

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR *Cryptococcus*
neoformans E *Cryptococcus gattii* DURANTE A INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS**

Tese de Doutorado

Letícia Silveira Goulart

Porto Alegre, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR *Cryptococcus*
neoformans E *Cryptococcus gattii* DURANTE A INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Letícia Silveira Goulart

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2009.

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

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Marilene Henning Vainstein pela oportunidade, confiança e orientação dispensada ao longo da realização deste trabalho.

A professora Diana Masih e a todos de seu laboratório, em especial a Laura Chiapello pela receptividade, atenção e auxílio valioso nos ensaios de infecção de macrófagos.

Ao Dr. Charley Christian Staats pela revisão da tese e demais contribuições.

A Lívia pela amizade, colaboração e ensinamentos que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Juli, pela colaboração e principalmente por todo o apoio e pela grande amizade que construímos.

A Roberta, Irina, Melissa, Carolina, Lis e Ângela agradeço pela força, convivência e especial amizade.

As amigas Bibiana e Cristiane pelo incentivo e companheirismo.

Ao Laboratório de Seqüenciamento da Rede Sul de Análise de Genomas PIGS – Cbiot UFRGS.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial ao Milton, Paulo, Luciano e Silvia pelo auxílio fundamental.

Ao CNPq pelo financiamento.

Ao meu esposo, Pietro, pelo incentivo, apoio e compreensão.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 O complexo <i>Cryptococcus neoformans</i>	13
2.2 Ciclo de vida de <i>C. neoformans</i>	15
2.3 Criptococose	17
2.4 Patogênese da criptococose	18
2.5.1 Cápsula polissacarídica.....	21
2.5.2 Melanina	23
2.5.3 Habilidade de desenvolvimento a 37 °C.....	25
2.5.4 Outros determinantes de virulência	25
2.6 Células fagocíticas	26
2.8 O genoma de <i>C. neoformans</i>	33
2.9 Análise da Diferença Representacional (RDA).....	36
3. OBJETIVOS	38
4. MANUSCRITO SUBMETIDO A MEDICAL MYCOLOGY	39
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	81
7. PERSPECTIVAS.....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO - CURRÍCULO LATTES	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
ABC	cassete de ligação a ATP
ADP	adenosina difosfato
AFLP	polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
Arf	fator de ribosilação do ADP
ATP	adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CO ₂	dióxido de carbono
COP	proteína de revestimento
CPK	proteína quinase de <i>Cryptococcus</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
L-DOPA	L-3-4-dihidroxi-fenilalanina
GalXM	galactoxilomanana
GXM	glicoronoxilomanana
GTP	guanosina trifosfato
GTPase	guanosina trifosfatase
h	hora
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HOG	alta osmolaridade do glicerol
Hsp	proteína de choque térmico
IL	interleucina
Kb	kilobase
M	molar
MAP	proteína quinase ativada por mitose
Mb	milhões de pares de bases
ml	mililitro
MLST	tipagem por sequenciamento multi-lócus
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
ng	nanogramas
PBS	salina tamponada com fosfato

pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
pH	potencial de hidrogênio iônico
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso
RDA	análise da diferença representacional
RE	retículo endoplasmático
RFLP	polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RPMI	acrônimo de <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	PCR acoplado a transcriptase reversa
SAGE	análise serial de expressão gênica
SNARE	fator sensível à N-etil maleimide
SNC	sistema nervoso central
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
spp	Espécies
UV	Ultravioleta
var	Variedade
µg	Microgramas
µl	Microlitros

LISTA DE TABELAS

Table 1. Summary of computational analysis of the genes obtained from <i>C. neoformans</i> macrophages infection.	63
Table 2. Summary of computational analysis of the genes obtained from <i>C. gattii</i> macrophages infection.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>C. neoformans</i> .	16
Figura 2. Possíveis rotas utilizadas por <i>C. neoformans</i> para ultrapassar a barreira hematoencefálica.	20
Figura 3. Cápsula polissacarídica.	22
Figura 4. Produção de melanina por <i>C. neoformans</i> .	24
Figura 5. Parasitismo de <i>C. neoformans</i> em macrófagos.	31
Fig. 1. Rat peritoneal macrophages infected with <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> and <i>Cryptococcus gattii</i> .	63
Fig 2. Validation of RDA results by quantitative real time RT-PCR analysis.	65

RESUMO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras encapsuladas e agentes etiológicos da criptococose. Estes microrganismos são patogénos intracelulares facultativos os quais interagem com macrófagos do hospedeiro durante o processo de infecção. *C. neoformans* é capaz de se replicar no interior de células fagocíticas utilizando uma estratégia única que envolve permeabilização do fagolisossoma e produção de polissacarídeos. No presente trabalho, a metodologia da Análise da Diferença Representacional (RDA) foi aplicada para identificar genes diferencialmente expressos por *C. neoformans* e *C. gattii* durante o desenvolvimento intracelular em macrófagos peritoneais de ratos. *C. neoformans* internalizados por macrófagos expressaram genes relacionados ao tráfego vesicular, transporte de membrana, atividade de chaperona, regulação da meiose, metabolismo de monossacarídeo e resposta ao estresse. Em *C. gattii*, foram induzidos transcritos relacionados à respiração aeróbica, endocitose, tráfego vesicular, metabolismo de monossacarídeo e nitrogênio, sinalização celular e resposta ao estresse. Nossos resultados revelaram novos genes envolvidos no parasitismo intracelular de *C. neoformans* e *C. gattii*.

1. INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras basidiomicéticas agentes da criptococose (Casadevall & Perfect, 1998). A pandemia da AIDS aumentou dramaticamente os casos de criptococose, sendo que atualmente 80% dos casos da doença são associados à infecção pelo HIV. A meningite criptococócica é a infecção fúngica do Sistema Nervoso Central (SNC) mais freqüente e a terceira complicação neurológica em pacientes com AIDS, nos quais pode causar mortalidade de até 30% (Friedman *et al.*, 2005). Outros grupos de risco para a doença incluem indivíduos submetidos ao uso prolongado de corticosteróides e ao transplante de órgãos (Chayakulkeeree & Perfect, 2006).

No Brail, a criptococose ocorre como primeira manifestação oportunista em cerca de 4% dos pacientes com AIDS, sendo responsável por 50% dos casos de morte devido a micoses sistêmicas neste grupo de indivíduos (Moretti *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2009). A criptococose ocasionada por *C. neoformans* e associada à AIDS predomina nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país (Moretti *et al.*, 2008). No Rio Grande do Sul, 95% dos casos de criptococose ocorrem em indivíduos infectados pelo vírus HIV (Leal *et al.*, 2008). A neurocriptococose causada por *C. gattii* acomete adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões norte e nordeste do Brasil, com letalidade de 35% a 40% (Moretti *et al.*, 2008).

C. neoformans e *C. gattii* são microrganismos intracelulares facultativos que utilizam uma estratégia única para sobreviver no interior de macrófagos, que inclui replicação intracelular, acúmulo de vesículas contendo polissacarídeo no citoplasma da célula fagocítica e alteração da permeabilidade do fagolisossoma (Feldmesser *et al.*, 2000; Toker & Casadevall, 2002). Esta propriedade confere características importantes

à levedura, como capacidade de disseminação, proteção da resposta imune e o desenvolvimento de um estado latente no hospedeiro (Del Poeta, 2004). Estudos *in vitro* os quais avaliam o desenvolvimento intracelular de *C. neoformans* e *C. gattii* promovem um excelente sistema para dissecar os mecanismos moleculares responsáveis por esta estratégia de parasitismo (Feldmesser *et al.*, 2001).

Conhecer os mecanismos utilizados por *C. neoformans* e *C. gattii* na forma de patógenos intracelulares é essencial para melhor compreender a patogênese da criptococose (Feldmesser *et al.*, 2001). A identificação dos mecanismos que regulam a expressão de fatores antifagocíticos deve desempenhar uma função chave para compreender o curso da infecção, e estes fatores podem representar alvos para novos modelos de estratégias terapêuticas para o controle da criptococose (Del Poeta, 2004). Além disto, a grande maioria dos estudos avalia somente a interação de *C. neoformans* com células do sistema imune, sendo reduzido o número de pesquisas que descrevem as estratégias de patogenicidade intracelular de *C. gattii*, o que merece uma grande atenção.

Neste contexto, o presente trabalho versa sobre a identificação de genes diferencialmente expressos por *C. neoformans* e *C. gattii* durante a infecção de macrófagos peritoneais de ratos. A metodologia de Análise da Diferença Representacional (RDA) foi utilizada para a identificação de seqüências expressas diferencialmente por *C. neoformans* e *C. gattii* internalizados por macrófagos. Identificar ao nível molecular os genes utilizados por estas leveduras no desenvolvimento intracelular poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O complexo *Cryptococcus*

O complexo *Cryptococcus* inclui as leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C). Anteriormente, *C. gattii* era considerado uma variedade e classificado como *C. neoformans* var. *gattii* (Lin & Heitman, 2006). *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, com 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo e são envolvidas por uma cápsula mucopolissacarídica, sendo que os sorotipos são caracterizados por diferenças estruturais presentes na cápsula polissacarídica (Casadeval & Perfect, 1998). As espécies diferem em suas características bioquímicas, fenotípicas, epidemiológicas, moleculares e genotípicas (Moretti *et al.*, 2008; Ma & May, 2009).

C. neoformans var. *grubii* é encontrado mundialmente e acomete preferencialmente pacientes imunossuprimidos, sendo responsável por 99% dos casos de criptococose em pacientes infectados pelo HIV. *C. neoformans* var. *neoformans*, apesar de possuir distribuição mundial, ocorre predominantemente na Europa, onde 30% das infecções são causadas por esta variedade (Schop, 2007; Bovers *et al.*, 2008). *C. neoformans* pode ser isolado do solo, de vegetais em decomposição e de fezes de aves, principalmente pombos, sendo os últimos a maior fonte ambiental desta espécie (Casadevall & Perfect 1998; Horta *et al.*, 2002; Abegg *et al.*, 2006). As excretas de aves ricas em fonte de nitrogênio, como uréia e creatinina oferecem condições adequadas ao desenvolvimento deste fungo. Além disto, as aves servem como carreadoras, transportando a levedura em suas penas, patas e bicos (Lin, 2009).

C. gattii é tipicamente restrito a regiões geográficas de clima tropical e subtropical. Esta espécie causa infecção predominantemente em indivíduos imunocompetentes, sendo responsável por 70 a 80% dos casos de criptococose em pacientes imunocompetentes, principalmente na Austrália e Papua Nova Guiné (Casadevall & Perfect 1998; Lin & Heitman, 2006). O principal nicho ecológico de *C. gattii* são as árvores de eucalipto, particularmente *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis*, mas o fungo também tem sido isolado de outras espécies de árvores como *Prunus dulcis*, *Cassia fistula* e *Pseudotsuga menziesii* (Dixit *et al.*, 2009). Por razões ainda sendo determinadas, *C. gattii* adquiriu uma habilidade de colonizar novas regiões bioclimáticas, o que ocasionou um surto de infecção em humanos e animais em Vancouver - Canadá, onde o número de casos de criptococose foi superior aos valores observados em regiões endêmicas da Austrália (Sorrel, 2001). A mudança na epidemiologia deste fungo provavelmente é uma consequência de alterações na ecologia e biologia da levedura e ilustra seu potencial em causar doença em humanos e animais (Dixit *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos moleculares foram desenvolvidos para genotipar e melhor compreender a epidemiologia de *C. neoformans* e de *C. gattii*. As técnicas utilizadas incluem PCR *fingerprint*, RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e MLST (*multilocus sequence typing*) (Meyer *et al.*, 1999; Horta *et al.*, 2002; Casali *et al.*, 2003; Boekhout *et al.*, 2001; Kidd *et al.*, 2004; Litvintseva *et al.*, 2006). As espécies e sorotipos do complexo *C. neoformans* são classificados em oito padrões moleculares, como segue: VNI=AFLP1 (sorotipo A), VNII=AFLP1A e AFLP1B (sorotipo A), VNIII=AFLP3 (híbrido AD), VNIV=AFLP2 (sorotipo D) e VGI=AFLP4, VGII=AFLP6, VGIII=AFLP5, VGIV=AFLP7 (todos correspondentes

aos sorotipos B e C) (Bovers *et al.*, 2008). Recentemente, Ngamskulrungrroj e colaboradores (2009) realizaram uma análise filogenética de isolados haplóides do complexo *Cryptococcus*. Os dados do sequenciamento multigênico revelaram sete linhagens haplóides, promovendo futuras evidências para considerar os tipos moleculares como variedades individuais, ou até mesmo como espécies.

2.2 Ciclo de vida de *C. neoformans* e *C. gattii*

C. neoformans e *C. gattii* são leveduras geralmente haplóides que predominantemente se reproduzem assexuadamente por brotamento. Entretanto, estes fungos podem apresentar uma transição dimórfica e originar a forma filamentosa através de duas rotas distintas, o *mating* ou a frutificação monocariótica (Figura 1). Os microrganismos são isolados de pacientes e do ambiente na forma leveduriforme. A fase filamentosa possibilita um maior acesso a nutrientes e determina a produção de esporos (Idnurm *et al.*, 2005).

C. neoformans e *C. gattii* possuem um sistema de *mating* bipolar, com *mating types* **a** e α . O *locus mating type* (*MAT*) é uma região do genoma fúngico que regula o ciclo sexual e codifica para a forma alélica **a** ou α (Bovers *et al.*, 2008). O *mating* ocorre quando células haplóides **a** e α se fundem, assim, inicia-se uma transição dimórfica com o desenvolvimento de uma forma filamentosa que cresce como uma hifa dicariótica **a** - α . A hifa aérea pode formar um basídio e depois sofrer meiose, dando origem a células filhas haplóides, os basidiósporos. Este processo de *mating* **a**- α , filamentação e produção de esporos foi observado em todos os sorotipos (Lin, 2009). A maioria dos isolados clínicos e ambientais possuem o *MAT* α e este *mating* também tem sido considerado mais virulento que o *MAT***a** (Bovers *et al.*, 2008).

As células de *Cryptococcus* spp. também podem sofrer filamentação na ausência de um *mating* oposto, este processo é chamado de frutificação monocariótica. Neste caso, células de um mesmo *mating* sofrem diploidização, ocorrendo, ao final do evento, meiose que leva à formação de basidiósporos (Lin *et al.*, 2005). A frutificação monocariótica deve oferecer uma vantagem de sobrevivência ao fungo, particularmente sob condições de mudanças ambientais, como redução de nutrientes e dissecação (Idnurm *et al.*, 2005).

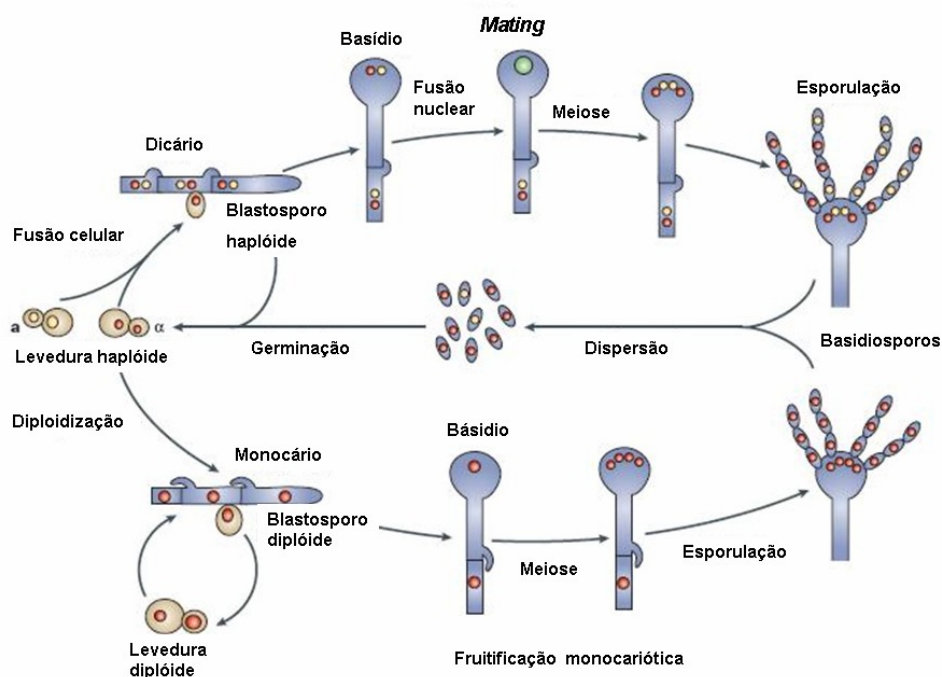


Figura 1. Ciclo de vida de *C. neoformans*. Durante o ciclo sexual da levedura (*mating*) ocorre fusão de células leveduriformes haplóides de *mating types* opostos, α e **a**. Formam-se hifas dicarióticas, as quais sofrem um processo meiótico de divisão celular, resultando na produção de basidiósporos. Durante o processo de frutificação monocariótica, células de um mesmo *mating type* sofrem diploidização, formando hifas diplóides, e, após a meiose, basidiósporos haplóides são produzidos. Estas partículas, oriundas de ambos os processos, dispersam no ambiente, e em condições ideais de germinação, dão origem a leveduras haplóides. Adaptado de Idnurm *et al.*, 2005.

2.3 Criptococose

C. neoformans e *C. gattii* são os agentes etiológicos da criptococose, sendo o SNC e pulmões os sítios anatômicos mais acometidos. Quando o sistema imune do paciente está comprometido, o fungo pode se disseminar por via hematogênica e causar doença sistêmica que pode envolver alguns órgãos como a pele, a próstata, os olhos e o trato urinário (Casadevall & Perfect, 1998; Steenbergen & Casadevall, 2003; Ma & May, 2009). A infecção abrange duas formas distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico: a criptococose oportunística, cosmopolita, associada às condições de imunodepressão celular causada predominantemente por *C. neoformans*; e a criptococose primária de hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, causada predominantemente por *C. gattii* (Moretti *et al.*, 2008).

A principal porta de entrada do fungo no organismo são os pulmões. Uma vez instalado, o fungo pode produzir criptococose pulmonar, que varia desde formas assintomáticas a quadros sintomáticos de pneumonia caracterizada por tosse, febre, dor no peito e perda de peso (Chayakulkeeree & Perfect, 2006). A partir do foco pulmonar o fungo pode se disseminar para o SNC causando meningoencefalite que envolve inflamação do espaço subaracnóide e do parênquima cerebral, sendo esta a forma mais grave da doença (Casadevall & Perfect, 1998; Steenbergen & Casadevall, 2003). As manifestações clínicas causadas por *C. gattii* envolvem predominantemente os pulmões, sendo caracterizadas por massas granulomatosas e requerem terapia antifúngica mais prolongada. Entretanto, *C. neoformans* possui uma predileção pelo SNC causando preferencialmente meningite (Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Lin, 2009).

A meningite criptocócica é a infecção fúngica do SNC mais freqüente, e a terceira complicação neurológica em pacientes com AIDS, nos quais pode causar mortalidade em 30% dos casos. A utilização da Terapia Anti-Retroviral Altamente Ativa (HAART – *Highly Active Antiretroviral Infected Individuals*) reduziu os casos de criptococose em indivíduos infectados com o vírus HIV, mas em países onde esta terapia ainda é pouco utilizada a criptococose permanece epidêmica como na África e Sudeste da Ásia (Lin & Heitman, 2006; Lin, 2009). No Brasil, *C. neoformans* foi responsável por 50% dos casos de morte devido a micoses sistêmicas em pacientes com AIDS entre 1996 a 2006 (Prado *et al.*, 2009).

2.4 Patogênese da criptococose

A infecção com *Cryptococcus* spp. ocorre por inalação de basidiosporos ou leveduras dessecadas que podem colonizar o trato respiratório sem produzir doença. Após o fungo se instalar nos pulmões, ele pode ser eliminado pelo sistema imune, causar doença pulmonar aguda, permanecer em um estado latente ou disseminar-se para o SNC, causando meningite. As manifestações iniciais da doença são dependentes do inóculo, virulência da cepa e estado imune do paciente (Chayakulkeeree & Perfect, 2006). Em hospedeiros imunocompetentes, a doença normalmente é contida em um granuloma pulmonar e a resposta imune humoral é ativada. Estudos sorológicos têm indicando que é freqüente a presença de anticorpos contra *C. neoformans* em indivíduos sem história clínica da doença, evidenciando que a levedura pode facilmente causar infecção, mas a doença é menos freqüente. Provavelmente, algumas destas infecções tornam-se latentes, e quando o hospedeiro torna-se imunossuprimido pode ocorrer uma

reativação da forma dormente (Garcia-Hermoso *et al.*, 1999; Steenbergen & Casadevall, 2003).

A imunidade celular é uma importante defesa do hospedeiro contra infecções de *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo crucial para conter a criptococose, desta forma, indivíduos com comprometimento desta resposta imune possuem maior risco de adquirir a doença. Quando o fungo entra no espaço alveolar, este é processado por macrófagos alveolares, e então outras células inflamatórias são recrutadas via citocinas e quimiocinas como interleucinas IL-12, IL-18 e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (Uicker *et al.*, 2005). A ativação da resposta imune mediada por células T e a formação granulomatosa desencadeada por macrófagos alveolares são importantes para limitar o crescimento de *C. neoformans*, entretanto, o fungo é capaz de sobreviver no interior de macrófagos resultando na persistência das infecções criptococócicas (He *et al.*, 2003). Em modelos de criptococose pulmonar em rato, a manutenção da infecção foi correlacionada com presença da levedura no interior de macrófagos e células epiteliais, indicando a capacidade do fungo de permanecer no interior destas células em todos os estágios da infecção (Goldman *et al.*, 2000; Feldmesser *et al.*, 2000).

C. neoformans é um patógeno intracelular facultativo que utiliza as células fagocíticas do hospedeiro para disseminar-se mais eficientemente e escapar da resposta imune. A identificação de *C. neoformans* em macrófagos pulmonares, monócitos circulantes e micróglia reforçam a idéia de que a levedura é veiculada dos pulmões para o cérebro via fagócitos mononucleares (Levitz *et al.*, 1999; Feldmesser *et al.*, 2000; Levitz, 2001; Santangelo *et al.*, 2004). A forma pela qual *C. neoformans* é capaz de migrar do foco primário de infecção para o cérebro tem sido relacionada a um mecanismo chamado “cavalo de Tróia”. Este modelo propõe que a levedura é engolfada por células fagocíticas no estágio inicial da infecção e então trafega para outros tecidos

no interior destas células sem exposição ao sistema imune, podendo permanecer no ambiente intracelular em um estado de latência (Luberto *et al.*, 2003).

Foram descritos três possíveis mecanismos pelos quais *Cryptococcus* spp. pode atravessar a barreira hematoencefálica e penetrar no SNC. O primeiro mecanismo indica que a levedura pode ultrapassar a barreira cerebral no interior de macrófagos via mecanismo de “cavalo de Tróia”. O segundo processo sugere que pode ocorrer uma transferência lateral, onde fagócitos infectados transferem a levedura para o interior de células endoteliais dos capilares da barreira hematoencefálica e no terceiro mecanismo as células fúngicas são capazes de ultrapassar sozinhas as células endoteliais e assim atingir o tecido cerebral (Figura 2) (Ma & May, 2009). Foi demonstrado que *C. neoformans* é capaz de ligar e ativar o plasminogênio do hospedeiro, com conseqüente formação de plasmina serina protease, contribuindo desta forma para a invasão da matrix extracelular e conseqüente acesso ao SNC (Stie *et al.*, 2009).

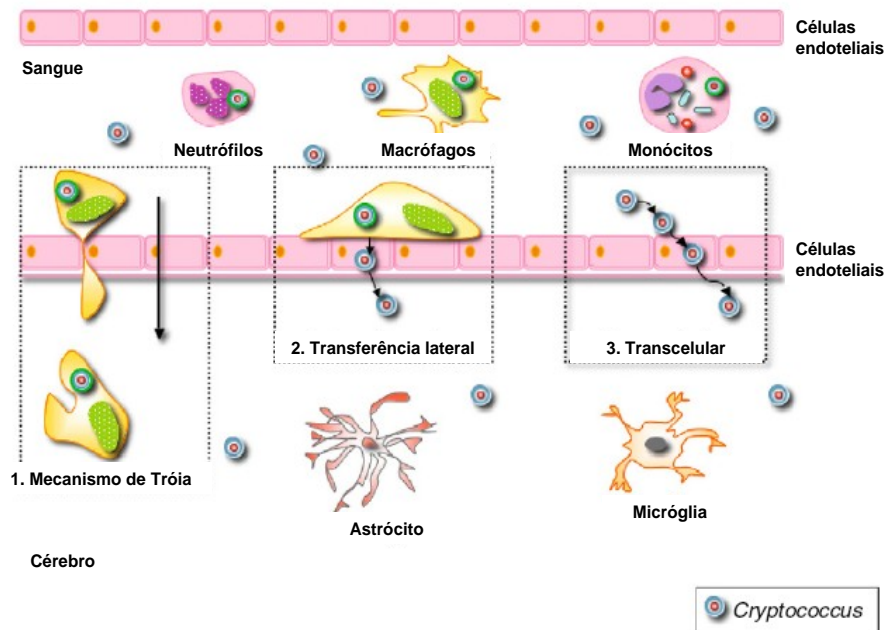


Figura 2. Possíveis rotas utilizadas por *C. neoformans* para ultrapassar a barreira hematoencefálica. (1) mecanismo de “cavalo de Tróia”; (2) transferência lateral de macrófagos para células endoteliais; e (3) travessia de leveduras isoladas por uma via transcelular. Adaptado de Ma & May, 2009.

2.5 Determinantes de virulência

C. neoformans e *C. gattii* expressam fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade, como a cápsula polissacarídica, a produção de melanina pela enzima lacase, o crescimento a 37 °C, as enzimas proteinases e fosfolipases, *mating type*, dentre outros (Steenbergen & Casadevall, 2003). A capacidade de *C. neoformans* se tornar patogênico deve ter originado de uma pressão seletiva ambiental imposta por organismos predadores como amebas e nematódeos, pois muitos fatores de virulência conferem vantagens para o desenvolvimento do fungo tanto no hospedeiro, como no meio ambiente (Casadevall *et al.*, 2003).

2.5.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula de *C. neoformans* e *C. gattii* é composta de dois polissacarídeos, a glucoronoxilomanana (GXM) e a galactoxilomanana (GalXM), e, em menor quantidade, por manoproteínas. A GXM corresponde a mais de 90% da massa da cápsula polissacarídica (Zaragoza *et al.*, 2009). A cápsula polissacarídica é essencial à virulência de *Cryptococcus* spp.. A síntese da cápsula é induzida por soro, limitação de ferro e níveis fisiológicos de CO₂ podendo a cápsula ser visualizada através da coloração com tinta da China (Figura 3) (Casadevall & Perfect, 1998; Zaragoza, *et al.*, 2003). *In vivo*, o tamanho da cápsula é influenciado pelo órgão e período da infecção, sendo maior nos pulmões e na fase aguda da doença (Del Poeta, 2004).

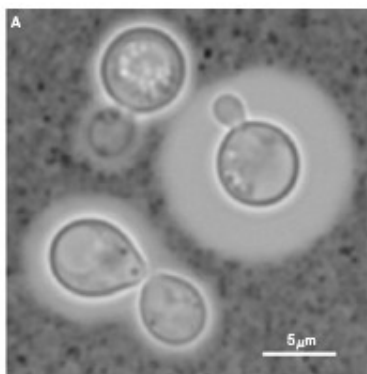


Figura 3: Cápsula polissacarídica. Coloração com tinta da China revela a cápsula (de vários tamanhos) que circunda as células leveduriformes de *C. neoformans*. Adaptado de Ma & May, 2009.

A cápsula é considerada um fator antifagocítico, inibindo a internalização de *Cryptococcus* spp. por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células endoteliais (Del Poeta, 2004). Adicionalmente, os polissacarídeos capsulares possuem um efeito deletério sobre o sistema imune, promovendo redução da liberação de citocinas por macrófagos ou monócitos, além de reduzem a migração de leucócitos para o sítio de inflamação (Bose *et al.*, 2003). Além destes mecanismos de depleção do sistema imune, GXM e GalXM são capazes de induzir apoptose em células T (Monari *et al.*, 2005) e em macrófagos, sendo a apoptose mediada pela expressão do ligante Fas (Villena *et al.*, 2008). *C. neoformans* também utiliza GXM para aderir às células do epitélio alveolar e após a internalização do fungo ocorrem danos à célula hospedeira por mecanismos ainda desconhecidos (Barbosa *et al.*, 2006).

O polissacarídeo capsular também pode desenvolver uma importante função na patogênese intracelular de *C. neoformans*, uma vez que leveduras internalizadas por macrófagos produzem e liberam vesículas contendo GXM (Feldmesser *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2007). Além deste fato, leveduras acapsuladas não replicam intracelularmente e não apresentam citotoxicidade para células fagocíticas, contrastando com as células encapsuladas que replicam e promovem a morte de macrófagos, o que

reforça a importância da cápsula polissacarídica para o crescimento intracelular (Feldmesser *et al.*, 2000).

A rota para a síntese da cápsula polissacarídica provavelmente envolve dezenas de genes, onde alguns destes já foram descritos. Os genes *CAP10*, *CAP59*, *CAP60* e *CAP64* são individualmente essenciais para a biossíntese de GXM e necessários para virulência em modelos de infecção em camundongos (Janbon, 2004). Outros genes também relacionados com a síntese de cápsula, mas que não são essenciais, são *CAS1* e *CAS3*, envolvidos na acetilação de GXM; e os genes *UXS1*, *UGD1*, *CAS31*, *CAS33*, *CAS34* e *CAS35*, os quais são importantes para a xilosilação de GXM (Ma & May, 2009). Apesar da descrição de alguns genes envolvidos na síntese de cápsula, muitos mecanismos reguladores do tamanho e da estrutura da cápsula ainda permanecem por ser identificados (Janbon, 2004). Entretanto, ensaios *in vitro* mostraram que Ferro é capaz de modular o tamanho da cápsula, onde células de *C. neoformans* sob condições de limitação de Fe apresentaram elevados níveis de transcritos para o gene *CAP60* (Lian *et al.*, 2005).

2.5.2 Melanina

Melaninas são pigmentos de coloração preta ou marrom, hidrofóbicos, de alto peso molecular, formados pela polimerização de compostos fenólicos e/ou indólicos. Em *C. neoformans* a capacidade de sintetizar melanina é conferida pela enzima lacase que converte compostos exógenos como L-DOPA, dopamina, norepinefrina e epinefrina no pigmento (Figura 4) (Casadevall *et al.*, 2003; Karkowska-kuleta *et al.*, 2009). O neurotropismo de *C. neoformans* pode ser explicado em parte pela habilidade do fungo em utilizar os neurotransmissores norepinefrina e dopamina como substrato para

produção de melanina (Steenbergen & Casadevall, 2003). No ambiente, a melanização é um mecanismo de proteção contra amebas (Steenbergen *et al.*, 2001), altas temperaturas e contra a radiação UV (Karkowska-kuleta *et al.*, 2009).

C. neoformans possui dois genes que codificam para lacase em seu genoma, *LAC1* e *LAC2*. Linhagens mutantes para *LAC1* (*lac1* Δ) foram analisadas em modelos de infecção experimental, e mostraram-se menos virulentas quando comparadas a linhagens selvagens (Salas *et al.*, 1996). Além disto, não ocorre expressão significativa do gene *LAC2* em relação ao *LAC1* e a geração de mutantes nulos para o gene *LAC2* não resulta na redução da virulência em camundongos (Zhu & Williamson, 2004).

A lacase também protege *C. neoformans* da atividade oxidativa dos macrófagos alveolares. Foi proposto que a lacase possui uma atividade de ferro oxidase. O Fe(II) pode reduzir o peróxido de hidrogênio em radicais livres, tóxicos para o fungo, a lacase é capaz de converter Fe(II) em Fe(III), protegendo desta forma a célula fúngica da formação dos radicais hidroxilas. Estes achados sugerem que lacase aumenta a virulência de *C. neoformans* por proteger o fungo dos mecanismos da resposta imune (Liu *et al.*, 1999).



Figura 4. Produção de melanina por *C. neoformans*. Colônias de *C. neoformans* (marrons) em contraste com colônias de *Candida albicans* (brancas), destacando a produção do pigmento melanina, em meio de cultura contendo compostos fenólicos. Adaptado de Idnurm *et al.*, 2005.

2.5.3 Habilidade de desenvolvimento a 37 °C

A habilidade de desenvolvimento a temperatura fisiológica é essencial para a virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*. Estudos moleculares identificaram uma variedade de genes associados ao desenvolvimento a 37°C. O gene *CNA1* codifica para a calcineurina A, cujos mutantes não são viáveis a temperatura fisiológica e são avirulentos em modelo de meningite criptocócica de coelho (Odom *et al.*, 1997). Os genes *SPE3-LYS9* (espermidina sintase-sacaropina desidrogenase) e *ILV2* (acetolactato sintase) são relacionados à biossíntese de aminoácidos e são necessários para sobrevivência de *C. neoformans* a 37°C. Adicionalmente, mutantes *ivl2Δ* rapidamente perdem a viabilidade a 37°C (Kingsbury *et al.*, 2004a; Kingsbury *et al.*, 2004b).

Diversos estudos avaliaram o perfil transcricional de *C. neoformans* na temperatura fisiológica do hospedeiro. Kraus e colaboradores (2004), através da técnica de hibridização de cDNA a microarranjos de DNA identificaram vários genes com a expressão modulada pela temperatura, dentre os quais o fator de transcrição *MGA2*. O produto deste gene está envolvido na biossíntese de ácidos graxos e a sua expressão é aumentada a 37°C. Rosa e Silva e colaboradores (2008) avaliaram os genes diferencialmente expressos por *C. neoformans* a 37 °C e identificaram produtos gênicos envolvidos em integridade da parede celular, resposta ao estresse, filamentação e metabolismo oxidativo.

2.5.4 Outros determinantes de virulência

As fosfolipases representam importante fator de virulência para *C. neoformans*, uma vez que hidrolisam ésteres de glicerolfosfolipídios causando a degradação das membranas celulares e lise de células do hospedeiro (Ma & May, 2009).

A urease confere virulência a *C. neoformans*, visto que mutantes nulos para o gene que codifica para esta enzima apresentam reduzida virulência em modelos de infecção em camundongos (Cox *et al.*, 2001). O *mating type* também é considerado um fator de virulência. Estudos epidemiológicos com *C. neoformans* var. *neoformans* mostraram que linhagens *mating type* α são mais virulentas, quando comparadas a linhagens de *mating* oposto (Kwon-Chung *et al.*, 1992). Em *C. neoformans* var. *grubii* linhagens de *mating* α e a são igualmente virulentas, entretanto, linhagens *mating* α apresentam uma predileção pelo SNC (Nielsen *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2005). Liu e colaboradores (2008) realizaram uma análise genética sistemática da virulência de *C. neoformans*, os autores construíram 1201 mutantes nulos e identificaram dezenas de genes ainda não descritos envolvidos na produção de cápsula, síntese de melanina, crescimento a temperatura corporal e virulência.

2.6 Células fagocíticas

A fagocitose é reportada como um processo mediado por receptores que leva a internalização de partículas por células fagocíticas. Macrófagos, células dendríticas e neutrófilos são células fagocíticas caracterizadas por sua habilidade de expressar uma série de receptores designados para reconhecer, ligar e desencadear a ingestão de patógenos, *debris* celulares e células apoptóticas. Estes fagócitos representam a primeira linha de defesa contra microrganismos, incluindo patógenos fúngicos, pois promovem sua remoção e destruição (Del Poeta, 2004). Os monócitos circulantes são os

precursores de macrófagos e células dendríticas, sendo recrutados para tecidos específicos via estímulos pró-inflamatório, metabólico ou imune (Gordon, 2007).

As populações de macrófagos teciduais compreendem os macrófagos alveolares, células de *kupffer* (fígado), micróglias (cérebro), macrófagos esplênicos, células de Langerhans (pele) e osteoclastos (ossos). Ainda não está claro se estas populações de macrófagos tecido-residentes são derivadas de linhagens específicas de precursores monocíticos ou se são derivados de um *pool* aleatório de monócitos. Além desta origem monocítica, os macrófagos teciduais também são capazes de apresentar uma proliferação local (Gordon & Taylor, 2005).

A superfície celular dos fagócitos é adornada com muitos receptores que são capazes de reconhecer e decodificar ligantes expressos na superfície de agentes infecciosos e células apoptóticas. Estes receptores reconhecem diretamente partículas livres ou alvos recobertos por opsoninas (Stuart & Ezekowitz, 2005). A opsonização facilita a fagocitose por promover um melhor reconhecimento dos antígenos pelos fagócitos. As duas maiores opsoninas presentes no soro de mamíferos são os anticorpos e o sistema complemento, que medeiam a fagocitose através de receptores distintos. (Kozel, 1993).

A ligação aos receptores é seguida pelo engolfamento e, após a internalização, a partícula é direcionada para uma organela delimitada por uma membrana, o fagossoma. A morte de patógenos internalizados requer a maturação do fagossoma através de eventos que levam a fusão do endossoma com lisossomas, gerando o fagolisossoma. A morte dos patógenos é mediada pelo complexo enzimático NADPH oxidase que catalisa a síntese de radicais livres tóxicos como os ânions peróxido e superóxido (Desjardins, 2003; Stuart & Ezekowitz, 2005).

2.7 Parasitismo intracelular de *C. neoformans*

A descoberta de similaridades entre a interação de *C. neoformans* com as amebas *Acanthamoebae castellanii* e *Dictiostelyium discoidum* e com macrófagos, gerou a hipótese de que a habilidade da levedura em sobreviver no interior das células fagocíticas do hospedeiro provavelmente evoluiu da interação do fungo com predadores do solo (Steenbergen *et al.*, 2001; Steenbergen *et al.*, 2003). A incubação de *C. neoformans* e amebas resulta em fagocitose das células leveduriformes, replicação intracelular das células fúngicas e morte das amebas. A levedura sobrevive à fagocitose promovida pelas amebas em um processo semelhante ao observado em macrófagos, envolvendo fatores de virulência e acúmulo de vesículas contendo polissacarídeos (Steenbergen *et al.*, 2001).

Vários estudos *in vitro* foram realizados a fim de elucidar os mecanismos utilizados por *C. neoformans* durante o crescimento intracelular (Tuker & Casadevall, 2002; Alvarez & Casadevall, 2006; Alvarez & Casadevall, 2007; Ma *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2008). Estas pesquisas foram baseadas em cultura celular englobando linhagens celulares de macrófagos incluindo a J774 e células primárias. O fungo é rapidamente fagocitado quando opsonizado com complemento ou anticorpos anti-cápsula polissacarídica, o que favorece a realização dos ensaios *in vitro* (Feldmesser *et al.*, 2001). Entretanto, o índice de fagocitose depende de algumas variáveis, incluindo a concentração e o tipo de opsonina, o tamanho da cápsula fúngica e a proporção de macrófagos para leveduras (Mukherjee *et al.*, 1998; Macura *et al.*, 2007).

Em modelos murinos, macrófagos alveolares e macrófagos peritoneais são capazes de fagocitar *C. neoformans* encapsulado somente na presença de opsoninas ou citocinas. A incubação de *C. neoformans* encapsulado com soro humano leva a ativação

da rota alternativa do sistema complemento e deposição do fragmento C3 (iC3b) na superfície e interior da cápsula polissacarídica, entretanto, para células com cápsula grande, o C3 não é opsônico. Quando é utilizado anticorpo anti-cápsula polissacarídica as células são fagocitadas independente do tamanho da cápsula (Del Poeta, 2004). Macrófagos de camundongos também são capazes de fagocitar *C. neoformans* na presença de interferon gama e lipopolissacarídeo bacteriano, sem a adição de complemento ou anticorpo (Schop, 2007).

C. neoformans possui uma estratégia única de sobrevivência intracelular que envolve permeabilização da membrana do fagolisossoma acoplada à secreção de vesículas contendo polissacarídeo capsular. Após a fagocitose, *C. neoformans* elabora sua cápsula, resultando em um grande fagossoma. A membrana do fagossoma torna-se mais permeável, o que resulta em aumento no pH do compartimento, acesso aos nutrientes citoplasmáticos e acúmulo de vesículas polissacarídicas no citoplasma do macrófago. Ao fim do processo, a contínua replicação leveduriforme pode provocar a lise do macrófago (Figura 5) (Feldmesser *et al.*, 2000; Toker & Casadevall, 2002).

C. neoformans pode também ser liberado da célula fagocítica em um processo em que fungo e macrófago permaneçam viáveis (Figura 5). Neste caso, ocorre a extrusão de um grande fagossoma contendo as células fúngicas, resultante da fusão de vários fagossomas menores. A extrusão do fagossoma ocorre após internalização de *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gattii*, sendo mais prevalente no último. Este processo provavelmente é promovido pela levedura e não pela célula hospedeira, uma vez que macrófagos englobando pérolas de poliestireno não apresentaram este evento (Alvarez & Casadevall, 2006). A extrusão pode ocorrer antes ou após a divisão celular de macrófagos, evidenciando mais uma vez, que o processo não danifica as células fagocíticas. Como a extrusão é precedida pela formação de um

fagossoma gigante, este evento influencia na distribuição das células fúngicas durante o processo de mitose dos fagócitos. Após a divisão celular de macrófagos contendo o grande fagossoma uma célula filha permanece infectada e a outra fica livre do patógeno, e este fenômeno parece ocorrer preferencialmente em *C. gattii*. Em macrófagos infectados com *C. neoformans* raramente forma-se o grande fagossoma, desta forma, findada a divisão mitótica, há leveduras em ambas as células filhas fagocíticas (Luo *et al.*, 2008).

Além dos mecanismos acima citados, *C. neoformans* também é capaz de apresentar uma transferência lateral entre fagócitos, movendo-se diretamente de macrófagos infectados para não infectados, sem contato com o ambiente extracelular (Figura 5). Esta transferência direta célula a célula pode contribuir para a habilidade da levedura de permanecer latente dentro de células hospedeiras por períodos assintomáticos, além de promover uma proteção à levedura durante a disseminação (Alvarez & Casadevall, 2007; Ma *et al.*, 2007).

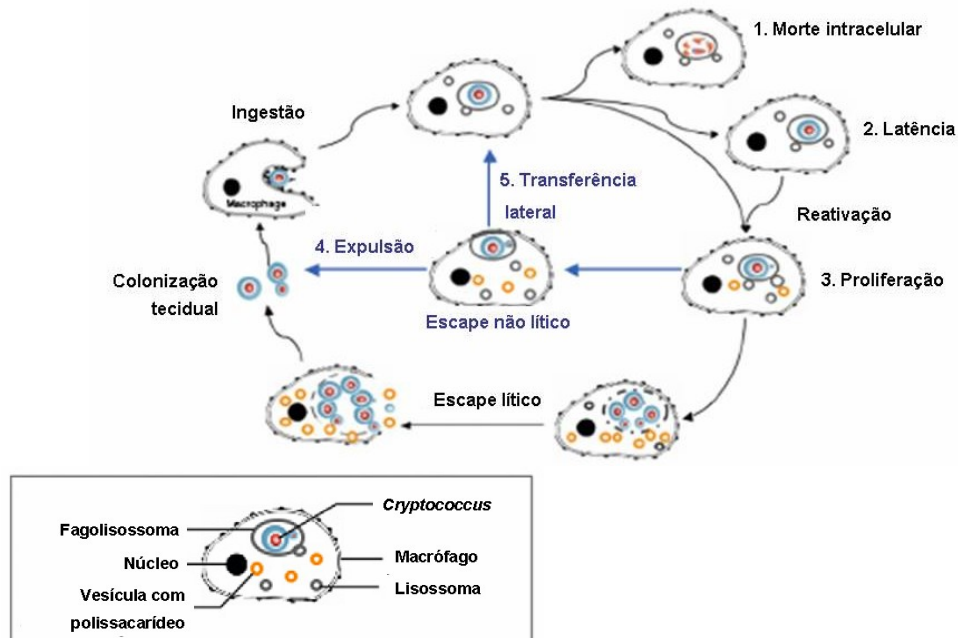


Figura 5: Parasitismo de *C. neoformans* em macrófagos. Após a fagocitose, as células de *C. neoformans* podem ser mortas pelos macrófagos (1) ou permanecer em estado latente (2). Quando o hospedeiro torna-se imunossuprimido, algumas células de *C. neoformans* ou populações latentes podem reativar e proliferar intracelularmente (3), seguida por lise da célula hospedeira e liberação das leveduras para o ambiente extracelular. As leveduras liberadas são capazes de colonizar o tecido ou infectar outros macrófagos. Rotas não líticas podem também ocorrer, nas quais as células leveduriformes são expelidas pelos macrófagos, nesta forma, os macrófagos e leveduras permanecem viáveis (4) ou as leveduras intracelulares são transferidas para macrófagos vizinhos via transferência lateral direta de célula a célula (5). Adaptado de Ma & May, 2009.

Um fator que influencia no padrão de liberação das células fúngicas por macrófagos, é o tipo de opsonina utilizada. Quando *C. neoformans* é opsonizado com complemento, a extrusão do fagossoma leva a dispersão das células leveduriformes de forma isolada. Quando *C. neoformans* e *C. gattii* são opsonizados com anticorpos, as leveduras são liberadas em microcolônias semelhantes à biofilmes e permanecem ligadas a célula hospedeira. Nestas estruturas, as células fúngicas estão agregadas a uma

matriz polissacarídica que contém anticorpos ligados, indicando que a ação das imunoglobulinas persiste após a fagocitose e provavelmente é um mecanismo de proteção *in vivo* que impede a dispersão das células fúngicas (Alvarez *et al.*, 2008).

Recente estudo desenvolvido por Alvarez e colaboradores (2009) reportou que o curso da infecção de monócitos sanguíneos humanos por *C. neoformans* é semelhante aos processos observados em macrófagos murinos. A interação de *C. neoformans* com monócitos resulta em ingestão, replicação intracelular e liberação de polissacarídeo, seguido por disseminação célula a célula e extrusão das leveduras. A ocorrência da extrusão do fagossoma sugere que este fenômeno deve desempenhar uma função central na propagação e disseminação deste patógeno fúngico (Alvarez *et al.*, 2009).

Alguns estudos têm identificado enzimas envolvidas na patogenicidade intracelular de *C. neoformans*, entretanto, muitos fatores permanecem desconhecidos, devido à complexidade deste processo, além das diferenças entre *C. neoformans* e *C. gattii* que ainda permanecem inexploradas. As enzimas lacase e superóxido dismutase (SOD) protegem *C. neoformans* da atividade antifúngica de macrófagos alveolares, provavelmente por aumentar a resistência ao dano oxidativo no interior do fagossoma (Liu *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 2003). A lacase de *C. neoformans* além da síntese de melanina, também possui uma atividade de ferro oxidase e esta ação no interior do fagossoma resulta em uma redução na formação de radicais hidroxila (Liu *et al.*, 1999). As SODs são enzimas que detoxificam radicais de oxigênio através da conversão de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Fridovich *et al.*, 1995), desta forma protegem os microrganismos dos radicais superóxidos liberados pelos macrófagos no fagossoma (Lynch & Kuramitsu, 2000).

O gene *PLB1* codifica a enzima fosfolipase B que contribui para a sobrevivência e replicação de *C. neoformans* em macrófagos *in vitro* (Cox *et al.*, 2001) e em monócitos

circulantes *in vivo* (Santangelo *et al.*, 2004). A fosfolipase B provavelmente degrada a membrana do fagossoma, permitindo acesso aos nutrientes presentes no citoplasma da célula hospedeira (Feldmesser *et al.*, 2001).

A síntese de esfingolipídios é essencial para o desenvolvimento intra e extracelular de *C. neoformans*. Os genes *IPC1* que codifica uma inositol-fosforil ceramida sintase 1 (*ipc1*) e o gene *ISC1* que codifica a inositol fosfofingolipídio fosfolipase C1 (*isc1*) são importantes para a sobrevivência de *C. neoformans* no interior de macrófagos. A *down*-regulação de *IPC1* e a deleção de *ISC1* reduzem significativamente o crescimento intracelular da levedura em linhagens de macrófagos (Luberto *et al.*, 2001; Shea *et al.*, 2006).

Fan e colaboradores (2005) aplicaram a técnica de hibridização de cDNA em microarranjos de DNA e identificaram vários genes envolvidos no crescimento intracelular de *C. neoformans*. Dentre os genes identificados, *LAC1*, *GPA1* e *PKA1* foram confirmados por serem fundamentais, uma vez que mutantes nulos para estes genes apresentaram um crescimento reduzido no interior de macrófagos quando comparados à linhagem selvagem. Os produtos dos genes *GPA1* e *PKA1* regulam a formação de cápsula, síntese de melanina, *mating* e resposta a glicose (Hull & Heitman, 2002), e os dados da sua expressão sugerem que estas funções também devem ser importantes durante o crescimento de *C. neoformans* no microambiente do fagossoma (Fan *et al.*, 2005).

2.8 O genoma de *C. neoformans*

O sequenciamento do genoma de duas linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* está completo e incluiu as linhagens JEC21 e B3501A (*C. neoformans*)

(Loftus *et al.*, 2005) e da linhagem R265 (*C. gattii* agente do surto de criptococose em Vancouver) disponível em http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans_b/MultiHome.html. Projetos de sequenciamento dos genomas de outros dois isolados estão em fase de finalização e englobam as linhagens H99 (*C. neoformans* var. *grubii*) e WM276 (*C. gattii*) (Ma & May, 2009).

A sequência nucleotídica dos 14 cromossomos, compreendendo um total de 20 Mb de DNA, foi determinada para duas linhagens do sorotipo D de *C. neoformans* relacionadas (JEC21 e B3501A) (Loftus *et al.*, 2005). Além do mais, foi determinada a sequência nucleotídica de uma biblioteca de cDNA normalizada com aproximadamente 23.000 clones produzida a partir de mRNA de cultivos da linhagem JEC21 em diferentes condições. Um total de 6572 genes codificantes de proteínas foi identificado, os quais continham uma média de 6,3 exons de 255 pares de bases (pb) e 5,3 íntrons de 67 pb. JEC21 e B3501A são linhagens altamente relacionadas, sendo detectada identidade de sequência em 50% do genoma, ao passo que o restante difere por pequenos polimorfismos. A grande maioria (99,7%) dos genes partilha mais de 98% de identidade em suas sequências de nucleotídeos (Loftus *et al.*, 2005).

Eventos de *splicing* alternativo e transcritos antisense foram identificados em genes codificando diferentes funções, o que sugere que ambos os processos são mecanismos genéticos regulatórios em *C. neoformans*. Formas de *splicing* alternativo foram preditas para 277 genes e transcritos antisense foram identificados em 53 genes. A presença e frequência destes transcritos antisense, assim como a presença de componentes moleculares necessários para interferência de RNA, indicam que a interferência por RNA dupla fita é provavelmente um mecanismo regulatório amplamente utilizado por *C. neoformans* (Loftus *et al.*, 2005).

Tranposons representam aproximadamente 5% do genoma de *C. neoformans*. Estes elementos estão alocados em blocos de 40 a 100kb em cada cromossomo. Cada bloco é único, porém todos contêm pelo menos uma cópia dos transposons Tcn5 e Tcn6, os quais podem representar regiões centroméricas (Loftus *et al.*, 2005). É provável que estes elementos direcionem um alto nível de rearranjos em regiões únicas do genoma, conferindo uma plasticidade genética responsável por instabilidades no cariótipo e variações fenotípicas (Idnurm *et al.*, 2005; Ma & May, 2009).

No total, 65% dos genes de *C. neoformans* possuem seqüências homólogas conservadas entre genomas de outros fungos e destas, 12% são restritas ao genoma do fungo basidiomicético *Phanerochaete chrysosporium*. Outros 10% dos genes parecem ser seqüências únicas de *C. neoformans*, baseado na ausência de homólogos descritos em bancos de dados públicos. Para os 25% restantes dos genes, não foram detectados ortólogos em bancos de dados de seqüências em fungos (Loftus *et al.*, 2005). Dentre os genes que parecem ser únicos a *C. neoformans*, são descritos dois grandes grupos: aqueles cujos produtos estão envolvidos na formação da cápsula e aqueles cujos produtos estão relacionados à formação da parede celular. Aproximadamente 60% dos genes de *C. neoformans* podem ser classificados de acordo com funções moleculares baseados no *Gene Ontology (GO annotation)*. Comparações com o perfil exibido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* revelaram uma distribuição similar de genes agrupados em distintas categorias funcionais (Loftus *et al.*, 2005). Em contraste com *S. cerevisiae*, o genoma de *C. neoformans* apresenta genes ricos em íntrons e um transcriptoma caracterizado por eventos de *splicing* alternativo (Loftus *et al.*, 2005). A elucidação do genoma completo de *C. neoformans* permitiu o desenvolvimento de vários estudos moleculares direcionados à patogenicidade da levedura.

2.9 Análise da Diferença Representacional (RDA)

A crescente disponibilidade do sequenciamento de genomas de microrganismos tem possibilitado o desenvolvimento de várias técnicas moleculares cujos resultados têm contribuído para a compreensão da patogênese de infecções fúngicas (De Backer & Dijck, 2003). Com o sequenciamento do genoma de *C. neoformans* ferramentas moleculares e genéticas têm sido utilizadas para estudar as interações patógeno-hospedeiro, neste sentido, foram realizadas avaliações do perfil transcricional da levedura em condições que mimetizam o ambiente do hospedeiro. A técnica de Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE) foi utilizada para identificar genes de *C. neoformans* transcritos preferencialmente a 37°C e durante meningite experimental em coelhos (Steen *et al.*, 2002; Steen *et al.*, 2003). A metodologia de hibridização de cDNA em microarranjos de DNA foi aplicada para avaliar a expressão gênica de *C. neoformans* durante crescimento a 37°C e durante o desenvolvimento no interior de macrófagos (Kraus *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2005). Rosa e Silva *et al.*, (2008) identificaram genes preferencialmente expressos por *C. neoformans* na temperatura fisiológica do hospedeiro através da técnica de RDA.

A metodologia de RDA acopla hibridização subtrativa ao enriquecimento cinético mediado por PCR, sendo inicialmente desenvolvida para a detecção de diferenças entre dois genomas complexos (Lisitsyn *et al.*, 1993). Esta metodologia foi subsequentemente modificada para analisar diferenças entre duas populações de mRNA, onde os fragmentos presentes em ambas populações são eliminados. A técnica utiliza o enriquecimento de fragmentos de cDNA alvo (*tester*) através de hibridizações subtrativas na presença de excesso de cDNA controle (*driver*), seguido de PCR (Hubank & Schatz, 1994). O procedimento pode ser dividido em três fases: a geração de *amplicons* representativos por PCR para formar as populações de cDNA a serem

comparados; a hibridização subtrativa destas representações levando ao enriquecimento dos fragmentos diferencialmente expressos e sequencial depleção de seqüências comuns em ambas populações; e a purificação, clonagem e sequenciamento dos produtos diferenciais (Bowler, 2004).

A técnica de RDA tem a adaptabilidade para ser aplicada em diversos processos biológicos, incluindo o estudo de desordens gênicas, a caracterização de mutantes e as interações patógeno-hospedeiro (Hubank & Schatz, 1994). Esta ferramenta tem sido amplamente utilizada em estudos de câncer (Hollestelle & Schutte, 2005), e em análises de expressão em uma série de organismos, tais como plantas (Ling *et al.*, 2003), insetos (Judice *et al.*, 2006), cestódeos (Bizarro *et al.*, 2005), bactérias (Choi *et al.*, 2002), e fungos (Dutra *et al.*, 2004; Bailão *et al.*, 2006; Baeza *et al.*, 2007; Rosa & Silva *et al.*, 2008).

A aplicação de estratégias genômicas para descoberta de novos antifúngicos tem recebido uma maior atenção nos últimos anos. Dois principais grupos de genes são alvos para antifúngicos: os genes essenciais para a viabilidade e os fatores de virulência e patogenicidade (De Backer & Dijck, 2003). A utilização da técnica de RDA para melhor compreensão das interações de *C. neoformans* e *C. gattii* com as células do hospedeiro poderá identificar genes importantes para a patogenicidade desta levedura, bem como, novos alvos para o desenvolvimento de antifúngicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a expressão gênica de *C. neoformans* e *C. gattii* durante o processo de fagocitose mediado por macrófagos peritoneais de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar infecção em macrófagos peritoneais de ratos com *C. neoformans* e *C. gattii*.

- Identificar as seqüências diferencialmente expressas por *C. neoformans* e *C. gattii* fagocitados por macrófagos.

- Confirmar a expressão fúngica diferencial durante o desenvolvimento intracelular por RT-PCR em tempo real.

4. MANUSCRITO SUBMETIDO A MEDICAL MYCOLOGY

***Cryptococcus gattii* genes preferentially expressed during rat macrophage infection**

Short title: *Cryptococcus* gene expression in macrophage infection

Letícia Goulart^a, Lívia Kmetzsch Rosa e Silva^a, Laura Chiapello^b, Carolina Silveira^a,
Juliana Crestani^a, Diana Masih^b, Marilene Henning Vainstein^{a*}

^a*Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.*

^b*Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Medina Allende y Haya de la Torre, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina*

*Corresponding author: Marilene Henning Vainstein, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa postal 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 (51) 3308-6060; Fax +55 (51) 3308-7309. e-mail: mhv@cbiot.ufrgs.br

Summary

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are encapsulated yeast agents of cryptococcosis and are facultative intracellular pathogens. The interaction of these yeasts with macrophages is essential for containing the infection; however, *Cryptococcus* overcomes this initial host defense barrier using a unique pathogenic strategy involving intracellular replication and cytoplasmic accumulation of polysaccharide-containing vesicles. Here, we employed representational difference analysis (RDA) to identify *C. neoformans* and *C. gattii* genes differentially expressed during intracellular growth in rat peritoneal macrophages. The upregulated transcripts of *C. neoformans* during macrophage interaction were related to ATP-binding cassette (ABC) transporters, intra-golgi transport, chaperone activity, ribosomal maintenance, NAD metabolism, histone methylation, stress response, and monosaccharide metabolism. In *C. gattii*, upregulated genes were related to cell growth, aerobic respiration, protein binding, microtubule nucleation, monosaccharides and nitrogen metabolism, inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity, cellular signaling, and stress response. Our findings reveal new genes that may be necessary for the intracellular parasitism of *C. neoformans* and *C. gattii*.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; RDA; macrophages

1. Introduction

The *Cryptococcus* species complex comprises basidiomycetous encapsulated yeast pathogens of humans causing a life-threatening disease of the central nervous system, lungs, and skin [1]. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) generally cause disease in immunocompromised patients, whereas *Cryptococcus gattii* (serotypes B and C) is a primary pathogen [2]. The human pathogenic *Cryptococcus* species complex have well-defined virulence factors that include the ability to grow at host body temperature (37°C), a polysaccharide capsule and melanin production, phospholipase, proteinase, and urease activities [3].

Infection by *C. neoformans* and/or *C. gattii* is thought to be acquired by inhalation of spores or desiccated yeast cells from an environmental source. After inhalation, the yeast cells first establish an infection in the lungs but then rapidly spread to the central nervous system through the bloodstream or lymphatic system and cause meningoencephalitis. *Cryptococcus* can be recovered from the peripheral blood either as free cells or internalized in mononuclear cells such as macrophages or neutrophils transported to micro-capillary beds where they interact with the blood-brain barrier. Evidence indicates that cryptococcal cells cross endothelial cells directly by transcytosis [4]. A Trojan Horse mechanism may also be involved. In this case, the yeasts are internalized in mononuclear cells at an early stage of infection and then trafficked by these host cells into distal tissues without being exposed to the full onslaught of the immune system [5, 6, 7]. The persistence of a dormant infection has been correlated with the presence of viable yeast cells within macrophages [8].

C. gattii, similarly to the *C. neoformans* varieties, is a facultative intracellular pathogen with related pathogenic strategies [6, 9]. Both yeasts do not avoid fusion with macrophage lysosomal compartments but rather reside and survive in an acidic phagolysosome [10] *Cryptococcus* can reproduce inside macrophages in a process that is associated with phagolysosomal fusion and accumulation of cytoplasmic vacuoles, with transfer of capsular polysaccharide into lysosomes [11]. Following phagosome enlargement, a macrophage phagosomal extrusion event occurs with the escape of the viable yeasts without killing the host cells. After the extrusion event, both the macrophages and expelled *Cryptococcus* continue to proliferate. This phenomenon may play an important role in the continued propagation and possibly spread to the central nervous system [12, 13]. The distribution of intracellular yeasts into daughter cells following the mitosis of macrophage-like cells depends on the single phagosome formation. The result distribution into daughter cells after cell division is a function of the intracellular cargo number and of the yeast strains and species. *C. gattii* and acapsular *C. neoformans* have an unequal distribution into daughter cells, in a process that produces one infected daughter cell and one clean daughter cell. The unequal cargo distribution appears to benefit the microbe by promoting host cell exocytosis [14].

Intracellular replication of *C. neoformans* has been ascribed to evolve from adaptations of its ability to survive and replicate inside amoeba for protection against environmental predators. This process results in amoeba death, replication of the fungal cells, and formation and accumulation of polysaccharide-filled vacuoles [15]. To survive and proliferate intracellularly, the microbes have developed mechanisms to avoid destruction by the degradative pathway, including escape from the phagosome into the host cytosol, the avoidance of phagolysosome fusion, and survival within the phagolysosome [16].

Genetic tools have been developed for studying the pathobiology of interactions between *C. neoformans* and its host. Representational Difference Analysis (RDA) is a rapid and effective method to identify genes differentially expressed under two growth conditions [17]. This strategy was applied to identify novel temperature regulated genes of *C. neoformans* [18]. In this study we report differential gene expression by *C. gattii* and *C. neoformans* internalized by rat peritoneal macrophages using cDNA RDA. This work provides the first description of *C. gattii* transcriptome during macrophage infection and describes novel genes expressed by host-internalized *C. neoformans*.

2. Materials and methods

2.1 Strain and culture conditions

C. neoformans var. *grubii* HC6 strain (clinical sample) [18] and *C. gattii* NIH 112B were used. For constructions of RDA libraries, the fungi were grown on RPMI medium at 37 °C for 24h (culture referred to as “driver”), or within macrophages at 37 °C for 24h (culture referred to as “tester”). Cells were harvested by centrifugation and immediately frozen in liquid nitrogen prior to RNA extraction.

2.2 Macrophage assay

Male Wistar rats were used at 8 to 10 weeks of age, and were housed and cared for in the animal resource facilities of the Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Chemical Sciences, National University of Cordoba, according to the institutional guidelines. The animals were sacrificed following protocols approved by the Animal Experimentation Ethics Committee, Faculty of Chemical Sciences, National University of Cordoba. To collect resident peritoneal macrophages, rats were euthanized by CO₂

inhalation, the peritoneal cavity was injected with ice-cold PBS (phosphate-buffered saline) pH 7.2, and peritoneal cells were harvested. Macrophages were separated from other cell populations on a discontinuous Percoll gradient [19]. Elicited macrophages were obtained 3 days after the mice were given an intraperitoneal injection of 3ml of sterile 4% thioglycolate medium. Tissue culture plates were seeded with peritoneal macrophages in RPMI medium containing 10% of fetal bovine serum, 0.3 µg/ml of lipopolysaccharide (LPS; Sigma, St. Louis, MO), 1% of L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 µg/ml of streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1µg/ml of antibody 2H1 (IgG generated from a BALB/c mouse immunized with *C. neoformans* glucuronoxylomannan conjugated to tetanus toxoid) [20]. After 2h incubation, nonattached macrophages were removed by washing the culture cells with PBS. Fungal cells for macrophage infection were grown in YPD broth for 16 h at 37 °C, centrifuged, resuspended in PBS, and counted with a hemocytometer. *C. neoformans* and *C. gattii* cells were added to the macrophage culture at a multiplicity of infection of 2:1 (yeast: macrophage) and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, the extracellular yeast cells were rinsed off with warm PBS and the remaining fungal cells within the attached macrophage cells were scraped and resuspended in ice-cold water. Macrophages were lysed by adding 0.05% of sodium dodecyl sulfate (SDS; Sigma) solution. Lysates were washed three times with ice-cold water by centrifugation and yeast cells were frozen at - 80°C until RNA isolation. As a control, *C. neoformans* and *C. gattii* cells were added to culture plates with RPMI medium in the absence of macrophages and incubated under the conditions described above.

2.3 RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated and cDNA was prepared using RNeasy Mini Kit (Qiagen) and SMART PCR Synthesis Kit (Clontech Laboratories), respectively, according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA synthesis was performed using 500 ng of total RNA, and an aliquot of 6 µl of first strand cDNA was used as a template to the second strand synthesis.

2.4 RDA

The cDNA fragments for RDA were generated according to the protocol previously described [18, 21]. Subtracted libraries were constructed using cDNAs from *C. neoformans* and *C. gattii* grown within macrophages as *tester* and cDNAs from yeasts grown in RPMI without macrophages as *driver*. A double-stranded cDNA sample of each condition was digested with *Sau3AI* restriction enzyme (Amersham Biosciences) and the resulting products were purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE). The digested *tester* cDNAs were ligated to RBam24/12 adapters. The first differential product was obtained by hybridization (20 h at 67 °C) of *driver* and *tester* cDNAs mixed at a 10:1 ratio, followed by PCR amplification with RBam24 primer. To generate the second differential products, NBam adapters were ligated to the *tester*, and PCR amplification was performed with a hybridization *driver/tester* ratio of 100:1.

2.5 Cloning and sequence analysis of the RDA products

The final RDA products were blunted with Klenow fragment of DNA polymerase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) and phosphorylated with T4 polynucleotide kinase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The fragments were ligated to *SmaI*-digested and dephosphorylated pUC18 vector. *E. coli* XL1-Blue competent cells were transformed

with the ligation products, and plasmid DNA was prepared from selected clones. Cloned inserts were sequenced with the Dyanamic ET Dye Terminator cycle sequencing kit for the Megabace DNA analysis system (GE). Sequence quality was analyzed and the contig assembly was performed using the Staden Package Software. The resulting sequences were compared with the Genbank database using the BLASTX algorithm at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Sequences returning matches with an E -value = -9 were annotated and classified based on their putative molecular function and/or biological process using the Gene Ontology classification system. Searches for well-conserved functional motifs were performed in the NCBI conserved domain database.

2.6 Real time RT-PCR analysis of representative regulated genes in C. gattii and C. neoformans

Real-time RT-PCR reactions were performed on an *Applied Biosystems 7500* Real-Time PCR System. PCR thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 95 °C for 5 min and 40 cycles at 95 °C for 15 s, 50 °C for 30 s, and 72 °C for 20 s. Platinum SYBR green qPCR Supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used as reaction mixture, adding 10 pmol of each primer and 2 µl of template cDNA at a final volume of 25 µl. All experiments were conducted with two independent macrophage infections and RPMI cultures, and each cDNA sample was analyzed in duplicate with each primer pair. Melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm a single PCR product. The data were normalized to actin cDNAs amplified in each set of PCR experiments. Relative expression data was obtained using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [22].

3. Results

3.1 RDA analysis of the genes preferentially expressed by *C. neoformans* and *C. gattii* in the macrophages infection

C. neoformans and *C. gattii* were internalized by rat peritoneal macrophages and replicated intracellularly during a 24 h infection (Fig. 1). RDA was used to identify genes preferentially expressed by *C. neoformans* and *C. gattii* during the macrophage infection. cDNA libraries were obtained from the phagocytosed yeasts and from yeast cells grown in RPMI medium. Different patterns of DNA amplification were observed after two rounds of subtractive hybridization (data not shown). A total of 768 clones (384 clones from each library) with an average length of 400 bp were sequenced. After Staden analysis 367 high quality sequenced cDNAs were compared with GenBank database. EST alignment enabled us to identify a total of 159 sequences for *C. neoformans* cDNA RDA library and 208 sequences to *C. gattii* library.

3.2 Phagocytosis induced genes in *C. neoformans* and *C. gattii*

The upregulated transcripts of *C. neoformans* during macrophage incubation were related to ATP-binding cassette (ABC) transporters, intra-golgi transport, chaperone activity, ribosomal maintenance, NAD metabolism, histone methylation, stress response and monosaccharide metabolism (Table 1). *C. gattii* internalized by macrophages expressed genes related to cell growth, aerobic respiration, protein binding, microtubule nucleation, monosaccharide and nitrogen metabolism, inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity, cellular signaling, and stress response (Table 2). Only two genes (Rds1 and zinc-binding dehydrogenase) were identified to be upregulated in both fungal species.

3.3 Well-conserved functional motifs in hypothetical proteins described in C. neoformans and C. gattii libraries

We performed searches in the NCBI conserved domain database to reveal the presence of well-conserved functional motifs in hypothetical proteins that were described in our libraries. In the *C. neoformans* library, the hypothetical protein CNBA6480 has a conserved domain (*Paal_thioesterase with a hot dog fold*) involved in transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis. The hypothetical protein CNBA2450 possesses an *Htpg* domain related to chaperones from Hsp90 family. The hypothetical protein with GenBank accession number XP_566652 also has this domain. In the *C. gattii* library, the hypothetical protein with GenBank accession number XP_567839 has the *phosphoinositide binding Phox Homology domain* of SNARE proteins, which is related to vesicular trafficking. Furthermore, we found that the hypothetical protein CNN01480 possesses a *Sur7* domain, related to protein and lipid endocytosis at the plasma membrane.

3.4 Confirmatory differential expression of C. neoformans and C. gattii identified sequences

To corroborate the RDA results, we performed real-time RT-PCR analysis to evaluate the expression of some upregulated genes during *C. neoformans* and *C. gattii* growth within macrophages. The transcripts encoding ARF small monomeric GTPase, nicotinate-nucleotide adenylyltransferase, protein-lysine n-methyltransferase, Rds1 protein, and zinc-binding dehydrogenase were confirmed to be upregulated in the internalized *C. neoformans* (Fig. 2A). The transcripts encoding aerobic respiration-

related protein, ARF GTPase activator, clathrin-coated vesicle protein, glutamate-ammonia ligase, inositol/phosphatidylinositol phosphatase, MAP kinase, Rds1 protein, trehalose synthase, and zinc-binding dehydrogenase were confirmed to be upregulated in the phagocytosed *C. gattii* (Fig. 2B).

4. Discussion

To analyze the late transcriptional response to phagocytosis, *C. neoformans* and *C. gattii* opsonized with antibody 2H1 were incubated by 24 h with rat peritoneal macrophages. This prolonged incubation allowed to interpret the adaptation of *C. neoformans* and *C. gattii* to the intracellular environment. We observed that yeasts were phagocytosed and replicated within rat peritoneal macrophages during infection (Fig. 1). In previous *in vitro* studies with rat alveolar macrophages the ingestion of opsonized *C. neoformans* was slow during the first hours of incubation, but were considerable after 24 h [23, 24]. The interaction between *C. neoformans* and hosts cells has been extensively studied with J774 murine macrophage-like cell line, but that of *C. gattii* and primary macrophages remain largely unexplored. Differences our similarity in the phagocytosis for *C. neoformans* and *C. gattii* by rat macrophages were not described, however, the course of phagocytosis of *C. gattii* in the J774 cells is similar to the *C. neoformans* [25].

cDNA RDA was used to identify differently expressed genes by *C. neoformans* var. *grubii* and *C. gattii* growing within phagocytic cells. cDNA RDA has the capacity and adaptability to be applied to a wide range of biological processes [17]. This technique has been used to study host-pathogen interactions involving the *C. neoformans* [18], *Paracoccidioides brasiliensis* [26], and *Trichophyton rubrum* [27] pathogenic fungi.

C. neoformans is a facultative intracellular pathogen that can replicate intracellularly in the host phagocytic cells coupled with intracellular secretion of capsular polysaccharide into vesicles [6]. Polysaccharide glucuronoxylomannan (GXM) is exported to the exterior of the cell in the secretory vesicle that crosses the cell wall during growth in culture medium and macrophage infection [28, 29]. We identified that internalization by macrophages activated expression of ARF small monomeric GTPase in *C. neoformans*. ARFs are the family of monomeric proteins implicated in intracellular vesicle trafficking, clathrin protein assembly, and maintenance of the integrity of the endoplasmic reticulum and Golgi compartments [30]. ARF is essential in yeasts and ARF mutations cause secretion defects in *S. cerevisiae* [31].

In the present study, we observed that phagocytosed *C. neoformans* expressed adrenoleukodystrophy protein, an ATP-binding cassette (ABC) transporter. ABC transporters are transmembrane proteins involved in the protection of cells from toxic compounds, and have been related to a form of defense against antimicrobial substances produced by the protective host phagocytic cells [32, 33]. *C. neoformans* internalized by murine macrophage-like expressed two peroxisomal fatty acid transporters similar to the adrenoleukodystrophy-related protein in humans [34]. In *C. albicans*, vacuolar ABC transporter Mlt1 has been putatively attributed to elimination of toxic substances produced by host phagocytes [35]. In *C. neoformans* the upregulation of the ATP binding cassette transporter-encoding gene antifungal resistance 1 (AFR1) enhances the virulence of this yeast and, specifically, its ability to survive within macrophages [33].

Some genes related to stress response were also expressed by macrophage-internalized *C. neoformans* (chaperone and Rds1). Molecular chaperones aid intracellular protein folding. They function both by suppressing the tendency of unfolded proteins to aggregate and by promoting the folding process [36]. Heat-shock

proteins (Hsps) have been identified as molecular chaperones. Furthermore, two hypothetical proteins that were differentially expressed in this library (GenBank accession numbers XP_566652 and XP_778245) have an *Htpg* domain related to chaperones from the Hsp90 family. They serve fundamental functions in cell physiology and can be induced by a variety of stressful stimuli [37].

C. neoformans infected macrophages are known to contain vesicles with polysaccharides [11]. Apparently, *C. gattii*, similarly to *C. neoformans*, released polysaccharide during macrophage interaction. Our results show for the first time that *C. gattii* also express genes involved in intracellular vesicle formation during macrophage interaction as, for example, a phosphatidylinositol phosphatase. This enzyme catalyzes the reversible production of the polyphosphoinositides that regulate diverse cellular processes, including growth, differentiation, cytoskeletal rearrangements, and membrane trafficking [38, 39]. The *C. gattii* phagocytosed cells also expressed clathrin-coated vesicle protein and coatamer zeta subunit, both of which are related to vesicle formation. COP- and clathrin-coated vesicles represent the two main classes of vesicular carriers within the biosynthetic and endocytic pathways. Clathrin is a major vesicle coat protein that is important for receptor-mediated endocytosis [40]. The vesicles are delivered to endosomes, from which the cargo can be trafficked to the degradation compartment, or recycled to the plasma membrane or to the biosynthetic intracellular organelles [41]. COPI-coated vesicles appear to be involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, in intra-Golgi transport, and possibly in endosomes [42]. ARF GTPase activator also is upregulated in *C. gattii*. Moreover, a hypothetical protein (GenBank accession number XP_567839), which is also differentially expressed in the *C. gattii* library, has the *phosphoinositide binding Phox Homology domain* of SNARE (Soluble

NSF attachment protein receptor) proteins. The SNARE family of proteins is composed of integral membrane proteins that serve as key factors for vesicular trafficking [43].

Golgi-vacuolar transport genes were differentially regulated during *C. neoformans* and *C. gattii* intracellular parasitism. This may be related to the recent observation that *Cryptococcus* makes vesicles that contain virulence factors such as glucosylceramide, urease and laccase [44]. Vesicular transport has been developed as a mechanism for efficient delivery of factors that combat host responses and are toxic to host cells with an end result of the vesicles significantly facilitating fungal pathogenesis [45].

Phagocytosis in *C. gattii* induced some genes involved in stress response (MAP kinase, trehalose synthase and Rds1). In pathogenic fungi, MAP kinases are key elements that control adaptation to environmental stress. MAP kinase pathways have an essential role in the control of virulence factors such as capsule biogenesis and growth at 37 °C in *C. neoformans* and oxidative stress response in *Candida albicans* [46, 47]. Trehalose is a nonreducing disaccharide present in a wide variety of organisms, which may serve as a source of energy and carbon. In addition, it has been shown that trehalose can protect proteins and cellular membranes from inactivation or denaturation caused by a variety of stress conditions, including desiccation, dehydration, heat, cold, and oxidation [48]. The essential role of the trehalose pathway for cryptococcosis was confirmed when a *C. neoformans* trehalose-6-phosphate synthase (*tps1*) mutant strain was found to be avirulent in both rabbits and mice models of experimental cryptococcosis [49]. In *C. albicans* the presence of trehalose is a factor that contributes to protecting cells from injury caused by macrophages [50]. Trehalose has a protective role against drastic oxidative stress which is presumably due to the burst of reactive oxygen and nitrogen species from the macrophages [51]. Recently, it was shown that

GXM promotes inducible nitric oxide synthase expression and concomitant nitric oxide production in rat macrophages [52].

Fan and coworkers [34] employed a microarray to analyze the transcriptional profile of *C. neoformans* in response to internalization by murine macrophages. We found some similarities in gene function identified in microarray analysis concerning secretion, membrane transport, and cell division. However, only the phosphatidylinositol phosphatase gene described in microarray study was also identified in our *C. gattii* library. Microarray and RDA use different strategies to value gene expression, so the divergence existent in our study and the microarray analyses can result from differences in experimental design. RDA analysis allowed us to identify a novel set of genes expressed by *C. neoformans* during macrophage infection. Five genes identified in the *C. neoformans* library and nine genes differentially expressed by *C. gattii* were evaluated and confirmed by quantitative RT-PCR, considering that total number of the identified genes is relatively low, the restrict number of the genes confirmed represent a limitation in our study. However, previous studies of RDA also verified by real time RT-PCR only more important genes [18,27].

Recently, Ma and coworkers [53] showed that Vancouver Island outbreak isolates have dramatically increased their ability to replicate within macrophages in comparison with other *C. gattii* strains, suggesting that this phenotype may be the cause of the outbreak. Microarray studies revealed that the hypervirulence of these isolates is characterized by the up-regulation of a large group of genes, many of which are encoded by mitochondrial genome or associated with mitochondrial activities. Predicted functions to some genes related to ability to survive and proliferate inside a host macrophage too were identified in our study how zinc-binding dehydrogenase, ER to Golgi transport-related protein, vesicular-fusion protein, heat shock protein, intra-Golgi

transport protein, endocytosis-related protein, trehalose-phosphate synthase, ribosomal subunit protein and GTPase activator.

Phagocytosed *C. gattii* and *C. neoformans* showed transcript profile differences. Only Rds1 and Zinc-binding dehydrogenase genes were expressed by both species. We also observed a different expression pattern in three temperature-regulated genes (calcium ion transporter, diacylglycerol cholinephosphotransferase and glyoxal oxidase precursor) in *C. neoformans* when compared with *C. gattii* [18]. This pattern of expression was expected due to a number of clear differences among *C. neoformans* and *C. gattii*, including their ecological niche, epidemiology, biochemistry, and association with host immune status. *C. gattii* infections have been documented more commonly in immunocompetent individuals, whereas a majority of the patients infected with *C. neoformans* have been immunocompromised, especially those with HIV infection. The differences between *C. neoformans* and *C. gattii* in host prediction remain largely unknown, and the modulation of the expression of antiphagocytic factors may play a key role in the outcome of cryptococcosis [54].

Rds1 was the most redundant gene in the *C. gattii* and *C. neoformans* libraries. The Rds1 gene is induced in response to heat stress in *Schizosaccharomyce pombe* [55] and in *C. neoformans* [18, 56]. We compared gene expression in *C. neoformans* or in *C. gattii* internalized by peritoneal macrophages at 37 °C, excluding genes responsive to high temperature only. This suggests that Rds1 may also be essential during intracellular growth.

Studies concerning the onset of cryptococcosis have focused on *C. neoformans*, and relatively little is known about the cellular pathogenic strategy of *C. gattii* [54]. This study provides the first description of genes expressed by *C. gattii* during rat macrophage infection and the assumption that the possible involvement of the genes

encoding for vesicle formation and vesicular trafficking is related to virulence. Knowledge of the mechanisms involved in the pathogenesis of cryptococcosis can lead to development of novel therapeutic agents and treatment strategies.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the CNPq, CAPES, and FAPERGS. Automated DNA sequencing was performed at the facilities of the Brazilian Genome Network at the Center of Biotechnology, CBiot-UFRGS-RS. The authors thank Dr. J. Polacco for critical reading of the manuscript.

References

- [1] Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 2006; **60**: 69-105.
- [2] Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol* 2008; **25**: 4-12.
- [3] Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 2003; **5**: 667-675.
- [4] Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 753-64.
- [5] Drevets DA, Leenen PJ. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes Infect* 2000; **2**: 1609-18.
- [6] Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 2000; **68**: 4225-37.
- [7] Luberto C, Martinez-Mariño B, Taraskiewicz D, Bolaños B, Chitano P, Toffaletti DL, *et al.* Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1080-94.
- [8] Feldmesser M, Tucker S, Casadevall A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 273-8.
- [9] Alvarez M, Saylor C, Casadevall A. Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. *Cell Microbiol* 2008; **10**: 1622-33.

- [10] Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun* 1999; **67**: 885-90.
- [11] Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **5**: 3165-70.
- [12] Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 2006; **7**: 2161-5.
- [13] Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 2006; **7**: 2156-60.
- [14] Luo Y, Alvarez M, Xia L, Casadevall A. The outcome of phagocytic cell division with infectious cargo depends on single phagosome formation. *PLoS ONE* 2008; **16**: 3219.
- [15] Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggests an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **18**: 15245-15250.
- [16] Del Poeta M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2004; **3**: 1067-75.
- [17] Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 5640-8.
- [18] Rosa e Silva LK, Staats CC, Goulart LS, Morello LG, Pelegrinelli Fungaro MH, Schrank A, Vainstein MH. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Res Microbiol* 2008; **159**: 221-9.

- [19] Chiapello LS, Baronetti JL, Aoki MP, Rubinstein HR, Masih DT. Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Immunology* 2004; **113**: 392-400.
- [20] Mukherjee J, Pirofski L, Scharff MD, Casadevall A. Antibody-mediated protection in mice with lethal intracerebral *Cryptococcus neoformans* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3636-3640.
- [21] Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Res Microbiol* 2004; **155**: 245-51.
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; **25**: 432-440.
- [23] Gross NT, Nessa K, Camner P, Chinchilla M, Jarstrand C. Interaction between *Cryptococcus neoformans* and alveolar macrophages. *J Med Vet Mycol* 1997; **35**: 263-9.
- [24] Nessa K, Gross NT, Jarstrand C, Johansson A, Camner P. *In vivo* interaction between alveolar macrophages and *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1997; **1**:1-7.
- [25] Alvarez M, Saylor C, Casadevall A. Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. *Cellular Microbiology* 2008; **10**:1622-33.
- [26] Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Walquíria Inês Molinari-Madlum EE, Soares Felipe MS, *et al.* Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis*

in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* 2006; **8**: 2686-97.

[27] Baeza LC, Bailão AM, Borges CL, Pereira M, Soares CM, Mendes-Giannini M. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. *Microbes Infect* 2007; **9**: 1415-21.

[28] Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, *et al.* Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 2007; **6**: 48-59.

[29] Yoneda A, Doering TL. An eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 5131-5140.

[30] Boman AL, Zhang C, Zhu X, Kahn RA. A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 1241-1255.

[31] Stearns T, Kahn RA, Botstein D, Hoyt MA. ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 6690-99.

[32] Burke MA, Ardehali H. Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. *Transl Res* 2007; **150**: 73-80.

[33] Sanguinetti M, Posteraro B, La Sorda M, Torelli R, Fiori B, Santangelo R, Delogu G, Fadda G. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2006; **74**: 1352-1359.

[34] Fan W, Kraus PR, Boily MJ, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryot Cell* 2005; **4**: 1420-33.

- [35] Theiss S, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Agabian N, Hacker J, Köhler GA. Functional analysis of a vacuolar ABC transporter in wild-type *Candida albicans* reveals its involvement in virulence. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 571-584.
- [36] Caplan AJ, Mandal AK, Theodoraki MA. Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol* 2007; **17**: 87-92.
- [37] Burnie JP, Carter TL, Hodgetts SJ, Matthews RC. Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev* 2006; **30**: 53-88.
- [38] De Matteis MA, Di Campli A, Godi A. The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 2005; **10**: 396-405.
- [39] Odorizzi G, Babst M, Emr SD. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 229-35.
- [40] Newpher TM, Idrissi FZ, Geli MI, Lemmon SK. Novel function of clathrin light chain in promoting endocytic vesicle formation. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 4343-52.
- [41] Maldonado-Báez L, Dorés MR, Perkins EM, Drivas TG, Hicke L, Wendland B. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 2936-48.
- [42] Nickel W, Wieland FT. Biogenesis of COPI-coated transport vesicles. *FEBS Lett* 1999; **25**: 395-400.
- [43] Kielen N, Kloepper TH, Fasshauer D. Phylogeny of the SNARE vesicle fusion machinery yields insights into the conservation of the secretory pathway in fungi. *BMC Evol Biol* 2009; **9**: 19.
- [44] Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell* 2008; **7**: 58-67.

- [45] Nosanchuk JD, Nimrichter L, Casadevall A, Rodrigues ML. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. *Communicative and Integrative Biology* 2008; **1**: 37-39.
- [46] Kraus PR, Fox DS, Cox GM, Heitman J. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol Microbiol* 2003; **48**: 1377-87.
- [47] Román E, Arana DM, Nombela C, Alonso-Monge R, Pla J. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol* 2007; **15**: 181-90.
- [48] Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 2003; **13**: 17-27.
- [49] Petzold EW, Himmelreich U, Mylonakis E, Rude T, Toffaletti D, Cox GM, Miller JL, Perfect JR. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2006; **74**: 5877-87.
- [50] Martínez-Esparza M, Aguinaga A, González-Párraga P, García-Peñarrubia P, Jouault T, Argüelles JC. Role of trehalose in resistance to macrophage killing: study with a tps1/tps1 trehalose-deficient mutant of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 384-394.
- [51] Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 2000; **24**: 469-86.
- [52] Chiapello LS, Baronetti JL, Garro AP, Spesso MF, Masih DT. *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. *Int Immunol* 2008; **20**: 1527-41.

[53] Ma H, Hagen F, Stekel DJ, Johnston SA, Sionov E, Falk R, Polacheck I, Boekhout T, May RC. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation.

Proc Natl Acad Sci U S A 2009; **106**:12980-5.

[54] Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol* 2009; **67**: 131-90.

[55] Ludin KM, Hilti N, Schweingruber ME. *Schizosaccharomyces pombe* Rds1, an adenine-repressible gene regulated by glucose, ammonium, phosphate, carbon dioxide and temperature. *Mol Gen Genet* 1995; **30**: 439-45.

[56] Kraus PR, Boily MJ, Giles SS, Stajich JE, Allen A, Cox GM, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryot Cell* 2004; **3**: 1249-60.

Table 1. Summary of computational analysis^a of the genes obtained from *C. neoformans* macrophage infection.

Annotation	E value ^b	Access number (Genbank) ^c	Frequency (number of clones) ^d	putative molecular function and/or biological process ^e
Adrenoleukodystrophy protein	6E-16	XP569624	3	ATP-binding cassette (ABC) transporter
ARF small monomeric GTPase	3E-10	XP572032	17	ER to Golgi transport / intra-Golgi transport
Chaperone	8E-31	XP568451	1	Chaperone activity / heat shock protein activity
Hypothetical protein CNA04620	3E-35	XP566839	6	Unknown
Hypothetical protein CNBA6480	3E-46	XP777526	25	Unknown
Hypothetical protein CNE03390	6E-20	XP570905	1	Unknown
Hypothetical protein CNBA2450	1E-13	XP778245	1	Unknown
Hypothetical protein CNBI2410	2E-64	XP773627	1	Unknown
Hypothetical protein	1E-17	XP569898	1	Unknown
Hypothetical protein	2E-14	XP566652	2	Unknown
Hypothetical protein	5E-26	XP571046	1	Unknown
Mitochondrial ribosomal protein L23	1E-14	XP568880	2	Ribosomal large subunit assembly and maintenance
MMS2	3E-17	XP567564	1	ER-associated protein catabolism/cell cycle
Nicotinate-nucleotide adenylyltransferase	2E-33	XP571297	3	NAD metabolism
Protein-lysine N-methyltransferase	7E-78	XP567697	5	Histone methylation/regulation of meiosis
Rds1 protein	6E-11	XP568514	67	Stress response
Zinc-binding dehydrogenase	2E-51	XP69885	1	D-xylose reductase activity / Monosaccharide metabolism

^a Sequence quality was analyzed using the Phred Program, and contig assembly was performed by using the Staden Package Software. The resulting sequences were compared with the Genbank database using BLASTX program.

^b E value according to information from BLASTX searches of the nonredundant database at NCBI.

^c Accession number of the gene products in the GenBank database.

^d Frequency represents the number of clones found in a total of 159 high quality sequenced cDNA clones.

^e Putative molecular function and/or biological process according to the Gene Ontology classification system.

Table 2. Summary of computational analysis^a of the genes obtained from *C. gattii* macrophage infection.

Annotation	E value ^b	Access number (Genbank) ^c	Frequency (number of clones) ^d	putative molecular function and/or biological process ^e
Aerobic respiration-related protein	2E-22	XP56666	10	Aerobic respiration
ARF GTPase activator	2E-21	XP572488	10	Cell growth, endocytosis and cell cycling
Clathrin-coated vesicle protein	8E-20	XP571414	12	Unknown
Coatomer zeta subunit (zeta-coat protein)	6E-17	XP569309	4	Protein binding
Cysteine desulfhydrase	1E-14	XP569458	2	Metabolism
EF-hand calcium-binding protein	2E-18	XP572464	2	Microtubule nucleation
Glutamate-ammonia ligase	7E-80	XP570366	10	Nitrogen metabolism
Hypothetical protein	1E-28	AAW44688	8	Unknown
Hypothetical protein	5E-11	XP572560	2	Unknown
Hypothetical protein	4E-18	XP567839	2	Unknown
Hypothetical protein	8E-30	XP570366	12	Unknown
Hypothetical protein	5E-49	XP568617	12	Unknown
CNN01480				
Hypothetical protein CNBM0080	7E-52	ZP01763164	24	Unknown
Hypothetical protein CNE02450	2E-24	XP570948	10	Unknown
Inositol/phosphatidylinositol phosphatase	2E-10	XP568319	2	Inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity
MAP Kinase	1E-12	XP572813	2	Signal transduction
Phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	9E-36	XP567793	8	Phosphogluconate dehydrogenase/glucose metabolism
Rds1 protein	4E-44	XP568514	40	Stress response
Trehalose synthase	4E-20	XP572131	18	Glycosyltransferase / Cell envelope biogenesis
Zinc-binding dehydrogenase	4E-51	XP569885	18	D-xylose reductase activity/ Monosaccharide metabolism

^a Sequence quality was analyzed using the Phred Program, and contig assembly was performed by using the Staden Package Software. The resulting sequences were compared with the Genbank database using the BLASTX program.

^b E value according to information from BLASTX searches of the nonredundant database at NCBI.

^c Accession number of the gene products in the GenBank database.

^d Frequency represents the number of clones found in a total of 208 high quality sequenced cDNA clones.

^e Putative molecular function and/or biological process according to the Gene Ontology classification system.

Fig. 1

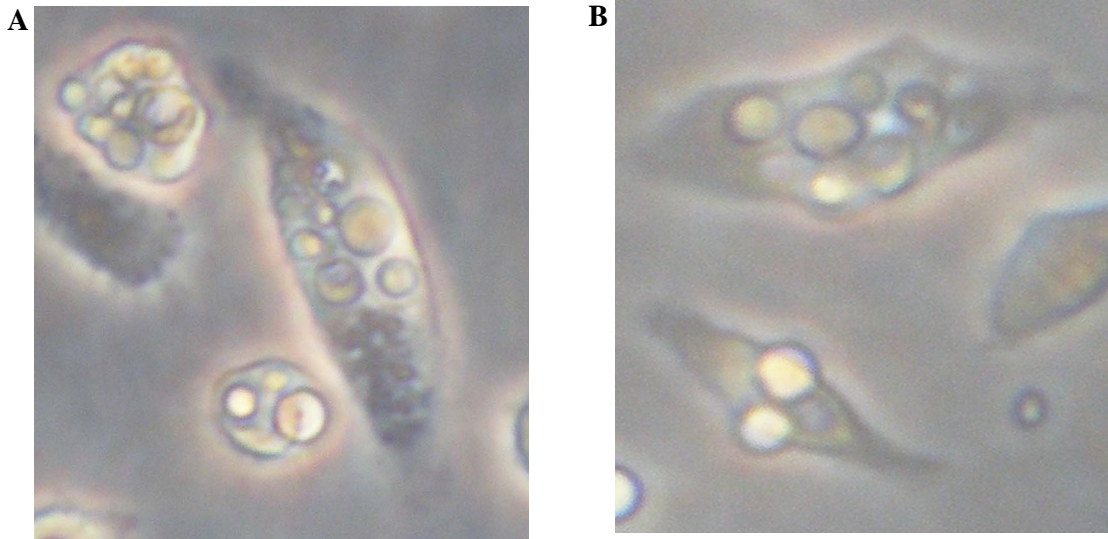


Fig. 1. Rat peritoneal macrophages infected with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. Photomicrography showing *C. neoformans* (A) and *C. gattii* (B) internalized by macrophages. Images were collected at 100X .

Fig. 2

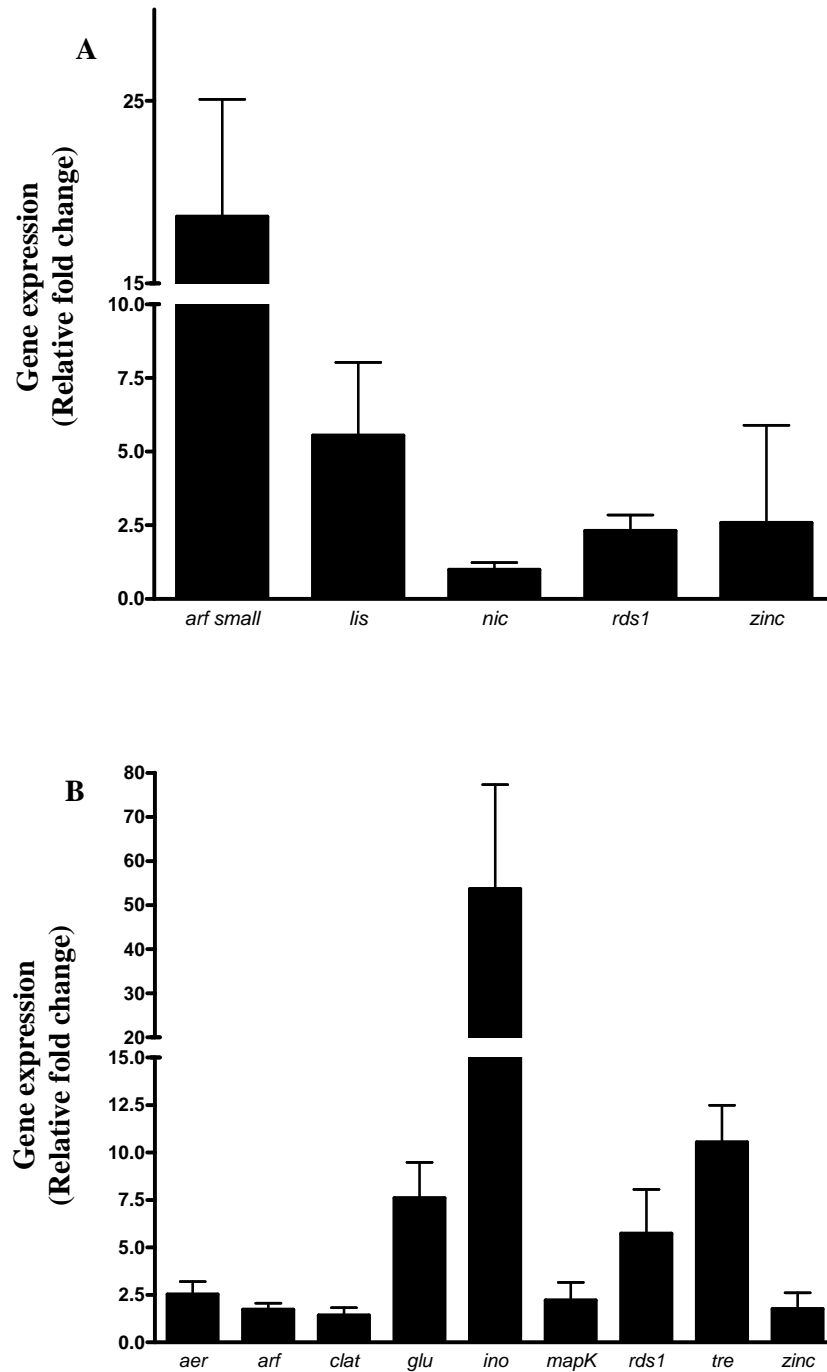


Fig 2. Validation of RDA results by quantitative real time RT-PCR analysis. The values represent the number of times (relative fold change) that a selected gene is expressed compared with control grown in RPMI medium in the absence of macrophages. (A) Relative expression of *C. neoformans* genes. The genes were as follows: ARF small

monomeric GTPase (*arf small*), nicotinate-nucleotide adenylyltransferase (*nic*), protein-lysine N-methyltransferase (*lis*), Rds1 protein (*Rds1*), zinc-binding dehydrogenase (*zinc*). (B) Relative expression of *C. gattii* genes. The genes were as follows: Aerobic respiration-related protein (*aer*), ARF GTPase activator (*aer*), clathrin-coated vesicle protein (*clat*), glutamate-ammonia ligase (*glu*), inositol/phosphatidylinositol phosphatase (*ino*), MAP Kinase (*mapk*), Rds1 protein (*Rds1*), trehalose synthase (*tre*), and zinc-binding dehydrogenase (*zinc*).

5. DISCUSSÃO

C. neoformans e *C. gattii* são patógenos intracelulares facultativos capazes de replicar no interior de células fagocíticas *in vivo* e *in vitro* (Feldmesser *et al.*, 2000; Goldman *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2008). Neste trabalho, através da metodologia de RDA foi possível identificar os genes diferencialmente expressos por estas leveduras durante o desenvolvimento intracelular em macrófagos peritoneais de ratos. A técnica de RDA foi anteriormente empregada com sucesso em *Paracoccidioides brasiliensis*, *Trichophyton rubrum* e *C. neoformans*. Nestes estudos, foi possível identificar genes expressos em condições que mimetizavam o microambiente do hospedeiro, os quais possivelmente estejam envolvidos na patogenicidade destes fungos (Bailão *et al.*, 2006; Baeza *et al.*, 2007; Rosa & Silva, 2008).

No presente estudo, os genes preferencialmente expressos por *C. neoformans* foram correlacionados ao tráfego vesicular, transporte de membrana, atividade de chaperona, regulação da meiose, metabolismo de monossacarídeo e resposta ao estresse. *C. gattii* internalizados por macrófagos expressaram genes relacionados à respiração aeróbica, endocitose, tráfego vesicular, metabolismo de monossacarídeo e nitrogênio, sinalização celular e resposta ao estresse.

Recentemente, Ma e colaboradores (2009) observaram que os isolados de *C. gattii* agentes do surto de criptococose em Vancouver apresentaram um índice de replicação intracelular em macrófagos maior quando comparados a outros *C. gattii*, sugerindo que esta capacidade tenha contribuído para a hipervirulência destas cepas. Ensaio de microarranjo foram projetados para identificar genes que apresentassem uma correlação significativa com a proliferação intracelular destas linhagens. Várias das funções preditas para os genes induzidos durante o parasitismo em macrófagos destes isolados também foram descritas em nosso estudo, tais como, transporte do retículo

endoplasmático para o Golgi, desidrogenase ligadora de zinco, proteína de choque térmico, fusão vesicular, transporte intra-Golgi, proteína associada à endocitose, ativador de GTPase e trealose-6- fosfato sintase.

Fan *et al.*, (2005) avaliaram o padrão transcricional de *C. neoformans* em resposta a fagocitose por macrófagos da linhagem celular J774 usando ensaios de hibridização de cDNA a microarranjos de DNA. As análises revelaram transcritos relacionados a estresse oxidativo, autofagia, secreção, divisão celular, reparo de DNA e biossíntese de aminoácidos. Foram observadas algumas similaridades entre este trabalho e o nosso estudo, no que se refere às funções gênicas de transporte de membrana, reparo de DNA, divisão celular e secreção, entretanto, somente o gene que codifica para a enzima inositol/fosfatidilinositol fosfatase foi descrito em ambos os estudos. Hibridização de cDNA a microarranjos de DNA e RDA utilizam estratégias metodológicas diferentes para avaliar a expressão gênica, desta forma, as divergências entre os resultados encontrados podem ser decorrentes das diferenças experimentais. A expressão diferencial de quatorze genes, identificados pela técnica de RDA, foi avaliada e confirmada através de ensaios de RT-PCR em tempo real, utilizando dois experimentos independentes de infecção em macrófagos.

C. neoformans e *C. gattii* internalizados por macrófagos expressaram genes envolvidos nos processos de tráfego de vesículas e secreção. Em *C. neoformans* o gene codificante para uma GTPase monomérica da família Arf (*ADP-ribosylation factor*) apresentou expressão diferencial, enquanto que em *C. gattii*, transcritos codificando um ativador de GTPase Arf, uma proteína de vesícula ligada a clatrina, uma subunidade zeta de coatômero, uma fosfatidilinositol fosfatase e uma proteína hipotética com domínio PX (*Phox Homology*) de SNARE (*soluble N-ethylmaleimidesensitive factor attachment receptor*) mostraram-se diferencialmente expressos.

Os eucariotos possuem um mecanismo de tráfego vesicular bem caracterizado, no qual proteínas e lipídios são modificados e transportados do retículo endoplasmático (RE) para a o Golgi, e deste para a membrana plasmática ou outros destinos celulares. Este transporte requer a formação controlada de vesículas e estruturas túbulo-vesiculares a partir de uma membrana doadora, o movimento destas vesículas para o seu alvo, e a sua fusão com a membrana aceptora. A formação das vesículas e seu transporte são mediados por proteínas de revestimento, como a clatrina e coatômeros, ao passo que o direcionamento à membrana alvo e a fusão com a membrana aceptora são definidos por proteínas SNAREs (Bonifacino & Glick, 2004). As proteínas de revestimento são recrutadas do citosol para a vesícula nascente, onde promovem uma deformação na membrana próxima ao local do brotamento, e eventualmente transportam a vesícula recém formada. Três complexos protéicos de revestimento de vesículas são conhecidos, o complexo clatrina, as proteínas COPI (*coat protein I*) e o complexo COPII (*coat protein II*) (Schekman & Orci, 1996).

C. gattii apresentou uma expressão diferencial de genes que codificam uma proteína de vesícula revestida por clatrina e uma subunidade zeta de coatômero, proteínas estas, que se relacionam às vesículas de clatrina e COPI, respectivamente. As vesículas revestidas por clatrina são produzidas na membrana plasmática ou brotam da região trans do Golgi e participam dos processos de endocitose e biogênese de lisossomos (Kirchhausen, 2000). Estas vesículas são derivadas de endossomas, onde o material interno pode ser trafegado para um compartimento de degradação ou reciclado na membrana plasmática ou em organelas intracelulares (Maldonado-Báez & Wedland, 2006). O complexo COPI consiste de uma Arf e de sete subunidades de coatômeros: α COP; β COP; β' COP; γ COP; δ COP; ϵ COP e ζ COP (Spang, 2002). COPI é responsável pela biogênese e transporte de vesículas por uma via retrógrada do Golgi para o RE. Em

S. cerevisiae, mutações nas subunidades de coatômeros afetam diretamente este tráfego de vesículas e resultam em falhas no processo de secreção (Duden *et al.*, 1994; Wuestehube *et al.*, 1996).

Proteínas da família Arf são um grupo de GTPases envolvidas em processos biológicos como manutenção da estrutura de organelas e tráfego vesicular em rotas secretórias e de endocitose, em humanos foram descritas 6 Arfs, enquanto que em *S. cerevisiae* foram identificadas 3 Arfs. Estas proteínas recrutam as subunidades de coatômeros presentes no citosol para a membrana do Golgi contribuindo para a formação do complexo COPI, além de direcionarem uma variedade de adaptadores de clatrina para o Golgi e para o compartimento de endossomas (Bonifacino & Glick, 2004; Memon, 2004). Durante o parasitismo intracelular, *C. neoformans* expressou transcritos que codificam uma Arf, enquanto *C. gattii* um ativador de Arf. A participação de Arfs na biologia de espécies fúngicas tem sido descrita por alguns autores. Mutantes nulos *ARF1* de *S. cerevisiae* apresentaram falhas nos processos de secreção (Stearns *et al.*, 1990). Em *Aspergillus nidulans*, o gene *ARFB* atua em um sistema secretório que envolve a formação de vesículas no corpo apical da hifa, contribuindo para o crescimento filamentoso polarizado (Lee & Shaw, 2008). Costa e colaboradores (2007) analisaram o padrão transcricional de células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas de fígados de camundongos e verificaram dentre vários genes a expressão de Arf e de coatômero zeta, indicando a participação destes, no processo de interação com o hospedeiro.

Além dos constituintes protéicos, os lipídios, em particular os fosfoinosítídeos, possuem funções regulatórias chave no tráfego de membrana. Os fosfoinosítídeos são substratos de diferentes quinases e fosfolipases, e podem produzir um conjunto de diferentes atividades biológicas que incluem regulação da secreção e remodelamento do

citoesqueleto de actina (Odorizzi *et al.*, 2000). *C. gattii* expressou uma fosfatidilinositol fosfatase durante o desenvolvimento intracelular em macrófagos. A fosfatidilinositol fosfatase melhor caracterizada de *S. cerevisiae* é a *sac1p*. Leveduras *SAC1* mutantes apresentam uma variedade de fenótipos, incluindo auxotrofia para o inositol, falhas no transporte de ATP no RE, desorganização do citoesqueleto de actina e supressão do processo de secreção (Novick *et al.*, 1989).

A proteína hipotética com número de acesso no *GenBank* XP_567839 possui um domínio PX (*Phox homology*) de SNARE e o gene que codifica esta proteína foi induzido durante o desenvolvimento intracelular de *C. gattii*. Domínios PX são encontrados em proteínas que desenvolvem papel fundamental em rotas endocíticas. Em *S. cerevisiae*, proteínas SNAREs ligam a fosfatidilinositol fosfato através de seus domínios PX regulando a maquinaria de fusão vesicular (Cheever *et al.*, 2006). Proteínas SNAREs interagem com proteínas de revestimento COPI e COPII durante os processos de transporte vesicular do Golgi para o RE e do RE para o Golgi, respectivamente, direcionando desta forma a fusão e o transporte de vesículas em diferentes organelas (Bonifacino & Glick, 2004).

A expressão diferencial de genes relacionados ao tráfego vesicular sugere que este processo é importante para o parasitismo intracelular de *C. neoformans* e *C. gattii*. Estudos prévios relatam que *C. neoformans* produz vesículas extracelulares durante o desenvolvimento em células do hospedeiro (Tucker & Casadevall, 2002; Rodrigues *et al.*, 2007). Tucker & Casadevall (2002) verificaram que a replicação intracelular de *C. neoformans* em macrófagos *in vitro* é acompanhada por um acúmulo de vesículas polissacarídicas no citoplasma destes fagócitos. Da mesma forma, Rodrigues e colaboradores (2007) demonstraram que *C. neoformans* pode produzir vesículas extracelulares durante o crescimento em meio de cultura, no interior de macrófagos e *in*

vivo na infecção pulmonar de camundongos, suportando a idéia de que o transporte vesicular é importante durante a infecção fúngica.

C. neoformans cultivado em meio mínimo produz vesículas extracelulares de diferentes tamanhos, morfologias e constituições, sendo compostas por lipídios, proteínas e carboidratos. Por análise proteômica destas vesículas foram caracterizadas 76 proteínas dentre estas, fatores de virulência (urease, lacase), proteínas de choque térmico, superóxido dismutase, catalase, entre outras (Rodrigues *et al.*, 2008). Além do polissacarídeo capsular GXM, o GalXM também foi relacionado a secreção vesicular (Jesus *et al.*, 2009). A recente constatação de que o transporte de vesículas contribui para a melanização de *C. neoformans*, uma vez que a síntese de melanina pode ocorrer no interior destas estruturas, reforça a idéia da importância da secreção vesicular para a virulência da levedura (Eisenman *et al.*, 2009).

As vesículas produzidas por *C. neoformans* são sintetizadas intracelularmente e transferidas para a superfície da célula fúngica (Yoneda & Doering, 2006, Rodrigues *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009). Entretanto, a completa biogênese destas estruturas bem como sua rota de tráfego intracelular ainda permanecem desconhecidas. Recentemente, a localização intracelular de GXM foi associada à membrana de estruturas semelhantes a vesículas, corpos multivesiculares e endossomas (Oliveira *et al.*, 2009). Dados de Yoneda & Doering (2006) sugerem que vesículas contendo GXM são formadas no Golgi e após são direcionadas para a membrana plasmática, de onde são transferidas para o ambiente extracelular por exocitose. Rodrigues e colaboradores (2008) propõem que as estruturas vesiculares possam ser liberadas na forma de exossomas, provavelmente provenientes de corpos multivesiculares, isto devido à similaridade encontrada entre a morfologia e os constituintes das vesículas e exossomas de mamíferos. Mutantes nulos de *C. neoformans* para o gene *SEC6* não produzem

exossomas e apresentam atenuada virulência em camundongos, sugerindo a participação destas estruturas vesiculares na infecção fúngica (Panepinto *et al.*, 2009). Em *C. neoformans*, mutação no gene *SAVI*, um homólogo de *SEC4* de *S. cerevisiae*, o qual codifica uma Rab GTPase, resulta em acúmulo intracelular de vesículas secretórias contendo GXM (Yoneda & Doering, 2006). Em nosso estudo identificamos que *C. neoformans* apresentou expressão diferencial de uma Arf GTPase, enquanto *C. gattii* expressou um ativador de Arf, uma vez que, estas proteínas atuam no Golgi em rotas secretórias, também podem estar envolvidas na produção de vesículas extracelulares. Estudos futuros devem ser realizados com mutantes nulos para os genes de secreção identificados a fim de confirmar seu envolvimento no processo de formação de vesículas extracelulares. A concentração de produtos fúngicos em vesículas pode aumentar a eficiência da levedura em adquirir nutrientes, além disto, o transporte vesicular pode ter sido desenvolvido por *C. neoformans* com a finalidade de liberar fatores que controlem as respostas do hospedeiro (catalase e superóxido dismutase) e que sejam tóxicos para o mesmo (GXM, urease e lacase), sendo assim, as vesículas facilitariam a patogenicidade fúngica (Casadevall *et al.*, 2009; Nosanchuk *et al.*, 2008).

A análise da expressão gênica de *C. neoformans* e *C. gattii* durante a fagocitose revelou alguns genes importantes na resposta ao estresse, indicando os possíveis mecanismos utilizados pelas leveduras para adaptação a vida intracelular. Estes genes incluíram aqueles que codificam para a proteína Rds1 e chaperonas em *C. neoformans* e Rds1, MAP quinase e trealose sintase em *C. gattii*. *C. neoformans* é capaz de crescer em condições de estresse como a 37 °C, privação de nutrientes e frente ao estresse oxidativo e nitrosativo (Brown *et al.*, 2007). Os macrófagos possuem uma variedade de processos antimicrobianos incluindo mecanismos oxidativos e nitrosativos, os quais levam a geração de espécies reativas como ânions superóxido, radicais hidroxila e

peróxido de hidrogênio resultantes da incompleta redução de oxigênio durante o metabolismo respiratório (Gordon, 2003). A resistência a oxidantes é um fator determinante no curso da infecção por *C. neoformans* (Ma & May, 2009).

Os metabólitos reativos de oxigênio podem danificar macromoléculas biologicamente ativas como o DNA e proteínas e conseqüentemente induzir a expressão de proteínas de choque térmico (Papp *et al.*, 2003). *C. neoformans* expressou uma chaperona e duas proteínas hipotéticas com domínio *Htpg* relacionado à chaperonas da família Hsp90. As chaperonas são produzidas por células sob condições de estresse, promovendo dobramento, desdobramento de proteínas, degradação de proteínas instáveis e o transporte de proteínas no interior da célula. As proteínas de choque térmico são chaperonas conservadas entre microrganismos e agrupadas por sua massa molecular (Burnie *et al.*, 2006). A proteína de choque térmico Hsp78 é induzida em *Candida albicans* em resposta ao estresse oxidativo de macrófagos (Lorenz *et al.*, 2004). Algumas proteínas de choque térmico de *C. neoformans* foram descritas por serem induzidas durante processos de patogênese em modelos de infecção animal, como por exemplo, uma Hsp70 produzida durante criptococose pulmonar em camundongos (Kakeya *et al.*, 1997). Uma análise serial da expressão gênica de *C. neoformans* durante meningite experimental em coelhos revelou a indução de várias proteínas de choque térmico tais como Hsp12, Hsp60, Hsp70 e Hsp90 (Steen *et al.*, 2003). A identificação de transcritos codificantes para chaperonas em *C. neoformans* durante a fagocitose sugere uma proteção celular frente ao dano causado pelo estresse oxidativo presente no fagolisossomo.

A fagocitose induziu a expressão de uma MAP quinase em *C. gattii*. MAP quinases de fungos patogênicos controlam a adaptação ao estresse ambiental. Em *C. neoformans* três vias de sinalização de MAP quinases são descritas, cada uma

envolvendo as seguintes proteínas *Cpk1* (*Cryptococcus* proteína quinase), *Hog1* (alta osmolaridade do glicerol) e *Mpk1* (Kozubowski *et al.*, 2009). Após a fagocitose, a privação de nutrientes, a redução do pH e o estresse oxidativo são importantes mudanças enfrentadas pelos microrganismos no vacúolo fagocítico (Casadevall & Pirofski, 2001). Alguns estudos sugerem a participação da MAP quinase Hog nestes processos em *C. albicans* e *C. neoformans*. Em *C. albicans* mutantes nulos *HOG1* são mais sensíveis a oxidantes *in vitro* quando comparados às linhagens selvagens (Alonso-Monge *et al.*, 2003) e a células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos, sugerindo a participação deste gene na resposta ao estresse oxidativo (Aranana *et al.*, 2007). Em *C. neoformans*, a via de sinalização mediada por Hog1 modula a resposta a estresse ambiental, incluindo choque osmótico, altas temperaturas, irradiação UV e estresse oxidativo (Bahn *et al.*, 2005). Outra MAP quinase, a *Mpk1* de *C. neoformans* é requerida para o crescimento a 37 °C e é essencial para proteção contra estresse oxidativo e nitrosativo, integridade celular e expressão de fatores de virulência como síntese de cápsula e melanina (Kraus *et al.*, 2004; Gerik *et al.*, 2008).

Transcritos codificantes para trealose sintase foram expressos por *C. gattii* em resposta a fagocitose. A trealose é um dissacarídeo que atua como reserva de carboidratos e como protetor de membranas celulares contra a inativação e a desnaturação causada por uma variedade de condições de estresse, incluindo dissecação, desidratação, choque térmico e oxidação (Elbein *et al.*, 2003). Diversos fungos como *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. nidulans* e *C. neoformans* sintetizam trealose em resposta ao estresse oxidativo (Fillinger *et al.*, 2001; Alvarez-Peral *et al.*, 2002; Arguelles, 2002; Petzold *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a deleção dos genes trealose-6-fosfato-sintase 1 (*Tps1*) e trealose-6-fosfato-sintase 2 (*Tps2*) em *C. gattii* afeta a capacidade de proliferação da levedura em invertebrados e em mamíferos e que a rota

de síntese da trealose desempenha uma função central na virulência de *C. gattii* através de múltiplos mecanismos (Ngamskulrunroj *et al.*, 2009 b). Em *C. neoformans* a *Tps1* é requerida para crescimento a 37 °C e mutantes nulos para *TPS1* são avirulentos em modelos de criptococose experimental em camundongos e coelhos (Petzold *et al.*, 2006). A trealose sintase também é induzida em *C. neoformans* durante a meningite experimental em coelhos (Steen *et al.*, 2003). Mutantes de *C. albicans* deficientes de *Tps 2* apresentam uma maior sensibilidade à ação fagocítica, provavelmente por uma inadequada proteção contra o estresse oxidativo presente no fagolisossoma, decorrente da inabilidade de sintetizar trealose (Martinez-Esparza *et al.*, 2009).

No presente estudo, transcritos codificantes para a proteína Rds1 foram os mais redundantes nas bibliotecas de *C. neoformans* e *C. gattii* e tiveram sua expressão diferencial confirmada por ensaios de RT-PCR em tempo real. O gene Rds1 é induzido em resposta ao estresse provocado por altas temperaturas, sendo este fenômeno descrito em *Schizosaccharomyce pombe* e em *C. neoformans* (Ludin, *et al.*, 1995; Kraus *et al.*, 2004; Rosa e Silva *et al.*, 2008). Na técnica de RDA, os genes relacionados exclusivamente ao desenvolvimento a 37 °C foram excluídos, desta forma, nossos resultados sugerem uma nova função para o gene Rds1, o qual deve ser importante para o crescimento intracelular em macrófagos. Outras proteínas descritas em nosso estudo, como proteínas de choque térmico e trealose desempenham importante papel não somente no crescimento em temperaturas elevadas como no estresse oxidativo.

C. neoformans e *C. gattii* apresentaram diferenças no padrão transcricional durante o desenvolvimento intracelular de macrófagos, somente transcritos codificando Rds1 e desidrogenase ligadora de zinco foram identificados em ambas as bibliotecas. Rosa e Silva e colaboradores (2008) também identificaram um padrão de expressão diferencial de três genes regulados pela temperatura (transportador de cálcio,

diacilglicerol colinofosfotransferase e proteína precursora de glioxal oxidase) em *C. neoformans* var. *grubii* quando comparados a *C. neoformans* var. *neoformans* e a *C. gattii*. Da mesma forma, Steen e colaboradores (2002) encontraram diferenças entre o padrão transcricional de *C. neoformans* sorotipo A e sorotipo D, durante o desenvolvimento a 37 e 25 °C.

Análises filogenéticas sugerem que *C. gattii* diverge das outras duas variedades em cerca de 37 milhões de anos, e que a variedade *grubii* e a variedade *neoformans* divergem entre si em aproximadamente 19 milhões de anos (Xu *et al.*, 2002; Marra *et al.*, 2004). Esta separação genética deve apresentar uma relevância nos estudos da patogênese molecular da criptococose, bem como, explicar diferenças observadas entre as espécies em relação a alguns genes de virulência (Xu *et al.*, 2002). Por exemplo, o fator de transcrição *Ste12* é importante para a virulência de *C. neoformans* var. *neoformans*, mas não para a virulência de *C. neoformans* var. *grubii* (Chang *et al.*, 2001). Inversamente, a proteína quinase *Ste20* é essencial para a virulência de *Cryptococcus* sorotipo A, ao passo que, em linhagens sorotipo D, a deleção do gene *STE20*, não modifica a virulência (Wang *et al.*, 2002). Tendo em vista estas diferenças, análises de expressão gênica devem ser direcionadas para variedades e espécies específicas, a fim de se compreender melhor a patogênese da infecção causada por cada tipo de levedura.

Nosso estudo permitiu identificar novos genes expressos por *C. neoformans* e *C. gattii* durante o parasitismo intracelular. Elucidar os mecanismos desenvolvidos por estas leveduras para sobreviver no ambiente intracelular das células fagocíticas do hospedeiro é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e de tratamento da criptococose.

6. CONCLUSÕES

- A técnica de RDA permitiu identificar genes diferencialmente expressos por *C. neoformans* e *C. gattii* durante o desenvolvimento intracelular em macrófagos peritoneais de ratos.
- Em *C. neoformans* e *C. gattii* o processo de fagocitose induziu a expressão de genes principalmente relacionados ao tráfego vesicular e a resposta ao estresse.
- *C. neoformans* e *C. gattii* expressaram diferentes transcritos em resposta à fagocitose, e somente os genes que codificam para a proteína Rds1 e para a enzima desidrogenase ligadora de zinco foram induzidos em ambas espécies.

7. PERSPECTIVAS

- Construir mutantes nulos de *C. neoformans* e *C. gattii* para alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos durante a fagocitose.
- Comparar o desenvolvimento intracelular em macrófagos destes mutantes com as linhagens selvagens.
- Avaliar o potencial de virulências dos genes selecionados em ensaios de infecção experimental em camundongos.
- Analisar a participação dos genes diferencialmente expressos envolvidos em tráfego vesicular no processo de secreção de vesículas extracelulares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEGG MA, CELLA FL, FAGANELLO J, VALENTE P, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, 161:83-91, 2006.
- ALONSO-MONGE R, NAVARRO-GARCÍA F, ROMÁN E, NEGREDO AI, EISMAN B, NOMBELA C, PLA J. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2:351-61, 2003.
- ALVAREZ M., CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Current Biology*, 7:2161-5, 2006.
- ALVAREZ M, CASADEVALL A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunology*, 16:8- 16, 2007.
- ALVAREZ M, SAYLOR C, CASADEVALL A. Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. *Cellular Microbiology*, 10:1622-33, 2008.
- ALVAREZ M, BURN T, LUO Y, PIROFSKI LA, CASADEVALL A. The outcome of *Cryptococcus neoformans* intracellular pathogenesis in human monocytes. *BMC Microbiology*, 2009, *in press*.
- ALVAREZ-PERAL FJ, ZARAGOZA O, PEDRENO Y, ARGÜELLES JC. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology*, 148: 2599-606, 2002.

- ARANA DM, ALONSO-MONGE R, CALDERONE R, PLA J. Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cellular Microbiology*, 9:1647-59, 2007.
- ARGÜELLES JC. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology*, 174:217-24, 2000.
- BAEZA LC, BAILÃO AM, BORGES CL, PEREIRA M, SOARES CM, MENDES-GIANNINI M. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. *Microbes Infection*, 9:1415-21, 2007.
- BAHN YS, KOJIMA K, COX GM, HEITMAN J. Specialization of the HOG pathway and its impact on differentiation and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell*, 16:2285-300, 2005.
- BAILÃO AM, SCHRANK A, BORGES CL, DUTRA V, MOLINARI-MADLUM EE, FELIPE MS, MENDES-GIANNINI MJ, MARTINS WS, PEREIRA M, SOARES CMA. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes and Infection*, 8: 2686-97, 2006.
- BARBOSA FM, FONSECA FL, HOLANDINO C, ALVIANO CS, NIMRICHTER L, RODRIGUES ML. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes and Infection*, 8:493-502, 2006.
- BIZARRO CV, BENGTON MH, RICACHENEVSKY FK, ZAHA A, SOGAYAR MC, FERREIRA HB. Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 144: 114-118, 2005.

- BOEKHOUT T, THEELEN B, DIAZ M, FELL JW, HOP WC, ABELN EC, DROMER F, MEYER W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 147:891-907, 2001.
- BONIFACINO JS, GLICK BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116:153-66, 2004
- BOSE I, REESE AJ, ORY JJ, JANBON G, DOERING TL. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2:655-63, 2003.
- BOVERS M, HAGEN F, BOEKHOUT T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 25: 4-12, 2008.
- BOWLER LD. Representational difference analysis of cDNA. *Methods in Molecular Medicine*, 94:49-66, 2004.
- BROWN SM, CAMPBELL LT, LODGE JK. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Current Opinion in Microbiology*, 10:320-5, 2007.
- BURNIE JP, CARTER TL, HODGETTS SJ, MATTHEWS RC. Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiology Reviews*, 30:53-88, 2006.
- CASADEVALL A, PERFECT JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington: American Society for Microbiology Press, 1998.
- CASADEVALL A, PIROFSKI L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 184:337-44, 2001.
- CASADEVALL A, STEENBERGEN JN, NOSANCHUK JD. Ready made virulence and dual use virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology*, 6:332-7, 2003.

- CASADEVALL A, NOSANCHUK JD, WILLIAMSON P, RODRIGUES ML. Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends in Microbiology*, 17: 158–162, 2009.
- CASALI A K, GOULART LS, ROSA E SILVA LK, RIBEIRO AM, AMARAL AA, ALVES SH, SCHRANK A, MEYER W, VAINSTEN MH. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research*, 3: 405-415, 2003.
- CHANG YC, PENOYER LA, KWON-CHUNG KJ. The second STE12 homologue of *Cryptococcus neoformans* is MATa-specific and plays an important role in virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:3258-63, 2001.
- CHAYAKULKEEREE M, PERFECT JR. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 20:507-44, 2006.
- CHEEVER ML, KUTATELADZE TG, OVERDUIN M. Increased mobility in the membrane targeting PX domain induced by phosphatidylinositol 3-phosphate. *Protein Sciences*, 15:1873-82, 2006.
- CHOI JY, SIFRI CD, GOUMNEROV BC, RAHME LG, AUSUBEL FM, CALDERWOOD SB. Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *Journal Bacteriology*, 184: 952-961, 2002.
- COSTA M, BORGES CL, BAILÃO AM, MEIRELLES GV, MENDONÇA YA, DANTAS SF, DE FARIA FP, FELIPE MS, MOLINARI-MADLUM EE, MENDES-GIANNINI MJ, FIUZA RB, MARTINS WS, PEREIRA M, SOARES CM. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology*, 153:4194-207, 2007.

- COX GM, MUKHERJEE J, COLE GT, CASADEVALL A, PERFECT JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 68: 443-448, 2000.
- COX GM, MCDADE HC, CHEN SC, TUCKER SC, GOTTFREDSSON M, WRIGHT LC, SORRELL TC, LEIDICH SD, CASADEVALL A, GHANNOUM MA, PERFECT JR. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 39:166-75, 2001.
- COX GM, HARRISON TS, MCDADE HC, TABORDA CP, HEINRICH G, CASADEVALL A, PERFECT JR. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infection and Immunity*, 71:173-80, 2003.
- DE BACKER MD, VAN DIJCK P. Progress in functional genomics approaches to antifungal drug target discovery. *Trends in Microbiology*, 11:470-8, 2003.
- DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 3: 1067-75, 2004.
- DE JESUS M, NICOLA AM, RODRIGUES ML, JANBON G, CASADEVALL A. Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. *Eukaryotic Cell*, 8: 96-103, 2009.
- DESJARDINS M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nature Reviews Immunology*, 3:280-91, 2003.
- DIXIT A, CARROLL SF, QURESHI ST. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009:840452, 2009, *in press*.

- DUDEN R, HOSOBUCHI M, HAMAMOTO S, WINEY M, BYERS B, SCHEKMAN R. Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *Journal of Biological Chemistry*, 269:24486-95, 1994.
- DUTRA V, NAKAZATO L, BROETTO L, SCHRANK I S, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. *Research in Microbiology*, 155: 245-251, 2004.
- ELBEIN AD, PAN YT, PASTUSZAK I, CARROLL D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13:17R-27R, 2003.
- EISENMAN, H.C., FRASES, S., NICOLA, A.M., RODRIGUES, M.L., CASADEVALL. A. Vesicle associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, in press, doi:10.1099/mic.0.032854-0.
- FAN W, KRAUS PR, BOILY MJ, HEITMAN J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryotic Cell*, 4:1420-33, 2005.
- FELDMESSER M., KRESS Y, NOVIKOFF P, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and Immunity*, 68: 4225-37, 2000.
- FELDMESSER M, TUCKER S, CASADEVALL A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, 9: 273-8, 2001.
- FILLINGER S, CHAVEROCHE MK, VAN DIJCK P, VRIES R, RUIJTER G, THEVELEIN J, D'ENFERT C. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 147:1851-62, 2001.

- FRIDOVICH I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64:97-112, 1995.
- FRIEDMAN GD, JEFFREY-FESSEL W, UDALTSOVA NV, HURLEY LB. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses*, 48:122-5, 2005.
- GARCIA-HERMOSO D, JANBON G, DROMER F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal Clinical Microbiology*, 37:3204-9, 1999.
- GERIK KJ, BHIMIREDDY SR, RYERSE JS, SPECHT CA, LODGE JK. PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative stresses, cell integrity, and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 7:1685-98, 2008.
- GOLDMAN DL, LEE SC, MEDNICK AJ, MONTELLA L, CASADEVALL A. Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infection and Immunity*, 68:832-8, 2000.
- GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages. *Nature*, 3:23-35, 2003.
- GORDON S, TAYLOR PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5:953-64, 2005.
- GORDON S. The macrophage: past, present and future. *European Journal of Immunology*, 1:9-17, 2007.
- HE W, CASADEVALL A, LEE SC, GOLDMAN DL. Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis. *Infection and Immunology*, 71:930-6, 2003.

- HOLLESTELLE A, SCHUTTE M. Representational difference analysis as a tool in the search for new tumor suppressor genes. *Methods in Molecular Medicine*, 103:143-159, 2005.
- HORTA JA, STAATS CC, CASALI AK, RIBEIRO AM, SCHRANK IS, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian State Rio Grande do Sul. *Medical Mycology*, 40:1-7, 2002.
- HUBANK M, SCHATZ DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research*, 22:5640-8, 1994.
- HULL CM, HEITMAN J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Genetics*, 36:557-615, 2002.
- IDNURM A, BAHN YS, NIELSEN K, LIN X., FRASER JA, HEITMAN J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, 3:753-64, 2005.
- JANBON G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Research*, 4:765-71, 2004.
- JUDICE CC, CARAZZOLE MF, FESTA F, SOGAYAR MC, HARTFELDER K, PEREIRA GA. Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insect Molecular Biology*, 15:33-44, 2006.
- KAKEYA H, UDONO H, IKUNO N, YAMAMOTO Y, MITSUTAKE K, MIYAZAKI T, TOMONO K, KOGA H, TASHIRO T, NAKAYAMA E, KOHNO S. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 65:1653-8, 1997.

- KARKOWSKA-KULETA J, RAPALA-KOZIK M, KOZIK A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56:211-24, 2009.
- KIDD SE, HAGEN F, TSCHARKE RL, HUYNH M, BARTLETT KH, FYFE M, MACDOUGALL L, BOEKHOUT T, KWON-CHUNG KJ, MEYER W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:17258-63, 2004
- KINGSBURY JM, YANG Z, GANOUS TM, COX GM, MCCUSKER JH. Novel chimeric spermidine synthase-saccharopine dehydrogenase gene (SPE3-LYS9) in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 3:752-763, 2004a.
- KINGSBURY JM, YANG Z, GANOUS TM, COX GM, MCCUSKER JH. *Cryptococcus neoformans* Ilv2p confers resistance to sulfometuron methyl and is required for survival at 37 degrees C and in vivo. *Microbiology*, 150:1547-1558, 2004b.
- KIRCHHAUSEN T. Clathrin. *Annual Review of Biochemistry*, 69:699-727, 2000.
- KOZEL TR. Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Archives of Medical Research*, 24:211-8, 1993.
- KOZUBOWSKI L, LEE SC, HEITMAN J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cellular Microbiology*, 11:370-80, 2009.
- KRAUS PR, BOILY M, GILES SS, STAJICH JE, ALLEN A, COX GM, FRED SD, PERFECT JR, HEITMAN J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a Genomic-DNA microarray. *Eucaryotic Cell*, 3: 1249-1260, 2004.
- Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 60:602-5, 1992.

- Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, Vainstein MH. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*, 166:71-5, 2008.
- LEE SC, SHAW BD. Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 283:216-22, 2008.
- LEVITZ SM, NONG SH, SEETOO KF, HARRISON TS, SPEIZER RA, SIMONS ER. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infection and Immunity*, 67:885-90, 1999.
- LEVITZ SM. *Cryptococcus neoformans*: intracellular or extracellular? *Trends in Microbiology*, 9:417-8, 2001.
- LIAN T, SIMMER MI, D'SOUZA CA, STEEN BR, ZUYDERDUYN SD, JONES SJ, MARRA MA, KRONSTAD JW. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 5:1452-72, 2005.
- LIN X, HULL CM, HEITMAN J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, 434:1017-21, 2005.
- LIN X, HEITMAN J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annual Review of Microbiology*, 60:69-105, 2006.
- LIN X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infection Genetics and Evolution*, 9:401-16, 2009.
- LING JQ, KOJIMA T, SHIRAIWA M, TAKAHARA H. Cloning of two cysteine proteinase genes, CysP1 and CysP2, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1627: 129-139, 2003.

- LISITSYN N, LISITSYN N, WIGLER M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259: 946-951, 1993.
- LITVINTSEVA AP, THAKUR R, VILGALYS R, MITCHELL TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*, 172:2223-38, 2006.
- LIU L, TEWARI RP, WILLIAMSON PR. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 67:6034-9, 1999.
- LIU OW, CHUN CD, CHOW ED, CHEN C, MADHANI HD, NOBLE SM. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell*, 135:174-88, 2008.
- LOFTUS BJ, FUNG E, RONCAGLIA P, ROWLEY D, AMEDEO P, BRUNO D, VAMATHEVAN J, MIRANDA M, ANDERSON IJ, FRASER JA, ALLEN JE, BOSDET IE, BRENT MR, CHIU R, DOERING TL, DONLIN MJ, D'SOUZA CA, FOX DS, GRINBERG V, FU J, FUKUSHIMA M, HAAS BJ, HUANG JC, JANBON G, JONES SJ, KOO HL, KRZYWINSKI MI, KWON-CHUNG JK, LENGELER KB, MAITI R, MARRA MA, MARRA RE, MATHEWSON CA, MITCHELL TG, PERTEA M, RIGGS FR, SALZBERG SL, SCHEIN JE, SHVARTSBEYN A, SHIN H, SHUMWAY M, SPECHT CA, SUH BB, TENNEY A, UTTERBACK TR, WICKES BL, WORTMAN JR, WYE NH, KRONSTAD JW, LODGE JK, HEITMAN J, DAVIS RW, FRASER CM, HYMAN RW. The genome of the basidiomycetous yeast human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307: 1321-1324, 2005.
- LORENZ MC, BENDER JA, FINK GR. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell*, 3:1076-87, 2004.
- LUBERTO C, TOFFALETTI DL, WILLS EA, TUCKER SC, CASADEVALL A, PERFECT JR, HANNUN YA, DEL POETA M. Roles for inositol-phosphoryl

- ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *C. neoformans*. *Genes & Development*, 15:201-12, 2001.
- LUBERTO C, MARTINEZ-MARIÑO B, TARASKIEWICZ D, BOLAÑOS B, CHITANO P, TOFFALETTI DL, COX GM, PERFECT JR, HANNUN YA, BALISH E, DEL POETA M. Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Investigation*, 112:1080-94, 2003.
- LUDIN KM, HILTI N, SCHWEINGRUBER ME. *Schizosaccharomyces pombe* Rds1, an adenine-repressible gene regulated by glucose, ammonium, phosphate, carbon dioxide and temperature. *Molecular and General Genetics*, 30:439-45, 1995.
- LUO Y, ALVAREZ M, XIA L, CASADEVALL A. The outcome of phagocytic cell division with infectious cargo depends on single phagosome formation. *PLoS One*, 16:e3219, 2008.
- LYNCH M, KURAMITSU H. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 2:1245-55, 2000.
- MA H, CROUDACE JE, LAMMAS DA, MAY RC. Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast. *BMC Immunology*, 16:8-15, 2007.
- MA H, MAY RC. Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology*, 67:131-90, 2009.
- MA H, HAGEN F, STEKEL DJ, JOHNSTON SA, SIONOV E, FALK R, POLACHEK I, BOEKHOUT T, MAY RC. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 4: 12980-5, 2009.
- MACURA N, ZHANG T, CASADEVALL A. Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration. *Infection and Immunity*, 75:1904-15, 2007.

- MALDONADO-BÁEZ L, WENDLAND B. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends in Cell Biology*, 16:505-13, 2006.
- MARRA RE, HUANG JC, FUNG E, NIELSEN K, HEITMAN J, VILGALYS R, MITCHELL TG. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety neoformans serotype D (*Filobasidiella neoformans*). *Genetics*, 167:619-31, 2004.
- MARTÍNEZ-ESPARZA M, MARTÍNEZ-VICENTE E, GONZÁLEZ-PÁRRAGA P, ROS JM, GARCÍA-PEÑARRUBIA P, ARGÜELLES JC. Role of trehalose-6P phosphatase (TPS2) in stress tolerance and resistance to macrophage killing in *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2009, *in press*.
- MEYER W, MARSZEWSKA K, AMIRMOSTOFIAN M, IGREJA RP, HARDTKE C, METHLING K, VIVIANI MA, CHINDAMPORN A, SUKROONGREUNG S, JOHN MA, ELLIS DH, SORRELL TC. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, 20:1790-9, 1999.
- MONARI C, PERICOLINI E, BISTONI G, CASADEVALL A, KOZEL TR, VECCHIARELLI A. *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. *The Journal of Immunology*, 174:3461-8, 2005.
- MORETTI ML, RESENDE MR, LAZÉRA MS, COLOMBO AL, SHIKANAI-YASUDA MA. Guidelines in cryptococcosis - 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41:524-44, 2008.
- MUKHERJEE J, KOZEL TR, CASADEVALL A. Monoclonal antibodies reveal additional epitopes of serotype D *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan that elicit protective antibodies. *The Journal of Immunology*, 161:3557-68, 1998.

- NGAMSKULRUNGROJ P, GILGADO F, FAGANELLO J, LITVINTSEVA AP, LEAL AL, TSUI KM, MITCHELL TG, VAINSTEIN MH, MEYER W. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. PLoS One, 10:e5862, 2009 a.
- NGAMSKULRUNGROJ P, HIMMELREICH U, BREGER JA, WILSON C, CHAYAKULKEEREE M, KROCKENBERGER MB, MALIK R, DANIEL HM, TOFFALETTI D, DJORDJEVIC JT, MYLONAKIS E, MEYER W, PERFECT JR. The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. Infect Immun, 77:4584-96, 2009 b.
- NIELSEN, K.; COX, G. M.; WANG, P.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. Infection and Immunity, 71: 4831-4841, 2003.
- NIELSEN K, COX GM, LITVINTSEVA AP, MYLONAKIS E, MALLIARIS SD, BENJAMIN DK JR, GILES SS, MITCHELL TG, CASADEVALL A, PERFECT JR, HEITMAN J. *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. Infection and Immunity, 73:4922-33, 2005.
- NOSANCHUK JD, NIMRICHTER L, CASADEVALL A, RODRIGUES ML. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. Communicative and Integrative Biology, 1:37-39, 2008.
- NOVICK P, OSMOND BC, BOTSTEIN D. Suppressors of yeast actin mutations. Genetics, 121:659-74, 1989.
- ODOM A, MUIR S, LIM E, TOFFALETTI DL, PERFECT JR, HEITMAN J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. EMBO Journal, 16: 2576-89, 1997.

- ODORIZZI G, BABST M, EMR SD. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 25:229-35, 2000.
- OLIVEIRA DL, NIMRICHTER L, MIRANDA K, FRASES S, FAULL KF, CASADEVALL A, RODRIGUES ML. *Cryptococcus neoformans* cryoultramicrotomy and vesicle fractionation reveals an intimate association between membrane lipids and glucuronoxylomannan. *Fungal Genetics and Biology*, 46: 956-63, 2009.
- PANEPINTO J, KOMPERDA K, FRASES S, PARK YD, DJORDJEVIC JT, CASADEVALL A, WILLIAMSON PR. Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 71: 1165–1176, 2009.
- PAPP E, NARDAI G, SÖTI C, CSERMELY P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors*, 17:249-57, 2003.
- PEDREÑO Y, GIMENO-ALCAÑIZ JV, MATAALLANA E, ARGÜELLES JC. Response to oxidative stress caused by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in trehalase genes. *Archives of Microbiology*, 177:494-9, 2002.
- PETZOLD EW, HIMMELREICH U, MYLONAKIS E, RUDE T, TOFFALETTI D, COX GM, MILLER JL, PERFECT JR. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immun*, 74: 5877-87, 2006.
- PRADO M, DA SILVA MB, LAURENTI R, TRAVASSOS LR, TABORDA CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104:513-21, 2009.
- RODRIGUES ML, NAKAYASU ES, OLIVEIRA DL, NIMRICHTER L, NOSANCHUK JD, ALMEIDA IC, CASADEVALL A. Extracellular vesicles

- produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*. 2008 Jan;7(1):58-67.
- RODRIGUES ML, NIMRICHTER L, OLIVEIRA DL, FRASES S, MIRANDA K, ZARAGOZA O, ALVAREZ M, NAKOUZI A, FELDMESSER M, CASADEVALL A. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell*, 6:48-59, 2007.
- ROSA E SILVA, L.K., STAATS, C.C., GOULART, L.S., MORELLO, L.G., PELEGRINELLI FUNGARO, M.H., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Research in Microbiology*, 159:221-9, 2008.
- SALAS, S. D.; BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; WILLIAMSON, P. R. Effect of the laccase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Experimental Medicine*, 184: 377-386, 1996.
- SANTANGELO R, ZOELLNER H, SORRELL T, WILSON C, DONALD C, DJORDJEVIC J, SHOUNAN Y, WRIGHT L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infection and Immunity*, 72:2229-39, 2004.
- SANTANGELO R, ZOELLNER H, SORRELL T, WILSON C, DONALD C, DJORDJEVIC J, SHOUNAN Y, WRIGHT L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infection and Immunity*, 72:2229-39, 2004.
- SCHEKMAN R, ORCI L. Coat proteins and vesicle budding. *Science*, 271:1526-33, 1996.

- SCHOP J. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. McGill Journal of Medicine, 10:35-43, 2007.
- SHEA JM, KECHICHIAN TB, LUBERTO C, DEL POETA M. The cryptococcal enzyme inositol phosphosphingolipid-phospholipase C confers resistance to the antifungal effects of macrophages and promotes fungal dissemination to the central nervous system. Infection and Immunity. 74:5977-88, 2006.
- SORRELL TC. *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. Medical Mycology, 39: 155-168, 2001.
- SPANG A. ARF1 regulatory factors and COPI vesicle formation. Current Opinion in Cell Biology, 14:423-7, 2002.
- STAMNES MA, ROTHMAN JE. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. Cell, 73:999-1005, 1993.
- STEARNS T, KAHN RA, BOTSTEIN D, HOYT MA. ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. Molecular Cell Biology, 10:6690-9, 1990.
- STEEN BR, LIAN T, ZUYDERDUYN S, MACDONALD WK, MARRA M, JONES SJ, KRONSTAD JW. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Genome Research, 12:1386-400, 2002.
- STEEN BR, ZUYDERDUYN S, TOFFALETTI DL, MARRA M, JONES SJ, PERFECT JR, KRONSTAD J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. Eukaryotic Cell, 2:1336-49, 2003.
- STEENBERGEN JN, SHUMAN HA, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggests an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98:15245-50, 2001.

- STEENBERGEN JN, NOSANCHUK JD, MALLIARIS SD, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infection and Immunity*, 71:4862-72, 2003.
- STEENBERGEN JN, CASADEVALL A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and Infection*, 5:667-675, 2003.
- STIE J, BRUNI G, FOX D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus*. *PLoS One*, 4:e5780, 2009 *in press*.
- STUART LM, EZEKOWITZ RA. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 22:539-50, 2005.
- TUCKER SC, CASADEVALL A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5:3165-70, 2002.
- UICKER WC, DOYLE HA, MCCRACKEN JP, LANGLOIS M, BUCHANAN KL. Cytokine and chemokine expression in the central nervous system associated with protective cell-mediated immunity against *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, 43:27-38, 2005.
- VILLENA SN, PINHEIRO RO, PINHEIRO CS, NUNES MP, TAKIYA CM, DOSREIS GA, PREVIATO JO, MENDONÇA-PREVIATO L, FREIRE-DE-LIMA CG. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Molecular Cell Biology*, 6:1274-85, 2008.

- WANG P, NICHOLS CB, LENGELER KB, CARDENAS ME, COX GM, PERFECT JR, HEITMAN J. Mating-type-specific and nonspecific PAK kinases play shared and divergent roles in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 1:257-72, 2002.
- WUESTEHUBE LJ, DUDEN R, EUN A, HAMAMOTO S, KORN P, RAM R, SCHEKMAN R. New mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affected in the transport of proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Genetics*, 142:393-406, 1996.
- XU J, LUO G, VILGALYS RJ, BRANDT ME, MITCHELL TG. Multiple origins of hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. *Microbiology*, 148:203-12, 2002.
- YONEDA A, DOERING TL. A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Mol Biol Cell*, 17:5131-40, 2006.
- ZARAGOZA O, FRIES BC, CASADEVALL A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infection and Immunity*, 71:6155-64, 2003.
- ZARAGOZA O, RODRIGUES ML, DE JESUS M, FRASES S, DADACHOVA E, CASADEVALL A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, 68:133-216, 2009.
- ZHU X, WILLIAMSON PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research*, 5: 1-10, 2004.