

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

Caracterização de mutantes de *Cryptococcus gattii*
associados à formação de biofilme

Dissertação de Mestrado

GABRIELA ZOTTIS CHITOLINA

Porto Alegre, março 2019.

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

Caracterização de mutantes de *Cryptococcus gattii*
associados à formação de biofilme

Dissertação de Mestrado

GABRIELA ZOTTIS CHITOLINA

Dissertação 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 Mestre.

Prof^a Dr^a Marilene Henning Vainstein
Orientadora

Porto Alegre, março 2019

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Marilene Henning Vainstein que me concedeu a oportunidade de fazer parte da sua equipe de laboratório. Agradeço pela confiança, pelo carinho, ensinamentos e por ter acreditado e me incentivado a continuar.

Ao Professores Augusto Schrank e a Professora Livia Kmetzsch pela atenção e disponibilidade sempre que precisei.

Aos professores Alexandre Macedo e Charley Staats, membros da comissão de acompanhamento.

Ao colega William Lopes que foi essencial para o desenvolvimento do projeto. A Cristine Goebel que me ajudou muito na fase inicial.

A todos colegas do laboratório 220 e 217 que me receberam, me ajudaram e de alguma forma contribuíram com o trabalho. Em especial Vanessa, Rafael, Eduarda Laura, Ane, Camila, Barbara, Herik e Glaci.

Agradeço a toda equipe de trabalho do Centro de Diagnóstico e Pesquisa de Patologia Aviária (CDPA) que me apoiou durante toda essa trajetória. Em especial Daiane Carvalho, Brunna Qadir, Daiane Wilsmann, Karine Pontin, Vivian Luca, Thales Furian e Karen Furian.

Os professores Tadeu Pippe Sale, Hamilton Moraes e Vladimir Pinheiro do Nascimento que permitiram os meus horários especiais na execução das minhas atividades.

Agradecimento aos meus pais Neuza Maria Zottis Chitolina e Valcir Chitolina que sempre me apoiaram e me acompanharam, mesmo à distância, sempre se fizeram presentes.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 O gênero <i>Cryptococcus</i>	11
1.2 Criptococose e processo de infecção	13
1.3 Mecanismos de Virulência	15
1.3.1 Desenvolvimento a 37 °C.....	15
1.3.2 Enzimas e melanina	16
1.3.3 Cápsula	18
1.3.4 Biofilme.....	20
2. OBJETIVO GERAL.....	24
2.1 Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Biblioteca de mutantes	25
3.2 <i>Screening</i> da biblioteca de mutantes	25
3.3 Caracterização Fenotípica	26
3.3.1 Melanização.....	26
3.3.2 Cápsula	26
3.3.3 Urease.....	27
3.3.4 Quantificação de GXM.....	27
3.3.5 Ensaio de fagocitose em macrófagos <i>in vitro</i>	27
3.3.6 Virulência em <i>Galleria mellonella</i>	28
3.4 Análise genotípica dos mutantes de <i>C. gattii</i>	28
3.5 Análise filogenética	29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Screening de mutantes formadores de biofilme.....	30
4.2 Identificação de alterações na cápsula polissacarídica	33
4.3 Melanização e atividade de urease.....	35
4.4 Diminuição nos níveis de fagocitose nos mutantes	36
4.5 Atenuação na virulência em modelo de estudo <i>Galleria melonella</i>	38
5. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICE.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES.

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AmB	Anfotericina B
ATMT	Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , do inglês <i>Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EPS	Matriz exopolimérica
FLC	Fluconazol
GalGXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IRI	Índice de replicação intrafagossômica
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
MM	Meio Mínimo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
PMA	Acetato de miristato de forbol
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut</i> (meio de cultivo)
SNC	Sistema Nervoso Central
T-DNA	DNA de transferência
UV	Ultravioleta
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: EVOLUÇÃO DO COMPLEXO DE ESPÉCIES <i>Cryptococcus neoformans</i>.	12
FIGURA 2: PROCESSO DE DISSEMINAÇÃO DE <i>Cryptococcus neoformans</i>.	14
FIGURA 3: DIAGRAMA REPRESENTANDO A CÁPSULA POLISSACARÍDICA.	18
FIGURA 4: ESQUEMA DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>C. neoformans</i> B3501.	21
FIGURA 5: FLUXOGRAMA GERAL DOS EXPERIMENTOS E REPRESENTAÇÃO DO SCREENING NA BIBLIOTECADA MUTANTES DE <i>C. gattii</i> R265 PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME..	30
FIGURA 6: ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME NOS MUTANTES SELECIONADOS.	32
FIGURA 8 ANÁLISE FENOTÍPICA DOS MUTANTES	36
FIGURA 9: SUSCETIBILIDADE DAS LINHAGENS MUTANTES DE <i>C. gattii</i> À FAGOCITOSE E A SOBREVIVÊNCIA NO MACRÓFAGO.	37
FIGURA 10: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA EM <i>Galleria mellonella</i>.	39
Figura 11: ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>Arf2</i> EM DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGO.	44
Figura 12: ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>Gtr1</i>.	45

RESUMO

Cryptococcus spp é o agente etiológico da meningite criptocócica e uma de suas características é a capacidade de formar biofilme. Esse mecanismo de virulência confere ao microrganismo uma maior resistência aos fármacos e às defesas do sistema imune. A formação de biofilme facilita a adesão em superfícies, como em cateteres de derivação ventrículo-atrial ou ventrículo-peritoneais usados para controlar a hipertensão intracraniana associada à meningoencefalite criptocócica. As etapas envolvidas na formação de biofilme microbiano são controladas por redes regulatórias complexas que coordenam a expressão de múltiplos genes. Contudo, os mecanismos de regulação gênica na formação do biofilme por *Cryptococcus* spp. não estão totalmente elucidados. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar genes que atuam na regulação da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii* a partir da triagem de uma biblioteca de 8.000 mutantes haploides ATMT da linhagem R265. A identificação da região de inserção de T-DNA foi realizada em dois mutantes. As análises indicaram que um dos genes inativados codifica um fator de ribosilação de ADP (ARF). A outra inserção foi identificada próxima ao gene que codifica a proteína GTR1. A ARF1 está envolvida com a regulação de vesículas no complexo de Golgi. Sugere-se a hipótese de um possível envolvimento da ARF1 na alteração da atividade vesicular que influenciaria na formação de biofilme. Por sua vez, GTR1 já foi descrito em *C. albicans* como regulador do fator de transcrição SPF1, o qual exerce uma regulação negativa na formação de biofilme. Os resultados do estudo sugerem que atividade das GTPases possa influenciar no fenótipo para formação de biofilme em *C. gattii*.

ABSTRACT

Cryptococcus spp. is the etiological agent of cryptococcal meningitis and it has the ability to form biofilm. This mechanism of virulence confers on the microorganism a greater resistance to drugs and immune system. Biofilm formation facilitates adhesion to surfaces, such as ventricular-atrial and ventriculo-peritoneal shunts used to control intracranial hypertension associated with cryptococcal meningoencephalitis. The steps involved in microbial biofilm formation are controlled by complex networks that regulate the expression of multiple genes. However, the mechanisms of genetic regulation involved in the biofilm formation are still not elucidate for *Cryptococcus* spp. The aim of the study was to identify genes involved in the regulation of biofilm formation of *Cryptococcus gattii* through the screening of a library with 8000 haploid mutants ATMT of the strain R265. Identification of the T-DNA insertion region was performed on two mutants. The results indicated that one of the inactive genes encodes a ribosylation factor- ADP (ARF). The other insert was identified next to the gene encoding the GTR1 protein. ARF1 is involved in the regulation of vesicles of the Golgi complex. We suggest the hypothesis of a possible involvement of ARF1 in the alteration of vesicular activity that would influence biofilm formation. GTR1 has already been described in *C. albicans* as a regulator of the transcription factor SPF1, which exerts a negative regulation on biofilm formation. The results suggest that the activity of GTPases may influence the phenotype for biofilm formation in *C. gattii*.

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica que tem como principais agentes etiológicos *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, esses patógenos tem como característica infectar tanto indivíduos imunocompetentes como imonocomprometidos respectivamente. A infecção ocorre através da inalação de partículas fúngicas, que podem atingir o pulmão, causando quadros clínicos respiratórios, ou evoluir para uma meningoencefalite fatal. (Dutra, 2017) Estima-se que ocorram anualmente 220.000 casos de meningite criptocócica no mundo. Cerca de 73% dos indivíduos acometidos estão na África subsaariana, seguido da Ásia e do Pacífico, os quais apresentam incidência de 19% da doença. A criptococose é considerada a segunda causa mais comum de mortalidade em pacientes com AIDS, atrás apenas da tuberculose (Rajasingham, 2017).

A ampla distribuição do *Cryptococcus gattii* no ambiente, em ameabas de vida livre, nematódeos do solo e árvores condicionam uma pressão seletiva para o desenvolvimento de estratégias de virulência (Camacho e Casadevall, 2018).

A formação de biofilme é um importante mecanismo de persistência, facilitando o crescimento em tecidos vivos e em uma variedade de superfícies abióticas, as quais são utilizadas em dispositivos médicos, conferindo resistência aos mecanismos imunes do hospedeiro e a terapia antimicrobiana (Martinez, 2015). A capacidade de *Cryptococcus* spp. aderir em dispositivos médicos como cateteres de derivação ventrículo-atrial, derivações ventrículo-peritoneais, usados para controlar a hipertensão intracraniana associada à meningoencefalite criptocócica, destaca a importância de se investigar as propriedades para a formação de biofilme desse organismo (Martinez e Casadevall, 2007).

Nos últimos anos a genômica funcional em fungos tem avançado. O desenvolvimento de vários sistemas de transformação, técnicas de mutagênese aleatória e mutação genética direcionadas foram adaptadas e desenvolvidas como ferramentas eficientes para investigar a função dos genes em fungos (Weld, Plummer, Carpenter, & Ridgway, 2006).

A agro-transformação é uma ferramenta muito utilizada para atribuição de função gênica em fungos, devido a capacidade da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* em transferir o T-DNA presente em um plasmídeo binário para células de levedura

(BUNDOCK ET AL., 1995). A criação de uma biblioteca de inserção permite relacionar alterações fenotípicas dos isolados transformados com a inativação do gene através do rompimento genético causado pelo DNA transferido. As sequências flanqueadoras do T-DNA são recuperadas por métodos de PCR inverso e então sequenciadas para determinação do gene inativado (Weld, 2006).

A formação de biofilme é controlada por redes regulatórias complexas que coordenam a expressão de múltiplos genes. Contudo para *Cryptococcus* spp. ainda há poucos estudos elucidando estes mecanismos de regulação na formação de biofilme (Lohse *et al.*, 2017).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar genes que atuam na regulação da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii*, a partir de uma biblioteca de mutantes haploides *ATMT* de R265.

1.1 O gênero *Cryptococcus*

Cryptococcus spp. é um fungo pertencente ao filo Basidiomycota. O gênero é representado por duas principais espécies: *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, que são os agentes etiológicos da criptococose. Essas espécies divergiram a aproximadamente 50 milhões de anos (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2017).

A levedura foi descrita pela primeira vez em 1894 na Itália por Sanfelice, que isolou a partir de suco de pêssago e nomeou como *Saccharomyces neoformans*. No mesmo ano o patologista Busse e o médico Abraham Buschke isolaram uma cultura de levedura de uma lesão na tíbia em uma mulher e nomearam o fungo como *Saccharomyces*. Mais tarde em 1901, Curtis isolou de um tumor no quadril de um paciente, e baseado nas diferenças das culturas descritas por Sanfelice e Busse, descreveu o fungo como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* que foi depois classificado como o primeiro isolado clínico de *C. gattii* (Srikanta *et al.*, 2014; May *et al.*, 2016).

Em meados do século XX, a partir de observações na parede celular e cápsula, as leveduras foram classificadas pela reação de aglutinação com anti-soro de coelho em quatro sorotipos: A, B, C, e D com base nas variações estruturais nos polissacarídeos da cápsula (Srikanta *et al.*, 2014). Durante várias décadas *C. neoformans* e *C. gattii* foram

agrupados como sendo duas variedades (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Com o advento do PCR e sequenciamento de DNA, juntamente com análises ecológicas e epidemiológicas, a classificação foi modificada. Atualmente o complexo de espécies *C. neoformans* está dividido em duas espécies: *C. neoformans* que abrange variedade *grubii* (sorotipo A), var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (Kwon-Chung e Varma, 2006; Kwon-Chung *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2015). Abordagens moleculares como PCR *fingerprinting*, e análise de polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP), separaram as duas espécies em tipos moleculares (Meyer *et al.*, 1999; Meyer, 2015).

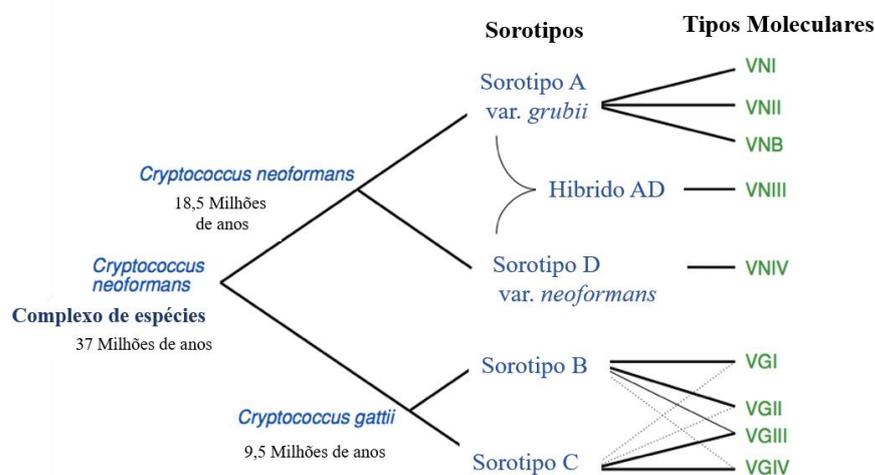


Figura 1: Evolução do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*. O complexo de espécies *Cryptococcus* contém duas subespécies, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que divergiram do ancestral comum ~ 37 e ~ 18,5 milhões de anos, respectivamente. Eles são divididos em quatro sorotipos consistindo em pelo menos nove tipos moleculares. Linhas sólidas, finas e tracejadas indicam a prevalência do respectivo sorotipo em cada tipo molecular. Adaptado de (Lin e Heitman, 2006).

Alguns autores questionaram o conceito atual de duas espécies no complexo de espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. Uma nova taxonomia foi proposta para as espécies patogênicas de *Cryptococcus* spp., e de acordo com a nova classificação baseada em diferentes padrões genéticos e moleculares, sete novas espécies foram sugeridas. No

entanto, a taxonomia molecular ainda precisa de uma correlação clínica mais precisa (Hagen *et al.*, 2015; Maziarz e Perfect, 2016).

A diferenciação do tipo molecular é de importância principalmente clínica e epidemiológica, tendo em vista que foram associados aos tipos moleculares VGI e VGII os casos de infecção em indivíduos hígidos, com surtos no noroeste do Pacífico norte-americano, no norte da Austrália e no centro da província de Papua Nova Guiné. Já os tipos moleculares VGIII e VGIV, aparentemente mais similares a espécie *C. neoformans*, acometem mais frequentemente indivíduos imunocomprometidos, incluindo aqueles com HIV/AIDS, documentados na África e nos Estados Unidos (Lin e Heitman, 2006; Byrnes *et al.*, 2011).

1.2 Criptococose e processo de infecção

Após a inalação, as partículas infecciosas de *Cryptococcus* spp. são confrontadas pelo sistema imune do hospedeiro. O pulmão contém uma mistura de fosfolípidios e glicoproteínas (sistema surfactante) que além de manter a tensão superficial durante a respiração também tem propriedades antimicrobianas. Um dos principais mecanismos de defesa do pulmão são os macrófagos que fagocitam e removem partículas exógenas e microrganismos (Esher *et al.*, 2018). Na resposta imune as células de levedura quando em contato com os macrófagos alveolares podem ser fagocitadas, os macrófagos alveolares ativados recrutam outras células imunes por meio de citocinas e quimiocinas que promovem uma resposta imune Th1 e provocam inflamação granulomatosa. *Cryptococcus* spp. diferentemente de outros patógenos se multiplica no interior dos macrófagos, e essa característica está associada com sua virulência (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

Na evolução da infecção pulmonar para meningoencefalite a levedura atravessa a barreira hematoencefálica e evidências sugerem que este processo pode ocorrer de duas formas: pela captação direta das células fúngicas pelas células endoteliais e transmigração através do citoplasma, ou por uma estratégia denominada “cavalo de Tróia” que envolve a migração de células fagocíticas contendo *Cryptococcus* spp. através da BHE. Em *C. gattii* a habilidade

e da célula residir e escapar de macrófagos está relacionada a altas taxas de proliferação intracelular em macrófagos caracterizando uma maior virulência (Kronstad *et al.*, 2011a; Sorrell *et al.*, 2016).

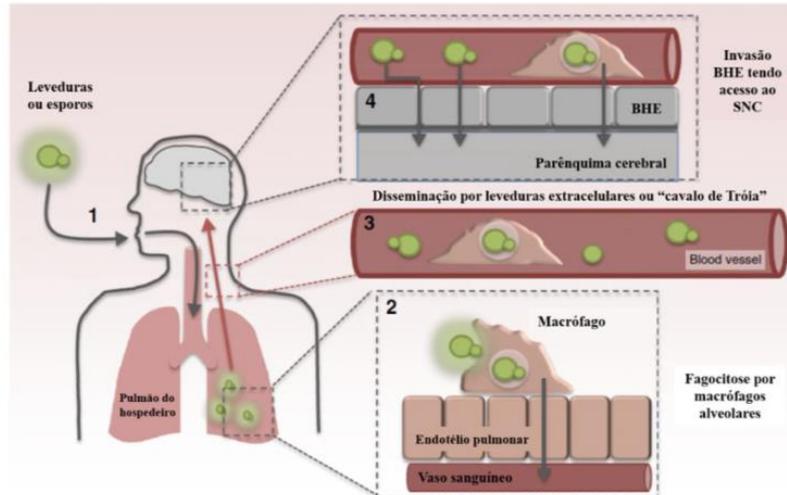


Figura 2: Processo de disseminação de *Cryptococcus neoformans*. 1) Esporos ou leveduras dessecadas são inalados e atingem os pulmões. 2) As leveduras são fagocitadas por macrófagos alveolares podendo ser disseminadas pelo organismo do hospedeiro no interior de células fagocíticas 3) As leveduras se disseminam pela corrente sanguínea do hospedeiro de forma isolada e também no interior de macrófagos, conhecido como “cavalo de Tróia” 4) A invasão criptocócica do SNC pelo cruzamento do BHE. Adaptado de (Taylor-Smith e May, 2016).

A evolução da doença pode iniciar com a formação de um complexo pulmonar-linfático onde a levedura permanece viável em estado de latência ou desenvolve uma pneumonia que pode se agravar, para uma meningoencefalite, sendo esta a forma mais grave da doença. Isso ocorre quando a levedura se dissemina pelo organismo e atravessa a BHE atingindo o SNC (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Taylor-Smith e May, 2016; Rajasingham *et al.*, 2017; Dhitinanmuang *et al.*, 2018).

1.3 Mecanismos de Virulência

Mecanismos moleculares possibilitam a um patógeno, vantagens durante uma infecção no hospedeiro. Nessa interação o patógeno reage as mudanças celulares adaptativas com induções específicas do fenótipo que permitem a sua sobrevivência e proliferação (Steenbergen *et al.*, 2001; Alspaugh, 2015 May; Benaducci *et al.*, 2016). Entre os fatores de virulência estão: (1) desenvolvimento a 37 °C, (2) secreção de enzimas de degradação, (3) síntese de melanina, (4) produção de cápsula polissacarídica e (5) formação de biofilme (Steenbergen e Casadevall, 2003; Kronstad *et al.*, 2011a; Benaducci *et al.*, 2016).

1.3.1 Desenvolvimento a 37 °C

C. gattii e *C. neoformans* são espécies que possuem a habilidade de se desenvolverem a temperatura de 37 °C. Essa característica é uma das principais razões dessas duas espécies serem patógenos capazes de causar uma doença invasiva, diferente das demais espécies, as quais não apresentam desenvolvimento nesta temperatura (Ma e May, 2009; Kwon-Chung *et al.*, 2014). A via de transdução envolvida na sobrevivência a altas temperaturas é regulada por calcineurina, uma proteína fosfatase serina/treonina ativada por calmodulina que é codificada pelo gene *CNA1* (Casadevall *et al.*, 2003; Kwon-Chung *et al.*, 2014). A enzima superóxido dismutase (Sod2) também está envolvida na regulação, uma vez que o mutante nulo do gene *SOD2* é avirulento e perde a capacidade de desenvolvimento a 37 °C. A superóxido dismutase apresenta uma função conservada e essencial como componente de defesa do sistema antioxidante mitocondrial, além de fornecer proteção frente a espécies reativas de oxigênio (Giles *et al.*, 2005; Findra Setianingrum1 e And David W. Denning1, 2018). Vários genes exibem expressão diferencial no desenvolvimento a 37 °C e atuam em diversas funções na célula, como integridade da parede e resposta ao estresse e metabolismo oxidativo (Rosa E Silva *et al.*, 2008).

1.3.2 Enzimas e melanina

As enzimas consideradas fatores de virulência contribuem para os danos no tecido do hospedeiro, tornando-o permissivo à infecção microbiana. Fosfolipase B e urease são as duas enzimas de degradação mais estudadas e que têm um papel relevante na patogenicidade criptocócica. Essas enzimas podem promover a sobrevivência intracelular das leveduras, penetrar no tecido do hospedeiro através da hidrólise das membranas celulares, fazer imunomodulação e aumentar a disseminação do patógeno do pulmão para o cérebro (Casadevall e Pirofski, 2009; Kwon-Chung *et al.*, 2014). As fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam ligações éster em glicerofosfolípidios que pode resultar na desestabilização de membranas, lise celular e liberação de segundos mensageiros lipídicos. A fosfolipase também pode clivar a fosfatidilcolina dipalmitoil, um dos principais componentes do surfactante pulmonar, e assim auxiliar na disseminação do fungo (Steenbergen e Casadevall, 2003).

A atividade da urease criptocócica é importante para a propagação do fungo no pulmão. A prevenção da disseminação sistêmica é dependente de uma resposta adaptativa Th1 enquanto que uma resposta adaptativa Th2 é não protetora, assim o equilíbrio entre uma resposta Th1 e Th2 é determinante para o resultado da infecção (Osterholzer *et al.*, 2009). A enzima promove o acúmulo de células dendríticas imaturas que influenciam na resposta imune não protetora do Tipo 2 (Kwon-Chung *et al.*, 2014). A urease catalisa a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amônia. A amônia gerada a partir da atividade ureolítica serve como fonte de nitrogênio que auxilia a sobrevivência da levedura a longo prazo em condições limitadas de nitrogênio (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2018). A amônia mediada pela urease também pode neutralizar qualquer microambiente ácido e, assim, auxiliar os patógenos a sobreviverem ao pH do fagolisossomo (Fu *et al.*, 2018). Além disso, a atividade ureolítica pode aumentar a invasão da levedura para o sistema nervoso central promovendo o sequestro da levedura nos microcapillares da barreira hematoencefálica (BHE) (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2018).

Existem três mecanismos potenciais para acessar o parênquima cerebral: (1) transcelular, células da levedura invadem diretamente as células endoteliais; (2) paracelular, através de uma BHE enfraquecida ou; (3) “cavalo de troia” através do qual o *Cryptococcus* spp. atinge o SNC transportado por macrófagos (Kronstad *et al.*, 2011a;

Feder *et al.*, 2015). Para uma transmigração bem-sucedida vários fatores, incluindo a atividade de urease, são relatados como importantes para o transporte intercelular, que pode causar danos às células endoteliais microvasculares cerebrais (Santiago-Tirado *et al.*, 2017; Squizani *et al.*, 2018). A transcrição de genes transportadores de cálcio e fatores relacionados a transmigração são controlados positivamente pela via de sinalização de Ca^{2+} /calcineurina e a atividade da urease é regulada pelo fator de transcrição Crz1 (Squizani *et al.*, 2018).

Um outro grupo de enzimas relacionada com a virulência são as lacases. São enzimas da parede celular que utilizam precursores dopaminérgicos como dopamina, norepinefrina, epinefrina e L-DOPA para produzir o pigmento melanina que vai proteger *Cryptococcus* spp. de vários estresses, incluindo o estresse oxidativo (Esher *et al.*, 2018). A lacase protege a levedura da atividade oxidativa dos macrófagos alveolares através da sua atividade de ferro oxidase, sequestrando e oxidando o ferro durante a infecção. A produção de lacase em *C. gattii* e *C. neoformans* é controlada por duas enzimas da parede celular que controlam a produção de melanina (Farrer *et al.*, 2018). Os genes envolvidos na regulação das enzimas são *LAC1* e *LAC2*. Linhagens mutantes para *LAC1* (*lac1Δ*) foram analisadas em modelo de infecção experimental e quando comparados com o selvagem se mostraram menos virulentas. No entanto, mutantes nulos para *LAC2* não apresentaram diferença na virulência (Zhu e Williamson, 2004; Esher *et al.*, 2018; Farrer *et al.*, 2018).

A melanina é um pigmento com carga negativa, é estável, insolúvel em solventes fisiológicos, resistente à degradação ácida e é produzida por uma lacase pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos. O neurotropismo de *C. neoformans* pode ser explicado em parte pela capacidade do fungo de usar neurotransmissores como epinefrina e dopamina como substratos para a produção de melanina (Steenbergen e Casadevall, 2003). Outra característica é o aumento da resistência criptocócica a peptídeos antifúngicos e microbicidas. As células melanizadas são menos suscetíveis que linhagens deficientes em melanina a estresses nitrosativo e oxidativo e são mais resistentes a fagocitose e a morte celular causada por células efectoras imunes. Como sequestradora de radicais livres, a melanina é capaz de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) (Steenbergen e Casadevall, 2003; Esher *et al.*, 2018).

1.3.3 Cápsula

A cápsula polissacarídica criptocócica é um importante mecanismo de virulência e fundamental para a biologia do fungo (Casadevall *et al.*, 2018). Uma estrutura dinâmica que pode sofrer modificações de acordo com as variações condicionadas pelo hospedeiro, como os níveis de dióxido de carbono (CO₂), privação de ferro, alteração de pH (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Casadevall *et al.*, 2018). A cápsula é formada por uma rede de polissacarídeos ancorados pela parede celular a qual é composta por glucanos, quitina, quitosana e glicoproteínas (Doering, 2009; Kwon-Chung *et al.*, 2014). A cápsula é composta principalmente de glucuronoxilomanana (GXM-1-7MDa) 88 %, glucuronoxilogalactomanana (GalGXM, 100KDa) 10 % e os outros 2 % de manoproteínas (MP) (Vartivarian *et al.*, 1989; Jesus *et al.*, 2010; Bielska e May, 2016). Diferenças estruturais no polissacarídeo dão origem a diferenças antigênicas que são usadas para agrupar linhagens criptocócicas nos sorotipos A, B, C, D e AD (Casadevall *et al.*, 2018). Na figura 3 podemos observar a organização da cápsula, com suas fibras entrelaçadas na superfície celular (Bielska e May, 2016).

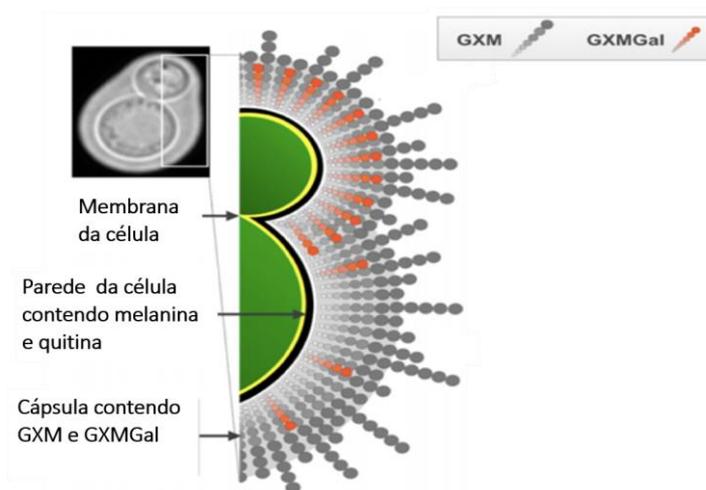


Figura 3: Diagrama representando a cápsula polissacarídica. As moléculas de GXMGal (mostradas em vermelho) são encontradas principalmente em cápsulas de células filhas em desenvolvimento e também nas cápsulas de células maduras, mas apenas transitória devido à secreção. Adaptado de (Bielska e May, 2016).

Os polissacarídeos capsulares também podem ser encontrados em vesículas extracelulares (EVs), as quais consistem de uma variedade de estruturas vesiculares como exossomos derivados de corpos multivesiculares (MVB), microvesículas derivadas de membrana plasmática e corpos citoplasmáticos semelhantes a vesículas (Rodrigues e Casadevall, 2018). Estão envolvidas no transporte bidirecional, como exportação de componentes da cápsula para a superfície celular e para o exterior da célula, e também fatores de virulência, tendo em vista que o conteúdo vesicular inclui polissacarídeo capsular, lipídeos, e uma variedade de enzimas relacionadas a virulência como urease, fosfatase e lacase (Nosanchuk *et al.*, 2008; Eisenman *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013; Rodrigues e Casadevall, 2018). Além disso as EVs também são internalizadas na célula, esse fenômeno é menos conhecido, mas tem sido relacionado à regulação da expressão gênica, atenuação da virulência, formação de biofilme, diminuição do crescimento, aumento da sobrevivência dos macrófagos e replicação de prions (Rodrigues e Casadevall, 2018). Existem evidências de que quando a cápsula está associada as EVs ocorre aumento da virulência, sendo necessário, porém, a presença de RNAs e proteínas que se encontram protegidos pela bicamada lipídica nas EVs. O tráfego intracelular que envolve os fatores de virulência e os polissacarídeos da cápsula, sintetizados internamente, são exportados por exocitose com função relacionada com a regulação da secreção pela via de sinalização cAMP (Kronstad *et al.*, 2011a; Bielska *et al.*, 2018). As vesículas podem ser fagocitadas por macrófagos e uma vez no citoplasma dos macrófagos os polissacarídeos capsulares podem alterar as funções celulares ou causar a lise celular, além de inibir a liberação de citocinas e a migração de leucócitos para sítios de inflamação (Rodrigues *et al.*, 2007; Ma e May, 2009; Oliveira *et al.*, 2010; Vecchiarelli *et al.*, 2013). A cápsula criptocócica tem propriedades antifagocíticas e interfere nos mecanismos imunes do hospedeiro como na imunidade adaptativa, inibindo a indução da expressão de ligantes necessários para ativação das células T (Huston *et al.*, 2016).

Como já mencionado *Cryptococcus* spp. podem alterar tanto o tamanho quanto a estrutura da cápsula de acordo com as condições ambientais, estratégias que permitem a levedura se proteger do hospedeiro (Doering, 2009). O aumento do tamanho da cápsula confere resistência as condições de estresse como espécies reativas de oxigênio e antifúngicos. O processo para o aumento da cápsula demanda energia e depende da

atividade mitocondrial (Trevijano-Contador *et al.*, 2017). Há um morfotipo de células conhecido como células Titãs, que resultam da modificação da levedura no pulmão. Foram descritas durante a infecção pulmonar primária, essas células não são fagocitadas e produzem células filhas de tamanho normal, sugerindo que elas desempenhem a função de disseminação da levedura (Zaragoza e Nielsen, 2013; Dambuza *et al.*, 2018).

Mutantes acapsulares de *Cryptococcus* spp. são avirulentos em modelo de infecção experimental murino. Segundo estudos realizados por Casadevall e colaboradores, o polissacarídeo capsular parece ser necessário para formação normal de biofilme, como pode ser observado em um mutante deficiente em capsula *cap59* que foi incapaz de formar biofilme (Martinez e Casadevall, 2005; Kwon-Chung *et al.*, 2014; Mayer *et al.*, 2018).

1.3.4 Biofilme

Biofilme em microbiologia se refere a comunidades complexas de microrganismos que podem ou não estar aderidas a superfícies sólidas, são considerados o estado mais comum de crescimento para muitas espécies microbianas. São compostos por células unicelulares vivas e por uma matriz extracelular composta, em geral, por proteínas, açúcares e ácidos nucleicos denominada matriz extracelular (ECM) formando uma estrutura dinâmica e protetiva. O biofilme permite aos organismos nele presentes, resistir a condições como privação de nutrientes, dessecação, e aumenta a sua resistência a drogas e compostos químicos. Expressa características diferentes das presentes em células isoladas, são características fenotípicas únicas que aumentam a resistência a mecanismos imunes do hospedeiro e a terapia antimicrobiana (Martinez e Casadevall, 2015; Lohse *et al.*, 2017).

Nos fungos, são comunidades celulares bem estruturadas e dinâmicas e conferem ao patógeno, resistência a ação de antifúngicos e ao sistema imune, sendo assim associados a infecções persistentes (Martinez e Casadevall, 2006; Sheppard e Howell, 2016; Lopes *et al.*, 2017a). O biofilme de *Cryptococcus* spp. é formado por células encapsuladas agregadas que estão envolvidas por uma matriz exopolimérica rica em

polissacarídeos (EPS). (Martinez e Casadevall, 2006) A formação de biofilme, influenciada por fatores biológicos e ambientais, representa a forma mais comum de organização dos microrganismos (Martinez e Casadevall, 2005). Primeiramente as células planctônicas criptocócicas iniciam com o processo de adesão, fase em que ocorre o desenvolvimento celular e a adesão das células em superfícies que podem ser bióticas ou abióticas, em um período entre 2 e 4 horas. No estágio intermediário entre 4 e 16 horas a população fúngica aumenta significativamente formando microcolônias. Durante o estágio de maturação entre 24 e 48 horas, a atividade metabólica permanece alta e estável, e a quantidade crescente de material extracelular permite que a microarquitetura do biofilme seja mais complexa (Martinez e Casadevall, 2015).

Em análises por microscopia eletrônica de varredura, *C. neoformans* foi usado como modelo para a visualização da distribuição celular durante a fase de adesão e formação do biofilme e observou-se que as células se agregam em uma estrutura ordenada específica apresentando uma disposição geométrica das células, lembrando uma flor, como pode ser observado na figura 4 (Lopes *et al.*, 2017b).

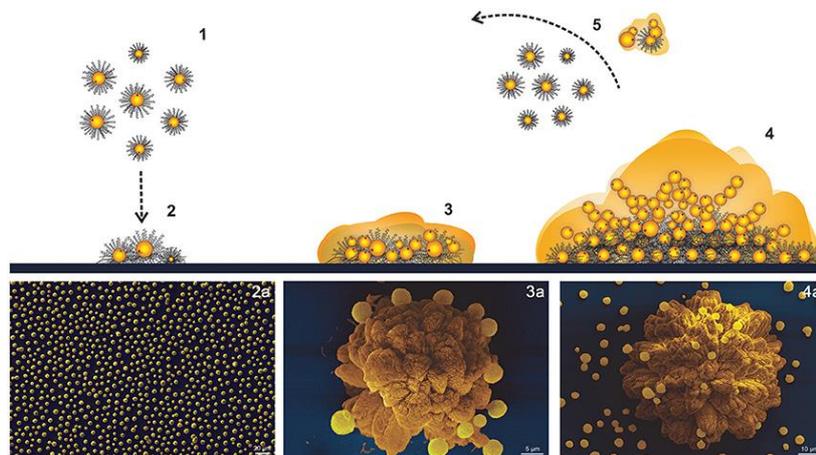


Figura 4: Esquema de formação de biofilme de *C. neoformans* B3501-A. (1,2)

A adesão de células planctônicas segue uma distribuição aproximadamente hexagonal. (3) Expansão e modelagem de cluster. (4) Biofilme maduro semelhante a uma flor. (5) Descolamento de microcolônias ou células planctônicas. (a) MEV dos estágios de desenvolvimento do biofilme. Adaptado de (Lopes *et al.*, 2017b).

A síntese de componentes capsulares está relacionada com a formação de biofilme, uma vez que as células criptocócicas acapsulares são incapazes de formar biofilme, mesmo na presença de GXM exógeno (Martinez e Casadevall, 2005). Grandes quantidades de polissacarídeo são secretadas durante a formação de biofilme. Esta estrutura tridimensional que envolve a população de células confere proteção e estabilidade ao patógeno. Em sua composição química estão presentes predominantemente xilose, manose, glicose e outros açúcares menores. Esses açúcares, porém, não estão presentes em polissacarídeos capsulares, o que sugere que outro tipo de polissacarídeo faça parte da composição da EPS (Martinez e Casadevall, 2007; 2015; Aslanyan *et al.*, 2017). Esses polissacarídeos são gerados intracelularmente e exportados para o espaço extracelular via secreção mediada por vesículas (Rodrigues *et al.*, 2007). Estudos sobre o efeito de anticorpos elicítados para polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* revelaram que os anticorpos monoclonais reduzem significativamente os níveis séricos de GXM tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A ligação do anticorpo à cápsula pode também desencadear mudanças na expressão gênica e alterar a fisiologia do fungo favorecendo a inibição da formação de biofilme (Martinez e Casadevall, 2015).

De acordo com os dados do *National Institutes of Health* (NIH), aproximadamente 80 % das infecções microbianas em humanos são causadas por biofilmes. Eles proporcionam uma maior resistência aos mecanismos imunes do hospedeiro e a terapia antimicrobiana. A capacidade de *Cryptococcus* spp. aderir em dispositivos médicos como cateteres de derivação ventrículo-atrial, derivações ventrículo-peritoneais, usados para controlar a hipertensão intracraniana associada à meningoencefalite criptocócica, destaca a importância de se investigar as propriedades para a formação de biofilme desse organismo (Martinez e Casadevall, 2007).

Pesquisas realizadas com células mutantes de *Candida albicans* revelaram que mais de 50 reguladores de transcrição estão relacionados com a formação de biofilme (Lohse *et al.*, 2017).

Um estudo recente caracterizou mutantes heterozigotos para GTPases Gtr1 e Rhb1 com alteração do controle de fenótipo para a formação de biofilme regulado por TORC1 (complexo proteico alvo de rapamicina) e também nas mudanças dos padrões de expressão gênica. O complexo TORC1 regula o metabolismo da célula quanto a morfogênese e aquisição de nitrogênio, além de estar relacionado com a regulação da

expressão de genes de adesão e formação de biofilme. Essa regulação ocorre via ativação do fator de transcrição Sfp1 que é um repressor do gene necessário para a formação de biofilme. Um mutante nulo para o gene *SFPI* mostrou defeito no crescimento de hifas e formação de biofilme. Sfp1 desempenha papel essencial na homeostase do cálcio (Movahed *et al.*, 2015; Flanagan *et al.*, 2017).

Uma análise realizada com mutantes de *C. neoformans* gerados por ATMT, em condições limitantes de aeração identificou-se o gene CNAG_00156.2, e uma sequência proteica traduzida deste gene foi usada para pesquisa de homologia em *Saccharomyces cerevisiae*, identificando-se o gene *CRZI/SP1* que codifica para o fator de transcrição dedo de zinco como potencial homólogo. Este gene também foi identificado como homólogo aos fatores de transcrição responsivos a calcineurina e também aos fatores de transcrição dependentes da via de sinalização da proteína quinase (Pkc1). A deleção do gene *CRZI/SP1* confirmou ser importante na integridade da parede celular, e na redução da formação de biofilme (Moranova *et al.*, 2014).

As etapas envolvidas na formação de biofilme microbiano são controladas por redes regulatórias complexas que coordenam a expressão de múltiplos genes. Contudo, para *Cryptococcus* spp. ainda faltam estudos elucidando os mecanismos de regulação gênica na formação de biofilme (Lohse *et al.*, 2017).

2. OBJETIVO GERAL

Identificar genes que atuam na regulação da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii*.

2.1 Objetivos específicos

- Selecionar linhagens mutantes formadoras de biofilme por meio de *screening* de uma biblioteca de mutantes haploides de *Cryptococcus gattii* R265.
- Analisar os fenótipos relacionados aos principais fatores de virulência dos mutantes selecionados.
- Identificar por PCR inverso e sequenciamento os genes inativados nos mutantes selecionados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Biblioteca de mutantes

Para a análise da formação de biofilme foi utilizada uma biblioteca de mutantes disponível no laboratório (comunicação pessoal Staats.C.S). Na construção da biblioteca de mutantes por inserção aleatória de T-DNA, o plasmídeo pPZP-HYG foi construído pela subclonagem de um fragmento de DNA que confere resistência à higromicina (HygR) presente no plasmídeo pJAF15 (Fraser *et al.*, 2003). no vector pPZP201BK (Covert *et al.*, 2001) previamente clivado com as enzimas XbaI e HindIII. O plasmídeo resultante foi transformado em *A. tumefaciens* linhagem EHA105 para posterior seleção de transformantes após desenvolvimento em caldo LB suplementado com canamicina (50 µg/mL). A transformação mediada por *A. tumefaciens* de *C. gattii* foi conduzida como descrito anteriormente (Idnurm *et al.*, 2004). Um total de 8.800 mutantes contendo inserção aleatória de T-DNA foram isolados e inoculados em placas de 96 poços contendo YPD suplementado com higromicina (200 µg/mL). Os estoques de glicerol foram preparados e armazenados a – 80 °C (comunicação pessoal Staats.C.S).

3.2 *Screening* da biblioteca de mutantes

Para reativar a biblioteca os inóculos foram transferidos com auxílio de um carimbo para placas de 96 poços contendo meio YPD e as placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. Para a avaliação da formação de biofilme, os mutantes foram transferidos para uma nova microplaca contendo meio mínimo (MM - 15 mM de glicose, 10 mM MgSO₄, 29 mM KH₂PO₄, 13 mM glicina e 2 mM tiamina-HCl a pH 5,5) e incubados a temperatura de 37 °C por 48 h. As microplacas foram lavadas três vezes com Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) para a remoção das células não aderentes (plantônicas) e a formação de biofilme foi quantificada usando o método do cristal violeta (Stepanović *et al.*, 2007). A leitura de absorbância foi realizada em um leitor de microplacas a 570 nm (Spectramax® i3x). Como controle negativo foi utilizado PBS e como controle positivo a linhagem selvagem R265, a qual é classificada como fraca formadora de biofilme. Os valores individuais de leitura de cada mutante foram

normalizados a partir dos valores de absorbância da linhagem selvagem R265. A classificação foi feita de acordo com os critérios estabelecidos com base nos valores de mediana (Md) e desvio padrão (DP) das leituras. Os mutantes considerados bons formadores de biofilme, foram as linhagens que obtiveram valor de absorbância \geq Md + 2 (Md + 1DP). Quando o valor de absorbância foi menor que \bar{x} WT e 20 % Md + 1DP, os mutantes foram considerados não formadores de biofilme. O cálculo utilizado para normalização das leituras foi:

$$\text{Valor normalizado} = \frac{(\text{OD}_{570} \text{ mutante} - \text{OD}_{570} \text{ controle})}{(\bar{x} \text{ OD}_{570} - \text{selvagem} - \text{OD}_{570} \text{ controle})}$$

Após a primeira triagem, os mutantes classificados como bons formadores de biofilme foram selecionados e utilizados em novos ensaios para confirmação dos resultados do *screening*.

3.3 Caracterização Fenotípica

3.3.1 Melanização

Para o ensaio de melanização os inóculos foram ajustados para 10^7 células/mL. Foi realizada uma diluição seriada e 5 μ L foram inoculados em placa de Petri com meio mínimo suplementado com 1 mM de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e incubadas por 72 h a 30 °C. A produção de melanina foi então determinada visualmente pela presença ou ausência de pigmento (Zhu e Williamson, 2004).

3.3.2 Cápsula

Para a medição da cápsula, os mutantes foram cultivados em YPD por 24 h a 30 °C e 200 rpm. A cultura foi centrifugada a 3.000 g e as células lavadas duas vezes com PBS. Aliquotas de 10^6 células foram inoculadas em MM num volume final de 500 μ L na placa de 24 poços e as placas foram incubadas por 72 h a 37 °C e 5 % de CO₂. Após a incubação, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4 % e lavadas três vezes com PBS. O volume de 5 μ L das suspensões foi misturado com 5 μ L de tinta da Índia e

distribuído em lâminas de microscopia para análise. As células foram fotografadas e as medidas do diâmetro total e corpo celular foram realizadas com o software ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Pelo menos 100 células foram analisadas para cada mutante.

3.3.3 Urease

A atividade de urease foi realizada de acordo com (Kwon-Chung *et al.*, 1987). As células dos mutantes foram incubadas em meio Roberts Urea Broth por 4 h a 37 °C com agitação. As células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante foi recolhido e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 560 nm. As leituras em que a densidade óptica foi $\geq 0,3$ foram consideradas positivas para atividade de urease.

3.3.4 Quantificação de GXM

Os polissacarídeos secretados foram quantificados por ELISA para detecção específica de GXM (Casadevall *et al.*, 1992). As células mutantes foram cultivadas em MM por 3 dias a 30 °C com agitação e separadas dos sobrenadantes da cultura por centrifugação (Nimrichter *et al.*, 2007).

3.3.5 Ensaio de fagocitose em macrófagos *in vitro*

Ensaio de fagocitose foram realizados para avaliar a suscetibilidade dos mutantes à atividade antifúngica dos macrófagos (Reuwsaat *et al.*, 2018). Uma alíquota de 100000 células J774.A1 em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS) foi incubada em placas de cultura de 96 poços por 24 h a 37 °C e 5 % de CO₂. Os mutantes foram cultivados em YPD por 18 horas a 30 °C. Após três lavagens com PBS, 10⁷ células de cada mutante foram opsonizadas com anticorpo monoclonal anti-GXM (MAb 18B7) e incubadas por 1 hora a 37 °C. As células de macrófagos foram lavadas uma vez com PBS e incubadas em DMEM sem FBS e com acetato de miristato de forbol 5 nM (PMA) para ativação durante 2 horas. Em seguida, os macrófagos foram expostos a células de levedura na proporção de 1:10 e incubados por 2 e 24 h a 37 °C e 5 % de CO₂. No final da incubação, as células de macrófagos foram lisadas com água gelada estéril e subsequentemente semeadas em placas YPD para determinação de CFU. A fagocitose foi determinada como a proporção

de células criptocócicas internalizadas para o número de células macrofágicas. O aumento da capacidade de se replicar nos macrófagos foi observado pela taxa de proliferação intracelular (IPR).

3.3.6 Virulência em *Galleria mellonella*

Os estudos de virulência foram realizados utilizando o modelo *Galleria mellonella*, fornecidas pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os mutantes foram cultivados em ágar YPD por 24 h a 30 °C e os inóculos foram preparados com 10⁸ células/mL em PBS. Um grupo de 10 larvas foi selecionado para cada mutante com larvas de tamanho similar (entre 220 - 260 mg cada). As larvas foram colocadas em placas de Petri e um inóculo de 10 µL de *C. gattii* selvagem e mutantes (10⁶ células) foram inoculados por injeção na última pró-leg esquerda, utilizando-se uma seringa Agilent (Agilent, EUA). Um grupo de 10 larvas também foi inoculado com PBS para monitorar os efeitos potenciais na sobrevivência devido a lesão física, enquanto outros 10 não foram inoculados sendo considerados o grupo controle.

Após a inoculação, as larvas foram incubadas a 37 °C por 12 dias e verificadas diariamente quanto à mortalidade. A análise de sobrevivência de Kaplan-Meier foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 6 para avaliar as diferenças de sobrevivência (Firacative *et al.*, 2014).

3.4 Análise genotípica dos mutantes de *C. gattii*

Para identificar o sítio de inserção do T-DNA foi realizado PCR inverso como descrito (Idnurm *et al.*, 2004). Primeiramente foi extraído o DNA genômico de cada mutante por fenol-clorofórmio. Em seguida, aproximadamente 2,0 µg de DNA genômico foram clivados com a enzima de restrição Bgl II (Promega) por 4 h. A reação foi então inativada por calor (15 minutos a 60 °C). O DNA clivado foi auto-ligado com DNA-ligase T4 por 18 h a 4 °C e 1 µL dessa reação foi utilizado para o PCR inverso com os primers AgLBIN (5'-AGAGGCGGTTTGCGTATTGG-3') e AgRBIN (5'-CAACAGTTGCGCAGCCTGAAT G-3'). Os produtos de PCR foram purificados em gel por PureLink Gel Extraction Lit (Invitrogen) e sequenciados pelo método de Sanger.

A sequência obtida foi comparada com o genoma de *C. gattii* R265 no banco de dados (fungidb.org) para identificar a posição do T-DNA no genoma dos mutantes.

3.5 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada por meio do programa MEGA 7.0. (Kumar *et al.*, 2016) As sequências de Arf2 (CNBG_2340) e Gtr1 (CNBG_1130) foram obtidas no genoma de *C. gattii* (<http://fungidb.org/fungidb/>). As sequências dos ortólogos foram obtidas no genoma de cada espécie citada nas árvores. A análise foi realizada por meio do método *neighbor-joining* (Li, 2015) com 1000 réplicas de bootstraps. Os valores de bootstraps gerados para cada nó representam o número de vezes que o agrupamento ocorreu. A distância evolutiva foi calculada pelo método de Poisson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Screening* de mutantes formadores de biofilme

A capacidade de formar biofilme é um importante fator de virulência em *Cryptococcus* spp (Casadevall e Pirofski, 2001; Benaducci *et al.*, 2016). Com o objetivo de buscar genes que atuam na regulação desse fator de virulência, foi realizado um *screening* em uma biblioteca de aproximadamente 8.000 mutantes de *C. gattii*, linhagem R265. O critério de seleção dos mutantes foi a maior capacidade de formação de biofilme em relação ao selvagem. A figura 5 representa uma análise geral do *screening* realizado. Pode-se observar no gráfico que a maioria dos mutantes formam menos biofilme em relação à linhagem selvagem. Uma parcela menor apresentou um aumento na formação de biofilme, sendo alguns desses aprofundados nesse estudo e representados pelos pontos em vermelhos.

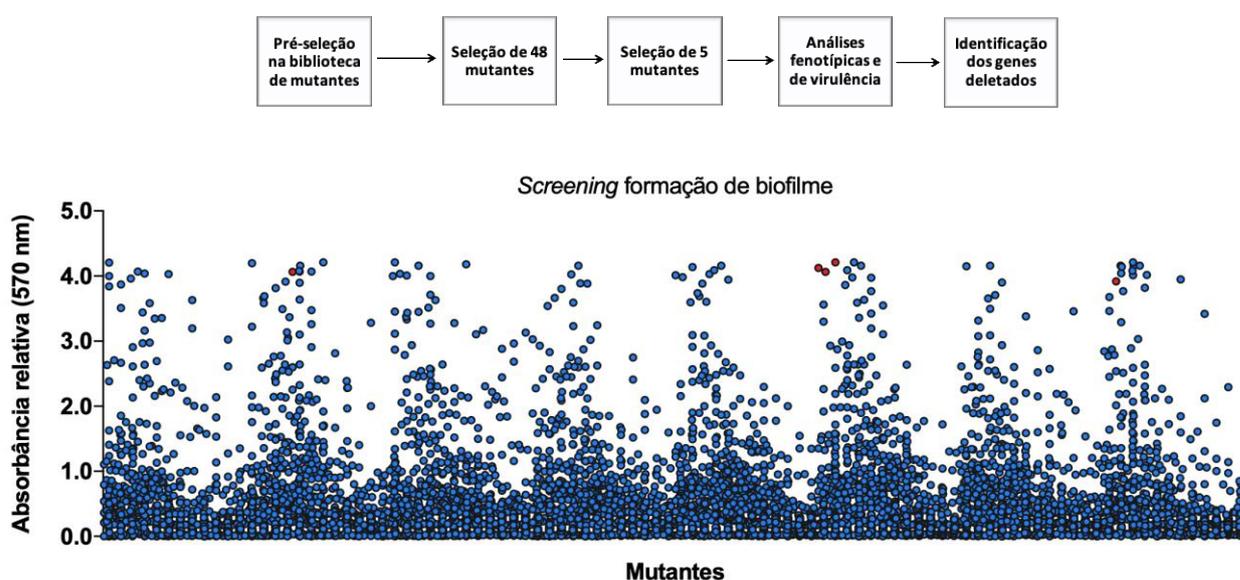


Figura 5: Fluxograma geral dos experimentos e representação do *screening* na biblioteca de mutantes de *C. gattii* R265 para formação de biofilme. No topo da figura estão representados os experimentos realizados em ordem cronológica. O gráfico representa o *screening* geral na biblioteca, em que cada ponto azul é um mutante analisado e os pontos vermelhos representam os mutantes selecionados para análises fenotípicas, virulência e identificação dos genes deletados. O teste foi realizado pela

técnica de coloração de cristal violeta. Um total de 84 placas foram analisadas, com leitura individual de cada mutante em uma OD de 570 nm.

Após a normalização dos dados baseada nos critérios estabelecidos, 48 mutantes foram selecionados. Um novo ensaio para avaliar a capacidade de formação de biofilme foi realizado (Figura 6A). Os mutantes que apresentaram diferença estatística na formação de biofilme em comparação com o selvagem foram submetidos novamente ao ensaio para confirmação, resultando por fim em 5 mutantes (Figura 6B). A partir desse resultado, os 5 mutantes foram escolhidos para análises fenotípicas e virulência, bem como identificação do gene o qual houve inserção do vetor de inativação.

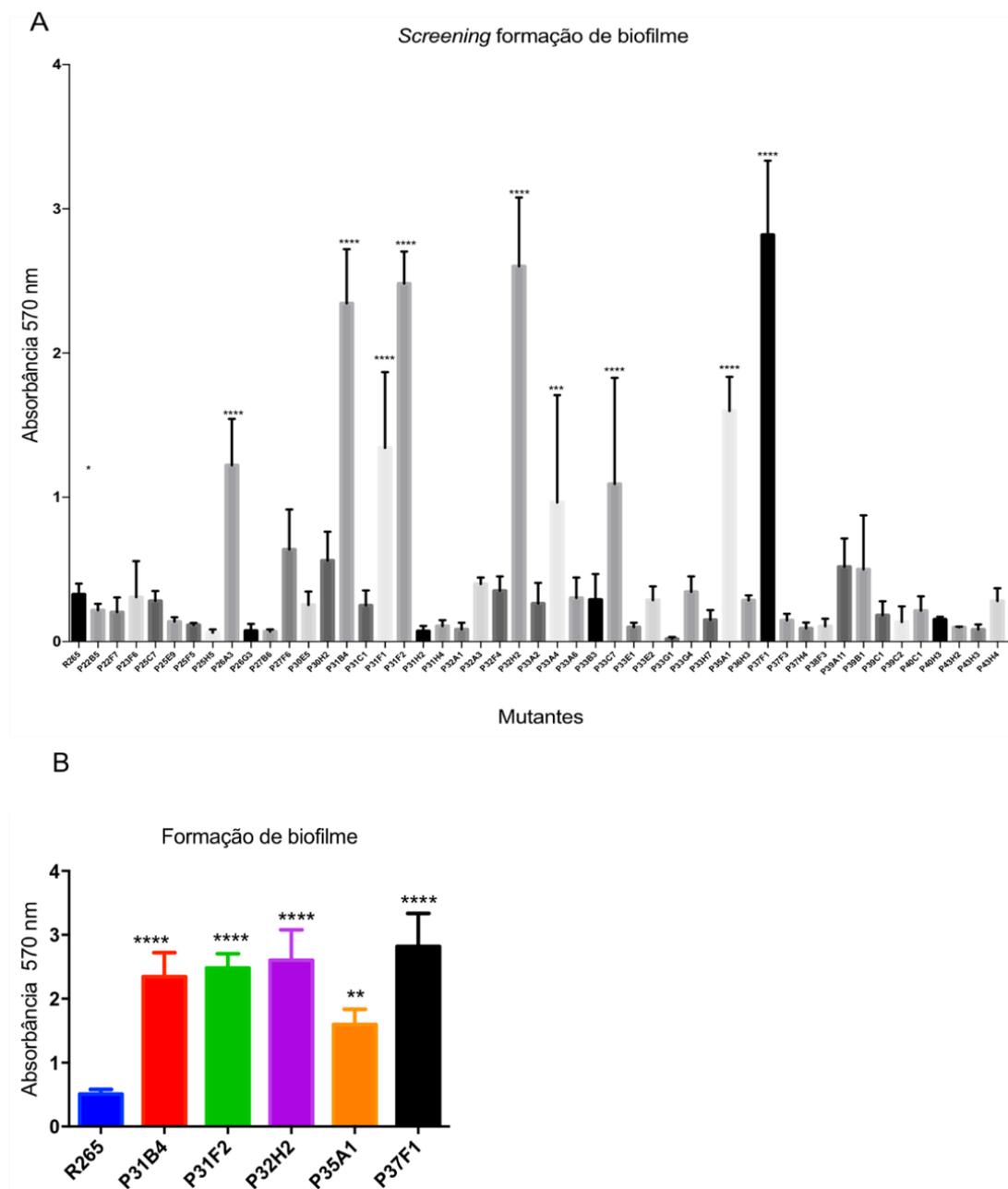


Figura 6: Análise da formação de biofilme nos mutantes selecionados. (A) Mutantes que apresentaram maior formação de biofilme dos 48 mutantes selecionados por cristal violeta. Foram realizadas quatro repetições biológicas a partir do inóculo ajustado a uma concentração de 10^7 células/mL. A leitura da absorbância foi realizada em OD 570 nm . Barras de erro indicam o desvio padrão (DP). (B) Mutantes que apresentaram maior formação de biofilme em relação a linhagem R265. Análises estatísticas foram realizadas pelo método One-way ANOVA onde * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.

4.2 Identificação de alterações na cápsula polissacarídica

Em *Cryptococcus* spp. a primeira estrutura de contato com superfícies bióticas e abióticas para adesão e consequente formação de biofilme é a cápsula polissacarídica (Pontes e Frases, 2015). Sabe-se que essa estrutura é essencial para sobrevivência desse fungo em seu hábitat bem como a capacidade de proliferação no hospedeiro (Camacho e Casadevall, 2018). Tendo em vista que a cápsula polissacarídica é um dos principais fatores de virulência e está envolvida na formação de biofilme, (Martinez e Casadevall, 2015; Leopold Wager *et al.*, 2016) ensaios *in vitro* para avaliar a capacidade de produção de fatores de virulência foram realizados nos 5 mutantes selecionados. Avaliou-se o diâmetro da célula e a espessura da cápsula, assim como a produção do polissacarídeo GXM. Na figura 7A está representado, em cinza, o diâmetro das células, os quais foram menores para os mutantes P32H2 e P35A1 em comparação com o selvagem. Os pontos em azul representam a espessura da cápsula de cada célula analisada, a qual, em média, foi menor para os mutantes P31B4, P32H2 e P35A1, enquanto que P31F2 apresentou uma cápsula maior em comparação ao R265. O mutante P37F1 teve o tamanho da cápsula semelhante ao selvagem, porém foi o único a apresentar maior quantidade do polissacarídeo GXM no sobrenadante, como pode ser observado na figura 7B. É possível observar o tamanho das cápsulas nas imagens de microscopia de luz na figura 7C.

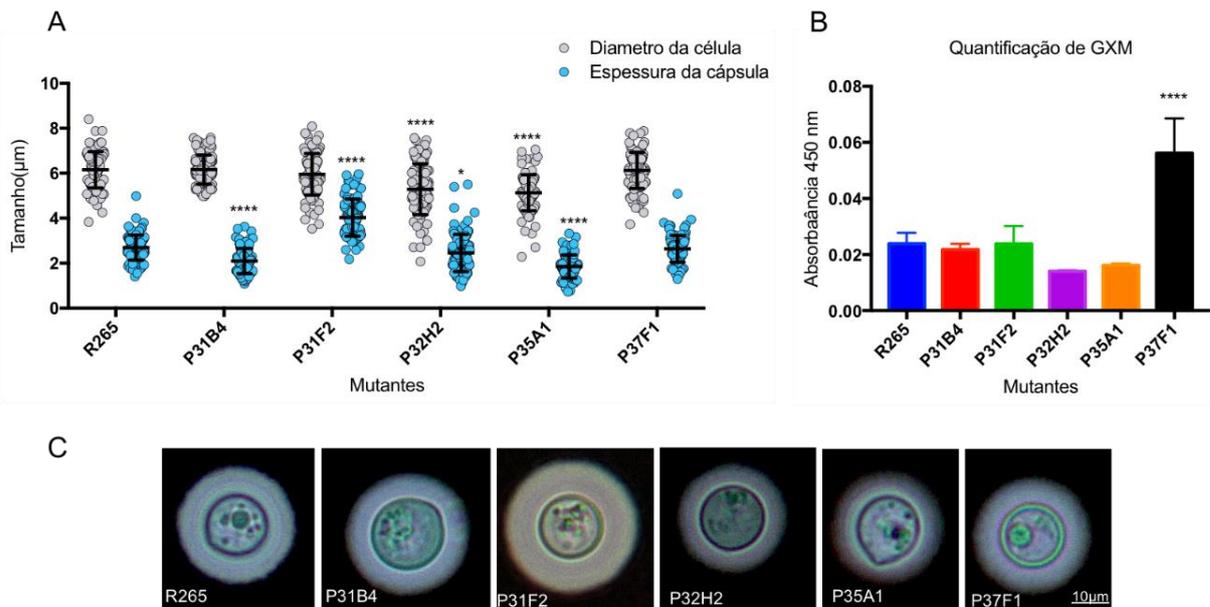


Figura 7: Diferenças no tamanho da cápsula e no conteúdo de GXM extracelular. Reatividade de polissacarídeo gxm com anticorpo 18B7(A) Diâmetro da célula representado por pequenas esferas cinzas e espessura da cápsula representado por pequenas esferas azuis. Tamanhos relativos ao selvagem R265 e aos mutantes. Os valores foram comparados por teste t $p < 0,05$ (B) Os polissacarídeos secretados foram quantificados por ELISA com anti-GXM 18B7. Os dados são apresentados como médias e desvios padrão (DS) (barras de erro) para três repetições biológicas (One-way ANOVA seguido pelo teste posthoc de Dunnett). Valor de **** $p < 0.0001$ (C) Representação do tamanho

da cápsula de cada um dos mutantes com contraste em tinta da Índia.

É descrito que a capacidade de formação de biofilme em *Cryptococcus* spp. é uma característica multifatorial, não sendo apenas a produção de GXM a única característica responsável por esse fator de virulência (Camacho e Casadevall, 2018). Entretanto, foi demonstrado em *C. neoformans* que anticorpos monoclonais anti-GXM possuem atividade antibiofilme, interferindo diretamente na liberação de polissacarídeo (Martinez *et al.*, 2004). Adicionalmente, microscopias eletrônicas de varredura demonstram uma complexa estrutura *flower-like* do biofilme desse patógeno, as quais são interconectadas por polissacarídeo (Lopes *et al.*, 2017a). Os resultados mostraram que apesar de uma forte formação de biofilme a espessura da cápsula foi variada entre os mutantes. As linhagens P31F2 e P32H2 apresentaram um aumento na espessura da cápsula o que poderia estar influenciando na maior formação de biofilme para esses mutantes. Além dessa análise, o diâmetro da célula também foi observado. A linhagem P32H2 apresentou menor diâmetro celular, porém uma maior espessura da cápsula. A quantidade de GXM liberada no sobrenadante foi semelhante ao selvagem com exceção do mutante P37F1. Levantamos a hipótese que o principal fator envolvido no aumento da produção de biofilme no mutante P37F1 deve-se aos elevados níveis de GXM, os quais foram detectados no meio extracelular (figura 7B). Quantidades copiosas de polissacarídeo capsular, são eliminadas durante a formação de biofilme criando uma EPS elaborada (Martinez e Casadevall, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008; Aslanyan *et al.*, 2017). A origem de GXM é intracelular e o seu transporte juntamente com muitos outros componentes da levedura estão relacionados a um mecanismo de secreção através de

empacotamento e exportação de vesículas para o meio extracelular. As vesículas contêm os principais blocos de construção para o crescimento capsular e do biofilme. Também estão envolvidos no aumento da cápsula e na formação de biofilme, os cátions divalentes, os íons de cálcio e magnésio que tem efeito direto sobre a montagem da cápsula, uma vez que agentes quelantes de cátions inibem a formação de biofilme, a secreção de vesículas extracelulares, e reduzem a quantidade de GXM (Martinez e Casadevall, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008; Aslanyan *et al.*, 2017).

4.3 Melanização e atividade de urease

Foi analisado o processo de melanização nos mutantes selecionados. Para isso, a produção de melanina foi avaliada após 72 h de incubação de uma diluição seriada dos mutantes em meio mínimo contendo L-DOPA. A partir de uma análise visual das colônias verificou-se que todos os mutantes produziram melanina (figura 8A). A produção de melanina está associada a proteção contra o estresse oxidativo, a resistência à degradação enzimática, fagocitose, peptídeos antifúngicos. Além disso, células melanizadas em biofilme conferem ainda mais resistência a drogas antifúngicas (Steenbergen e Casadevall, 2003; Nosanchuk e Casadevall, 2006; Aslanyan *et al.*, 2017).

Além do ensaio de melanização foi avaliada a atividade de urease após incubação dos mutantes em caldo Roberts urea e quantificação por espectrofotometria (OD₅₆₀). A atividade de urease dos mutantes foi semelhante à linhagem selvagem R265 (figura 8B).

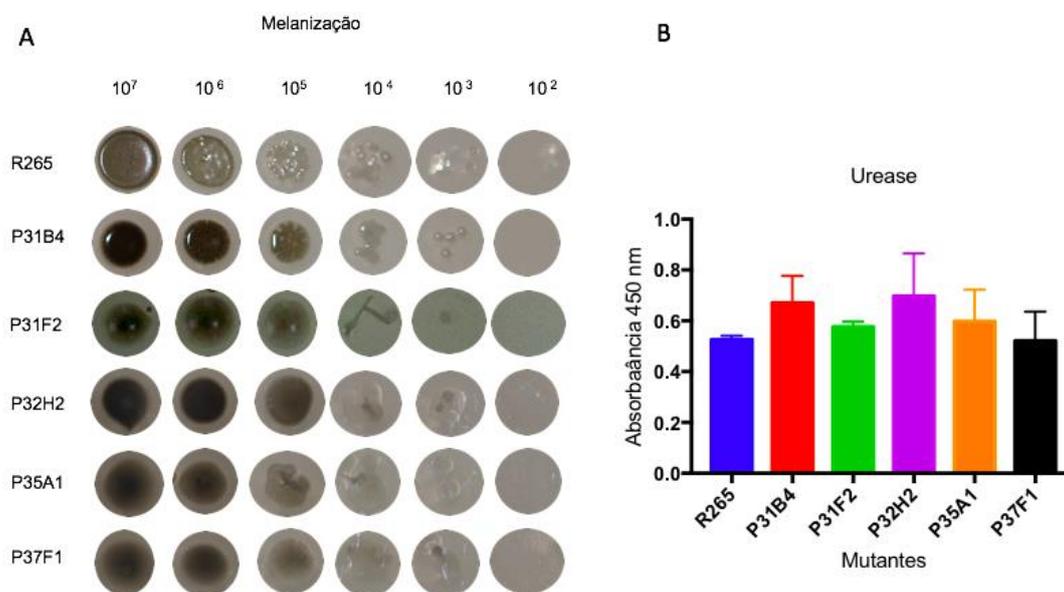


Figura 8 Análise fenotípica dos mutantes. (A) Análise visual da produção de melanina após crescimento da levedura em meio sólido suplementado com L-DOPA a 30 °C após 72 horas. (B) O ensaio de atividade da urease, as células foram incubadas em caldo de ureia Roberts. A atividade da urease foi medida pela densidade óptica a 560 nm, valores de leitura superiores a 0,3 foram considerados positivos. Barra de erro indicam DP. Os valores médios foram comparados com a linhagem selvagem R265 usando ANOVA unidirecional com teste post hoc de Tukey.

4.4 Diminuição nos níveis de fagocitose nos mutantes

É descrito que a cápsula de *Cryptococcus* spp. aumenta de tamanho durante o processo de infecção, principalmente quando à temperatura de 37 °C. Adicionalmente, a cápsula atua inibindo o reconhecimento da célula fúngica por parte das células de defesa do hospedeiro e, por consequência, diminuindo a taxa de fagocitose (Zaragoza *et al.*, 2008). Devido aos resultados obtidos no experimento de diâmetro de cápsula, surgiu o questionamento quanto a susceptibilidade dessas linhagens frente a ação de macrófagos. Tendo em vista que os macrófagos são a primeira linha de defesa do hospedeiro contra as células criptocócicas, (Kronstad *et al.*, 2011b; Alspaugh, 2015) foi avaliada a resposta

da interação dos mutantes com os macrófagos J774.A1, comparando com o selvagem R265.

Primeiramente foi avaliado os níveis de fagocitose dos mutantes em um período de incubação de 2 horas. Em seguida avaliou-se o índice de replicação intracelular. As células dos mutantes foram opsonizadas com o anticorpo 18B7 e incubadas com células J774.16 durante 2 e 24 h. Após a remoção do sobrenadante e a lavagem das células o número de células internalizadas foi determinado por análise de CFU. Curiosamente, somente os mutantes P31F2, P35A1 e P37F1 apresentaram menor índice de fagocitose em 2 h (Figura 9). Levantamos a hipótese de que o aumento no diâmetro da cápsula, bem como o aumento da secreção de GXM, principalmente no mutante P37F1, estão relacionados com a diminuição dos níveis de fagocitose, uma vez que GXM como uma molécula imunorreguladora modularia a atividade dos macrófagos. A diminuição nos níveis de internalização provavelmente deve-se à inibição do reconhecimento das células fúngicas por parte dos macrófagos. Entretanto, mais análises moleculares devem ser realizadas para tal afirmação.

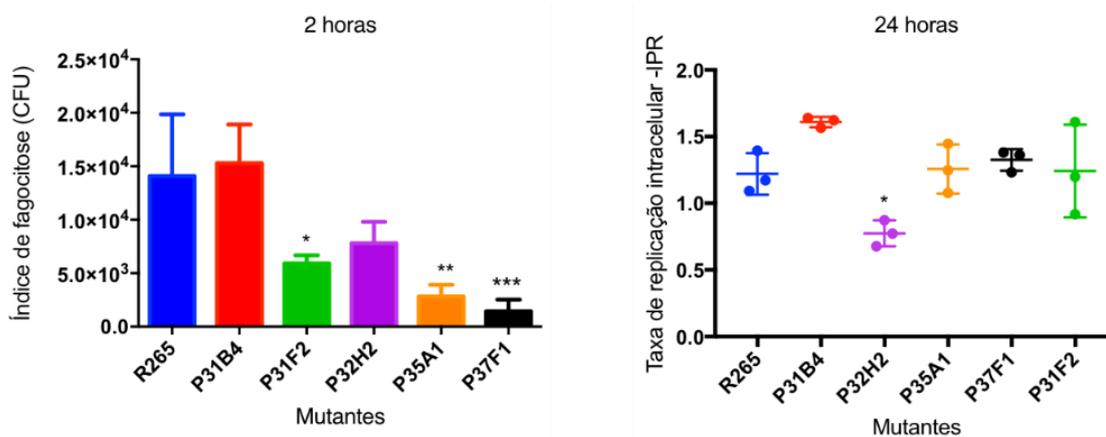


Figura 9: Suscetibilidade das linhagens mutantes de *C. gattii* à fagocitose e a sobrevivência no macrófago. (A e B) Após 2 e 24 horas de interação dos mutantes com células J774.A1, as células foram lisadas e determinou-se o número de CFU por mL. A determinação de CFU representa células de levedura internalizadas por macrófagos. Barra de erro indicando o DP. Os valores médios foram comparados com WT (R265) usando One-Way ANOVA com teste post hoc de Dunnett * $p < 0,001$.

A análise da taxa de replicação intracelular em 24 horas demonstrou que não há diferença estatística para a grande maioria dos mutantes, quando comparada a selvagem. Entretanto, o mutante P32H2 teve menor taxa de replicação (Figura 9). Sugerimos que as alterações no diâmetro de cápsula observados nos mutantes, não estão interferindo na capacidade de sobrevivência no ambiente intrafagossomal. Somado a isso, a normal atividade de urease nessas linhagens corroboram com esse resultado, visto que a atividade dessa enzima está diretamente relacionada com o desenvolvimento do fungo no fagolisosomo por meio da modulação do pH (Fu *et al.*, 2018).

4.5 Atenuação na virulência em modelo de estudo *Galleria mellonella*

G. mellonella é um modelo de estudo bem aceito para estudos de interação patógeno-hospedeiro (Jorjão *et al.*, 2018). Devido ao fato de que esse modelo pode ser submetido à temperatura de 37 °C, realizamos ensaio para avaliação da virulência dos mutantes. Um grupo de 10 larvas por mutante foi infectado, com uma concentração de 10⁶ células por larva. Após a inoculação as larvas foram analisadas todos os dias para avaliação da mortalidade. A curva de mortalidade revelou que os mutantes P31B4 e P31F2 apresentaram um perfil de virulência atenuado em comparação com o selvagem (Figura 10). Diversos fatores podem estar relacionados com esse fenótipo de virulência observado, desde de alterações na cápsula bem como uma série de modificações estruturais nessas linhagens.

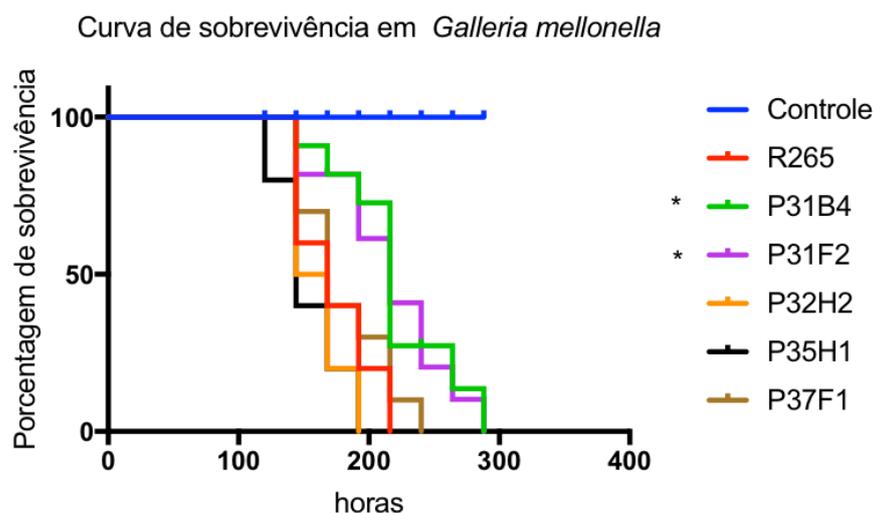


Figura 10: Curva de sobrevivência em *Galleria mellonella*. As larvas foram inoculadas com linhagens mutantes de *C.gattii* e com linhagem selvagem R265. Para cada linhagem grupos de 10 larvas foram inoculadas com 10^8 células/mL. PBS foi administrado no grupo controle e as larvas foram observadas diariamente. Os mutantes P31B4 e P31F2 apresentaram uma menor virulência em relação ao WT. Teste de Log-Rank (Mantel-Cox) foi realizado ***** $p < 0.0001$.

4.6 Identificação dos genes deletados

Para identificar as sequências da região inativada pelo plasmídeo de inserção dos mutantes, foi realizada a técnica de PCR inverso e sequenciamento das regiões flanqueadoras do sítio o qual houve inserção do vetor. Utilizando o método de Sanger, as sequências foram comparadas com o genoma de *C. gattii* R265 usando o banco de dados FungiDB. Foi possível identificar o gene inativado de duas das linhagens mutantes. Como representado na tabela 1, o mutante denominado P31B4, apresentou inserção do vetor da região codificante para o gene codificador da proteína Gtr1 (CNBG_1131). No mutante P32H2, a região inativada foi do gene codificador do fator de ribosilação de ADP (ARFs), com código de acesso CNBG_2340.

Tabela 1: Identificação dos genes inativados nos mutantes formadores de biofilme.

Região Genética Inativada nos Mutantes				
Placa	poço	Primer	CNBG-número	Função/função predita
31	B4	AgLBin	CNBG_1130	Proteína hipotética
		AgRBin	CNBG_1131	Gtr1/RagA GTP protein Gtr1
32	H2	AgLBin	CNBG_2340	Fator de ribosilação ADP
		AgRBin	CNBG_2340	Fator de ribosilação ADP

No fungo *Mucor circinelloides*, genes codificadores para o fator de ribosilação de ADP (ARFs) possuem papel na morfogênese e na virulência desse patógeno (Patiño-Medina *et al.*, 2018). As proteínas da família do fator de ribosilação de ADP (ARF) são conhecidas por seu papel como reguladores da GTPase na montagem e desmontagem do revestimento de vesículas e mais recentemente na formação de túbulos bidirecionais do Golgi (Bottanelli *et al.*, 2017). A ativação dessas proteínas é regulada temporalmente por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) que catalisam a troca de GDP com GTP em ARFs e também em proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), que por sua vez catalisam a hidrólise de GTP no ARF, assim essas GTPases circulam entre um estado ligado ao GTP ativo e um estado de ligação inativo do GDP, regulado pelos GEFs e GAPs. Todos os Gaps contem domínio catalítico GAP do dedo de zinco conservado, o que permite a identificação desses reguladores de ARF em todos os organismos. O ARF1 é o mais estudado na família de ARFs, está envolvido na montagem e brotamento de vesículas de COPI (proteína de revestimento) no Golgi, responsável pela via retrograda (Golgi-RE) (Donaldson e Jackson, 2011; Paczkowski e Fromme, 2016; Bottanelli *et al.*, 2017). Segundo alguns estudos foi observado que a inativação de fatores de troca de GTP do tipo Sec7, que catalisa a ativação da GTPase Arf1p localizados no aparelho de Golgi de células mamíferas e de leveduras, resultou na redução massiva do tamanho da cápsula. Os nossos resultados sugerem que as proteínas do fator de ribosilação de ADP (ARFs) possam estar envolvidas na regulação da formação de biofilme de *C. gattii*. As vesículas

contendo GXM são derivadas do aparelho de Golgi e ARF regula o transporte de vesículas, a inativação do gene que codifica para o fator de ribosilação de ADP, pode estar influenciando na liberação de vesículas que poderiam estar envolvidas na formação da cápsula polissacarídica, uma vez que o mutante P32H2 apresentou a espessura da cápsula maior em relação ao selvagem R265. A hipótese é de que a inativação do gene pode estar envolvida no aumento da capacidade de formação de biofilme nessa linhagem, visto que tal mutante pode apresentar defeitos na síntese de vesículas e por consequência na estrutura capsular, impactando diretamente na formação de estrutura de biofilme é apenas uma hipótese inicial, mais experimentos serão realizados para comprovar tal teoria.

A disponibilidade de nutrientes é um dos principais determinantes do desenvolvimento celular, também atuam como sinais celulares para regular a atividade de várias vias de sinalização altamente conservadas (Dechant *et al.*, 2014). Nas leveduras a glicose promove o crescimento através da ativação das vias Ras/PKA e TORC1. Ambas são essenciais para a viabilidade celular, uma vez que a inativação delas leva ao crescimento prejudicado. Essas vias estão envolvidas em processos como biogênese do ribossomo, autofagia e resposta geral ao estresse. As vias são ativadas através da ATPase vacuolar (V-ATPase) que interage com duas GTPases distintas, Arf1 e Gtr1, que são necessárias para a ativação de Ras e TORC1 respectivamente (Sengottaiyan *et al.*, 2012; Dechant *et al.*, 2014). Em *Candida albicans* o complexo TORC1 também está relacionado com a regulação da expressão de genes de adesão e formação de biofilme. Essa regulação ocorre via ativação do fator de transcrição *sfp1* que é um repressor do gene necessário para a formação de biofilme (Movahed *et al.*, 2015; Flanagan *et al.*, 2017). Os resultados obtidos para o mutante P31B4 corroboram com dados já descritos na literatura. Foi demonstrado que a linhagem de *C. albicans* mutante para o gene *Gtr1* apresenta aumento nos níveis de formação de biofilme em superfícies plásticas (Flanagan *et al.*, 2017). Em *Saccharomyces cerevisiae* *Gtr1* é um gene codificador para uma GTPase reguladora da ativação do complexo alvo de rapamicina 1 (TORC1) bem como responsável pela sensibilidade à privação de nutrientes. (Heitman *et al.*, 1991) Visto que, em *C. albicans*, TORC1 está relacionado com a regulação negativa do crescimento filamentoso, (Su *et al.*, 2013) bem como na expressão de genes envolvidos na adesão celular e por consequência na formação de

biofilme, (Chen e Lan, 2015) sugerimos que um sistema similar possa ocorrer em *C. gattii*.

4.7 Análise filogenética

Em *C. albicans* a inibição da expressão do gene *ARF2* está relacionada com defeitos no desenvolvimento da forma filamentosa, integridade da parede celular e por consequência atenuação da virulência. Tais características estão relacionadas com alterações no complexo de Golgi (Labbaoui *et al.*, 2017). Em *Aspergillus nidullans*, a proteína ortóloga de Arf2 possui relação com o desenvolvimento hifal através do sistema secretório, sendo sua localização em vesículas derivadas do complexo de Golgi (Lee e Shaw, 2008). Devido ao resultado obtido no trabalho, no qual o mutante de *C. gattii* apresentou alterações na formação de biofilme, hipotetizamos que o gene CNBG_2340, identificado como fator de ribosilação no genoma dessa levedura (tabela 1), representa um homólogo de Arf2 presente em outras espécies de fungos. Realizamos por meio do programa MEGA 7.0, uma análise filogenética das sequências de ortólogos de Arf2 em diversas espécies de fungos. Como representado na figura 11 a sequência de Arf2 apresentou uma maior proximidade filogenética com ortólogos de outras espécies de *Cryptococcus* spp. e de *A. nidulans* (Figura 11). Nossa hipótese é que em *C. gattii* Arf2 esteja participando do sistema secretório, interferindo dessa maneira, na adesão celular e formação de biofilme. Entretanto, experimentos devem ser realizados para a caracterização funcional dessa proteína.

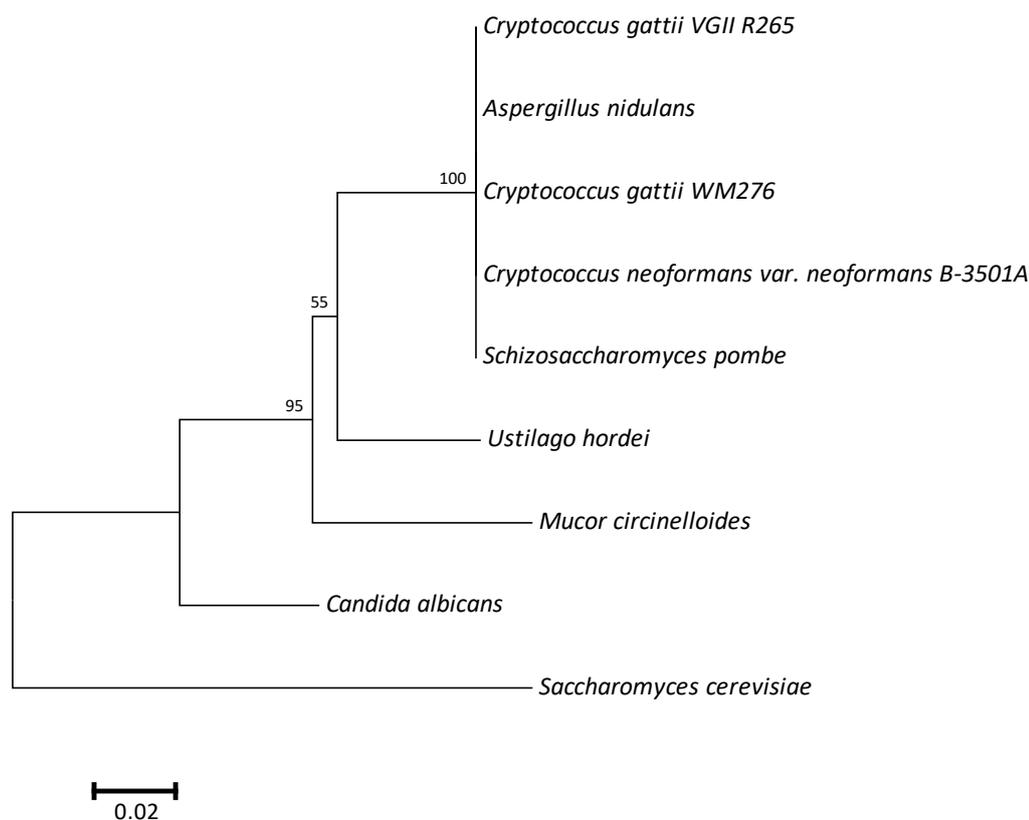


Figura 11: Análise filogenética de Arf2 em diferentes espécies de fungos. A sequência de ARF2 de *C. gattii* linhagem R265 (CNBG_2340) foi utilizada como parâmetro para a busca de ortólogos no genoma de *Aspergillus nidulans* (AN1126), *C. gattii* WM276 (CGB_G2180W), *C. neoformans* B-3501A (CNBG1540), *Schizosaccharomyces pombe* ASM294V2 (SPBC4F6.18C), *Ustilago hordei* Uh364 (CCF54131.1), *Mucor circinelloides* (156501), *C. albicans* SC5314 (C3_04950W) e *S. cerevisiae* S288C (CAA65622). Análise filogenética realizada por meio do método *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987; Li, 2015), com 1000 réplicas de bootstraps. A distância evolutiva calculada utilizando o método de Poisson.

Uma segunda análise filogenética foi realizada por meio da sequência de Gtr1 de *C. gattii*. A comparação foi realizada com ortólogos em diversas espécies de fungos. Tal proteína apresentou uma maior proximidade genética de seu ortólogo em *Schizosaccharomyces pombe* (Figura 12). Curiosamente, apresentando uma maior distância filogenética do ortólogo de outras espécies de *Cryptococcus* spp. Entretanto, a descrição da funcionalidade de Gtr1 em *S. pombe* demonstra seu papel como ativador

da via TORC1, a qual é responsável pela inibição da diferenciação sexual. No mesmo trabalho foi demonstrado que as proteínas Gtr1 e Gtr2 localizam-se nos vacúolos juntamente com TORC1, onde ocorre a ativação dessa via. Apesar dessa via atuar inibindo a diferenciação sexual, possui atividade de indução de crescimento celular (Valbuena *et al.*, 2012). Nossa hipótese é de que Gtr1 de *C. gattii*, assim como em *S. pombe*, possui atividade de ativação da via de TORC1 a qual regula negativamente a formação de biofilme.

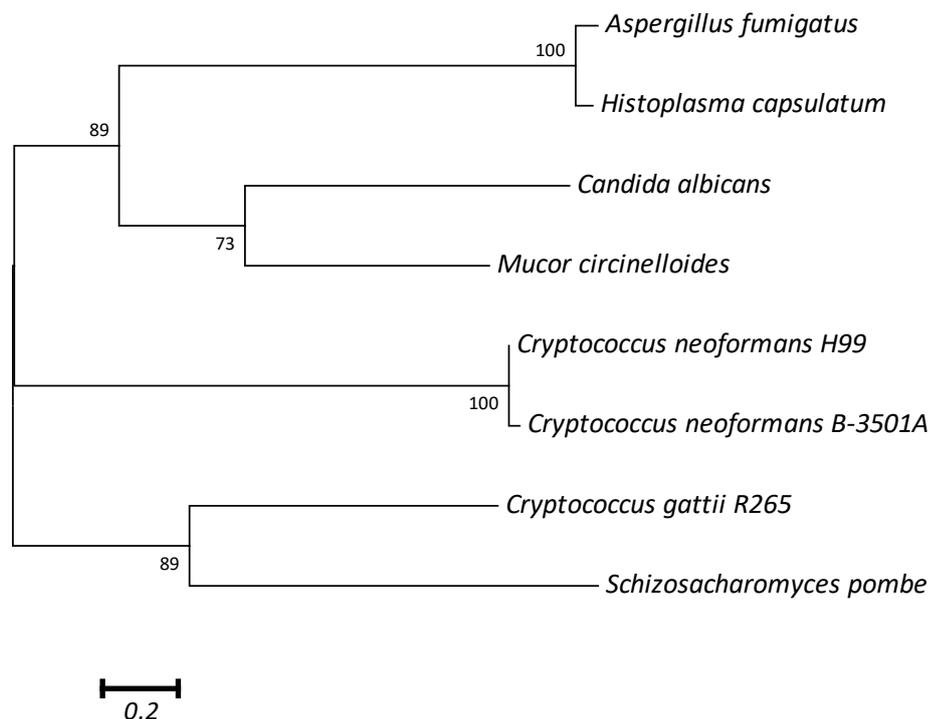


Figura 12: Análise filogenética de Gtr1. A sequência da proteína Gtr1 de *C. gattii* R265 (CNBG_1131) foi utilizada na busca por ortólogos em *Aspergillus fumigatus* (AFUB_057200), *Histoplasma capsulatum* (AGR95_101680), *C. albicans* (C2_08600W_A), *M. circinelloides* (QYA_108427), *C. neoformans* H99 (CNAG_00804), *C. neoformans* B-3501A (CNBA7650) e *S. pombe* (SPBC337.13C). A distância evolutiva calculada utilizando o método de Poisson. Análise filogenética realizada por meio do método *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987; Li, 2015), com 1000 réplicas de bootstraps.

Em *C. albicans*, TORC1 é responsável pela regulação da expressão de genes codificadores para adesinas, atuando na adesão celular em tecidos, formação de biofilme

e virulência dessa levedura(Wei e Zheng, 2011). Também é descrito em *S. cerevisiae* a relação da via de TORC1 com a capacidade adesão(Bojsen *et al.*, 2016). Os trabalhos publicados na literatura, os quais comprovam a relação de via de TORC1 com esse fator de virulência, mais especificamente a ativação da via de TORC1 por Gtr1 e consequente inibição da formação de biofilme, reforçam que o mutante selecionado possui uma maior capacidade de expressão desse determinante devido a deleção gênica de Gtr1. Dessa maneira não ocorrendo a regulação negativa da formação de biofilme.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho buscamos identificar genes que atuam na regulação da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii*, a partir de uma biblioteca de mutantes haploides *ATMT* de R265. A identificação da região de inserção de T-DNA foi realizada em dois mutantes. As análises indicaram que um dos genes inativados codifica para um fator de ribosilação de ADP (ARF). A outra inserção foi identificada próxima ao gene que codifica para a proteína GTR1. ARF1 está envolvido com a regulação de vesículas no complexo de Golgi. Hipotetizamos o possível envolvimento da GTPase ARF1 na alteração da atividade vesicular que influenciaria na formação de biofilme. GTR1 por sua vez, já foi descrito para modelo de *C. albicans* na regulação do fator de transcrição SPF1 que exerce uma regulação negativa sobre o gene inibindo a formação de biofilme. Nossos resultados sugerem que atividade das GTPases possa influenciar no fenótipo para formação de biofilme em *C. gattii*. Porém, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

REFERÊNCIAS

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 55-8, May 2015.

ALSPAUGH, J. A. Virulence Mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genet Biol**, p. 9, 2015 May.

ASLANYAN, L. et al. The Crucial Role of Biofilms in *Cryptococcus neoformans* Survival within Macrophages and Colonization of the Central Nervous System. **Journal of Fungi**. 3: 10 p. 2017.

BENADUCCI, T. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Front Microbiol**, v. 7, p. 290, 2016.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Res**, v. 16, n. 1, p. f0v106, Feb 2016.

BIELSKA, E. et al. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 1556, 04 2018.

BOJSEN, R. et al. A common mechanism involving the TORC1 pathway can lead to amphotericin B-persistence in biofilm and planktonic *Saccharomyces cerevisiae* populations. **Sci Rep**, v. 6, p. 21874, Feb 2016.

BOTTANELLI, F. et al. A novel physiological role for ARF1 in the formation of bidirectional tubules from the Golgi. **Mol Biol Cell**, v. 28, n. 12, p. 1676-1687, Jun 2017.

BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infect**, v. 13, n. 11, p. 895-907, Oct 2011.

CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Cryptococcal Traits Mediating Adherence to Biotic and Abiotic Surfaces. **J Fungi (Basel)**, v. 4, n. 3, Jul 2018.

CASADEVALL, A. et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, p. 1-10, Aug 2018.

CASADEVALL, A.; MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D. Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. **J Immunol Methods**, v. 154, n. 1, p. 27-35, Sep 1992.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J Infect Dis**, v. 184, n. 3, p. 337-44, Aug 2001.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. **J Water Health**, v. 7 Suppl 1, p. S2-S18, 2009.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 332-7, Aug 2003.

CHEN, H. F.; LAN, C. Y. Role of SFP1 in the Regulation of *Candida albicans* Biofilm Formation. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129903, 2015.

COVERT, S. F. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, v. 105, n. 3, p. 259-264, 2001.

DAMBUZA, I. M. et al. The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. **PLoS Pathog**, v. 14, n. 5, p. e1006978, 05 2018.

DECHANT, R. et al. Cytosolic pH regulates cell growth through distinct GTPases, Arf1 and Gtr1, to promote Ras/PKA and TORC1 activity. **Mol Cell**, v. 55, n. 3, p. 409-21, Aug 2014.

DHITINANMUANG, W.; CHONGTRAKOOL, P.; JITMUANG, A. Undiagnosed *Cryptococcus gattii* meningitis leading to subsequent ventriculoperitoneal shunt infection in a patient with symptoms of normal pressure hydrocephalus: case report and literature review. **BMC Infect Dis**, v. 18, n. 1, p. 257, Jun 2018.

DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Microbiol**, v. 63, p. 223-47, 2009.

DONALDSON, J. G.; JACKSON, C. L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 6, p. 362-75, Jun 2011.

DUTRA, F. et al. Warfare and defense: The host response to *Cryptococcus* infection. **Fungal Biology Reviews**, v. 32, p. 35-51, 2017.

EISENMAN, H. C. et al. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 12, p. 3860-7, Dec 2009.

ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e180057, 2018.

FARRER, R. A. et al. Transcriptional Heterogeneity of. **mSphere**, v. 3, n. 5, Oct 2018.

FEDER, V. et al. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **FEBS J**, v. 282, n. 8, p. 1406-18, Apr 2015.

FINDRA SETIANINGRUM¹, RIINA RAUTEMAA-RICHARDSON^{1,3,4,*}; AND DAVID W. DENNING^{1, 5}. **Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects**. *Medical Mycology*. Oxford University Press on behalf of The International Society for Human and Animal Mycology 2018.

FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. Galleria mellonella model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014.

FLANAGAN, P. R. et al. The. **mSphere**, v. 2, n. 6, 2017 Nov-Dec 2017.

FRASER, J. A. et al. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 5, p. 1036-45, Oct 2003.

FU, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS Pathog**, v. 14, n. 6, p. e1007144, Jun 2018.

GILES, S. S. et al. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2005.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 16-48, May 2015.

HEITMAN, J.; MOVVA, N. R.; HALL, M. N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 905-9, Aug 1991.

HUSTON, S. M. et al. *Cryptococcus gattii* Capsule Blocks Surface Recognition Required for Dendritic Cell Maturation Independent of Internalization and Antigen Processing. **J Immunol**, v. 196, n. 3, p. 1259-71, Feb 2016.

IDNURM, A. et al. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 2, p. 420-9, Apr 2004.

JESUS, M. D. et al. Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 500-8, 2010 Nov-Dec 2010.

JORJÃO, A. L. et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 01 2018.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011a.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, v. 33, n. 7, p. 1870-4, 07 2016.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p. a019760, Jul 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132> >.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 574-87, Jun 2006.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 55, n. 8, p. 1751-4, Aug 1987.

LABBAOUI, H. et al. Role of Arf GTPases in fungal morphogenesis and virulence. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 2, p. e1006205, 02 2017.

LEE, S. C.; SHAW, B. D. Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 283, n. 2, p. 216-22, Jun 2008.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Front Microbiol**, v. 7, p. 105, 2016.

LI, J. F. A fast neighbor joining method. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 3, p. 8733-43, Jul 2015.

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

LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single- and multi-species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19, 2017-10-03 2017.

LOPES, W. et al. Geometrical Distribution of. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2534, 2017.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6350-62, Oct 2005.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1021-33, Mar 2006.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 14, p. 4592-601, Jul 2007.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 3, Jun 2015.

MARTINEZ, L. R.; MOUSSAI, D.; CASADEVALL, A. Antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan inhibits the release of capsular antigen. **Infect Immun**, v. 72, n. 6, p. 3674-9, Jun 2004.

MAY, R. C. et al. Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 106-17, 02 2016.

MAYER, F. L.; SÁNCHEZ-LEÓN, E.; KRONSTAD, J. W. A chemical genetic screen reveals a role for proteostasis in capsule and biofilm formation by. **Microb Cell**, v. 5, n. 11, p. 495-510, Oct 2018.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, Mar 2016.

MEYER, W. Cryptococcus gattii in the Age of Whole-Genome Sequencing. **MBio**, v. 6, n. 6, p. e01761-15, Nov 2015.

MEYER, W. et al. 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**, v. 20, n. 8, p. 1790-9, Jun 1999.

MORANOVA, Z. et al. The CRZ1/SP1-like gene links survival under limited aeration, cell integrity and biofilm formation in the pathogenic yeast Cryptococcus neoformans. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 158, n. 2, p. 212-20, Jun 2014.

MOVAHED, E. et al. Genome-Wide Transcription Study of Cryptococcus neoformans H99 Clinical Strain versus Environmental Strains. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137457, 2015.

NIMRICHTER, L. et al. Self-aggregation of Cryptococcus neoformans capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 8, p. 1400-10, Aug 2007.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3519-28, Nov 2006.

NOSANCHUK, J. D. et al. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. **Commun Integr Biol**, v. 1, n. 1, p. 37-39, 2008.

OLIVEIRA, D. L. et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infect Immun**, v. 78, n. 4, p. 1601-9, Apr 2010.

OLIVEIRA, D. L. et al.. Where do they come from and where do they go: candidates for regulating extracellular vesicle formation in fungi. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 5, p. 9581-603, May 2013.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **Am J Pathol**, v. 174, n. 3, p. 932-43, Mar 2009.

PACZKOWSKI, J. E.; FROMME, J. C. Analysis of Arf1 GTPase-Dependent Membrane Binding and Remodeling Using the Exomer Secretory Vesicle Cargo Adaptor. **Methods Mol Biol**, v. 1496, p. 41-53, 2016.

PATIÑO-MEDINA, J. A. et al. Control of morphology and virulence by ADP-ribosylation factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. **Curr Genet**, v. 64, n. 4, p. 853-869, Aug 2018.

PONTES, B.; FRASES, S. The *Cryptococcus neoformans* capsule: lessons from the use of optical tweezers and other biophysical tools. **Front Microbiol**, v. 6, p. 640, 2015.

SINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infect Dis**, May 2017.

REUWSAAT, J. C. V. et al. A Predicted Mannoprotein Participates in. **mSphere**, v. 3, n. 2, 04 2018.

RODRIGUES, J. et al. Pathogenic diversity amongst serotype C VGIII and VGIV *Cryptococcus gattii* isolates. **Sci Rep**, v. 5, p. 11717, Jul 2015.

RODRIGUES, M. L.; CASADEVALL, A. A two-way road: novel roles for fungal extracellular vesicles. **Mol Microbiol**, v. 110, n. 1, p. 11-15, Oct 2018.

OLIVEIRA, D. L. et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 1, p. 48-59, Jan 2007.

OLIVEIRA, D. L. et al.. Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? **Lipid Insights**, v. 2, p. 27-40, Aug 2008.

ROSA E SILVA, L. K. et al. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Res Microbiol**, v. 159, n. 3, p. 221-9, Apr 2008.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, n. 4, p. 406-25, Jul 1987.

SANTIAGO-TIRADO, F. H. et al. Trojan Horse Transit Contributes to Blood-Brain Barrier Crossing of a Eukaryotic Pathogen. **MBio**, v. 8, n. 1, 01 2017.

SENGOTTAIYAN, P. et al. The intrinsic GTPase activity of the Gtr1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Biochem**, v. 13, p. 11, Jun 2012.

SHEPPARD, D. C.; HOWELL, P. L. Biofilm Exopolysaccharides of Pathogenic Fungi: Lessons from Bacteria. **J Biol Chem**, Apr 2016.

SORRELL, T. C. et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes Infect**, v. 18, n. 1, p. 57-67, Jan 2016.

SQUIZANI, E. D. et al. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. **Cell Microbiol**, v. 20, n. 2, Feb 2018.

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

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. **Microbes Infect**, v. 5, n. 7, p. 667-75, Jun 2003.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-9, Aug 2007.

SU, C.; LU, Y.; LIU, H. Reduced TOR signaling sustains hyphal development in *Candida albicans* by lowering Hog1 basal activity. **Mol Biol Cell**, v. 24, n. 3, p. 385-97, Feb 2013.

TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Curr Opin Microbiol**, v. 34, p. 67-74, 12 2016.

TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. Capsule Enlargement in. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1423, 2017.

VALBUENA, N.; GUAN, K. L.; MORENO, S. The Vam6 and Gtr1-Gtr2 pathway activates TORC1 in response to amino acids in fission yeast. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 8, p. 1920-8, Apr 2012.

VARTIVARIAN, S. E. et al. Localization of mannoprotein in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 171, n. 12, p. 6850-2, Dec 1989.

VECCHIARELLI, A. et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1107-16, Sep 2013.

WEI, Y.; ZHENG, X. F. Nutritional control of cell growth via TOR signaling in budding yeast. **Methods Mol Biol**, v. 759, p. 307-19, 2011.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2043-57, Oct 2008.

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 409-13, Aug 2013.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 1, p. 1-10, Oct 2004.

APÊNDICE

Sequências

P32H2_Borda esquerda

GSCCCGGGCGTTAATMAGTACATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGT
TGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCTCAAAGGTTTGGTGG
TGGAGGAAATAAATGATCGGCAGAGCGCCACCAAGGCGGGATTATTGGAA
CTCCGACGCGCGGGCGGTGGCTCGCCCTCCATGATGCACGCCACGTCCATCG
TCCCTCTCAAATACTGTACGTAGTAATATCAACCCCTTCTTCAGTTCCATCG
TATCTCCTACTCTATAGCATCACACAAAATCAGTAGAAACAATGGGTCTTT
CTGTCTCCAAGCTCCTCAACGGCCTCTTCGGCAAGAAGGAGATGCGTGCGT
AAAAATCGCCTTCGCCTGACTGTTCA TGCTCTTGACGTGTCATTCGCTCCCG
CTCACTCTGATGTTCACTTTTCAGGAATCCTTATGGTTCGGTCTCGATGCTGC
TGGTAAAACAACCATCCTTTACAAGCTTAAGCTCGGTGAGATTGTCACCAC
TATCCCTACCATTTGGTGAGTGAAGTATTACTCGAACGTTGTTTATGTGCACG
CGACTCATCTTCTTAGGCTTCAATGTGGAAACGGTTCGAGTACAAGAACATT
TCTTTCACAGTCTGGGATGTGGGAGGACAGGATAAGATTTCGACCCTTGTGG
AGGCATTGTAAGTTTTTTCCAGATCTAGAGAAGAGGAGGGTGAATAAATTT
GAGGAACGGTAGGGTAGTGGGAACAAAAAGTGGAGGGGTGAGGGATCAA
ACACTGATAGTTTAAACTGAAGCGGGAAACGACATCTGATCCAAGCTCAAG
CTCATTTTCGCCATTCMAGGCTGSCGCAACTGGWKAGGAGAGAAAAAAAAA
A

P32H2-Borda direita

GGATCCKGARCTGGATMGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACTATCA
GTGTTTGATCCCTCACCCCTCCACTTTTTGTTCCCACTACCCTACCGTTCCTC
AAATTATTCACCCTCCTCTTCTCTAGATCTGGAAAAAACTTACAATGCCTCC
ACAAGGGTTCGAATCTTATCCTGTCCTCCCACATCCCAGACTGTGAAAGAAA
TGTTCTTGTACTCGACCGTTTCCACATTGAAGCCTAAGAAGATGAGTCGCGT
GCACATAAACAACGTTTCGAGTAATACTTCACTCACCAATGGTAGGGATAGT
GGTGACAATCTCACCGAGCTTAAGCTTGTAAGGATGGTTGTTTTACCAGC
AGCATCGAGACCGACCATAAGGATTCCTGAAAAGTGAACATCAGAGTGAG
CGGGAGCGAATGACACGTCAAGAGCATGAACAGTCAGGCGAAGGCGATTT
TTACGCACGCATCTCCTTCTTGCCGAAGAGGCCGTTGAGGAGCTTGGAGAC
AGAAAGACCCATTGTTTCTACTGATTTTGTGTGATGCTATAGAGTAGGAGA
TACGATGGAACCTGAAGAAGGGGTTGATATTACTACGTACAGTATTTGAGAG
GGACGATGGACGTGGCGTGCATCATGGAGGGCGAGCCACCGCCGCGCGTC
SGAGTTCCAATAATCCCGCCTTGGTGGCGCTCTGCCGATCATTTATTTCTC
CACCACCAAACCTTTGAGGATATATTGTGGTGTAACAAAWTTGACGCTTA
GACAACCTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACGCCG
AAATTGCTCTAGCCATACGCAAACCCGCTCTAGAGAGGGCAWAAACAAA
A

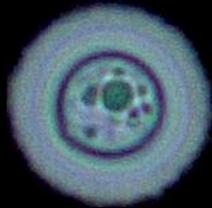
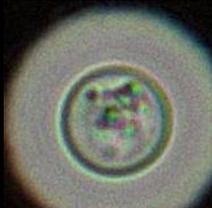
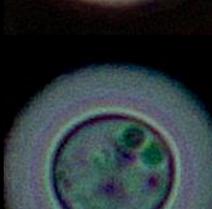
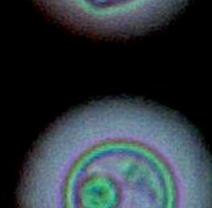
P31B4_Borda esquerda

CTKGGGSSGTWATTMGTACATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTAATCATACA
CGAACGGGGAGATTAGGAGGATGGYAAAKGTACAGATAATGTAGCATCGT
TGTGTTTTTATGTTATGASATTTCACTGGCMATACAAACAATATCAATTACT
AATGATACWGTAAAACGAAACCCCACTTTCGCAGGCAGAGACCAA AKGAK
CACTCKAC

P31B4_Borda direita

AGAAWWMYTKRRMCTTGGAWMGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAAC
TATCAGTGTTTGAATCCACTGATTCCCTAGTTTTTCTCTAGTTTTTTCCATAG
TGACCTCAGWCCAACCTCAACCGCCTACCAATTACTACCAATCAAGCAGAA
CATCTCGCTCCGGTGCTTGGCTGCATTAATGGTGCGTCTTCTTTATCTACCG
AATCCCATGCTGGCACACTTGGGTCGTCTTCGTCTTTGCACACATACCTCGT
TTTTGCATCGCGTTTGCATATCCTAAATTAACCGACCATTAGCCTTTTAT
TTCATTTTATTTTCATTAACCCCTGTCTATTTCTTCCCCGGCCACAYACTC
TCTCTTCTTTTCAAGGACCGAGACAGAGATGCAAGATCAAAACATAGAAAC
GTATAACTTACCCACACTTTCTCTCCARC

Tabela Geral

Mutantes	Formação de biofilme (570 nm)	Urease (560 nm)	Capsula Tamanho relativo	GXM ($\mu\text{g GXM}/10^6$ cell)	Índice de fagocitose (CFU)	Taxa de replicação intracelular - IPR	Curva de sobrevivência	LM
R265	0,507	0,5363	1,88	0,02392	14098	1,22	216	
P31B4	2,344	0,6705	1,68	0,02179	15298	1,609	288	
P31F2	2,481	0,5763	2,39	0,02384	5933	1,242	288	
P32H2	2,601	0,697	1,96	0,01405	7796	0,7742	192	
P35A1	1,599	0,5981	1,74	0,01614	2822	1,257	192	
P37F1	2,818	0,5212	1,87	0,05615	1449	1,325	240	

CURRICULUM VITAE

Chitolina, G.Z.

1. DADOS PESSOAIS

Nome completo: Gabriela Zottis Chitolina

Local e data de Nascimento: Tuparendi-RS 17 de janeiro de 1988

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Faculdade de Veterinária.

Av. Bento Gonçalves, 8824 (CDPA)

Agronomia 91540-000 – Porto Alegre, RS – Brasil

Telefone (51) 33086130 E-mail: gabriela_zottis@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

Graduação em Ciências Biológicas- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Brasil – (2014).

Curso técnico profissionalizante de biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS – (2008).

3. ESTÁGIO

Período: 04/2014 até 06/2014

Local: Complexo Santa Casa – Hospital Dom Vicente Scherer

Responsável: Ivana Gottardo Rocha

Atividades: Participar das atividades de rotina do laboratório no controle de qualidade de equipamentos de esterilização de alimentos do hospital

Período: 06/2013 até 08/2013

Local: Cento de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – Faculdade de Veterinária - UFRGS Responsável: Carlos Tadeu Pippi Salle

Atividades: Participar da rotina do laboratório acompanhando necropsias e auxiliando nos exames bacteriológicos, histopatológicos e moleculares.

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

HERPICH, J.I. ; **CHITOLINA, G. Z.** ; GAVA, M. S. ; MORAES, L.B. ; FURIAN, T.Q. ; BORGES, K.A. ; FORTES, F. B. B. ; MORAES, H. L. S. ; SALLE, C.T.P. . Characterization of Immune and Enteric Systems of Broilers after Imunosupression with Dexamethasone. ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE (ONLINE) **JCR**, v. 46, p. 1, 2018.

CARVALHO,D; MORAES, L.B. ; **CHITOLINA, G. Z.** ; HERPICH, J.I. ; OSORIO, F. S. ; FALLAVENA, L. C. B. ; MORAES, H. L. S. ; SALLE, C.T.P. . Evaluation of thymic lymphocyte loss of broiler using Digital Analysis of the Lymphoid Depletion System (ADDL). Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso) **JCR**, v. 36, p. 652-656, 2016.

GAVA, MS; MORAES, LB; CARVALHO, D; **CHITOLINA, GZ**; FALLAVENA, LCB; MORAES, HLS; HERPICH, J; SALLE, CTP. Determining the Best Sectioning Method and Intestinal Segment for Morphometric Analysis in Broilers. Revista Brasileira de Ciência Avícola **JCR**, v. 17, p. 145-149, 2015.

EMERY, BD; FURIAN, TQ; **CHITOLINA, GZ** ; PILATTI, RM ; BORGES, KA ; SALLE, CTP ; MORAES, HLS . Establishment of a Pathogenicity Index for Mice to Pasteurella multocida Strains Isolated from Poultry and Swine. REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA AVÍCOLA , v. 20, p. 237-244, 2018.

EMERY, B.D. de; FURIAN, T.Q.; PILLATI, R.M. ; **CHITOLINA, G.Z.** ; BORGES, K.A. ; SALLE, C.T.P. ; MORAES, H.L.S. . Evaluation of the biofilm formation capacity of Pasteurella multocida strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity. PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE), v. 37, p. 1041-1048, 2017.

WILSMANN, D.; CARVALHO, D.; MARTINS, A.; **CHITOLINA, G.Z.**; FURIAN, T.Q.; NASCIMENTO, V.P. Evaluation of the efficacy of electrochemically activated water against Salmonella Heidelberg isolates. In: International Poultry Scientific Forum, 2018, Atlanta. 2018 International Poultry Scientific Forum - Abstracts, 2018. v. 1. p. 6-6.

EMERY, B.D. de; FURIAN, T.Q.; NASCIMENTO, V.P.; **CHITOLINA, G.Z.**; BORGES, K.A. Evaluation of the biofilm formation capacity of Pasteurella multocida strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity. In: International Poultry Scientific Forum, 2018, Atlanta. 2018 International Poultry Scientific Forum Abstracts, 2018. v. 1. p. 69-69.