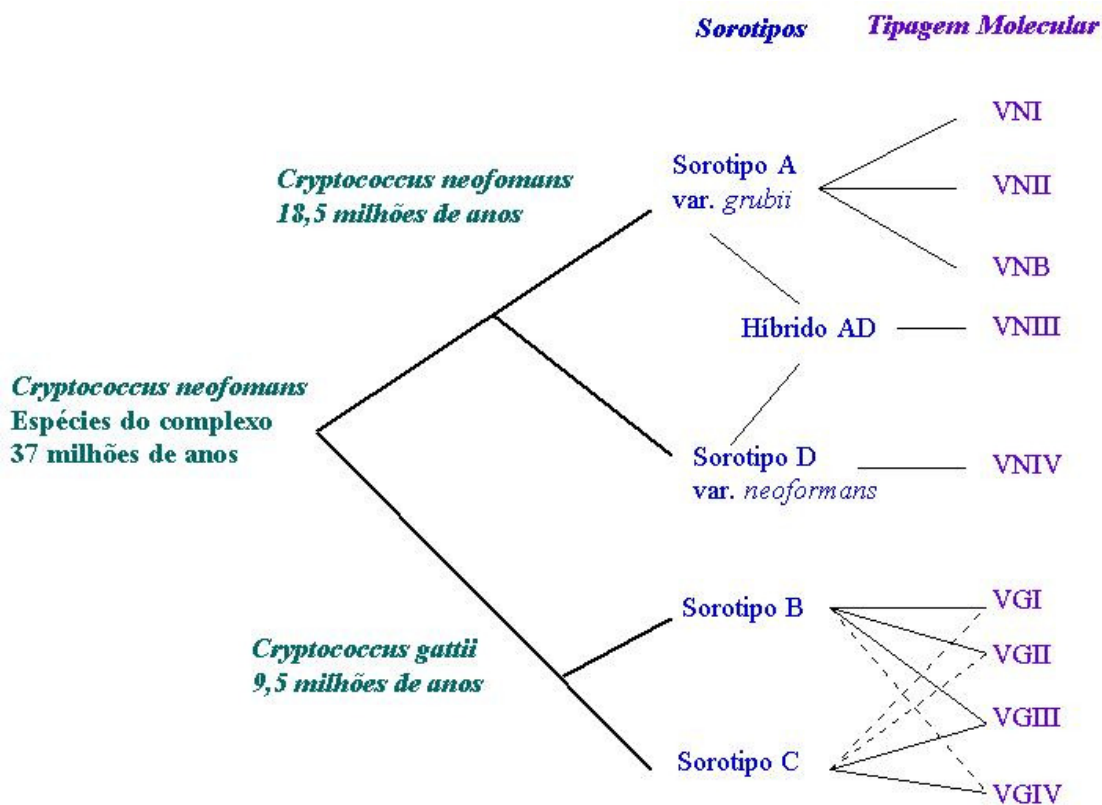


Figura 1. Evolução do complexo da espécie de *C. neoformans*. O complexo de espécies de *Cryptococcus* é composto por *C. neoformans* e *C. gattii*, que divergiram de um ancestral comum há mais de 37 e 18,5 milhões de anos, respectivamente. As duas espécies são divididas em 4 sorotipos e 9 tipos moleculares (Adaptada de LIN e HEITMAN, 2006).

1.2 *Cryptococcus gattii*: um patógeno emergente

Até recentemente, *C. gattii* era pouco estudado já que a infecção por este microrganismo compreendia apenas 1% dos casos de criptococose no mundo (Hansong Ma e Robin C. May, 2009). Mesmo em áreas onde *C. gattii* é endêmico, como na Austrália, a taxa de infecção é de 0,94 casos por milhão de residentes por ano (Chen *et al.*, 2000; Sorrel, 2001). No entanto, a recente epidemia de criptococose causada por *C. gattii* estimulou a realização de maiores estudos sobre esta espécie. Essa epidemia foi inicialmente notada em 1999 na Ilha de Vancouver, British Columbia, Canadá. Entre 2002 e 2006, a média anual de incidência de criptococose foi de 6,5 casos por milhão em British Columbia e 27,9 casos por milhão nas Ilhas Vancouver (BC Control, 2007).

A mudança na epidemiologia de *C. gattii* é provavelmente consequência de alterações na ecologia e biologia do fungo e ilustra seu potencial em causar doenças

sérias ao homem. A colonização de *C. gattii* nas Ilhas Vancouver, e possivelmente outras regiões adjacentes, indica que esse fungo tem a habilidade de se adaptar a novas condições ambientais (Ashwin *et al.*, 2009). Foi sugerido por Kidd *et al.* (2004) que o clima temperado de Vancouver pode proporcionar um nicho favorável à sobrevivência e dispersão de *C. gattii*, assim como também, o aquecimento global poderia favorecer sua colonização em novas regiões geográficas.

1.2.1 A infecção por *Cryptococcus gattii*

O ciclo de infecção é muito similar entre *C. gattii* e *C. neoformans*. Acredita-se que a infecção seja adquirida por inalação de propágulos do fungo dispersos no ambiente, os quais se alojam nos pulmões e logo podem seguir pela via hematogênica até o sistema nervoso central (Figura 2). As infecções pulmonares são mais brandas, pois neste ambiente o fungo pode ser eficientemente fagocitado e destruído pelas células de defesa do sistema imune, ou sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos. Quando atinge o sistema nervoso central, inicia a fase crônica e mais grave da doença, vindo a desenvolver quadros de meningoencefalite ou meningite (Lin e Heitman, 2006).

O aspecto clínico da infecção é o mais discrepante entre as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. A doença causada por *C. gattii* é caracterizada por uma alta incidência de criptococomas nos pulmões e cérebro, aumento na morbidade neurológica e resposta mais tardia ao tratamento com antifúngicos (Sorrel, 2001). A doença ocasionada por *C. neoformans* é associada a lesões pulmonares e cerebrais que se apresentam como infiltrados mais difusos.

Além da infecção em humanos, também ocorre a infecção em animais como gatos, cavalos, cachorros, coalas entre outros, sendo que apresenta ocorrência mais freqüente em gatos que nas outras espécies (Gemma *et al.*, 2008). Na epidemia no Canadá, foi relatada uma incidência duas a três vezes maior de criptococose em casos veterinários que em seres humanos (Lester *et al.*, 2004).

Animais responsáveis pela dispersão

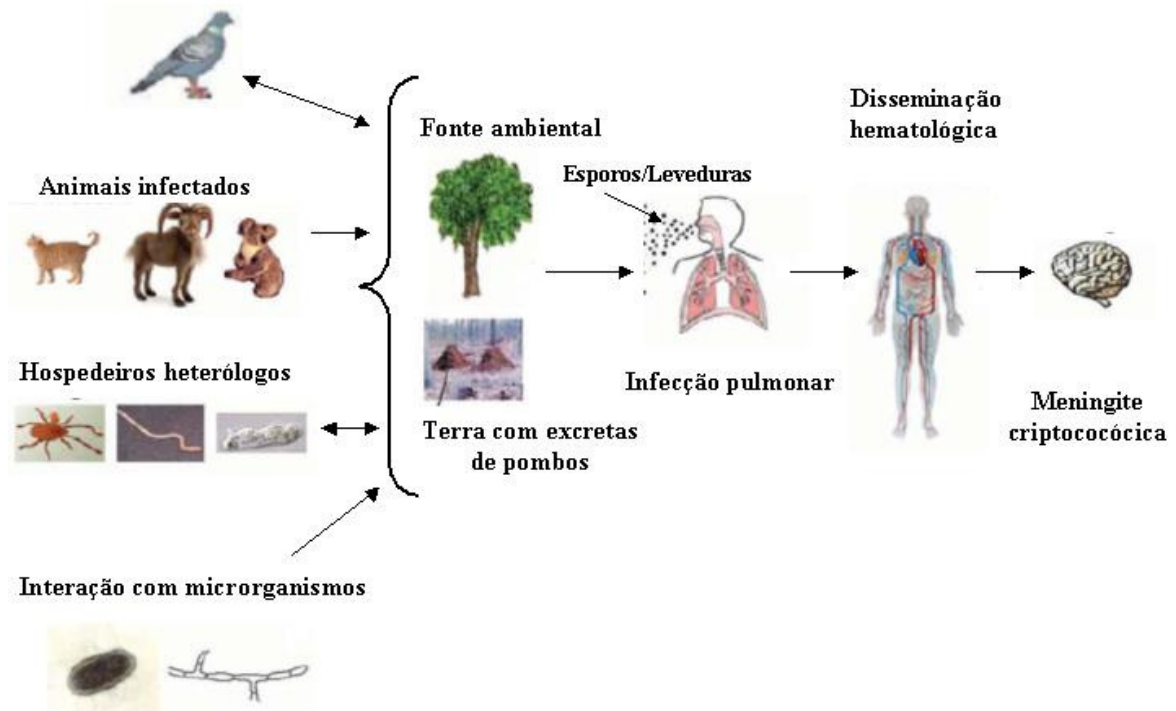


Figura 2: Ciclo de infecção do *Cryptococcus* spp. O fungo sobrevive no ambiente, no solo e em árvores. Os pássaros, em especial os pombos, podem ser os responsáveis pela distribuição global do fungo. O fungo infecta vários animais: gatos, cachorros, coalas, cabras entre outros. Ele também pode sobreviver no meio ambiente com predadores, assim como aranhas, vermes, amebas e podem ainda estabelecer relação com outros microrganismos, como bactérias e outros fungos. Em humanos, o fungo se estabelece nos pulmões através da inalação de esporos ou células leveduriformes dissecadas, presentes no meio ambiente. Quando o indivíduo torna-se imunocomprometido, o fungo pode reagir da forma latente ou dormente (o qual este pode se encontrar) e invadir o sistema nervoso central (SNC). A infecção do SNC representa a forma mais severa de criptococose humana (Adaptado de LIN e HEITMAN, 2006).

1.2.2 Fatores de virulência de *Cryptococcus gattii*

As infecções fúngicas podem ser consideradas como um pequeno desvio no ciclo natural de alguns fungos, os quais, na maioria das vezes, necessitam de determinantes que possibilitem seu desenvolvimento no hospedeiro. Estes determinantes são fatores de virulência, características que propiciam ao microrganismo transpor as defesas do indivíduo infectado (Rosa e Silva, 2006).

A Tabela 1, adaptada de Ashwin *et al.* (2009), cita uma série de fatores de virulência de *C. gattii* e suas funções.

Tabela 1. Fatores de virulência de *C. gattii* e suas funções. Adaptado de Ashwin *et al.* (2009).

Fator	Função
Cápsula e polissacarídeos associados	Evasão da fagocitose Redução da apresentação de antígeno Redução da produção de citocinas Indução de células T supressoras, que inibem imunidade mediada por células Inibição da resposta das células T pela GXM Inibição pela GXM da migração de leucócitos a sítios de inflamação
Melanina	Proteção contra radiação UV Proteção contra radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio Pode contribuir ao tropismo pelo sistema nervoso central Contribui a carga celular negativa
Manitol	Sugestão de aumento na pressão intracranial Proteção contra estresse Proteção contra radicais livres derivados de oxigênio
Proteases extracelulares	Atividade proteolítica Pode contribuir com a degradação de proteínas envolvidas na integridade tecidual e imunidade do hospedeiro
Produtos da rota da lacase	Oxidação de difenol Síntese de melanina Degradação de lignina da madeira
Superóxido-dismutase	Proteção contra estresse oxidativo Proteção contra ruptura oxidativa produzida pro células imune efectoras
Fosfolipases	Invasão tecidual pela degradação de lipídeos de membrana dos mamíferos e surfactante pulmonar
Urease	Função exata desconhecida Pode agir na transferência de Cryptococcus para o sistema nervoso central
Fator de transcrição STE α (em células de mating type α)	Seu aumento pode levar a síntese da difenoloxidase (que é uma lacase)
Crescimento a temperatura fisiológica (37°C)	Sobrevivência e persistência no hospedeiro
Tolerância a pH baixo	Sobrevivência e persistência no ambiente
Tolerância a níveis elevados de sal	Sobrevivência e persistência no ambiente
Mudança fenotípica	Mudança no tamanho da cápsula – variante mocóide mais virulenta, variante mais lisa supostamente capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica

Dentre os fatores citados na Tabela 1, os mais bem estabelecidos são a presença da cápsula polissacarídica, a produção do pigmento melanina e a capacidade de desenvolvimento a 37°C.

A cápsula, que pode ser observada na Figura 3A, é composta principalmente pelos polissacarídeos glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), contendo aproximadamente 88% de GXM e 10% de GalXM (Friess *et al.*, 1999). Confere proteção contra a desidratação e atua como uma barreira física que interfere no processo de fagocitose e dificulta a ação do sistema imune do hospedeiro (Idnurm *et al.*, 2005). Componentes da cápsula inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, inativam componentes do sistema complemento, e reduzem a migração de leucócitos ao sítio de infecção (Bose *et al.*, 2003). Já foram identificados mais de 70 genes envolvidos na biossíntese da cápsula, sendo os mais importantes os genes das famílias *CAP* e *CAS* (Chang e Kwon-Chung, 1999; Moyrand *et al.*, 2002). Em estudos de infecção experimental de camundongos, a composição antigênica da cápsula *in vivo* é distinta em diferentes órgãos infectados, sugerindo uma evolução da estrutura capsular durante a infecção (Charlier *et al.*, 2005). Mutantes acapsulados são avirulentos sendo facilmente fagocitados por macrófagos e neutrófilos (Kwong-Chung e Rhodes, 1986). Durante a infecção, há um aumento significativo do tamanho da cápsula devido à presença de estímulos tais como altos níveis de CO₂, limitação de ferro e contato com macrófagos (Bose *et al.*, 2003; McFadden e Casadevall, 2001).

A melanina é um pigmento de cor marrom que desempenha função de proteção contra os raios ultravioleta e outras agressões do meio ambiente (Nosanchuk *et al.*, 1999). Esse pigmento é formado pela oxidação de compostos fenólicos e indólicos. Durante o desenvolvimento da criptococose, a melanina pode ser formada pela oxidação das catecolaminas encontradas no cérebro, dessa maneira protegendo a levedura de radicais livres que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro (Casadevall *et al.*, 2000), isso justifica o tropismo desse patógeno pelo cérebro (Casadevall e Perfect, 1998). Na figura 3B podem ser observadas colônias de *C. neoformans* melanizadas, de cor marrom, comparadas com colônias brancas de *Candida albicans*.

Por ser uma característica de relevância para o presente estudo, o desenvolvimento a 37°C será melhor abordado no próximo tópico.

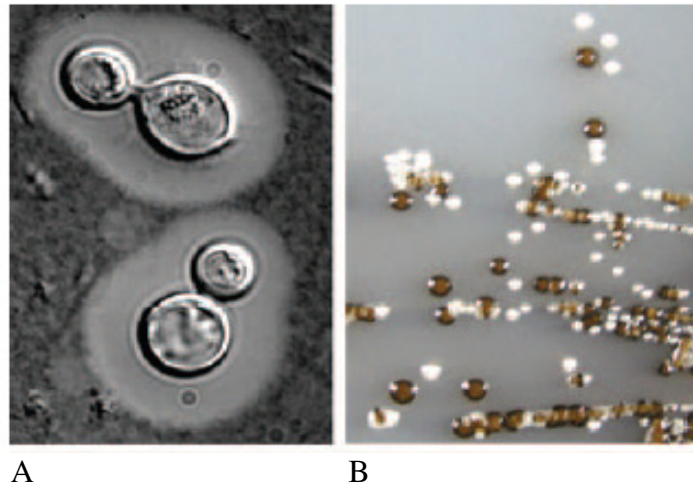


Figura 3: Características que permitem diferenciar *Cryptococcus neoformans* de outros fungos. (A) A não permeabilidade da tinta da Índia através da cápsula polissacarídica, permite identificar as células fúngica. Devido às diferenças de densidades nas estruturas celulares de *Cryptococcus* spp. é possível distinguir a cápsula do restante da célula. (B) Os fungos produzem melanina na presença de moléculas difenólicas (L-DOPA, por exemplo), produzindo colônias marrons. É observada a diferença de colônias de *Cryptococcus* em contraste com as colônias de *Candida albicans* que se apresentam brancas (IDNURM, 2005).

1.3 Desenvolvimento a 37°C

A capacidade de desenvolvimento a 37°C é uma característica fundamental de patógenos humanos sendo indispensável ao estabelecimento e manutenção dos mesmos no hospedeiro. Dentre as 38 espécies do gênero *Cryptococcus*, *C. neoformans* e *C. gattii* são as únicas capazes de estabelecer desenvolvimento normal acima de 30°C (Perfect, 2006) e a tolerância a temperaturas relativamente elevadas pode variar entre as linhagens e variedades (Martinez *et al.*, 2001).

Estudos moleculares identificaram uma variedade de genes associados ao desenvolvimento a 37°C em *C. neoformans* (Perfect, 2006). Alguns dos produtos gênicos desses estudos são a proteína calcineurina, a qual é necessária para resposta ao estresse e integridade celular em leveduras (Odom *et al.*, 1997); MPK1, enzima envolvida na manutenção da integridade celular (Kraus *et al.*, 2003); RAS1, que regula o estabelecimento da forma filamentosa, *mating*, e desenvolvimento em altas temperaturas, dentre outros.

Buscando identificar genes diferencialmente expressos por *C. neoformans* a 37°C, uma análise por microarranjo identificou o fator de transcrição *MGA2*, envolvido na biossíntese de ácidos graxos. A expressão de genes envolvidos em processos de remodelamento de membrana parece ser essencial para a adaptação a temperaturas elevadas (Kraus *et al.*, 2004). Os genes regulados pela temperatura identificados em *C.*

neoformans atuam em uma variedade de processos biológicos e são apenas uma fração de alvos potenciais para inibição do desenvolvimento da levedura no hospedeiro (Perfect, 2005).

1.4 O estudo proteômico comparativo

A análise sistemática de todas as proteínas em um tecido ou célula foi popularizada sob o termo proteômica (Domon e Aebersold, 2006). Em análises de fígado humano, na intenção de se obter o nível de correlação entre a abundância de mRNA e proteínas correspondentes, foi observado um coeficiente de correlação de 0,48, sugerindo que a regulação pós-transcricional da expressão gênica é um fenômeno freqüente em organismos superiores (Anderson e Seilhamer, 1997). A proteômica, portanto, parece ser uma ferramenta muito apropriada para entender-se o funcionamento dos genes, pois analisa o produto final do genoma.

Nenhum método ou instrumento existente é capaz de identificar e quantificar os componentes de uma amostra protéica complexa em uma única etapa de operação (Aebersold & Mann, 2003). Ao contrário, componentes individuais para separação, identificação e quantificação de polipeptídios, assim como ferramentas para integração e análise de todos os dados devem ser utilizadas em conjunto.

A abordagem proteômica exige a separação de proteínas com alta resolução para posterior análise. A separação das proteínas de uma mistura complexa em géis de poliacrilamida por eletroforese bidimensional, seguida da identificação em MS é o método mais amplamente utilizado (Washburn *et al.*, 2001). Em um experimento de 2D-PAGE, as proteínas são separadas em uma dimensão de acordo ao ponto isoelétrico (pI), e em uma segunda dimensão pelo peso molecular.

Se o objetivo é prover uma lista de todas as proteínas presentes em uma amostra, metodologias baseadas em cromatografia multidimensional acoplada à espectrometria de massas em tandem (MS/MS) podem fornecer resultados superiores. Por outro lado, se o objetivo for observar mudanças quantitativas na expressão de proteínas ou suas modificações pós-traducionais durante um processo biológico, os géis bidimensionais ainda são os mais recomendáveis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a presença de proteínas diferencialmente expressas na multiplicação de *Cryptococcus gattii* a temperatura de infecção (37°C) e ambiente (25°) para posterior identificação das mesmas.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a padronização do método de extração/solubilização das proteínas totais de *Cryptococcus gattii*;
- Comparar o padrão de expressão das proteínas nas diferentes condições de cultivo através de análise *in silico*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e condições de cultivo

Foi utilizada no estudo a linhagem R265 de *C. gattii* (proveniente da epidemia de criptococose em Vancouver – Canadá (Kidd *et al.*, 2004)). As leveduras foram cultivadas inicialmente em ágar Sabouraud por 72 h a 30°C. Por conseguinte, foram incubadas em 50 ml de caldo Sabouraud a 25°C, sob agitação constante a 200 rpm por 20 h. Após centrifugação a 2.500 rpm por 5 min, o sedimento de células foi ressuspenso em 10mL de água Milli-Q e foi feita a contagem das células para posterior inóculo. O inóculo foi realizado em 100 mL de meio Sabouraud contendo 5×10^7 células mL⁻¹ e permaneceu por 20 h a 25°C ou 37°C em agitação constante a 200 rpm. Logo, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min, descartou-se o sobrenadante e as células foram lavadas três vezes com água Milli-Q seguidas por centrifugações nas mesmas condições mencionadas e posteriormente foram congeladas para liofilização e extração das proteínas totais.

3.2 Extração de Proteínas Totais

Para a escolha do melhor método de extração/solubilização das proteínas de *C. gattii* foram testados os seguintes métodos:

Método 1: As células liofilizadas foram maceradas até a formação de um pó fino em gral com pistilo e adição de nitrogênio líquido e ressuspendidas em tampão de suspensão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 50 µM TPCK; 1 mM PMSF; 5 mM Iodoacetamida;

Método 2: método 1 com acréscimo de 2% de CHAPS no tampão de suspensão;

Método 3: método 1 com uso de sonicação (3 pulsos de 30 s - 20Hz) após o passo inicial de solubilização.

Após esse passo inicial, diferente para cada método, foi realizada agitação em vortex por 10 min com intervalos de 1 min no gelo e 1 min no vortex. Logo, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 20 min a 8°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e sobre os restos celulares foi adicionada a metade do volume do tampão de suspensão utilizado na primeira extração e repetido o procedimento com intervalos de agitação e gelo e centrifugação. Os sobrenadantes oriundos da primeira extração e

centrifugação e o da segunda extração foram juntados e filtrados em seringa e filtro (0,45 µm) estéreis. As proteínas foram quantificadas utilizando reagente de Bradford e visualizadas por eletroforese em SDS-PAGE unidimensional com uma concentração final de acrilamida de 12%. Com a finalidade de se testar a eficiência da quantificação com reagente de Bradford e possível interferência dos inibidores de proteases na quantificação, também foi realizada quantificação das proteínas com *BCATM Protein Assay Kit* (PIERCE). Após a quantificação, o sobrenadante que continha as proteínas foi distribuído em alíquotas contendo 1,2 mg de proteína, quantidade utilizada para eletroforese bidimensional. Posteriormente, as alíquotas foram liofilizadas e conservadas a -80°C para posteriores análises.

3.3 Eletroforese bidimensional

3.3.1 Primeira dimensão

Para precipitação das proteínas e remoção de contaminantes, foram testadas três metodologias: uso de TCA 20% diluído em água MilliQ, uso de TCA 20% diluído em acetona e uso de Kit comercial de limpeza da amostra (2-D Clean-Up Amersham Biosciences e 2-D Clean-Up Bio-Rad). Quando utilizado TCA, as amostras foram diluídas em uma proporção de 1:8 (uma medida de amostra para 8 de TCA 20%, tanto diluído em água como em acetona) e deixadas a 4°C por aproximadamente 16 hs. Para obtenção do sedimento contendo as proteínas, as amostras foram centrifugadas por 15 min, 14.000 rpm a 10°C, seguidas de 3 lavagens com acetona gelada.

Após obtenção do sedimento protéico o mesmo foi ressuscitado em 300 µL de tampão de solubilização (9 M uréia, 4% CHAPS, 1% DTT, 0,2% anfólitos), deixado 1 h a 22°C com agitações leves a cada 20 min e logo centrifugado por 45 min a 14.000 rpm a 20°C. A hidratação das fitas de pH imobilizado de 17 cm com faixa de pH de 4-7 (ReadyStripTM IPG Strip, Bio-Rad) ocorreu de forma passiva, aproximadamente 16 hs a 22°C. Após a hidratação das fitas, as amostras foram isofocalizadas (PROTEAN IEF – Bio-Rad) até alcançar um total acumulado de 70.000 Vh e logo armazenadas a -80°C até a realização da migração da segunda dimensão.

3.3.2 Segunda dimensão

Para realização da migração da segunda dimensão as tiras foram descongeladas, incubadas sob leve agitação por 15 min em 5 mL de tampão de equilíbrio (uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, Tris pH 8,8 0,375 M, 0,0008% azul de bromofenol) inicialmente contendo 1% de DTT, que promove redução, e logo contendo 4% de iodacetamida, que promove alquilação da amostra. Por conseguinte, utilizando o sistema *Protean XL II System* (Bio-Rad), as tiras foram submetidas à SDS-PAGE. Os géis foram preparados com uma concentração final de acrilamida de 12%.

3.3.3 Análise dos géis bidimensionais

Ao final da migração, os géis bidimensionais foram corados com Comassie Brilliant Blue G250, descorados com água destilada e ácido acético 10%, escaneados e analisados *in silico* com o software PDQuest Basic 8.0 (Bio-Rad) com o método estatístico de regressão local.

4. RESULTADOS

4.1 Cultivos das leveduras

Foram realizados três cultivos de *C. gattii* (R265) partindo de uma concentração de 5×10^7 células mL⁻¹. Desses cultivos obteve-se, de um modo geral, aproximadamente 5 mg/ml de extrato protéico total, dados evidenciados na Tabela 2.

Tabela 2: Produção de extrato protéico total de *C. gattii*

Amostra	Data do cultivo	Temperatura (°C)/ Volume do cultivo utilizado na extração (ml)	Concentração protéica (mg/ml)	Volume (ml)
R265	24/04/09	25 / 50	5,7	2,6
R265	24/04/09	37 / 50	2,27	7,5
R265	10/07/09	25 / 50	4,93	2,8
R265	10/07/09	37 / 50	5,04	3,0
R265	28/08/09	25 / 50	5,68	3,2
R265	28/08/09	37 / 50	5,45	2,7

4.2 Otimização da extração/solubilização das proteínas totais de *C. gattii*

No presente estudo, três metodologias para extração e solubilização das proteínas totais de *C. gattii* foram testadas. O método 3, no qual se utiliza além da maceração com nitrogênio líquido e tampão de solubilização com inibidores de proteases um método mecânico para extração e solubilização das proteínas através do uso de sonicação, apresentou um total na quantificação de proteínas maior que os demais métodos. No entanto, o método 2, onde se acrescenta um método químico pela adição de um detergente zwitteriônico (CHAPS) ao tampão de solubilização, apresentou uma quantificação intermediária entre os métodos 1 e 3 e verificou-se uma resolução melhor das proteínas, apresentando um número maior de spots e resolução de proteínas ácidas. Esses dados podem ser evidenciados na Figura 4.

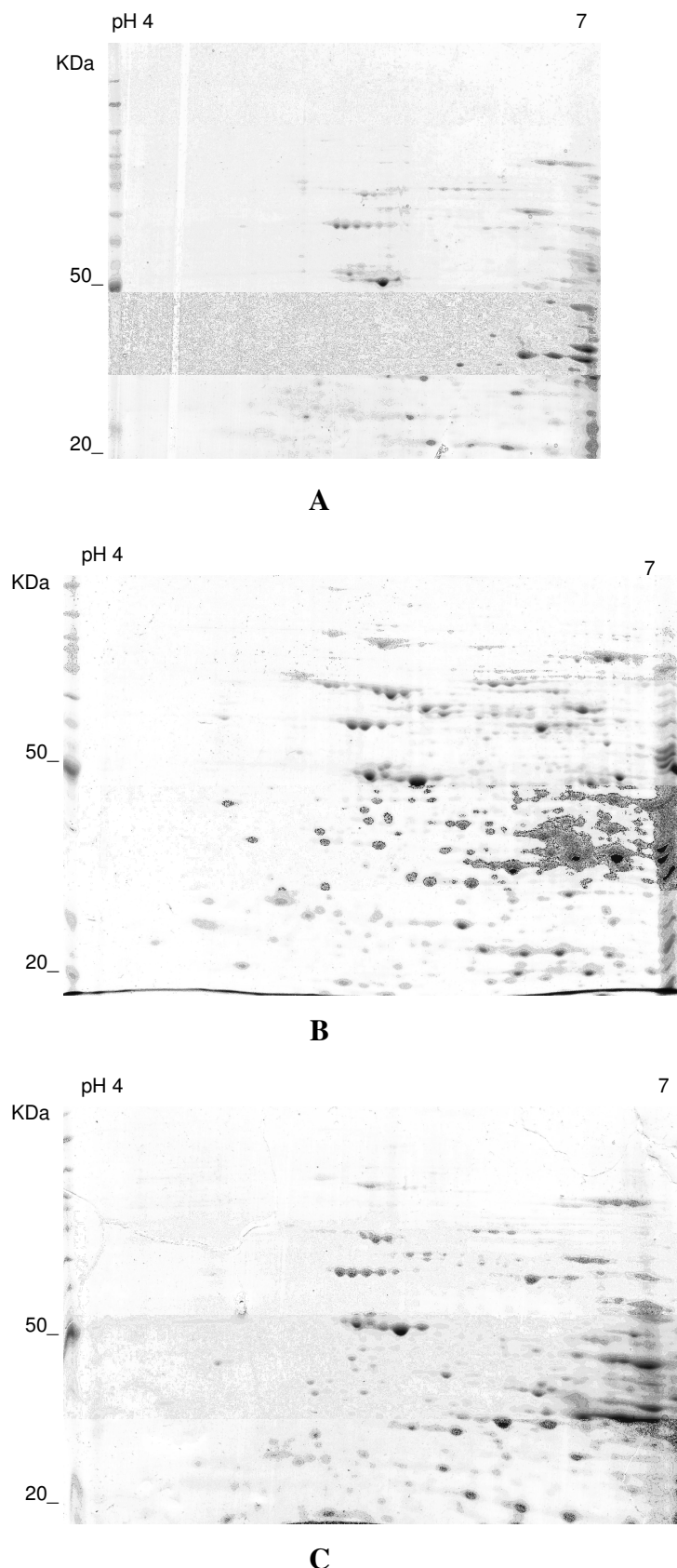


Figura 4: Padronização do método de extração/solubilização das proteínas totais de *C. gattii*. Eletroforese bidimensional do extrato protéico oriundo do cultivo de *C. gattii* a 37°C utilizando-se 1,2 mg de proteínas em tiras de 17 cm com faixa de pH 4-7. **A.** Método 1 (extração das proteínas por maceração com nitrogênio líquido e tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 50 µM TPCK; 1 mM PMSF; 5 mM Iodoacetamida); **B.** Método 2 (método 1 com acréscimo de 2% de CHAPS no tampão de extração); **C.** Método 3 (método 1 com uso de sonicação após o passo inicial de solubilização).

4.3 Quantificações das proteínas

Para quantificação das proteínas totais foi utilizada técnica de Bradford. Para verificar uma possível interferência dos inibidores de proteases (utilizados no tampão de extração) na quantificação protéica empregando este método, foi realizada quantificação com ensaio de BCA (ácido bicinchoninico). Nesse teste, a mesma amostra foi processada até o passo de ressuspensão em tampão de extração quando então foi ressuspensa em tampão contendo os inibidores de proteases e tampão sem os inibidores, apenas com os tamponantes Tris e EDTA. A quantificação foi feita no mesmo dia, e os resultados foram muito similares para as duas técnicas. A quantificação por Bradford da amostra contendo os inibidores resultou em 4,5 mg/mL de proteínas e por BCA 4,1 mg/mL, a amostra sem os inibidores resultou em 4,6 mg/mL de proteínas dosadas por Bradford e 4,8 mg/mL no ensaio com BCA. Os resultados da quantificação protéica foram avaliados em SDS-PAGE unidimensional e demonstraram-se fidedignos, conforme pode ser observado na Figura 5.

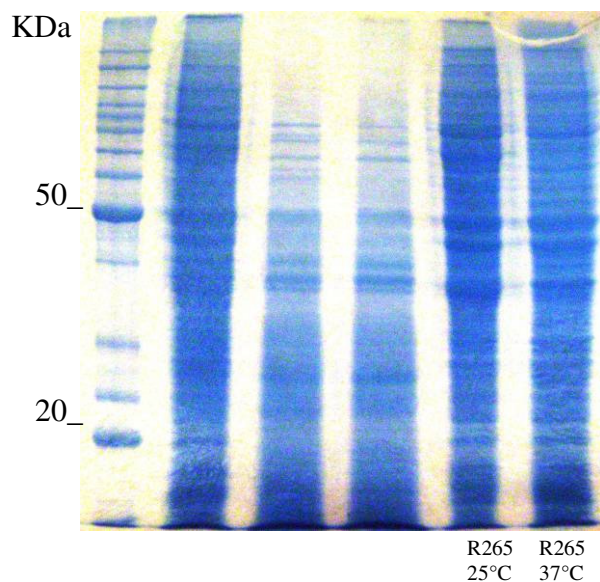
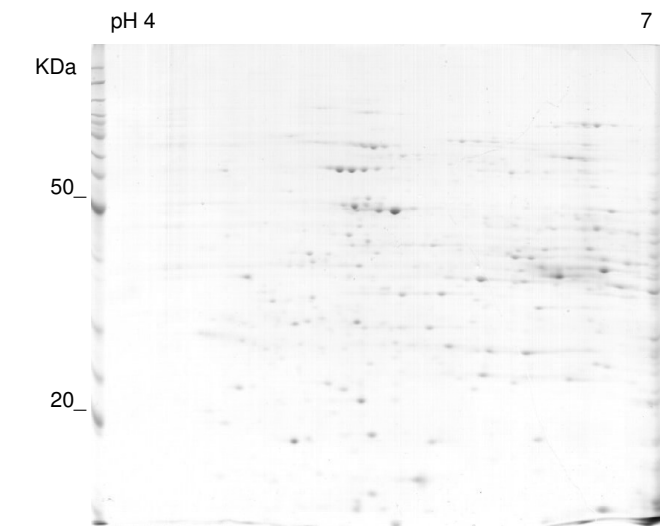


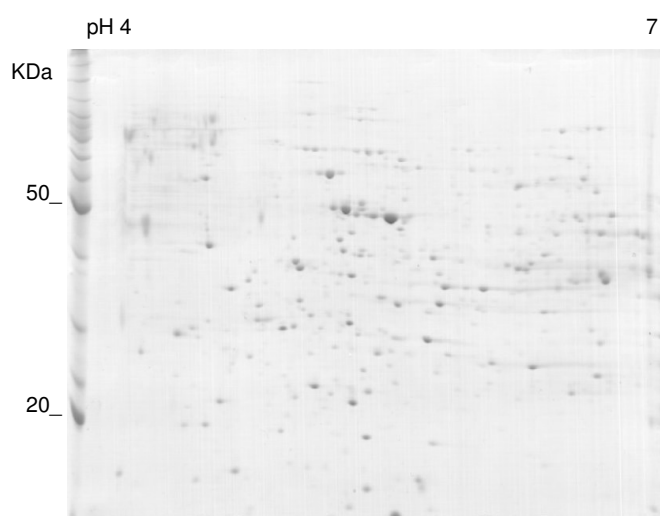
Figura 5. SDS-PAGE unidimensional para confirmação da quantificação protéica. Gel com uma concentração final de acrilamida de 12% utilizando 75 µg de proteínas em cada amostra.

4.4 Otimização do método de precipitação do extrato protéico total de *C. gattii*

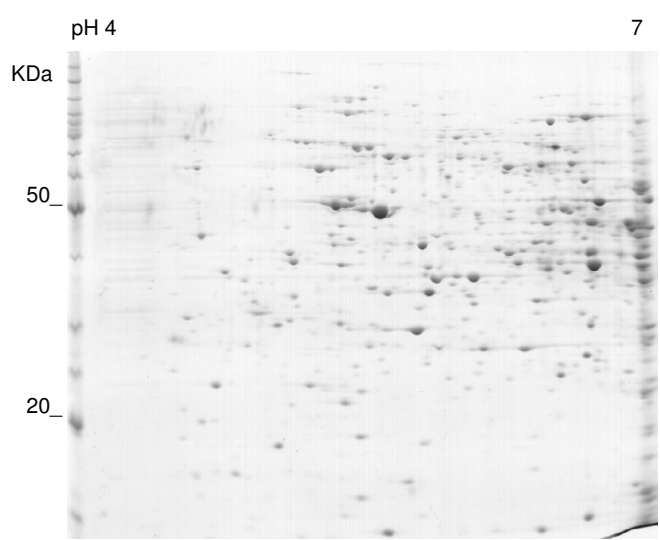
Em estudos prévios no laboratório de fungos de interesse médico e biotecnológico, a precipitação das proteínas da espécie *C. neoformans* era realizada com TCA 20% diluído em água e apresentava-se como uma boa opção para esse propósito. Porém, nas análises de *C. gattii*, a precipitação com TCA não demonstrou boa eficiência, apresentando muita perda de proteínas como pode ser observado na figura 6A. Nos experimentos de precipitação das proteínas, foi observado que a utilização de Kit comercial de limpeza (2-D Clean-Up - Amersham Biosciences e 2-D Clean-Up - Bio-Rad) apresenta-se melhor que a precipitação com TCA 20% diluído em água e TCA 20% diluído em acetona, sendo que destes, TCA 20% diluído em acetona mostrou-se melhor, pois perdem-se menos proteínas. Estes dados podem ser notados quando observa-se o maior spot das amostras que encontra-se a aproximadamente 50 KDa e pH 5,5, pode-se perceber que o mesmo apresenta-se muito maior quando se utiliza o kit comercial de limpeza e comparando-se a precipitação com TCA 20% o esse spot é maior quando a diluição do TCA se dá em acetona (Figura 6 A, B e C).



A



B

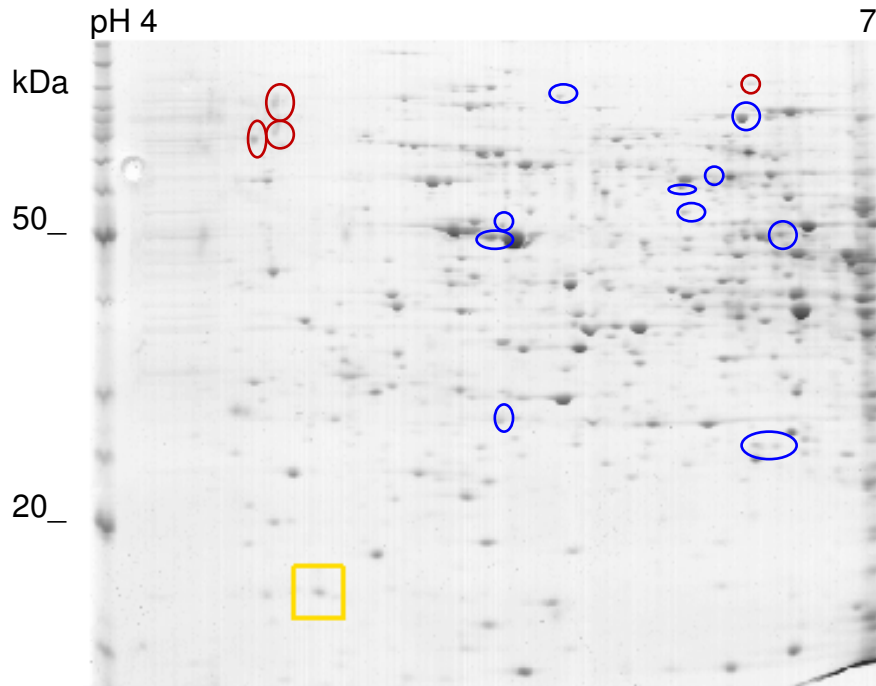


C

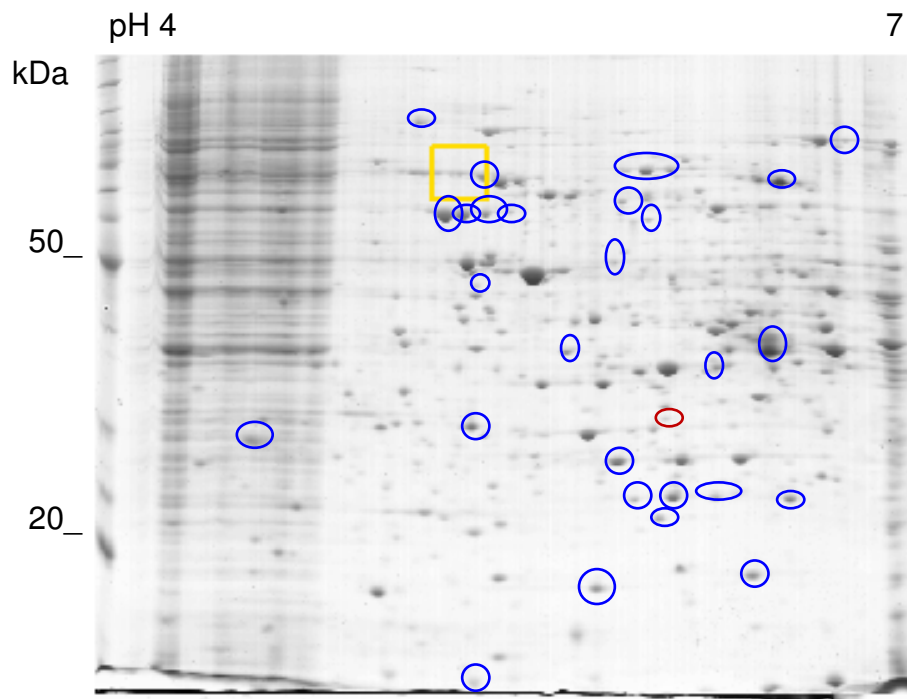
Figura 6. Comparação do métodos de precipitação das proteínas de *C. gattii*. A) Precipitação com TCA 20% diluído em água; B) Precipitação com TCA 20% diluído em acetona; C) Precipitação com kit comercial de limpeza da amostra (2-D Clean-Up, Bio-Rad). Em A e B as amostras foram diluídas em uma proporção de 1:8 (uma medida de amostra para 8 de TCA 20%)

4.5 Proteômica comparativa do crescimento de *C. gattii* a 25° e 37°C

Para análise no software PDQuest 8.0 (Bio-Rad) de proteômica comparativa do crescimento de *C. gattii* nas diferentes temperaturas testadas foram selecionados quatro géis de crescimento a 25°C e três géis (chamados de réplicas técnicas) de crescimento a 37°C oriundos do cultivo do dia 24 de abril de 2009 a fim de se testar as variações analíticas existentes na confecção dos géis e diferenças na expressão das proteínas nas condições testadas (Anexos 1 e 2). O método estatístico adotado para análise foi análise de regressão local. Dessa análise obtiveram-se 342 spots dos quais 42 foram excluídos por apresentar um padrão que impossibilitaria precisão em sua análise devido à isofocalização ruim ou estarem muito próximos dos extremos de pH. Portanto, foi verificado um padrão global de spots de 88% que coincidiram em ambas as condições de cultivo ou em cada condição para aqueles presentes apenas em uma das condições. Posteriormente, foi realizada comparação dos resultados obtidos nas réplicas técnicas com géis provenientes de um cultivo diferente nas mesmas condições (chamada réplica biológica) para verificar as variações biológicas e artefatos de técnica, como possíveis variações na extração/solubilização das proteínas, que poderiam gerar um resultado errôneo (no anexo 3 podem ser observados os géis de uma das réplicas biológicas, a terceira réplica não apresentou um padrão bom nos géis e por isso deverá ser repetida). Dessa análise geral entre réplicas técnicas e biológicas obtiveram-se cinco proteínas com expressão apenas a 25°C, duas com expressão apenas a 37°C, dez proteínas com expressão aumentada em no mínimo 50% a 25°C e vinte e sete proteínas com expressão aumentada em no mínimo 50% a 37°C (a figura 7 apresenta um gel representativo de cada condição de crescimento com os dados acima descritos em evidência).



A



B

Figura 9. Análise proteômica comparativa dos cultivos de *C. gattii* a 25°C e 37°C. Eletroforese bidimensional de extrato protéico oriundo dos cultivos de *C. gattii* a 25°C e 37°C utilizando-se 1,2 mg de proteínas em tiras de 17 cm com faixa de pH 4-7. A. Cultivo a 25°C; B. Cultivo a 37°C. Quadrados amarelos e círculos vermelhos: proteínas que estão representadas em apenas uma condição de cultivo. Círculos azuis: proteínas com expressão aumentada em cada condição.

5. DISCUSSÃO

A habilidade de se manter no ambiente e poder se desenvolver a 37°C é um elemento fundamental na invasão ao hospedeiro dos fungos patogênicos ao homem. Para tanto, esses patógenos desenvolveram as ferramentas moleculares necessárias para sobreviver no corpo do hospedeiro enquanto que os fungos não patogênicos raramente possuem esta capacidade inata.

O recente surto de infecção por *C. gattii* no Noroeste do Pacífico destaca o fato de que este fungo é um importante patógeno emergente que pode se adaptar a novos nichos ambientais (Ashwin *et al.*, 2009). É do interesse de cientistas e médicos entender melhor a patogênese da doença ocasionada por *C. gattii* e os fatores de virulência, a fim de descobrir estratégias eficazes de prevenção e tratamento, incluindo medidas para limitar a exposição humana a este fungo patogênico.

O emprego de *C. neoformans* como um organismo modelo para compreender o potencial patogênico de *C. gattii* já não é suficiente pelas disparidades fundamentais que existem entre as duas espécies, tais como diferenças de tropismo pelo hospedeiro e a expressão de certos fatores de virulência (Ashwin *et al.*, 2009). Existem cada vez mais relatos a respeito das diferenças que ocorrem entre as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*, que divergiram já a 9,5 milhões de anos (Lin e Heitmann, 2006). Recentemente Popchai *et al.* (2009) estudando genes de rotas de síntese da trealose, verificaram que a deleção do gene TPS1 não causava danos em *C. neoformans* enquanto para *C. gattii* se verifica diminuição da virulência por defeito no crescimento a 37°C.

Kraus *et al.* (2004), utilizando microarranjos de DNA em análise de transcrição regulada por temperatura em *C. neoformans*, descreveram 49 genes induzidos a 37°C. Rosa e Silva *et al.* (2008), utilizando a técnica de RDA, identificaram 29 genes com regulação aumentada a 37°C. Muitos autores defendem o uso de metodologias de análise proteômica como forma de corroborar dados obtidos em análises genômicas, pois refletem o produto final dos transcritos após terem passado pelos mecanismos de regulação pós-transcricionais.

Existem métodos de análise proteômica mais sensíveis que a técnica de eletroforese bidimensional, metodologias baseadas na separação de peptídeos por cromatografia líquida em nanocolunas de alta eficiência diretamente ligadas ao espectrômetro de massas (Delahunt e Yates, 2005). Porém, poucos lugares no mundo dominam essas tecnologias que atualmente são bastante robustas e de custos muito elevados. Uma das limitações da técnica de eletroforese bidimensional é a sensibilidade,

proteínas com baixa expressão como muitos receptores celulares e fatores de transcrição acabam tendo suas variações dificilmente observadas por esta técnica. Ainda assim, os resultados obtidos neste estudo encontram-se muito próximos dos resultados obtidos nas análises gênicas, onde o número de spots verificados como proteínas diferencialmente expressas esta bem próximo do número de genes regulados pela temperatura descritos por Rosa e Silva *et al.* (2008).

Uma etapa importante quando se trabalha com proteínas é a extração e solubilização das mesmas. Embora um procedimento padrão para extração de proteínas seria altamente desejável no que diz respeito à simplicidade e reprodutibilidade, não existe um método único de preparação da amostra que pode ser universalmente aplicado a todos os tipos de amostras analisadas por 2-DE (Dunn, 1993). Embora um grande número de protocolos padrão tenha sido publicado, estes protocolos têm de ser adaptados ao tipo de amostra a ser analisada, bem como às proteínas de interesse (Görg *et al.*, 2004).

Normalmente, as células microbianas ou tecidos vegetais exigem métodos mais robustos para a lise celular devido à solidez das suas paredes celulares, enquanto que métodos mais simples podem ser aplicados para os tecidos de mamíferos (Görg *et al.*, 2004). Durante ou após a lise celular, compostos que interferem nas análises tais como enzimas, sais, lipídios, ácidos nucleicos, polissacarídeos, fenóis vegetais e/ou proteínas muito abundantes têm que ser removidos ou inativados. Os dois parâmetros mais importantes são o sal e a proteólise (Görg *et al.*, 2004).

Íons de sal podem interferir na separação por eletroforese e aumentar a condutividade na isoeletrofocalização, prolongando assim o tempo necessário para atingir o estado estacionário. Em casos extremos, a isoeletrofocalização pode praticamente parar devido ao excesso de sal. A remoção do sal pode ser obtida por diálise, ou precipitação das proteínas com TCA ou solventes orgânicos (por exemplo, acetona fria). Uma alternativa é o uso de kits 2-D Clean-Up (Görg *et al.*, 2000)

TCA é comumente utilizado para inativação de proteases (Grassl, 2009). A precipitação com TCA/acetona é muito útil para minimizar a degradação de proteínas, para a remoção de compostos interferentes, como o sal, ou polifenóis, e para o enriquecimento de proteínas muito alcalinas, tais como proteínas ribossomais de lisados de células totais (Görg *et al.*, 2000).

Polissacarídeos e ácidos nucleicos podem interagir com anfólitos e proteínas, e dar origem a padrões de 2-D entremeados. Além disso, estas macromoléculas podem também aumentar a viscosidade das soluções e obstruir os poros do gel de

poliacrilamida. A menos que presentes em baixas concentrações, polissacarídeos e ácidos nucléicos devem ser removidos. Um método comum é a precipitação de proteínas com acetona ou TCA/acetona, mas as perdas de proteínas nem sempre podem ser evitadas devido à solubilização insuficiente das mesmas (Görg *et al.*, 2004).

Ainda que amplamente utilizado e embora tenha sido o método utilizado em trabalhos prévios desenvolvidos no laboratório de biologia de fungos de interesse médico e biotecnológico, onde se desenvolveu este estudo, neste trabalho os resultados obtidos através da precipitação com TCA foram insatisfatórios. Uma possível explicação a este problema pode ter origem na cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* que pode variar em tamanho dependendo do ambiente, condições de crescimento e da linhagem estudada (Casadevall e Perfect, 1998). Faganello *et al.* (2006) analisando a cápsula de *C. neoformans* e *C. gattii* observaram diferenças na indução de produção da mesma por diferentes substratos e cada vez existem mais relatos na literatura quanto às diferenças existentes entre as espécies. A estrutura da cápsula, muito rica em polissacarídeos, e essas diferenças descritas poderiam interferir tanto na solubilização como na precipitação das proteínas para análise e justificar a variação observada nos testes com TCA.

A técnica de Bradford, utilizada neste estudo para quantificação das proteínas totais, apresenta uma estabilidade de 2 min a 1 h e uma sensibilidade quatro vezes maior que a técnica de Lowry (Bradford, 1976). Na comparação da quantificação das proteínas para verificar uma possível interferência dos inibidores de proteases os resultados demonstraram-se muito similares na quantificação por Bradford e por BCA, através desses resultados, pode-se inferir que os inibidores não causavam interferência na quantificação por Bradford ou essa interferência seria mínima e presente também no outro método de quantificação utilizado. Além disso, os resultados obtidos na técnica de Bradford foram compatíveis com os resultados observados em SDS-PAGE unidimensional, como pôde ser observado na figura 5.

Muitos dos géis utilizados neste estudo apresentaram arrastes de bandas onde as proteínas não foram corretamente isoeletrofocalizadas, principalmente nos extremos das proteínas mais ácidas. Isso provavelmente ocorreu devido a um problema na partida das tiras de pH imobilizado que podem ter perdido a capacidade de focalização nesses extremos, já que todos os géis que apresentaram esse problema tiveram suas proteínas hidratadas em tiras do mesmo lote. Por isso seria importante que as réplicas técnicas, assim como a terceira réplica biológica, fossem repetidas para que se obtenha um padrão melhor dos géis e assim resultados mais confiáveis.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

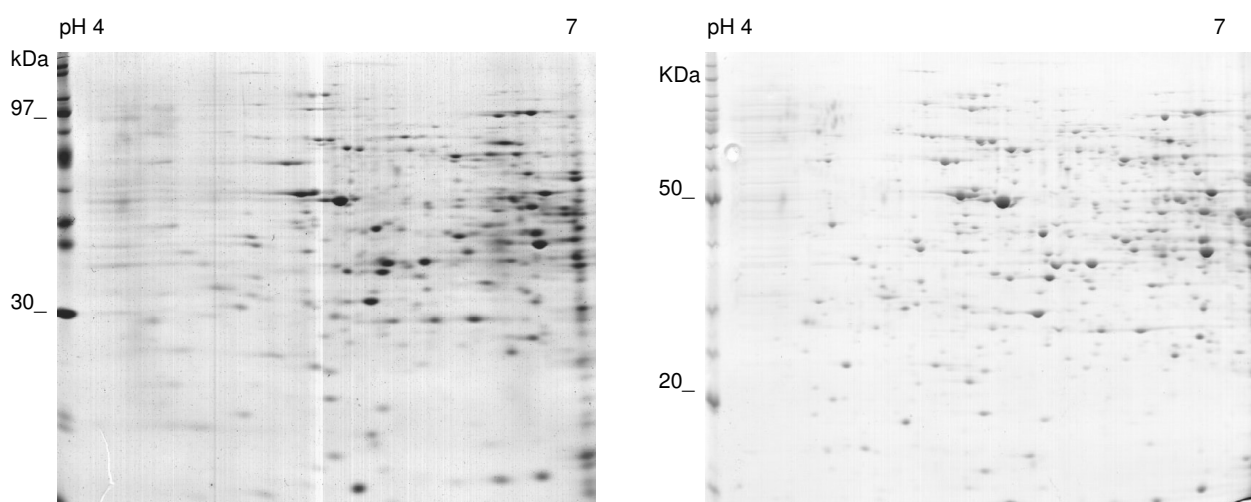
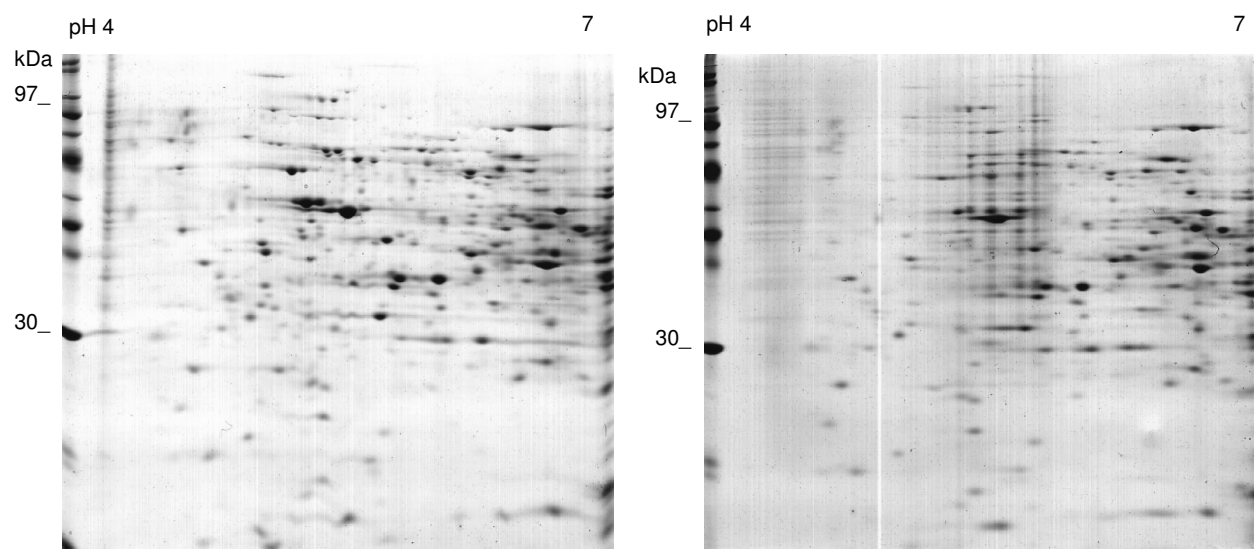
Apesar dos problemas descritos, os resultados obtidos neste estudo são bastante promissores e demonstram que a eletroforese bidimensional apresentou-se como uma boa ferramenta para a análise proteômica comparativa, sendo uma técnica relativamente simples e de fácil reprodutibilidade. Para alcançar resultados mais precisos a repetição das réplicas técnicas e da terceira réplica biológica para obtenção de um padrão melhor dos géis e assim uma análise mais confiável faz-se necessária, assim como a identificação das proteínas que se demonstrarem como diferencialmente expressas.

A ocorrência de epidemia ocasionada pela linhagem hipervirulenta (R265) utilizada neste trabalho nos remete a necessidade de mais estudos envolvendo *C. gattii*. Estudos no sentido de se esclarecer as diferenças entre espécies do gênero *Cryptococcus* e entre linhagens hipo e hipervirulentas para melhor compreensão do potencial patogênico deste patógeno emergente, que segundo Meyer (2007) poderia ser originário da América do Sul.

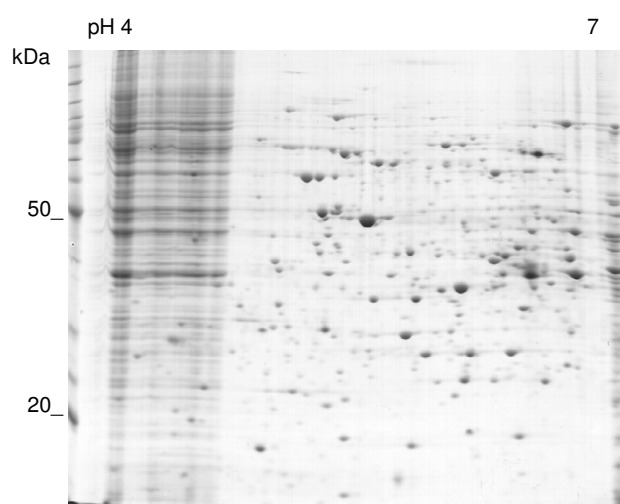
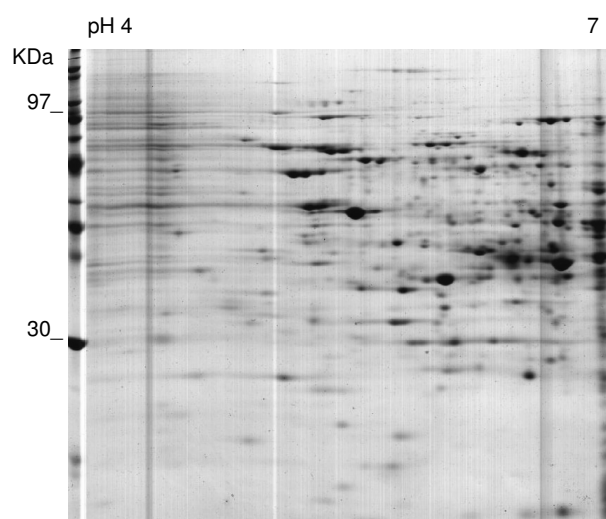
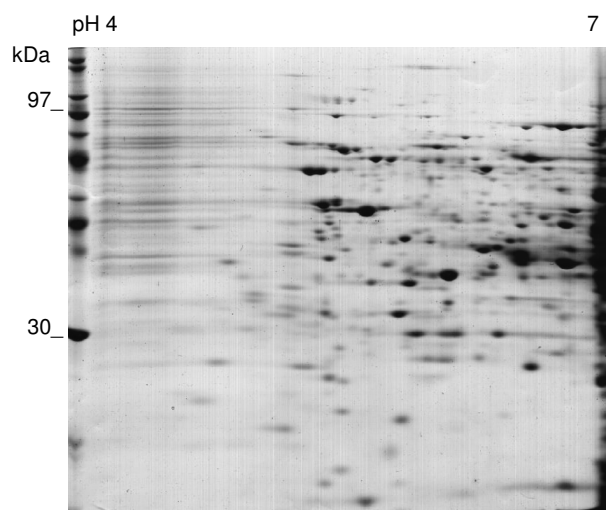
As terapias utilizadas atualmente para o tratamento da criptococose são inadequadas, devido à alta toxicidade e ação fungistática. Promissores alvos para nova geração de agentes antifúngicos incluem proteínas que são essenciais para o desenvolvimento no hospedeiro (Missal *et al.*, 2004). A identificação das proteínas diferencialmente expressas verificadas neste estudo, além de contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos utilizados por *C. gattii* para colonizar o hospedeiro, garantindo seu desenvolvimento a temperatura de infecção, também são potenciais alvos para estudos de desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da criptococose ocasionada por este patógeno.

7. ANEXOS

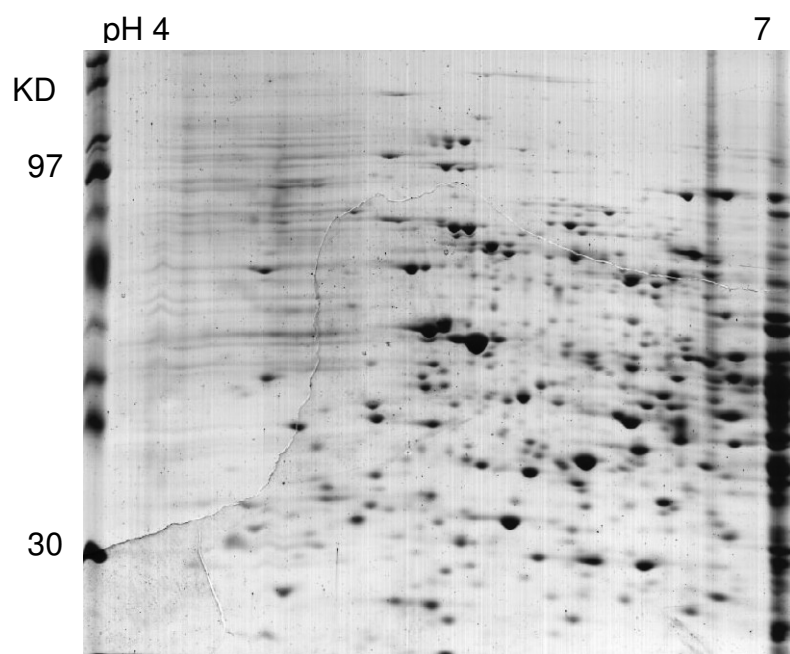
Anexo 1. Géis 2D das réplicas técnicas dos cultivos de *C. gattii* a 25°C. Eletroforese bidimensional de extrato protéico oriundo dos cultivos de *C. gattii* a 25°C do dia 24/04/09 utilizando-se 1,2 mg de proteínas em tiras de 17 cm com faixa de pH 4-7.



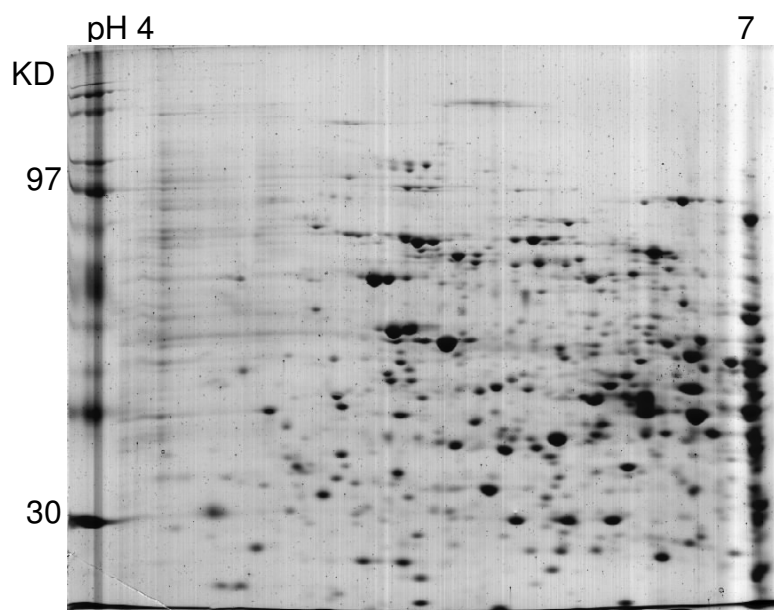
Anexo 2. Gésis 2D das réplicas técnicas dos cultivos de *C. gattii* a 37°C. Eletroforese bidimensional de extrato protéico oriundo dos cultivos de *C. gattii* a 37°C do dia 24/04/09 utilizando-se 1,2 mg de proteínas em tiras de 17 cm com faixa de pH 4-7.



Anexo 3. Réplicas biológicas dos cultivos de *C. gattii* a 25° e 37°C. Eletroforese bidimensional de extrato protéico oriundo dos cultivos de *C. gattii* a 25° e 37°C do dia 28/08/09 utilizando-se 1,2 mg de proteínas em tiras de 17 cm com faixa de pH 4-7.



A



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, n. 422, p. 198-207, 2003.
- ALVES, S. H *et al.* *In vitro* susceptibility antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. **Rev Inst Med trop S Paulo**, v. 5, n. 43, p. 257-260, 2001.
- ANDERSON, L. e SEILHAMER, J. A. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, n. 18, p. 533-537, 1997.
- ASHWIN, D. *et al.* *Cryptococcus gattii* : An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, 13p., 2009.
- BC Centre for Disease Control. BC *Cryptococcus gattii* Surveillance Summary, 1999–2006, 2007.
- BODASING, N. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an HIV-positive patient: first observation in the United Kingdom. **J Infect**, v. 49, p. 253 – 255, 2004
- BOEKHOUT, T. The 5th Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis, Adelaide, 2002. **FEMS Yeast Research** 3, III-IV, 2003.
- BOSE, I. *et al.* A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, n. 2, p. 655-663, 2003.
- BOVERS, M. *et al.* Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Rev Iberoam Micol.** n. 25, p. S4-S12, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**, n. 72, p. 248-254, 1976.
- CASADEVALL, A. e PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. **Washington: American Society for Microbiology Press**, 1998.
- CASADEVALL. A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, n. 3, p. 354-358, 2000.
- CASALI, A. K. *et al.* Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res**, n. 3, p. 405-415, 2003.
- CASTELLÁ, G. *et al.* Criptococosis y animals de compañía. **Ver Iberoam Micol**, n. 25, p. S19-S24, 2008.

CHANG, Y. C. e KWON-CHUNG, K. J. Isolation, characterization, and localization of capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, n. 181, p. 5636-5643, 1999.

CHARLIER, C. *et al.* Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. **Am J Pathol**, n.166, p. 421-432, 2005.

CHEN, S. *et al.* Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis**, n. 31, p. 499-508, 2000.

DELAHUNT, C. e YATES, J. R. III. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. **Methods**, n. 35, p. 248-255, 2005.

DOMON, B. e AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, n. 312, p. 212-217, 2006.

DUNN, M. J. Gel Electrophoresis: Proteins, **BIOS**, Oxford, England, p. 41–127, 1993.

FAGANELLO, J. *et al.* An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. **Journal of Microbiological Methods**, n. 64, p. 416-419, 2006.

FRIES, BC; *et al.* Phenotypic switching in *C. neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. **Infect Immun**, n. 67, p. 6076-6083, 1999.

GÖRG, A. *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.

GÖRG A. *et al.* Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. n. 4, p. 3665-3685, 2004.

GRASSL, A. *et al.* Preserving the yeast proteome from sample degradation. **Proteomics**, n. 9, p. 4616-4626, 2009.

HANSONG Ma e ROBIN C. MAY. Virulence in *Cryptococcus* Species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 6, 2009.

HORTA, J. A *et al.* Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Med Mycol**, n. 40, p. 1-7, 2002.

IDNURM, A. *et al.* Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, n. 10, p. 753-764, 2005.

KIDD, S.E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci**, v. 101, p. 17258–17263, 2004.

KRAUS, P. R. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* MAP Kinase homology Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. **Mol Microbiol**, n. 48, p. 1377-1387, 2003.

KRAUS, P. R. *et al.* Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a Genomic-DNA microarray. **Eukaryot Cell**, n. 3, p. 1249-1260, 2004.

KROCKENBERGER, M. B. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): serological evidence for subclinical cryptococcosis. **Med Mycol**, n. 40, p. 273-282, 2002.

KWON-CHUNG e K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, n. 51, p. 218-223, 1986.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, n. 51, p. 804-806, 2002.

LESTER, S. J. *et al.* Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases (January to July 2003). **J Am Vet Med Assoc**. n. 225, p. 1716-1722, 2004.

LIN, X. e HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69 – 105, 2006.

MARTINEZ, L. R. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **J. Clin Microbiol**, n. 39, p. 3365-3367, 2001.

McFADDEN, D. C. e CASADEVALL, A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**, n. 39S1, p. 19-30, 2001.

MEYER, W. *et al.* Global molecular epidemiology of *Cryptococcus gattii* VGII isolates traces the origin of the Vancouver Island outbreak to Latin American. **24th Fungal Genetics Conference**, 2007.

MISSAL, T. A. *et al.* Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, n. 51, p. 1447-1458, 2004.

MOYRAND, F. *et al.* Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, n. 45, p. 837-849, 2003.

MUYEMBE TAMFUM, J. J. *et al.* Cryptococcosis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. A case associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Kinshasa, Zaire. **Med Trop**, v. 52, p. 435-438, 1992.

NOSANCHUK, J. D. *et al.* Evidence that *Cryptococcus neoformans* is mobilized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. **Infect Immun**, n. 67, p. 5477-5479, 1999.

ODOM, A. *et al.* Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, n. 16, p. 2576-2589, 1997.

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

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, n. 6, p. 463 – 468, 2006.

POPCHAI, N. *et al.* The Trehalose Synthesis Pathway Is an Integral Part of the Virulence Composite for *Cryptococcus gattii*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4584-4596, October 2009.

ROSA E SILVA, L. K. *et al.* Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Research in Microbiology**, n. 159, p. 221-229, 2008.

ROSA E SILVA, L. K. Identificação de genes regulados pela temperatura na levedura patogênica *Cryptococcus neoformans*. **Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular**, 49p., 2006.

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

WASHBURN, M. P. *et al.* Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature**, n. 19, p. 242-247, 2001.