

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA
DE *CRYPTOCOCCUS GATTII* À TEMPERATURA DE INFECÇÃO**

Dissertação de Mestrado

Juliana Ferraz de Correa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein

Co-orientador: Prof. Dr. Augusto Schrank

Porto Alegre, agosto de 2012.

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

Apoio: CAPES, CNPq e FINEP

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Marilene Vainstein, por me acompanhar e orientar em mais uma etapa de minha formação profissional, pelo apoio e compreensão quanto às minhas decisões e confiança em meu comprometimento e responsabilidade quanto ao desenvolvimento deste projeto.

À Claudinha, Cláudia Bemfica, pelos momentos de descontração e por toda a ajuda em diversas situações.

À Lívia e ao Charley pela paciência e disponibilidade nas tantas vezes que discutimos dados, resultados e experimentos.

À Natully pela ajuda com os *primers* e execução inicial dos experimentos de RT-PCR.

À Vanessinha, Vanessa Barcelos, pelas incontáveis horas que dispôs de seu tempo para me ajudar no mundo dos RNAs!

À Juli, Juliana Crestani, que foi parte importante no início do desenvolvimento deste projeto e por todas as dicas e auxílio com a proteômica.

À Josi, responsável pelas análises de espectrometria de massas, pela doçura e a forma sempre atenciosa e gentil de resolver as coisas e fornecer os dados.

À minha chefe, Loreci Portal, pelo apoio, autorizando a flexibilidade de meu horário de trabalho para que fosse possível cursar disciplinas e concluir experimentos.

Aos meus familiares por acreditarem sempre, muitas vezes mais que eu mesma, no meu potencial e o apoio incondicional no alcance a esta meta.

Aos meus amigos por compartilhar dos bons momentos, me proporcionar tantas alegrias e dividir o peso das angústias dando força e alento para nunca desistir.

E finalmente ao meu marido, amor, amigo, companheiro, Marcelo, pela infinita paciência com meus frequentes altos e baixos, pela força, o estímulo, por me ajudar a não ser tão estressada e levar as coisas de uma forma mais leve e por compartilhar de ideais, objetivos e caráter.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Aspectos Gerais	8
1.2 <i>Cryptococcus gattii</i>	10
1.2.1 Ecologia e epidemiologia.....	10
1.2.2 Fatores de virulência	13
1.2.2.1 A cápsula polissacarídica	15
1.2.2.2 O pigmento melanina.....	19
1.2.2.3 O desenvolvimento à temperatura de infecção.....	20
1.2.3 A infecção por <i>Cryptococcus gattii</i> e sua interação com o Hospedeiro .	22
1.3 Eletroforese bidimensional na análise proteômica	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. MANUSCRITO CIENTÍFICO	32
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69
6. REFERÊNCIAS.....	70
7. CURRICULUM VITAE.....	78

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

ACN - acetonitrila

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

cm - centímetros

CO₂ - dióxido de carbono

DNA - ácido desoxirribonucléico

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

GXM - glicuronoxilomanana

GalXM - galactoxilomanana

h - hora

Hz - hertz

HIV - vírus da imunodeficiência humana

kDa – quilodalton

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

M - molar

mM - milimolar

μM - micromolar

mL - mililitros

μL - microlitros

mg/mL - miligramas por mililitro

μg - microgramas

min - minutos

μm - micrômetros

MS - espectrometria de massas

nm - nanômetros

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

PMSF - fluoreto de fenilmetil sulfonil

qRT-PCR – reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real

°C - graus Celsius

RDA - análise da Diferença Representacional

RNA - ácido ribonucleico

rpm - rotações por minuto

RT-MMLV – transcriptase reversa do vírus da leucemia Maloney de camundongos

RT-PCR – reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SDS - dodecil sulfato de sódio

TPCK - N- tosil -1 fenilalanina-clorometil cetona

Var - variedade

Vh - volts hora

2DE - eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

RESUMO

Cryptococcus gattii é uma levedura basidiomicética que possui uma cápsula polissacarídica robusta e é um dos agentes etiológicos da criptococose. A linhagem R265 de *C. gattii* foi responsável pelo surto de criptococose na Ilha de Vancouver e há vários estudos indicando sua dispersão e ocupação de novos nichos ecológicos. Fatores de virulência bem caracterizados deste patógeno incluem: a capacidade de sintetizar o pigmento antioxidante melanina, a produção de uma cápsula polissacarídica antifagocíticas e a capacidade de sobreviver e proliferar a 37°C. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi identificar proteínas envolvidas na resposta da linhagem R265 de *C. gattii* à variação de temperatura experimentada quando o fungo deixa o ambiente para sobreviver no hospedeiro, usando análise *in vitro* e proteômica comparativa. Nossos dados demonstram que as proteínas com expressão aumentada a 25°C atuam principalmente em processos metabólicos de proteínas, carboidratos, lípidios, ácidos orgânicos e aminoácidos e que as proteínas com expressão aumentada a 37°C, em sua maior parte, participam de processos que incluem fosforilação, metilação, processos catabólicos de corpos cetônicos, GTP e ATP e processos metabólicos de nucleosídeos. A diferença mais notável entre as condições testadas é a predominância, no desenvolvimento de *C. gattii* a 25°C, de proteínas envolvidas em processos de oxirredução e a presença de um número considerável de proteínas envolvidas na resposta ao stress e em processos catabólicos no desenvolvimento a 37°C. Em suma, o presente estudo é a primeira análise proteômica a fornecer informação sobre proteínas reguladas pela variação de temperatura e a primeira descrição da resposta da linhagem hipervirulenta R265 de *C. gattii* à esta condição. As proteínas identificadas podem ser alvos para novos estudos na identificação de proteínas-chave para o desenvolvimento do fungo a 37°C e para a pesquisa de biomarcadores que podem contribuir para o tratamento e prevenção da criptococose causada por este patógeno.

ABSTRACT

Cryptococcus gattii is a basidiomycetous yeast which has a robust polysaccharide capsule and is one of the etiological agents of cryptococcosis. The R265 strain of *C. gattii* was responsible for the Vancouver Island outbreak and there are various studies including their dispersal and occupation of new ecological niches. Well-characterized virulence factors of this pathogen include: the ability to synthesize the antioxidant pigment melanin; the production of an antiphagocytic polysaccharide capsule; and the ability to survive and proliferate at 37°C. In this sense, the objective of this study was identified proteins involved in the response of *C. gattii* strain R265 to the temperature variation experimented when the fungi leaves the environment to survive in the host, using *in vitro* analysis and comparative proteomics. Our data demonstrated that the proteins up-regulated at 25°C act mainly in protein, carbohydrate, lipid, organic acid and amino acid metabolic processes and proteins up-regulated at 37°C participate mostly in processes that include phosphorylation, methylation, ketone body, GTP and ATP catabolic process and nucleoside metabolic process. The most striking difference between the conditions tested is the prevalence of proteins involved in oxidation-reduction in *C. gattii* growth at 25°C and the presence of a relevant number of proteins involved in stress response and catabolic process in *C. gattii* growth at 37°C. In brief, this study is the first proteomic analysis to provided information about proteins regulated by the infection temperature and the first description of the response of *C. gattii* high virulent strain R265 to this condition. The proteins identified could be targets to further studies for the identification of key proteins for the development at 37°C and to the search for biomarkers that can contribute to the treatment and prevention of cryptococcosis caused by this pathogen.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

O gênero *Cryptococcus* compreende 70 espécies descritas apenas na fase anamorfa, a maioria saprófita, distribuídas nos cinco continentes e encontradas em uma ampla variedade de habitats incluindo águas salinas e em locais como a Antártida e o Himalaia. Algumas destas espécies, as leveduras patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, são classificadas na forma teleomorfa, *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillisporus*, respectivamente, e estão incluídas no Complexo de Espécies *Cryptococcus*. Essas espécies apresentam maior destaque por serem os principais agentes etiológicos da criptococose, embora, mais raramente, também se encontrem relatos de espécies como *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* ocasionando essa infecção (Khawcharoenporn *et al*, 2007).

A criptococose é uma micose sistêmica que acomete o homem e vários outros mamíferos, sendo uma das infecções fúngicas mais prevalentes afetando o sistema nervoso central. Há alguns anos, quando se pensava em criptococose, logo se associava sua ocorrência à espécie *C. neoformans*, considerando que menos de 1% dos casos dessa doença era ocasionado por *C. gattii*. Porém, esse panorama foi modificado após a epidemia causada por *C. gattii* nas ilhas Vancouver, Canadá (Kidd *et al.*, 2004) e, desde 1999, essa espécie que era pouco estudada passou a ser amplamente citada na literatura e objeto de vários estudos, incluindo ainda sua dispersão e ocupação de novos nichos ecológicos (Nicol *et al.*, 2008; Byrnes & Heitman, 2009; Dixit *et al.*, 2009; MacDougall *et al.*, 2007).

Uma combinação de estudos moleculares (Meyer *et al.*, 1999; Boekhout *et al.*, 2001; Latouche *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2003) agruparam as linhagens mundialmente obtidas do Complexo *Cryptococcus* em oito tipos moleculares distintos: VNI e VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A); VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo D); VNIII (híbrido, sorotipo AD); e VGI, VGII, VGIII e VGIV, todos correspondentes aos sorotipos B e C (*C. gattii*), indicando uma

evolução de forma independente em paralelo. Estudos recentes propõem ainda um tipo molecular separado, VNB, para a linhagem isolada em Botswana (Litvintseva *et al.*, 2006). Essa classificação quanto ao tipo molecular pode ser observada esquematicamente na Figura 1.

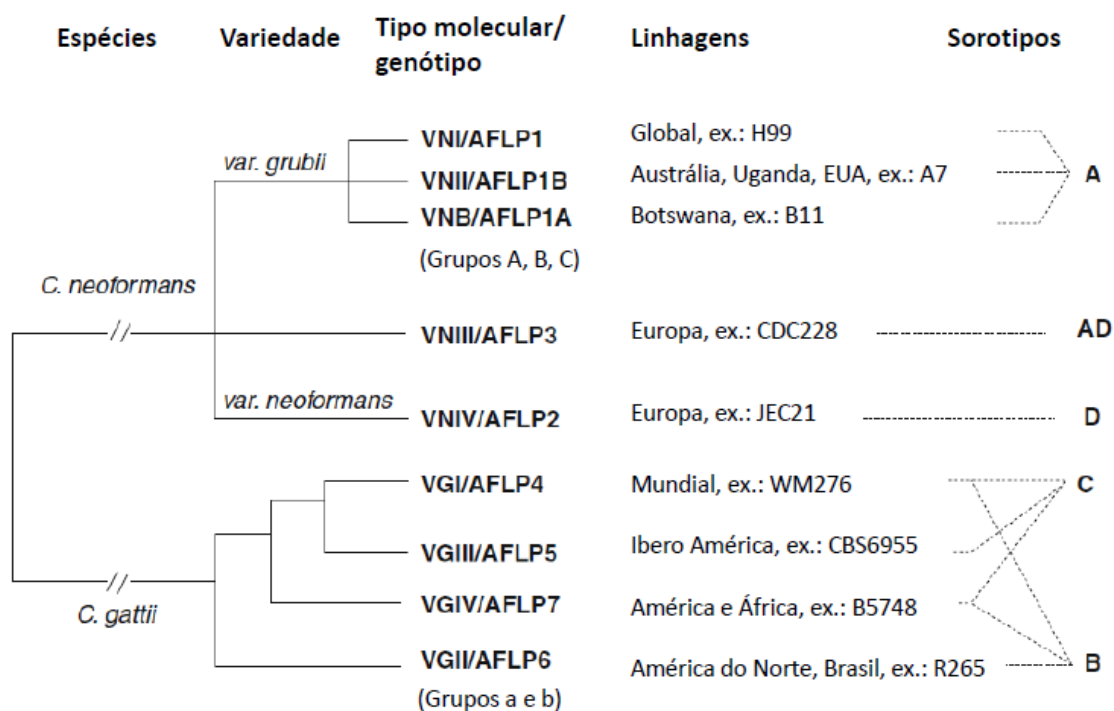


Figura 1. Filogenia das espécies do Complexo *Cryptococcus*. Para *C. neoformans*, duas linhagens monofiléticas, correspondentes às variedades *grubii* e *neoformans*, estão claramente presentes juntamente com a população híbrida. Dentro de *C. neoformans*, os sorotipos correspondem aos genótipos. Para *C. gattii*, quatro linhagens monofiléticas são encontradas, mas neste grupo sorotipos e genótipos não necessariamente se correlacionam um com o outro. Adaptada de Ma & May, 2009.

1.2 *Cryptococcus gattii*

1.2.1 Ecologia e epidemiologia

C. gattii foi inicialmente isolado em amostras de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália, sendo autóctone dessa região, e por algum tempo pensou-se que este seria exclusivamente o habitat desse fungo. Algumas décadas se passaram e ficou claro que cavidades em decomposição em troncos e galhos de várias espécies de árvores são o habitat preferencial deste fungo, bem como de várias espécies do gênero *Cryptococcus* distribuídas ao redor do mundo (Ellis & Pfeiffer, 1990; Sorrel *et al.*, 1996; Chaturvedi & Chaturvedi, 2011). Além de árvores, foi encontrado também no ar, no solo e em corpos de água em áreas densamente infestadas (Kidd *et al.*, 2007). Uma observação relevante é a de que *C. gattii* não foi encontrado com regularidade em excretas de aves, conhecido como nicho ecológico de *C. neoformans*. Nesse substrato, *C. gattii* demonstra-se incapaz de completar o ciclo sexual, sendo esta uma característica diferencial importante entre essas duas espécies (Nielsen *et al.*, 2007).

C. gattii era considerado restrito a regiões de clima tropical e subtropical até a ocorrência da epidemia ocasionada por este patógeno nas Ilhas Vancouver no Canadá, região de clima temperado (Kidd *et al.*, 2004). Como pode ser observado na Figura 2, o estudo de Springer & Chaturvedi (2010) constatou a presença de isolados de *C. gattii* em regiões que vão bem além dos trópicos.

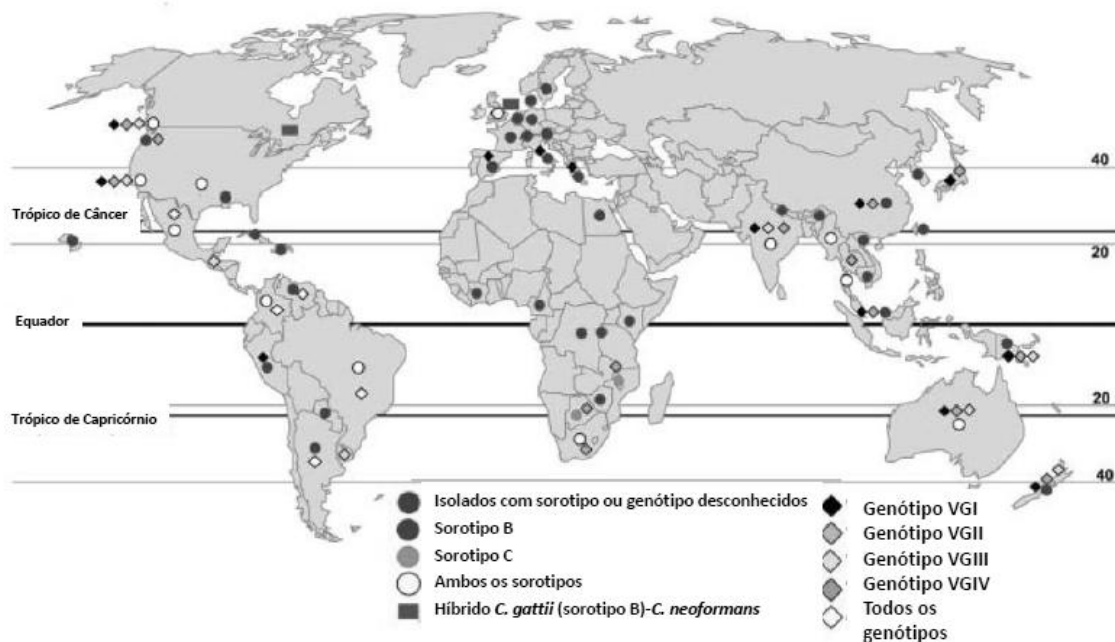


Figura 2. Distribuição de isolados de *C. gattii* de origem clínica humana, veterinária e ambiental. Círculos indicam informação de sorotipos, losangos indicam informação de genótipos e retângulos indicam híbridos entre *C. gattii* e *C. neoformans*. Relatórios e pesquisas são inconsistentes e várias áreas entre regiões com isolados positivos compartilham espécies de árvores e condições climáticas podendo abrigar o patógeno. Dessa forma, é possível que *C. gattii* esteja mais amplamente distribuído do que o documentado. Figura extraída de Springer & Chaturvedi, 2010.

A mudança na epidemiologia de *C. gattii* é provavelmente consequência de alterações na ecologia e biologia do fungo e ilustra seu potencial em causar doenças sérias ao homem. Estudando relações filogenéticas entre as espécies do Complexo *Cryptococcus*, Ngamskulrungraj *et al.* (2009) constataram que o clado VGII, responsável pela epidemia em Vancouver, foi o único que apresentou clara evidência de recombinação em todos os testes realizados. Eventos frequentes de recombinação na população global desse clado poderiam explicar a capacidade desse genótipo de se adaptar a novas condições ambientais expandindo seu nicho ecológico, como no caso da epidemia em Vancouver. Kidd *et al.* (2004)

sugeriram que o clima temperado de Vancouver pode proporcionar um nicho favorável à sobrevivência e dispersão de *C. gattii*, assim como também o aquecimento global poderia favorecer sua colonização em novas regiões geográficas.

Por acometer majoritariamente indivíduos imunocompetentes, *C. gattii* é considerado um patógeno primário. Porém, há alguns relatos nas últimas décadas de pacientes imunocomprometidos infectados por esse patógeno, na maioria dos casos pacientes HIV – positivos (Muyembe Tamfum *et al.*, 1992; Bodasing *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, *C. gattii* era pouco estudado já que a infecção por este microrganismo compreendia menos de 1% dos casos de criptococose no mundo (Ma & May, 2009). Mesmo em áreas onde *C. gattii* é endêmico, como na Austrália, a taxa de infecção era de 0,94 casos por milhão de residentes por ano (Chen *et al.*, 2000; Sorrel, 2001). No entanto, a epidemia de criptococose causada por *C. gattii* estimulou a realização de um maior número de estudos sobre esta espécie. Essa epidemia foi inicialmente notada em 1999 na Ilha de Vancouver, British Columbia, Canadá. Entre 2002 e 2006, a média anual de incidência de criptococose foi de 6,5 casos por milhão em British Columbia e 27,9 casos por milhão nas Ilhas Vancouver (BC Centre for Disease Control, 2007). O número de casos notificados por ano atingiu um patamar na Ilha de Vancouver em 2002, mas aumentou no continente desde 2005 (Galanis & MacDougal, 2010).

Na epidemia, não foi constatada variação na incidência de criptococose de acordo com os meses ou estações do ano e observou-se uma maior predisposição à infecção entre pacientes com idade mais avançada, especialmente na faixa etária entre 70 e 79 anos (Galanis & MacDougal, 2010). Foi relatada ainda, uma incidência duas a três vezes maior de criptococose em casos veterinários que em seres humanos (Lester *et al.*, 2004).

1.2.2 Fatores de virulência

As infecções fúngicas podem ser consideradas como um pequeno desvio no ciclo natural de alguns fungos, os quais, na maioria das vezes, necessitam de determinantes que possibilitem seu desenvolvimento no hospedeiro. Estes determinantes são fatores de virulência, características que propiciam ao microrganismo transpor as defesas do indivíduo infectado (Rosa e Silva *et al.*, 2008).

A Tabela 1 apresenta uma série de fatores de virulência de *C. gattii* e suas funções correspondentes.

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

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

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

1.2.2.1 A cápsula polissacarídica

A cápsula, evidenciada na Figura 3 através de coloração com tinta da Índia, é composta principalmente pelos polissacarídeos glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), contendo aproximadamente 90-95% de GXM e 5-10% de GalXM (Rakesh *et al.*, 2009). A GXM é um polímero de grandes dimensões que determina o sorotipo de *C. neoformans* e *C. gattii* e isso é possível porque as diferentes estruturas da cápsula podem ser distinguidas por diferentes anticorpos. A GalXM é uma galactana de tamanho muito menor que GXM. Além disso, uma série de manoproteínas foram identificadas na cápsula de *Cryptococcus spp.*, compreendendo menos de 1% da estrutura capsular.

A cápsula atua como uma barreira física que interfere no processo de fagocitose e alguns dos seus componentes inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e inativam componentes do sistema complemento, dificultando a ação do sistema imune do hospedeiro. Além da função de evasão do sistema imune, a cápsula confere proteção contra a desidratação no ambiente (Bose *et al.*, 2003; Idnurm *et al.*, 2005).

As manoproteínas presentes na cápsula, quando manossiladas ou glicosiladas, agem como antígenos criptocócicos promovendo a ativação e maturação de células dendríticas, sendo responsáveis pelo estímulo da resposta de células-T. Já a GXM promove o evento contrário, inibindo essa resposta, bem como, a migração de leucócitos a sítios de inflamação (Ma & May, 2009).

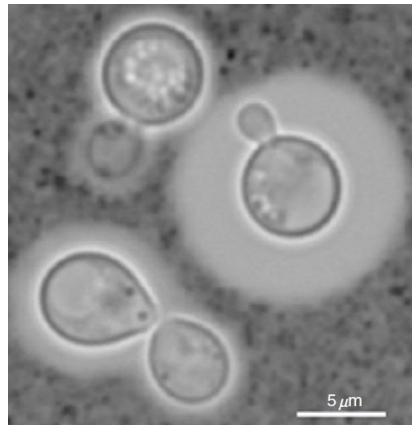


Figura 3. Cápsula de *Cryptococcus spp.* Células leveduriformes coradas com tinta da Índia. A impermeabilidade da cápsula polissacarídica à tinta permite identificar as células fúngicas e distinguir a cápsula. Figura extraída de Ma & May (2009).

Mais de 70 genes envolvidos na biossíntese da cápsula foram identificados, sendo os genes das famílias *CAP* e *CAS* os mais importantes (Chang & Kwon-Chung, 1999; Moyrand *et al.*, 2006). Em estudos de infecção experimental de camundongos, a composição antigênica da cápsula *in vivo* é distinta em diferentes órgãos infectados, sugerindo que exista uma modificação da estrutura capsular durante o progresso da infecção (Charlier *et al.*, 2005). Há relatos de mutantes acapsulados que são avirulentos, sendo facilmente fagocitados por macrófagos e neutrófilos (Kwon-Chung & Rhodes, 1986).

A cápsula criptocócica pode variar em tamanho dependendo das condições ambientais. Durante a infecção, há um aumento significativo em seu tamanho devido à presença de estímulos tais como altos níveis de CO₂, limitação de ferro e contato com macrófagos (McFadden & Casadevall, 2001; Bose *et al.*, 2003).

Na natureza, as células criptocócicas raramente apresentam tamanhos grandes como o visto em isolados clínicos. Conforme ilustrado na Figura 4, as partículas infecciosas, para serem inaladas e penetrarem nas vias aéreas, tem de apresentar diâmetros menores que 4 μm, com pouca ou nenhuma cápsula. Uma heterogeneidade de tamanhos de células criptocócicas tem sido documentada em

cortes de tecidos durante infecções pulmonares em modelos murinos com identificação desde tamanhos gigantes a muito pequenos (Kronstad *et al.*, 2011).

Zaragoza e colaboradores (2010) encontraram células gigantes (25 – 30 μm) em pulmão de camundongos três semanas após o início da infecção em dez linhagens diferentes de *C. neoformans* e em quatro linhagens diferentes de camundongos. A proporção de células gigantes variou entre 10 e 80% do total de células fúngicas contadas no pulmão, dependendo do tempo de infecção, da inflamação pulmonar e a carga fúngica geral. Em geral, a proporção de células gigantes foi maior em camundongos que receberam um inóculo baixo e apresentaram pouca sintomatologia e baixa inflamação.

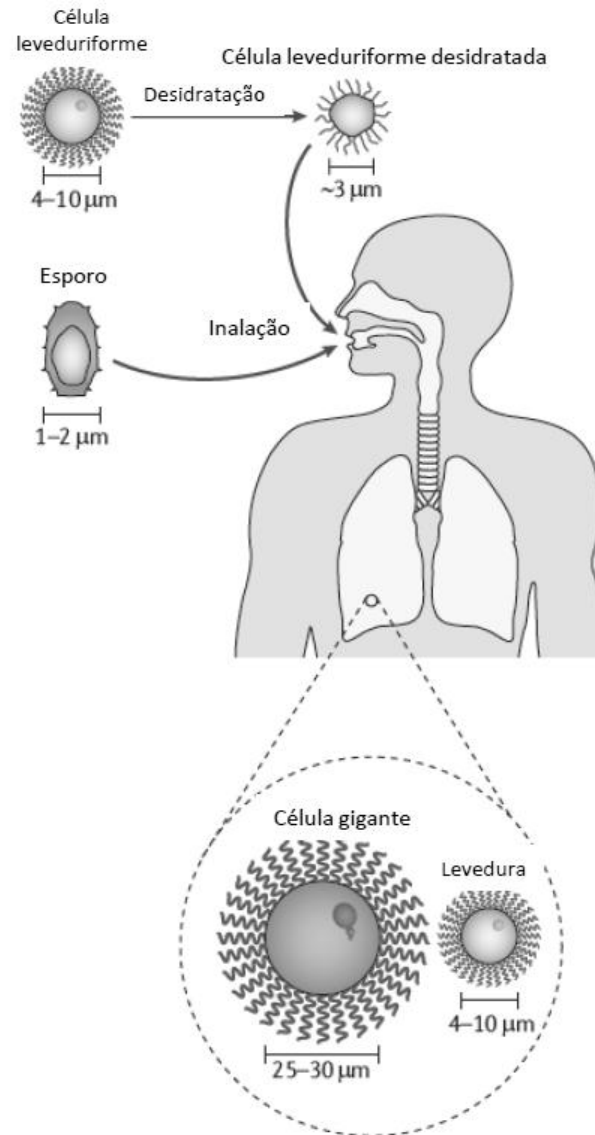


Figura 4. Diversidade de tamanhos apresentados pelas células de *Cryptococcus neoformans*. As células leveduriformes podem se tornar desidratadas no ambiente de tal modo que o seu tamanho reduzido permite a inalação alcançando tecidos pulmonares. A germinação de esporos ou o crescimento vegetativo de células de leveduras em tecido pulmonar resultam na proliferação e formação de células gigantes de uma fração da população. Observação: as células não estão desenhadas em escala. Figura extraída de Kronstad *et al.* (2011).

1.2.2.2 O pigmento melanina

A melanina é um pigmento de cor marrom que desempenha função de proteção contra os raios ultravioleta e outras agressões do meio ambiente como altas temperaturas, congelamento e descongelamento (Rosas & Casadevall, 1997; Nosanchuk *et al.*, 1999). Esse pigmento hidrofóbico, negativamente carregado e de alto peso molecular é formado pela oxidação de compostos fenólicos e indólicos. Durante o desenvolvimento da criptococose, a melanina pode ser formada pela oxidação das catecolaminas encontradas no cérebro. Dessa maneira, a levedura se protege de radicais livres que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro, o que pode justificar o tropismo desse patógeno pelo cérebro (Casadevall *et al.*, 2000).

Em *C. neoformans* a enzima responsável pela conversão de compostos fenólicos em melanina é a lacase. O fungo exibe intensa atividade dessa enzima tendo vários possíveis genes para a mesma, o gene mais bem caracterizado é *LAC1*. Mutantes para esse gene apresentam fenótipo albino na presença de compostos fenólicos e virulência atenuada em modelos animais (Salas *et al.*, 1996).

Tem sido sugerido que o mecanismo primário para a importância da melanina é sua capacidade de agir como antioxidante, porém, existem outros possíveis mecanismos nos quais a levedura pode usar a melanina como proteção contra o hospedeiro incluindo a integridade e a carga da parede celular, interferência na suscetibilidade a antifúngicos, supressão da fagocitose mediada por anticorpos e proteção contra temperaturas extremas (Perfect, 2005). Na Figura 5 podem ser observadas colônias de *C. neoformans* melanizadas, de cor marrom, comparadas com colônias brancas de *Candida albicans*.

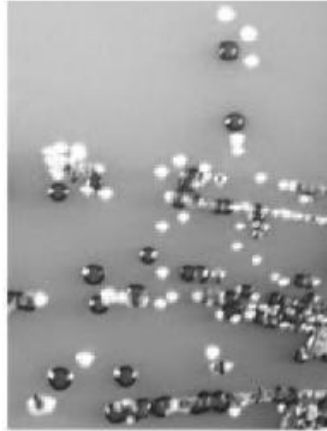


Figura 5. Colonias melanizadas de *Cryptococcus neoformans*. O fungo produz melanina na presença de compostos fenólicos (como L-DOPA) adquirindo coloração marrom, em contraste com a levedura, também patogênica, *Candida albicans*, que forma colônias brancas sem a produção de melanina. Adaptada de Idnurm *et al.* (2005).

1.2.2.3 O desenvolvimento à temperatura de infecção

Os fungos são ubíquos e mais de 20.000 espécies já foram identificadas. No entanto, menos de 0,01% dos fungos é capaz de causar doença em seres humanos. Este fenômeno é, em grande parte, devido à incapacidade que a maioria dos fungos ambientais apresenta de se desenvolver a 37°C (Steenbergen & Casadevall, 2003). Portanto, a capacidade de desenvolvimento a 37°C é uma característica fundamental de patógenos humanos sendo indispensável ao estabelecimento e manutenção dos mesmos no hospedeiro. Dentre as espécies do gênero *Cryptococcus*, poucas são capazes de estabelecer desenvolvimento normal acima de 30°C (Perfect, 2006) e a tolerância a temperaturas relativamente elevadas pode variar entre as linhagens e variedades (Martinez *et al.*, 2001). No caso de mutantes para o gene *ura5* em *C. neoformans*, que codifica a enzima orotidina monofosfato pirofosforilase, linhagens do sorotipo D não apresentaram defeitos no desenvolvimento em temperaturas elevadas, enquanto, para o sorotipo A, esses mutantes apresentaram sensibilidade, tendo seu desenvolvimento comprometido nessa condição (Edman & Kwon-Chung, 1990; Kraus *et al.*, 2004).

Estudos prévios sobre a resposta de leveduras a temperaturas baixas e elevadas concentraram-se na avaliação de choques bruscos de temperatura, em vez de uma adaptação gradual das células a essas condições de crescimento subótimas (Strassburg *et al.*, 2010). Nisamedtinov *et al.* (2008) demonstraram que a taxa de alteração das condições ambientais é um fator importante na resposta ao estresse. Em condições de mudança gradual, as leveduras apresentaram uma adaptação, com redução significativa na expressão de proteínas de resposta a estresse, indicando estresse imediato menor em comparação com o gerado por mudanças bruscas na temperatura.

Para sobreviver e proliferar no hospedeiro, os microrganismos patogênicos devem regular com precisão sua morfogênese. Essa regulação frequentemente é controlada por vias de transdução de sinais conservadas que determinam mudanças morfológicas em várias espécies. Uma dessas vias, cujos componentes incluem proteínas Ras e PAK quinase Ste20, permite o desenvolvimento de *C. neoformans* em temperaturas elevadas. O fator Cdc24 é um efetor de Ras em *C. neoformans* para mediar a capacidade do fungo de se desenvolver em temperaturas elevadas e causar doença (Nichols *et al.*, 2007). RAS1 regula também o estabelecimento da forma filamentosa e *mating*. Mutantes para Ras1 e Cdc24 demonstram redução no desenvolvimento em temperaturas elevadas e são atenuados em modelos de criptococose murina (Cooney & Klein, 2008).

Estudos moleculares identificaram ainda uma variedade de genes associados ao desenvolvimento a 37°C em *C. neoformans* (Perfect, 2006). Alguns dos produtos gênicos identificados nesses estudos são a proteína calcineurina, a qual é necessária para resposta ao estresse e integridade celular em leveduras (Odom *et al.*, 1997); MPK1, enzima envolvida na manutenção da integridade celular (Kraus *et al.*, 2003); e o fator de transcrição MGA2, envolvido na biossíntese de ácidos graxos. A expressão de genes envolvidos em processos de remodelamento de membrana parece ser essencial para a adaptação a temperaturas elevadas (Kraus *et al.*, 2004). Rosa e Silva *et al.* (2008) identificaram 29 genes induzidos a 37°C cujos produtos estão envolvidos na integridade da parede celular, resposta a estresse, filamentação, metabolismo oxidativo e

metabolismo de ácidos graxos. Os genes regulados pela temperatura identificados em *C. neoformans* atuam em uma variedade de processos biológicos, sendo apenas uma fração dos alvos potenciais para inibição do desenvolvimento da levedura no hospedeiro (Perfect, 2005).

Steen *et al.* (2002) em análises de transcriptoma de *C. neoformans* utilizando a técnica de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) evidenciaram ainda um aumento na expressão de genes de histonas em crescimento a 25°C, indicando uma influencia da temperatura na estrutura da cromatina. Nesse mesmo estudo, no crescimento do fungo a 37°C, foi encontrado um aumento na expressão de genes que codificam proteínas de choque térmico e genes cujos produtos estão envolvidos na maquinaria de transcrição.

Outros estudos de genes regulados pela temperatura em *C. neoformans* detectaram transcritos importantes na resposta estresse induzidos durante o aumento da temperatura de 25 para 37°C (Kraus *et al.*, 2004; Steen *et al.*, 2002). Nesse contexto, um componente importante no desenvolvimento em altas temperaturas em *S. cerevisiae* e *C. albicans* é a indução de proteínas de choque térmico que atuam como chaperonas moleculares (Gasch *et al.*, 2000; Enjalbert *et al.*, 2003).

1.2.3 A infecção por *Cryptococcus gattii* e sua interação com o hospedeiro

O ciclo de infecção, ilustrado na Figura 6, é muito similar entre *C. gattii* e *C. neoformans*. Acredita-se que a infecção seja adquirida por inalação de propágulos do fungo dispersos no ambiente, os quais se alojam nos pulmões e logo podem seguir pela via hematogênica até o sistema nervoso central. Essa infecção pode ocorrer em mamíferos terrestres e marinhos, ressaltando a natureza ubíqua desse patógeno (D'Souza *et al.*, 2011).

As infecções pulmonares são mais brandas, pois neste ambiente o fungo pode ser eficientemente fagocitado e destruído pelas células de defesa do sistema

imune, ou sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos. Quando atinge o sistema nervoso central, inicia a fase crônica e mais grave da doença, vindo a desenvolver quadros de meningoencefalite ou meningite (Lin & Heitman, 2006).

Por causar lesões múltiplas nos pulmões e no cérebro dos pacientes, com aumento na morbidade neurológica e resposta mais tardia ao tratamento com antifúngico, *C. gattii* é considerado clinicamente mais virulento que *C. neoformans*. A doença ocasionada por *C. neoformans* é associada a lesões mais brandas que se apresentam como infiltrados difusos (Sorrel, 2001; Chaturvedi & Chaturvedi, 2011).

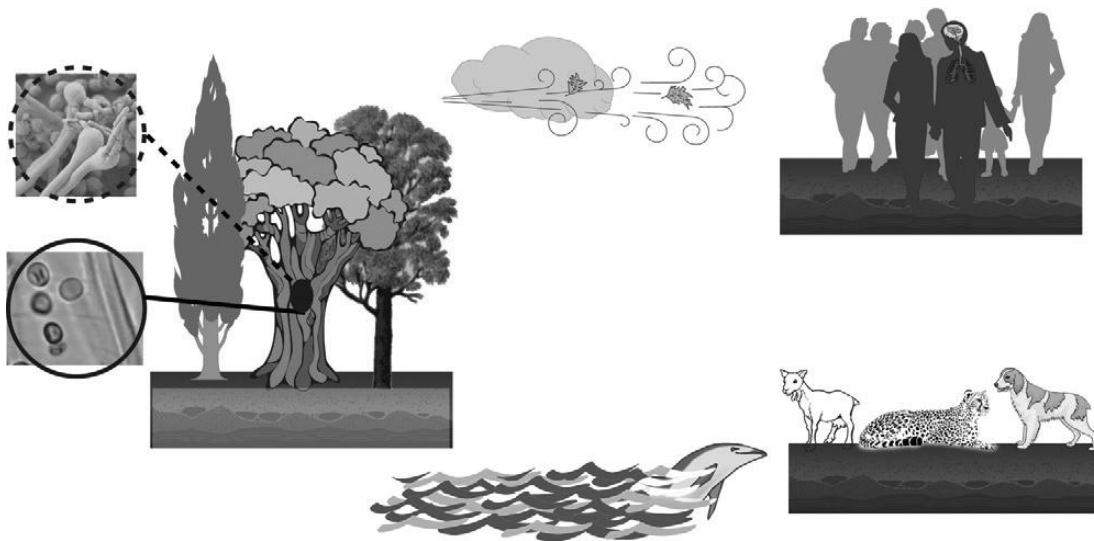


Figura 6. Ciclo de infecção sugerido para *C. gattii* e eventos que podem levar à criptococose. Os propágulos infecciosos (células leveduriformes ou esporos) podem estar dispersos no ambiente em plantas, solo, ar e água sem qualquer hospedeiro intermediário. Seres humanos e animais (domésticos ou selvagens) que entram em contato com propágulos fúngicos na maior parte permanecem assintomáticos, mas um pequeno número de seres humanos e de animais infectados desenvolvem infecções graves principalmente nos pulmões e cérebro. Figura extraída de Chaturvedi & Chaturvedi (2011).

Está bem estabelecido que as células leveduriformes de *C. neoformans* e *C. gattii* podem sobreviver e proliferar em macrófagos alveolares (Goldman *et al.*, 2000; Feldmesser *et al.*, 2000; Feldmesser *et al.*, 2001; Del Poeta, 2004). Nesse contexto, uma avaliação da interação entre esporos e células fagocíticas em cultura revelou uma notável diferença em relação às interações observadas entre células leveduriformes e células fagocíticas. Esporos são prontamente fagocitados por macrófagos murinos na ausência de opsoninas, enquanto as células leveduriformes requerem opsonização prévia (Kronstad *et al.*, 2011).

A fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos pode ser mediada por receptores, como o receptor de manose, receptor β -glutan, receptores de anticorpos e receptores do sistema complemento. Após a internalização por macrófagos, ocorre a formação do fagossomo, que usualmente é muito eficiente na digestão de microrganismos internalizados. No entanto, para *C. neoformans* quatro resultados podem ser observados após a fagocitose: (1) a levedura é destruída pelo macrófago; (2) a levedura permanece em estado de latência no interior do macrófago; (3) a levedura se desenvolve no interior do fagossomo, eventualmente causando a lise do macrófago; e (4) a levedura deixa o macrófago por um processo de expulsão sem que isso provoque a morte do macrófago ou da levedura (Ma & May 2009). Esses processos estão ilustrados na Figura 7.

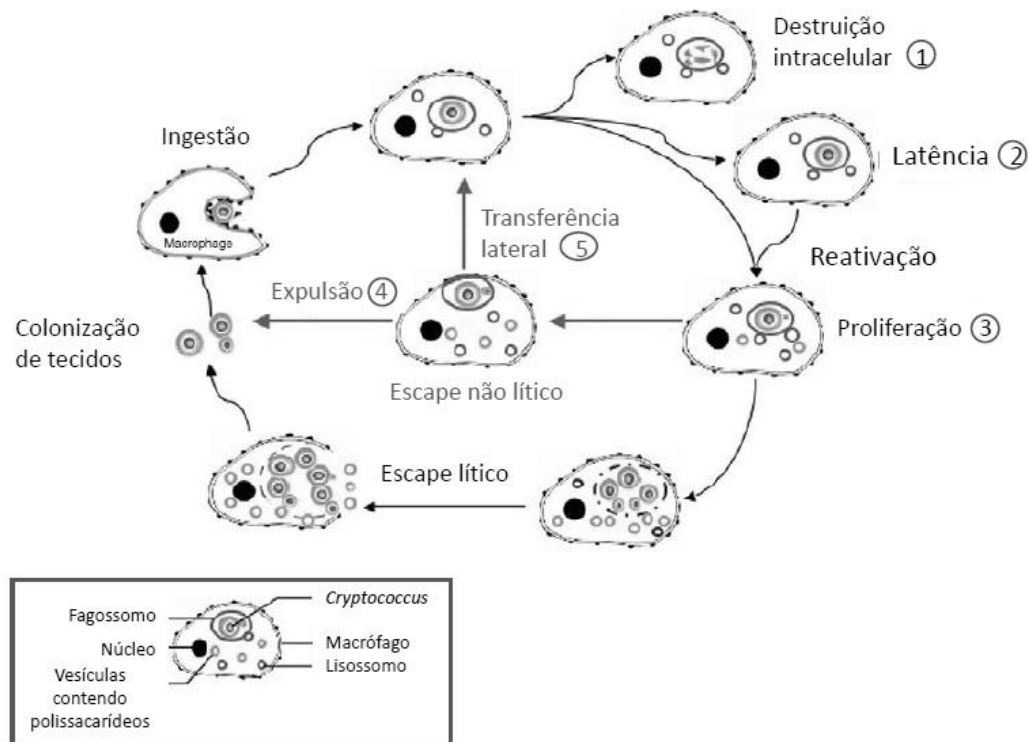


Figura 7. Parasitismo de macrófagos por *C. neoformans*. Após a fagocitose, a levedura internalizada pode ser destruída por macrófagos (1) ou permanecer latente (2). Quando o hospedeiro torna-se imunocomprometido, algumas leveduras ou populações latentes podem se reativar e proliferar intracelularmente (3), seguido pela explosão lítica das células hospedeiras e liberação das células de levedura intracelulares para o ambiente extracelular. As células de levedura liberadas podem continuar infectando mais macrófagos ou estabelecer uma dominância extracelular. Vias de escape, sem lise também foram observadas para *C. neoformans*, durante as quais as células de levedura são expulsas por macrófagos sem causar a morte de uma das partes (4) ou as células de levedura intracelulares são entregues diretamente a um macrófago vizinho por meio de transferência lateral (5). Figura adaptada de Ma & May (2009).

A capacidade de *C. neoformans* e *C. gattii* de influenciar o ambiente intracelular dos macrófagos durante a proliferação, expulsão e transferência entre células é, provavelmente, dependente de rotas de exportação de fatores de virulência do fungo. Esses “pacotes de distribuição de fatores de virulência” podem ser liberados pela fusão de corpos multivesiculares dentro da membrana

plasmática (Kronstad *et al.*, 2011). A Figura 8 ilustra os mecanismos pelos quais os “pacotes de distribuição de fatores de virulência” são exportados.

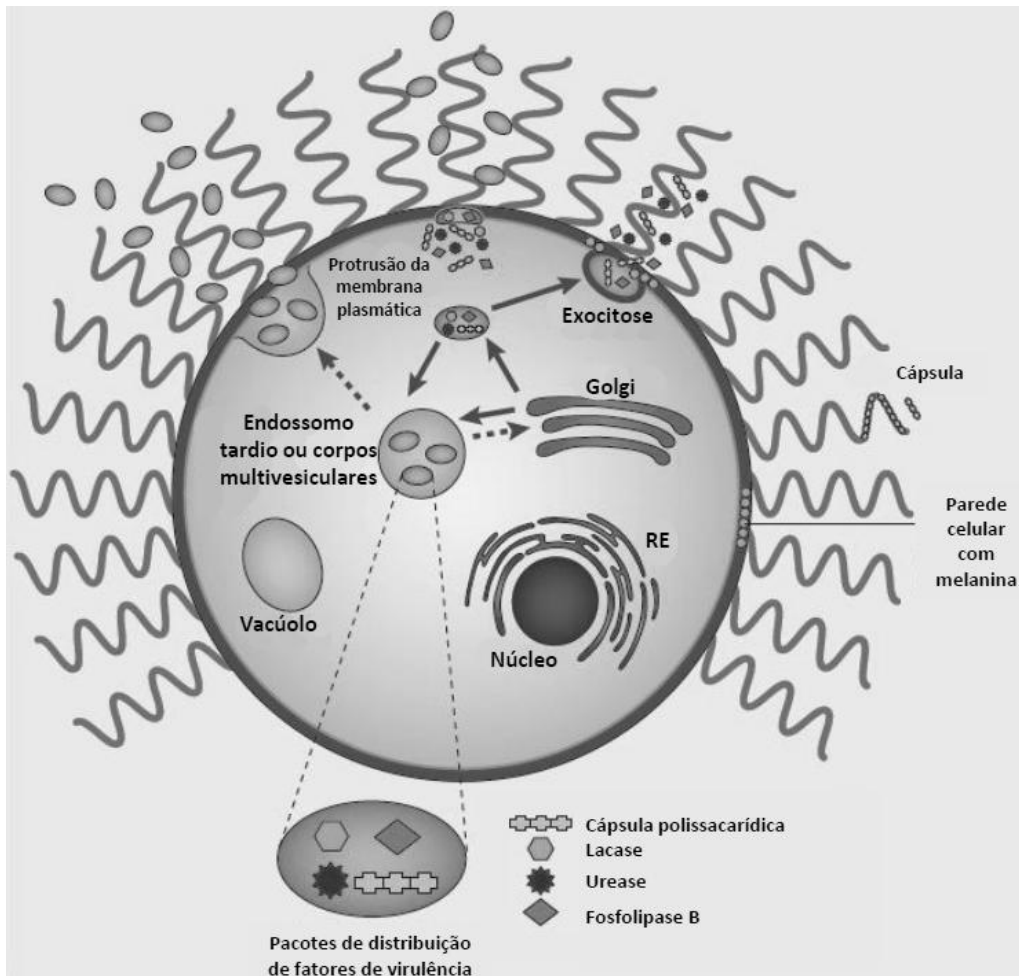


Figura 8. Mecanismos que propiciam a exportação dos “pacotes de distribuição de fatores de virulência” (*Virulence factor delivery bag*). As vesículas extracelulares são produzidas por *C. neoformans* durante a infecção e contêm polissacárideos da cápsula que se acumulam no citoplasma de macrófagos infectados *in vivo* e *in vitro*. As células fagocíticas mostram permeabilização da membrana fagossômica, e é possível que as vesículas criptocócicas e/ou enzimas exportadas desempenhem um papel importante nessa modificação. As vesículas extracelulares a partir dos sobrenadantes de culturas de fungos são internalizadas por macrófagos e também induzem a produção de óxido nítrico, factor de necrose tumoral, interleucina 10 e fator de crescimento de transformação β . Figura adaptada do texto de Kronstad *et al.* (2011).

A defesa do hospedeiro contra *C. neoformans* é regulada pela imunidade celular, especialmente linfócitos T, que desempenham um papel central na erradicação desta infecção. A exposição humana a vários patógenos pode estimular pelo menos dois padrões de produção de citocinas, principalmente pelas células T CD4+: Th1 e Th2. Para *C. neoformans* o equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 influencia marcadamente o resultado da infecção, esse equilíbrio é mantido principalmente por células fagocíticas efectoras, como os neutrófilos e as células dendríticas, e alguns linfócitos primários, como células *natural killer* T. Foi observado que o predomínio na síntese de citocinas Th1 sobre Th2 protege camundongos da infecção, enquanto a infecção é exacerbada em condições de prodomínio de Th2. Citocinas Th1 e Th17 ativam funções anticriptocócicas enquanto citocinas Th2 inibem essas funções (Perfect, 2005, Voelz *et al.*, 2009).

A proliferação de leveduras intracelulares e as taxas de expulsão criptocócicas foram significativamente menores após o tratamento com citocinas Th1, interferon γ e factor de necrose tumoral α e da citocina Th17, interleucina-17 (IL-17). No entanto, as citocinas Th2, IL-4 e IL-13 aumentaram significativamente a proliferação de leveduras intracelulares e reduziram a ocorrência de expulsão do patógeno. Estes resultados ajudam a explicar o prognóstico pobre associado com o perfil de citocinas Th2, como no caso de pacientes infectados com o HIV. Alguns dados sugerem que a gravidade na infecção ocasionada por *C. gattii* seja devido a um defeito na indução da resposta imune do hospedeiro, resultando em baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias, que, como descrito, são cruciais para o controle da disseminação do fungo no organismo (Ma & May, 2009; Chaturvedi & Chaturvedi, 2011; Voelz *et al.*, 2009).

1.3 Eletroforese bidimensional na análise proteômica

A análise sistemática das proteínas em um tecido ou célula foi popularizada sob o termo proteômica (Domon & Aebersold, 2006). O proteoma é como uma fotografia instantânea da expressão das proteínas em um determinado momento e

sob condições específicas. Pode-se dizer que existe um genoma específico para cada organismo ou célula, mas há um número infinito de proteomas quando se refere à expressão das proteínas. Uma descrição completa do proteoma de um organismo não só proporciona um catálogo de todas as proteínas codificadas pelo genoma, mas também dados sobre a expressão das proteínas sob condições definidas (López, 2007).

Frequentemente medidas dos níveis de mRNA são utilizadas como representantes da abundância proteica. No entanto, essa relação não é totalmente conhecida e dois genes com medida de igual nível de mRNA podem ter abundâncias proteicas diferentes, apresentando baixos coeficientes de correlação da expressão e coexpressão mRNA-proteína (Östlund & Sonnhammer, 2012). No estudo de Jon Laurent *et al.* (2010), foram analisados conjuntos de dados em larga escala da expressão de mRNA e proteínas correspondentes em sete espécies diferentes: duas espécies de bactérias, levedura, nematódeo, mosca, humano e planta. Surpreendentemente, foi observado que a abundância das proteínas apresenta uma correlação significativamente maior entre os diversos táxons comparado aos níveis de mRNAs correspondentes ($p=0,0008$, Wilcoxon pareado). Esses dados sustentam a presença de uma forte pressão seletiva para a manutenção da abundância das proteínas durante a evolução, mesmo quando os níveis de mRNA divergem.

A abordagem proteômica exige a separação de proteínas com alta resolução para posterior análise. A separação das proteínas de uma mistura complexa em géis de poliacrilamida por eletroforese bidimensional, seguida da identificação em MS é uma ferramenta importante na análise e detecção de proteínas de origens biológicas complexas. Nela, as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico através da focalização isoelétrica na primeira dimensão, e de acordo com sua massa molecular com uso de eletroforese com sódio dodecil sulfato (SDS) na segunda dimensão (O'Farrell, 1975; Washburn *et al.*, 2001).

Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH utilizado, 2DE pode resolver mais de 5000 proteínas simultaneamente (2000 proteínas rotineiramente)

e pode detectar aproximadamente 1 ng de proteína por spot. Além disso, a técnica proporciona um mapa de proteínas que refletem mudanças nos níveis de expressão proteica, isoformas e modificações pós traducionais, tal como fosforilação, glicosilação ou uma proteólise limitada. Isso pode ser identificado no gel por sua localização em pontos diferentes no eixo horizontal ou vertical (Görg *et al.*, 2004).

A espectrometria de massas esta entre o conjunto de técnicas com as quais as proteínas podem ser investigadas em grande escala. Suas três principais aplicações na proteômica são: catalogar a expressão da proteína, definir as interações protéicas e identificar locais de modificação da proteína. A utilização da MS na proteômica não se resume à aplicação de uma única técnica para todos os fins, mas sim numa escolha de metodologias adequadas para investigações específicas. Para tanto, deve ser considerado o tipo de instrumentação, o método de fragmentação e a estratégia de análise mais adequada para uma amostra individual (Han *et al.*, 2008).

No panorama atual, a 2DE apresenta dois principais inconvenientes e três principais vantagens. Os dois principais inconvenientes são sua baixa eficiência na análise de proteínas hidrofóbicas e sua alta sensibilidade à escala dinâmica e problemas de distribuição quantitativa. As três principais vantagens são sua robustez, seu paralelismo e sua habilidade de analisar proteínas completas em alta resolução. Quando combinadas essas três características, o uso da eletroforese 2DE se apresenta como uma opção extremamente vantajosa no estudo de amostras com uma faixa limitada de expressão proteica, como no caso de estudos com bactérias ou subfrações celulares (Rabilloud *et al.*, 2010).

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

2. JUSTIFICATIVA

Informações sobre os processos biológicos e respostas às condições experimentadas pelo patógeno no contexto do hospedeiro são importantes para a compreensão de sua patogenicidade e virulência. No caso de *C. gattii*, pela sua semelhança e proximidade evolutiva, muitas vezes extrapolam-se os conhecimentos obtidos em estudos com *C. neoformans* a essa levedura.

Os estudos da resposta à variação de temperatura em *C. neoformans* são majoritariamente análises de transcriptoma e em *C. gattii* estes são muito limitados. Por isso, informações provenientes de análises proteômicas podem acrescentar informações relevantes no entendimento da resposta de *C. gattii* a essa condição.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Este estudo tem por objetivo a identificação de proteínas diferencialmente expressas em resposta à temperatura avaliando o perfil proteômico de *Cryptococcus gattii* nas condições de desenvolvimento a 25°C e a 37°C, que simulam temperaturas às quais a levedura é exposta no ambiente e durante a infecção em hospedeiros mamíferos, respectivamente.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar um protocolo para extração/solubilização das proteínas totais de *Cryptococcus gattii*;
- Comparar o padrão de expressão das proteínas nas diferentes condições de cultivo por análise *in silico* e identificar as proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas;
- Identificar funções moleculares e processos metabólicos envolvidos na resposta de *C. gattii* ao desenvolvimento a 25°C e 37°C;
- Comparar os resultados obtidos neste estudo com resultados de outros estudos envolvendo virulência e patogenicidade de *C. gattii* e resultados obtidos com análises similares realizadas com *C. neoformans*.

4. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Manuscrito formatado de acordo aos padrões da revista científica BMC Microbiology.

Proteins regulated by the infection temperature in the *Cryptococcus gattii* hipervirulent strain R265

Juliana Ferrraz de Correa¹, Juliana Crestani¹, Livia Kmetzsch¹, Vanessa Barcelos¹, Charley Christian Staats¹, Augusto Schrank¹, Marilene Henning Vainstein¹ #

¹ *Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. CEP 91501-970. Porto Alegre. RS. Brasil.*

#Corresponding author: Marilene Henning Vainstein

Av. Bento Gonçalves. 9500 – Prédio 43421 – Campus do Vale/UFRGS

CxP 15005. CEP 91501-970. Porto Alegre. RS – Brasil

Tel.: +55-51-3308-7767; 3308-6060; fax: +55-51-3308-7309

E-mail address: mhv@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

Background: *Cryptococcus gattii* is a basidiomycetous yeast which has a robust polysaccharide capsule and is one of the etiological agents of cryptococcosis. The R265 strain of *C. gattii* was responsible for the Vancouver Island outbreak and there are various studies including their dispersal and occupation of new ecological niches. Well-characterized virulence factors of this pathogen include: the ability to synthesize the antioxidant pigment melanin; the production of an antiphagocytic polysaccharide capsule; and the ability to survive and proliferate at 37°C. In this sense, the objective of this study was identified proteins involved in the response of *C. gattii* strain R265 to the temperature variation experimented when the fungi leaves the environment to survive in the host, using *in vitro* analysis and comparative proteomics.

Results: Our data demonstrated that the proteins up-regulated at 25°C act mainly in protein, carbohydrate, lipid, organic acid and amino acid metabolic processes and proteins up-regulated at 37°C participate mostly in processes that include phosphorylation, methylation, ketone body, GTP and ATP catabolic process and nucleoside metabolic process. The most striking difference between the conditions tested is the prevalence of proteins involved in oxidation-reduction in *C. gattii* growth at 25°C and the presence of a relevant number of proteins involved in stress response and catabolic process in *C. gattii* growth at 37°C.

Conclusions: In brief, this study is the first proteomic analysis to provided information about proteins regulated by the infection temperature and the first description of the response of *C. gattii* high virulent strain R265 to this condition. The proteins identified could be targets to further studies for the identification of key proteins for the development at 37°C and to the search for biomarkers that can contribute to the treatment and prevention of cryptococcosis caused by this pathogen.

Keywords: *Cryptococcus gattii*; comparative proteomic, response to temperature variation, protein profiles.

BACKGROUND

The *Cryptococcus* Species Complex includes two basidiomycetous encapsulated yeast species, *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*, both etiological agents of cryptococcosis, an infection that affects humans and several other mammals and the most common fungal infection that affects the central nervous system. *C. gattii* is an emerging pathogen that causes diseases more commonly in immunocompetent patients. The *C. gattii* hypervirulent R265 strain has gained its importance as the causative agent of the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island in Canada [1; 2] and the northwest region of USA [3; 4]. *C. neoformans* mainly causes meningoencephalitis in HIV infected patients worldwide [5] except for countries in Far East Asia where cryptococcosis is more common among non-HIV patients [6; 7].

Humans acquire the infection by inhaling airborne cells from the environment. In the lungs, these cells become encapsulated yeasts and proliferate. In people with healthy immune responses, the infection may resolve or remain latent and subsequently cause disease. However, in immunocompromised people the yeasts can disseminate to almost any part of the body leading to a lethal meningoencephalitis [8]. An estimated 1 million new infections are acquired each year, and the majority of these cases occur in sub-Saharan Africa, which has the highest prevalence of patients with HIV/AIDS [9]. Hence, a comprehensive insight into cryptococcal physiology and *Cryptococcus*-elicited pathology is necessary for developing prophylactic treatments and effective medical interventions.

C. gattii is known to be associated with a variety of trees, especially Eucalyptus trees [10] and was thought to be restricted to tropical and subtropical areas [11]. Extensive surveys in North and South America, however, revealed that the ecological niche of *C. gattii* has been expanded to areas with temperate climates, such as the Pacific Northwest region of USA and Canada [6; 7], or high mountain regions in Colombia [12]. In Brazil, *C. gattii* is endemic in some States, like Amazonas, Bahia and others [13], and affects mostly children and young adults in North and Northeast [14].

C. gattii and *C. neoformans* well-characterized virulence factors include: (i) the ability to synthesize the antioxidant pigment melanin; (ii) the production of an antiphagocytic polysaccharide capsule; and (iii) the ability to survive and proliferate at 37°C [15]. Most of the information regarding the genes involved in development at 37°C is focused on molecular studies involving *C. neoformans*. Some of the gene products described in these studies include: calcineurin, which is required for stress response and cell integrity in yeast [16; 17; 18; 19; 20]; MPK1, an enzyme involved in maintaining cell integrity [21]; and *ras1*, which regulates the establishment of the filamentous form, mating, and development at high temperatures [22; 23].

In order to identify genes differentially expressed by *C. neoformans* at 37°C a microarray analysis identified the transcriptional factor MGA2 involved in the biosynthesis of fatty acids [22]. Rosa e Silva and colleagues identified 29 genes induced at 37°C which products were involved in cell wall integrity, stress response, filamentation, oxidative metabolism, protein targeting and fatty acids metabolism [23]. Temperature regulated genes in *C. neoformans* participate in a variety of biological processes and are only a fraction of potential targets for inhibiting the development of yeast in the host [24].

In *C. gattii* there is limited information about its response to temperature variability and there are few studies on the proteomic profile involved in this response. So, in this study, our goals were identify proteins that respond to temperature regulation in this pathogen and that are possibly important to its virulence and maintenance in the host. We identified several proteins that display differential expression when is compared *C. gattii* development at 25°C and 37°C, temperatures that simulate conditions that the fungus finds in the environment and in the mammalian host, respectively. The proteins identified are involved in different biological processes, such as oxidation-reduction, cellular metabolism, primary metabolism, response to stress and others. Our findings provide new information about the response of this pathogen related to the temperature variability.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strain and culture conditions

The strain R265 serotype B, previously identified by Kidd *et al.*, 2004 [1] was a gift from Dr. Wieland Meyer from the culture collection of Molecular Mycology Research Laboratory, Westmead Hospital (University of Sydney, Australia). Cultures were maintained in Sabouraud Dextrose Agar (0.3% yeast extract, 1% peptone, 2% dextrose and 2% Bacto agar). Yeast cells were grown in Sabouraud Liquid Medium for 24 h at 25°C with shaking (200 rpm), collected by centrifugation and quantified. After, about 5×10^7 cells/mL were cultivated in 100 mL of fresh medium for 16 h at 25°C or 37°C with shaking (200 rpm). Finally, the cells were centrifuged, washed three times with sterile Milli-Q water, lyophilized and stored to proceed with the proteins or RNA extraction opportunely.

Extraction and solubilization of *C. gattii* proteins

To choose the best method for extraction and solubilization of proteins from *C. gattii* three initial protocols were tested. Lyophilized *C. gattii* cells were disrupted with mortar and pestle in liquid nitrogen to a fine powder. The resulting sample, in the protocol 1, was suspended in extraction buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA; 50 mM TPCK; 1 mM PMSF; 5 mM iodoacetamide. For protocol 2, the same extraction buffer was used with addition of 2% CHAPS. For protocol 3, the same extraction buffer used in protocol 1 was utilized and sonication was applied in an ice bath for three 30 s bursts (20 Hz in a VC601 Sonics and Materials Inc. sonicator) with 1 min intervals.

After this, the following steps were the same for all protocols. The protein suspensions were vortexed for 10 min (at 1 min intervals on ice and on vortex) and cell debris were pelleted by centrifugation at 10.000xg for 20 min at 8°C. The supernatant was transferred to a clean new tube. Half of the volume of extraction buffer used before was added to cell debris and the centrifugation procedure was repeated as before. The resulting supernatant was combined with the first in the

same tube. Protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA).

To obtain non-solubilized proteins in the first buffer, another eight variations of extraction buffers were evaluated. The new buffer was added to the pellet derived from the initial extraction step and the contents were boiled for 10 min and centrifuged. This last supernatant was removed and combined with the previous. The contents of each buffer tested was as follow: (1) Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.1 M; SDS 2%; DTT 10 mM; (2) Tris-HCl 50 mM; SDS 2%; EDTA 0.1 M; (3) Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.1 M; DTT 10 mM; Triton X-100 0.25%; (4) Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.1 M; Triton X-100 0.25%; (5) Tris-HCl 50 mM; Triton X-100 0.25%; (6) Tris-HCl 50 mM; SDS 2%; (7) Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM, TPCK 50 mM, PMSF 1 mM, Iodacetamida 5 mM, CHAPS 2%; (8) Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM, TPCK 50 mM, PMSF 1 mM, Iodacetamida 5 mM, CHAPS 2%; DTT 10 mM.

Protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad). One-dimensional and two-dimensional SDS-PAGE 12% was performed to identify the combination of protocol and buffer extraction to achieve the best method for solubilization and resolution of total proteins.

One-dimensional Gel Electrophoresis

For each sample tested, 0.5 mg of protein extract was used. The samples were precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA) in a proportion of 1:1 (v / v), incubated at 4°C for 14-16 h, centrifuged at 10,400 g for 15 min and washed with 100% acetone. After this step, the protein pellet was resuspended in a volume of 20 µL of denaturing buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol, 10% SDS), boiled at 100°C for 3 min and loaded into SDS-PAGE 12% gels. The protein extract was subjected to electrophoresis under denaturing conditions using the Mini Protean II Electrophoresis Cell System (BioRad). After electrophoresis (150 V for about 1 h) the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical).

Two-dimensional Gel Electrophoresis

2DE experiments were performed with three biological and two technical replicates, resulting in eight gels. For each gel, 1.2 mg of total protein extract, quantified by Bradford assay, were lyophilized and submitted to ReadyPrep 2-D Cleanup kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations. The resulting protein pellet was suspended in 300 μ l of rehydration/sample buffer (9M Urea, 4% CHAPS, 1% Dithiothreitol (DTT), 0.2% Ampholytes pH 3-10 (Bio-Rad) and separated in the first dimension on an IPG strip (17 cm, pH 4-7 or pH 3-10, Bio-Rad. Hercules. CA). Isoelectric focusing was performed in a Protean IEF cell system (Bio-Rad, Hercules, CA) under the following conditions: 250 V for 15 min; ramped 250 V to 10.000 V over 3 h, and 10.000 V for a total of 60.000V/h with a maximum current setting of 50 μ A per strip at 20°C. Before the second dimension the strips were placed into equilibration buffer (30% glycerol, 6M Urea, 1% DTT and a trace of Bromophenol Blue) for 15 min. Disulfide groups were subsequently blocked for additional 15 min incubation in a similar solution, except for the replacement of DTT by 4% iodoacetamide. Each IPG strip was placed on top of SDS-PAGE 12% gel that were run using a PROTEAN II xi 2D Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) at a constant current of 50 mA for about 8 h. Proteins were visualized by Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

2D-gel image analysis

Gels were scanned using a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad. Hercules, CA) and the images were analyzed with the PDQuest 2-D Gel Analysis Software version 8.0.1 (Bio-Rad, Hercules, CA). The automatically generated spot detection and matching were checked manually and corrected if needed. The differentially expressed proteins were searched based on at least an 1.3-fold change between average expressions in groups of analysis (growth at 25°C and growth at 37°C) at the probability level $p \leq 0.05$ according to the Student's t-test.

In-gel Digestion

Differentially expressed protein spots were excised from the 2D-gel, cut into small pieces and destained using 50% methanol and 5% acetic acid in water. Gel plugs were dehydrated by three washing steps with 200 μ L 50% acetonitrile (ACN) and 50 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) for 15 min followed by one washing step with 100 μ L ACN. After washing, the gel plugs were dried by vacuum centrifugation (Labconco CentriVap Cold Concentrator) and subjected to trypsin digestion for 18-24 h at 37°C, using 20 μ L of 10 μ g/mL trypsin (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) diluted in 25 mM NH_4HCO_3 . Peptide extraction was performed twice for 15 min with 100 μ L of a 100% ACN and 5% formic acid solution. Trypsin digests were then concentrated in a SpeedVac concentrator to approximately 10 μ L and suspended in 10 μ L 0.1% trifluoroacetic acid (TFA).

Mass spectrometry analyses

Five microliters of each peptide sample were loaded onto a Waters nanoACQUITY UPLC system coupled to a Waters Micromass Q-TOF Micro Spectrometer (Waters MS Technologies, UK) to be analyzed by on-line liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS). The peptides were eluted from the reverse-phase column toward the mass spectrometer at a flow rate of 600 nl/min with a 1-90% linear gradient of 0.1% formic acid/ACN for 20 min. The MS survey scan was set to 1 s (0.1 s interscan delay) and recorded from 200 to 2000 m/z range. MS/MS scans were acquired from 50 to 2500 m/z range, and scan and interscan rates were set for MS. DDA (data directed analysis) mode was used to run the samples. For each survey scan, the three most intense multiple charged ions were selected for MS/MS analysis. The collision energies for peptide fragmentation were set using the charge state recognition files for +2 and +3 peptide ions provided by MassLynx (Waters). MS/MS raw data were processed using Mascot Distiller version 2.4.2.0 (Matrix Science) and exported in .mgf (mascot generic file) format to perform a search in MASCOT database.

MS/MS data analysis and protein identification

MS/MS data were analyzed using the MASCOT (Matrix Science) software against the *C. gattii* database following these parameters: trypsin enzyme with a maximum of two missed cleavage, fixed carbamidomethyl alkylation of cysteines, variable oxidation of methionine and phosphorylation of serines and threonines. The significance threshold was set at $p \leq 0.05$ and only peptides with individual ion scores above this significance threshold were considered for protein identification. To reduce the false discovery rate at least two peptide identifications were considered necessary to support each protein. The MS/MS spectra of protein identifications based on a single peptide and on borderline scores were manually inspected for acceptance. The Blast2GO tool (www.blast2go.org) [25] was used to categorize proteins according to biological process and molecular functions.

Quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Two micrograms of total RNA was treated with DNase (Fermentas Life Sciences) and reverse transcription was done using the M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) according to the enzyme protocol. The cDNA was quantified by qRT-PCR using a Platinum SYBR green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) in an Applied Biosystem Step One Real-Time PCR System. qRT-PCR analysis was performed in 48-well plates in triplicate for each cDNA sample with a final volume of 20 μ l. The cycling program was 50°C for 10 min. 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 15 s. 55°C/60°C (according to the primer pair utilized) for 15 s and 60°C for 1 min. Amplifications of each specific gene target were checked with a melting curve analysis at the end of the PCR. The expression ratios were normalized to *Actin* expression and calculated according to the $\Delta\Delta C_t$ method [26]. The data were presented as fold change relations between growth at 25°C and growth at 37°C plotted in a log₁₀ scale of the fold change values (37/25°C).

RESULTS AND DISCUSSION

Development of an efficient protocol for solubilization and resolution of *Cryptococcus gattii* R265 proteins

An important step in proteomic studies is the extraction and solubilization of proteins of interest. Although a standard procedure is desirable with regard to the simplicity and reproducibility, there is no universally applicable method for all types of samples analyzed by 2DE and protocols have to be adapted to the type of sample tested [27]. Accordingly, we compared different methods for extraction and solubilization to optimize the pattern resolution of *C. gattii* proteins to be used in 2DE. Initially, three variations of protocol were tested and evaluated according to the pattern of proteins reached in 2DE (data shown in Supplementary Figure 1). The protocol 1 utilized an extraction buffer containing Tris-HCl, EDTA and protease inhibitors on the cell lysate; in the protocol 2, the same extraction buffer was used with addition of 2% CHAPS; for protocol 3, the same extraction buffer used in protocol 1 was utilized and sonication was applied on the cell lysate with the buffer.

The method that utilize protease inhibitors and a zwitterionic detergent, CHAPS, seems to be the best choice demonstrating better resolution of proteins and also a larger number of spots of proteins with more acid pI, which are generally more resilient to solubilization. In previous studies in our laboratory we observed an improved efficiency of proteins resolution using only urea as chaotropic agent instead of a combination of urea and thiourea (data not shown). In agreement with our findings, it has been described that CHAPS is far superior to other detergents when urea alone is used as chaotrope [28].

Furthermore, after that initial solubilization step, we tested if a new buffer with another combination of agents could achieve proteins not initially solubilized, resuspending the cell debris resulting of the first step to eight variations of different buffers. The one-dimensional SDS-PAGE analysis (shown in Supplementary Figure 2) indicates that four buffers tested presented similar results. Both have in common in their composition the Tris-HCl buffer agent, a chelating agent and inhibitor of metalloproteases EDTA, and an detergent with specific and differentiated

characteristics, in this case SDS or Triton X-100, each tested in the presence or absence of the reducing agent DTT.

While SDS is known to solubilize almost any protein, the situation is very different under the low-salt, electrically-neutral detergent conditions prevailing under IEF conditions. In this case, the electrostatic repulsive effect brought by the ionic polar heads of SDS is not available, resulting in much poorer solubilization [29]. Under the tested conditions and the resolution level of the dye used, SDS and Triton X-100 detergents showed very similar efficiency in the solubilization of proteins and the addition to buffer of DTT showed no detectable differences. Therefore, the buffer containing Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.1 M and TRITON 0.25% represent a good choice for 2DE analysis considering that does not have the disadvantages of SDS and provided similar results in this study.

Finally, to achieve the solubilization of most proteins, the optimized protocol used, in the first step, agitation of the cell lysate with a buffer containing Tris-HCl, EDTA, protease inhibitors and CHAPS, and, in a second step, the heating of the previous cell debris with a buffer containing Tris-HCl, EDTA and Triton X-100. The proteic content of the first and second steps were mixed forming a single fraction to proceed with the 2DE.

2D-gel analysis and identification of temperature regulated proteins

Three independent experiments generated three biological replicates that were analyzed with two technical replicates using the PDQuest 2-D Gel Analysis Software version 8.0.1 (Bio-Rad). The 2-DE analysis of each condition revealed an average of 1300 spots from protein extracts of *C. gattii* grown at 37°C and about 1150 spots from protein extracts of *C. gattii* grown at 25°C. Student's *t test* statistical analysis revealed a total of 85 differentially expressed proteins. From this analysis, 47 of 50 up-regulated proteins in *C. gattii* grown at 37°C and 29 of 35 up-regulated proteins in *C. gattii* grown at 25°C were successfully identified; the remainder proteins were excluded because neither the mass spectrometry nor

mascot analysis confidence parameters were achieved. Differences in protein spot intensity, represented as fold change, ranged from 1.3 to 5.5.

The CNBG_4996 conserved hypothetical protein appear only in gels representative of the condition of growth at 25°C; CNBG_3408 conserved hypothetical protein, HHE domain-containing protein and cupim 2 domain-containing protein appear only in the other condition. Zinc-binding dehydrogenase appears in more than one spot in the proteome map of both temperatures, probably corresponding to protein isoforms or post-translational modifications. Figure 1 show representative 2D gels of the two analyzed conditions and indicate spot number of the differentially expressed proteins.

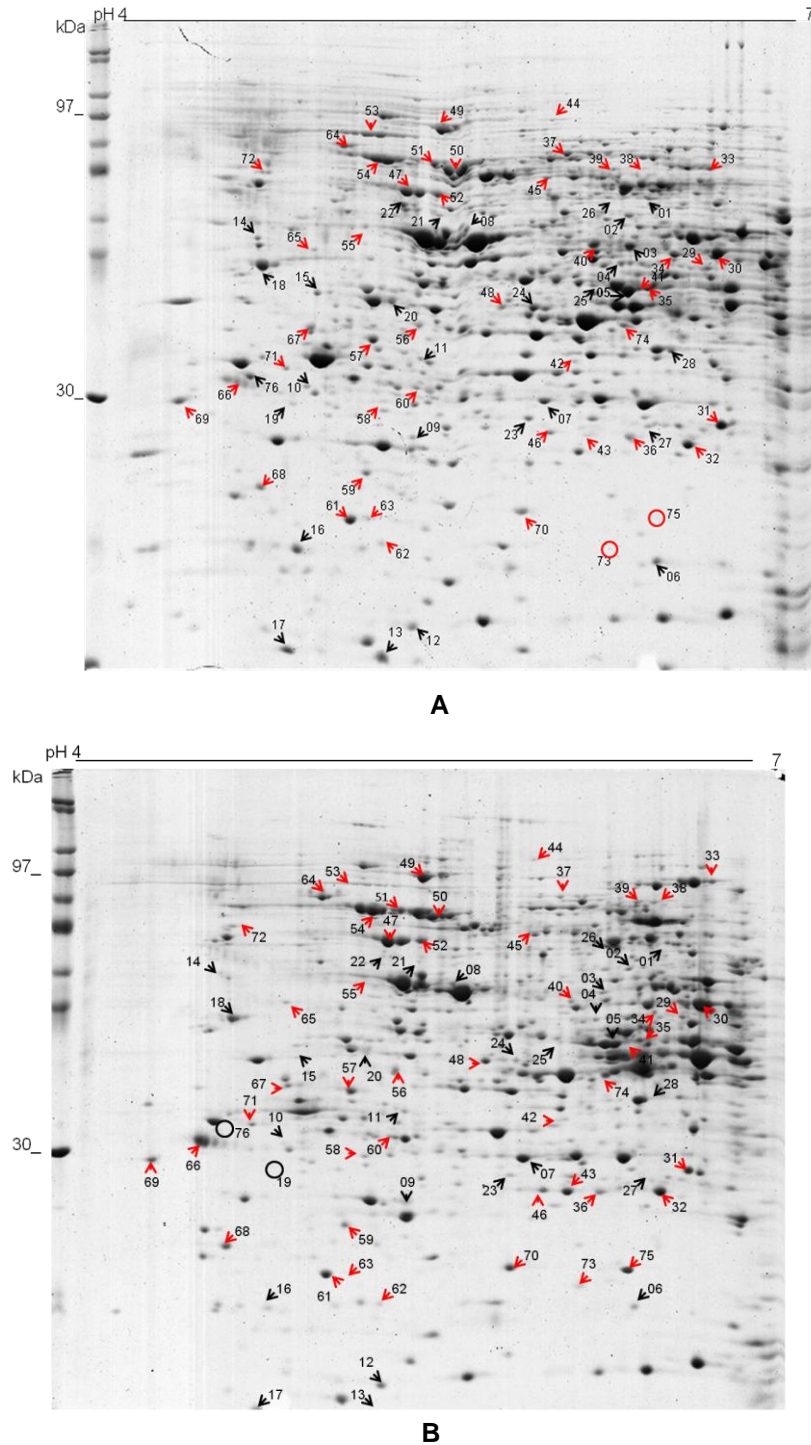


Figure 1. Representative 2DE profiles of proteins extracted from *C. gattii* cells after growth at different temperatures. The figure shows representative 2DE gel pictures (1.2 mg of proteins loaded in IPG strips of 17 cm with pH range 4-7) of whole cell protein lysates from *C. gattii* growth at 25°C or 37°C. (A) Proteins from lyophilized *C. gattii* cells after grown at 25°C; (B) proteins from lyophilized *C. gattii* cells after grown at 37°C. Spots exhibiting differential expression are indicated by arrows: black arrows represent proteins up-regulated at 25°C and red arrows represent proteins up-regulated at 37°C. Circles represent absence of the spot in that condition.

In order to determine the protein identities all 85 spots corresponding to differentially expressed proteins were submitted to in gel digestion with trypsin and MS analysis following by proteins database sequence matching. Broad Institute *C. gattii* database accession numbers (CNBG) and proteins description, Mascot scores, sequence coverage (%), protein molecular weights observed and expected, isoelectric points (pI) observed and expected, fold change and functional categorization of each identified spot are listed in Tables 1 and 2.

Hypothetical conserved proteins represented 39% of the proteins up-regulated at 37°C and 25% of the proteins up-regulated at 25°C. Search in Broad Institute database and blast against NCBI non-redundant databases was used to search for putative conserved domains and possible descriptions of these proteins. These information was listed in functional categorization of tables 1 and 2. The majority of putative conserved domains found include domains related to stress response and protein folding like the Hsp70 protein, CS domain, chaperone protein DnaK, TCP-1/cpn60 chaperonin family and chaperonin GroL.

The proteins identified in the present study represent around 15% of predicted protein-coding genes of the *C. gattii* genome [30], very similar to the results obtained by RDA or microarray analysis, where the number of differentially expressed proteins found is very close to the number of genes regulated by temperature described by Rosa e Silva *et al.* (2008) [23] and by Kraus *et al.* (2004) [21, 22] in studies with *C. neoformans*.

Table 1. Identified *C. gattii* proteins up-regulated at 25°C

Spot number	Protein ID and description	pI exp/obs	MW exp/obs	MASCOT score	Sequence coverage	Fold change	Molecular Function and/or Biological Process
1	CNBG_5083TO malate dehydrogenase	7,7/ 6,4	66,0/ 63,0	163	40	2,3	Oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor
2	CNBG_2289TO hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	6,2/ 6,3	54,8/ 57,0	265	23	1,8	Isoprenoid biosynthetic process
3	CNBG_1488TO methionine adenosyltransferase	5,7/ 6,3	43,4/ 48,0	629	54	2,4	Methionine adenosyltransferase activity
4	CNBG_0301TO sorbitol dehydrogenase	5,8/ 6,3	44,8/ 45,0	298	38	2,1	Oxidoreductase activity/ zinc ion binding
5	CNBG_3878TO zinc-binding dehydrogenase	6,0/ 6,3	37,2/43,0	958	50	1,4	Oxidoreductase activity/ zinc ion binding
6	CNBG_3878TO zinc-binding dehydrogenase	6,0/ 6,4	37,2/ 20,0	99	14	2,3	Oxidoreductase activity/ zinc ion binding
7	CNBG_3231TO hypothetical protein	5,3/ 5,9	10,9/ 31,0	37	35	2,0	Unknown
8	CNBG_3197TO conserved hypothetical protein	5,9/ 5,6	54,9/ 52,0	70	2	1,6	Unknown
9	CNBG_1378TO conserved hypothetical protein	5,1/ 5,3	23,8/ 28,0	38	18	2,1	Thiopurine S-methyltransferase activity
10	CNBG_0134TO conserved hypothetical protein	5,9/ 4,9	59,7/ 32,0	36	3	2,0	Remodeling and manipulation of chromatin
11	CNBG_3221TO conserved hypothetical protein	5,1/ 5,4	31,7/ 33,0	47	12	2,5	Aldehyde-lyase activity/ zinc ion binding/ carbohydrate metabolic process

12	CNBG_4559TO cytochrome c oxidase polypeptide IV	6,0/ 5,3	17,2/ 16,0	162	20	1,9	Cytochrome-c oxidase activity
13	CNBG_5414TO YjgF family translation initiation inhibitor	5,3/ 5,4	14,0/ 15,0	107	26	2,1	Inhibition of protein synthesis initiation
14	CNBG_5365TO cellulase	4,5/ 4,6	48,8/ 48,0	78	6	2,3	Hydrolysis of cellulose
15	CNBG_5510TO conserved hypothetical protein	4,6/ 4,9	28,5/ 43,0	48	17	3,7	Unknown
16	CNBG_3684TO predicted protein	4,9/ 4,8	11,2/ 20,0	56	11	4,8	Protein binding
17	CNBG_5600TO cytochrome-c oxidase chain VI	4,9/ 4,8	7,6/ 15,0	54	14	3,1	Cytochrome-c oxidase activity
18	CNBG_1355TO endopeptidase	4,8/ 4,6	47,3/ 45,0	214	15	1,4	Proteolysis
19	CNBG_4996TO conserved hypothetical protein	4,6/ 4,8	22,7/29,0	56	10	**	Hydrolase activity/ zinc ion binding
20	CNBG_4625TO pyruvate dehydrogenase e1 component beta subunit	6,1/ 5,3	44,2/ 42,0	28	6	2,0	Aldehyde-lyase activity/ zinc ion binding/ carbohydrate metabolic process
21	CNBG_2791TO conserved hypothetical protein	5,2/ 5,5	40,4/ 54,0	69	15	1,7	Unknown
22	CNBG_2438TO alpha-amylase	5,0/ 5,3	57,8/ 57,0	41	2	1,9	Carbohydrate metabolic process
23	CNBG_2990TO endopeptidase	5,6/ 5,8	21,3/ 29,0	45	9	2,0	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process
24	CNBG_0434TO Gpd1 protein	5,4/ 5,8	37,9/ 42,0	61	27	1,4	Carbohydrate metabolic process/ oxidation-reduction process
25	CNBG_3878TO zinc-binding dehydrogenase	6,0/ 6,1	37,2/ 44,0	100	24	1,4	Oxidoreductase activity/ zinc ion binding
26	CNBG_4577TO NAD-aldehyde dehydrogenase	6,2/ 6,2	56,2/ 63,0	53	6	2,1	Oxidoreductase activity
27	CNBG_5520TO cytoplasm protein	5,3/ 6,4	29,0/ 28,0	32	7	1,5	Oxidation-reduction process

28	CNBG_0128TO methionine adenosyltransferase II	5,9/ 6,5	33,8/ 34,0	57	7	1,8	Coenzyme binding/ catalytic activity
76	CNBG_0223 conserved hypothetical protein	6,35/ 4,6	90,2/ 33,0	43	2	**	Protein sorting ^[31]

Spot number respective to Figure 1

Accession number — accession number of matched protein from Broad Institute *C. gattii* database

Expt pl or Mr— experimental isoelectric point and molecular mass estimated from the 2DE gels

Theo pl or Mr— theoretical isoelectric point and molecular mass based on amino acid sequence of the identified protein

Mascot score — score obtained from the Mascot search for each match

Sequence coverage — percent amino acid sequence coverage for the identified protein

** spots with fold change ≥ 10 or visualized only in *C. gattii* growth at 25°C

[31] Conibear E, Stevens TH, 2000.

Table 2. Identified *C. gattii* proteins up-regulated at 37°C

Spot number	Protein ID and description	pI exp/obs	MW exp/obs	MASCOT Score	Sequence Coverage	Fold Change	Molecular Function and/or Biological Process
29	CNBG_2060TO conserved hypothetical protein	6,2/ 6,6	42,9/ 45,0	143	22	2,0	Oxidoreductase activity
30	CNBG_2246TO phosphoglycerate kinase	6,3/ 6,6	45,0/ 48,0	38	6	1,8	Phosphoglycerate kinase activity/ glycolysis
31	CNBG_5531TO cytoplasm protein	6,6/ 6,7	23,6/ 30,0	50	4	1,3	Oxidoreductase activity
32	CNBG_2659TO conserved hypothetical protein	5,4/ 6,6	22,3/ 27,0	114	32	1,7	Flavin mononucleotide binding
33	CNBG_0463TO conserved hypothetical protein	6,0/ 6,6	49,8/ 75,0	76	7	1,3	Unknown
34	CNBG_2659TO conserved hypothetical protein	5,4/ 6,5	22,3/ 47,0	58	12	2,1	Flavin mononucleotide binding
35	CNBG_3878TO zinc-binding	6,0/ 6,4	37,2/ 44,0	78	21	1,3	Oxidoreductase activity/ zinc ion

	dehydrogenase						binding
36	CNBG_2659TO conserved hypothetical protein	5,4/ 6,3	22,3/ 27,0	56	17	2,0	Flavin mononucleotide binding
37	CNBG_0453TO chaperone	5,6/ 6,0	64,7/ 75,0	30	2	1,4	Protein binding
38	CNBG_1927TO malate dehydrogenase	6,4/ 6,3	69,3/ 75,0	32	10	1,8	NAD binding/ oxidoreductase activity
39	CNBG_1927TO Malate dehydrogenase	6,4/ 6,2	69,3/ 75,0	28	1	1,4	NAD binding/ oxidoreductase activity
40	CNBG_2333TO elongation factor TU	9,0/ 6,1	49,6/ 48,0	30	4	1,3	GTP binding/ translation elongation factor activity
41	CNBG_5326TO D-lactaldehyde dehydrogenase	5,8/ 6,3	38,2/ 44,0	41	5	2,6	Catalytic activity/ coenzyme binding
42	CNBG_3408TO conserved hypothetical protein	5,8/ 5,9	32,6/ 33,0	29	4	**	Oxidoreductase activity
43	CNBG_0257TO HHE domain-containing protein	6,6/ 6,0	25,2/ 27,0	40	27	**	Oxygen-binding
44	CNBG_5625TO conserved hypothetical protein	6,0/ 5,9	24,5/ 98,0	35	2	2,0	Unknown
45	CNBG_4651TO succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	6,3/ 5,9	60,0/ 66,0	36	6	2,1	CoA-transferase activity
46	CNBG_4048TO uracil phosphoribosyltransferase 1	5,6/ 6,0	25,8/ 28,0	116	38	2,0	Uracil phosphoribosyltransferase activity
47	CNBG_5573TO conserved hypothetical protein	5,3/ 5,3	61,5/ 61,0	489	56	3,3	ATP binding/ protein folding
48	CNBG_0266TO chaperone activator	7,7/ 5,7	39,7/ 40,0	41	6	2,2	Chaperone binding/ ATPase activator activity/ response to stress
49	CNBG_4912TO conserved hypothetical protein	5,1/ 5,5	83,9/ 97,0	40	9	2,4	Protein folding/ response to stress
50	CNBG_4499TO conserved hypothetical protein	5,6/ 5,5	71,9/ 71,0	34	4	1,3	Protein folding and stabilization; response to stress
51	CNBG_3287TO conserved	5,2/ 5,3	63,3/ 71,0	39	6	4,0	Protein folding and stabilization;

	hypothetical protein						response to stress
52	CNBG_1357TO conserved hypothetical protein	9,7/ 5,5	69,1/ 61,0	31	6	1,5	Unknown
53	CNBG_5683TO MMS2 protein	4,9/ 5,1	89,9/ 79,0	165	33	5,5	ATP binding/ cell division
54	CNBG_3266TO conserved hypothetical protein	5,0/ 5,2	69,6/ 71,0	40	10	2,2	Protein folding/ response to stress
55	CNBG_5573TO conserved hypothetical protein	5,3/ 5,1	61,5/ 53,0	114	6	1,8	ATP binding/ protein folding
56	CNBG_0282TO cytoplasm protein	5,2/ 5,4	35,8/ 38,0	217	43	2,3	Protein-protein interactions
57	CNBG_0785TO 6-phosphogluconolactonase	4,8/ 5,2	32,8/ 35,0	86	27	2,0	Pentose-phosphate shunt
58	CNBG_4930TO conserved hypothetical protein	4,9/ 5,2	24,8/ 30,0	85	5	2,1	Ubiquitination and kinetochore function
59	CNBG_2284TO rho GDP-dissociation inhibitor 1	4,8/ 5,2	24,5/ 26,0	120	26	1,6	Rho GDP-dissociation inhibitor activity
60	CNBG_5468TO hob3 protein	5,1/ 5,4	29,4/ 32,0	48	9	1,7	Protein binding
61	CNBG_1839TO actin lateral binding protein	4,9/ 5,2	19,6/ 21,0	117	32	2,5	Unknown
62	CNBG_0959TO cytoplasm protein	5,0/ 5,2	17,9/ 20,0	195	39	1,9	Unknown
63	CNBG_1839TO actin lateral binding protein	4,9/ 5,2	19,6/ 22,0	23	16	4,4	Unknown
64	CNBG_5018TO luminal binding protein	4,6/ 5,0	40,7/ 76,0	159	11	1,5	Stress response
65	CNBG_5579TO conserved hypothetical protein	4,8/ 4,9	40,9/ 46,0	81	6	1,6	Unknown
66	CNBG_0216TO Hob1 protein	7,7/ 4,5	49,8/ 32,0	21	2	3,5	Protein binding
67	CNBG_5277TO conserved hypothetical protein	4,7/ 4,9	27,1/ 37,0	163	17	1,3	Protein biosynthesis/ Initiation factor
68	CNBG_3378TO elongation factor 1-beta	4,4/ 4,7	23,9/ 24,0	39	5	1,4	Translation elongation factor activity
69	CNBG_0290TO conserved hypothetical protein	4,4/ 4,4	27,4/ 30,0	64	17	2,1	Probably involved in mitochondrial oxidative phosphorylation

70	CNBG_2494TO conserved hypothetical protein	9,5/ 5,8	21,7/ 23,0	83	10	1,6	Antioxidant activity/ oxidoreductase activity
71	CNBG_0379TO carboxyl-terminal proteinase	4,6/ 4,8	18,3/ 32,0	34	20	1,8	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
72	CNBG_5500TO F-actin capping protein	4,5/ 4,7	49,8/ 66,0	81	9	2,4	Actin cytoskeleton organization
73	CNBG_0905TO cupin 2 domain-containing protein	6,1/ 6,2	19,4/ 22,0	33	14	**	Unknown
74	CNBG_0672TO oxidoreductase	5,9/ 6,3	33,2/ 40,0	282	46	1,6	Oxidoreductase activity
75	CNBG_4629 zinc finger domain-containing protein	9,6/ 6,4	36,9/ 23,0	37	7	**	DNA replication

Spot number respective to Figure 1

Accession number — accession number of matched protein from Broad Institute *C. gattii* database

Expt pI or Mr— experimental isoelectric point and molecular mass estimated from the 2DE gels

Theo pI or Mr— theoretical isoelectric point and molecular mass based on amino acid sequence of the identified protein

Mascot score — score obtained from the Mascot search for each match

Sequence coverage — percent amino acid sequence coverage for the identified protein

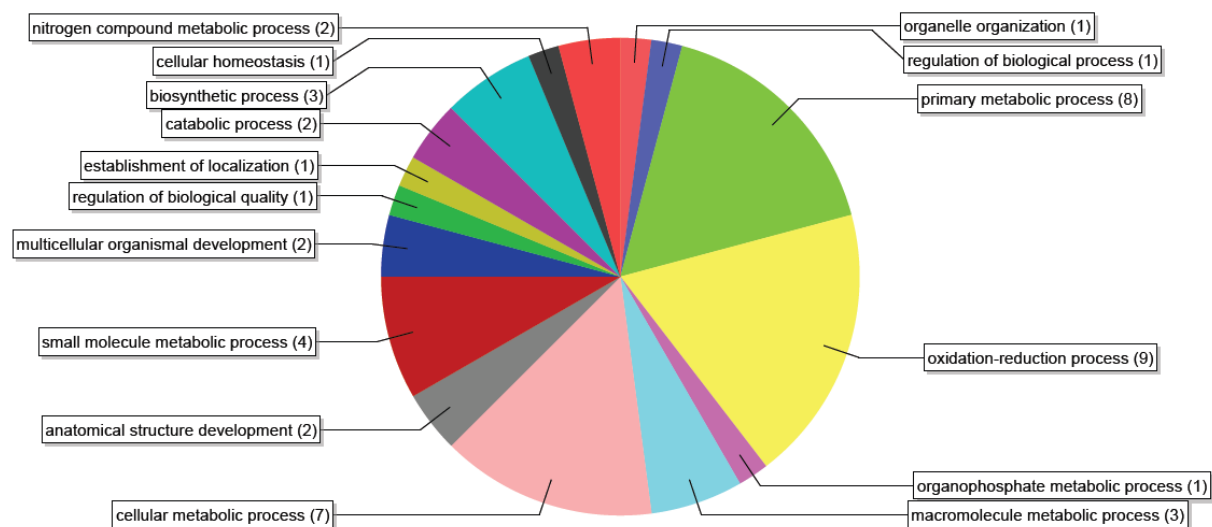
** spots with fold change ≥ 10 or visualized only in *C. gattii* growth at 37°C

Classification of biological processes and molecular function of the identified proteins

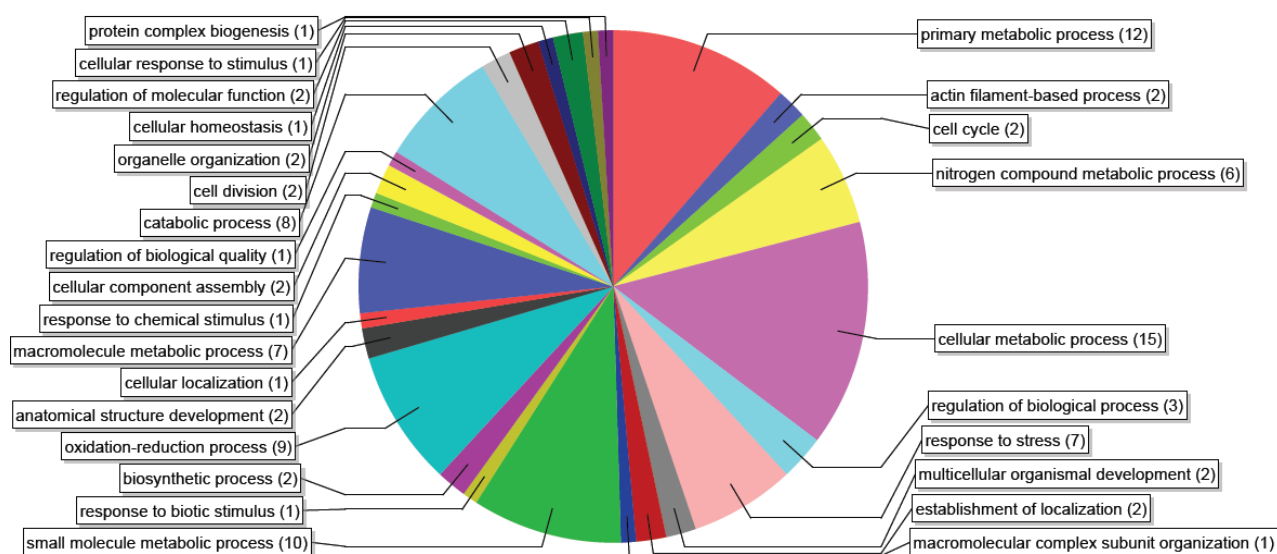
GO annotation provided a broad view of the *C. gattii* response to different growth temperatures. Figure 2 shows the up-regulated proteins annotated according with biological processes terms - using the Blast2GO platform in the response of *C. gattii* growth at 25°C and growth at 37°C. In both conditions we found proteins that are involved in primary metabolic processes, small molecule metabolic processes and cellular metabolic processes. However, the processes that integrate this broader classification were different for each condition: the proteins up-regulated at 25°C act mainly in protein, carbohydrate, lipid, organic acid and amino acid metabolic processes and the proteins up-regulated at 37°C participate in processes that include phosphorylation, methylation, ketone body, GTP and ATP catabolic process, nucleoside metabolic process and others. The most striking difference between the conditions tested is the prevalence of proteins involved in oxidation-reduction in *C. gattii* growth at 25°C and the presence of a relevant number of proteins involved in stress response and catabolic process in *C. gattii* growth at 37°C.

As expected, the response to stress biological process was predominant at 37°C in comparison with the response to growth at 25°C. Transcriptional analysis of *C. neoformans* temperature regulated genes detected transcripts important for stress responses induced upon a shift from 25 to 37°C [22; 32]. In this context, one important component of the response to high-temperature growth in both *S. cerevisiae* and *Candida albicans* is the induction of heat shock proteins that act as molecular chaperones [33; 34]. In *C. gattii* stress response the CNBG_0453 chaperone has a molecular function of heat shock protein binding and the CNBG_0266 chaperone activator acts on chaperone binding. On the list of conserved hypothetical proteins identified in this work a lot of them are up-regulated at growth at 37°C and has putative conserved domains of heat shock protein and chaperone (CNBG_4912, CNBG_4499, CNBG_3287 and CNBG_3266). The conserved hypothetical protein CNBG_5573 belongs to the TCP-1/cpn 60 chaperonin family that are stress-induced, that acts to stabilize or

protect disassembled polypeptides under heat-shock conditions [35]. The conserved hypothetical protein CNBG_4930 has a CS domain that has been suggested to be a binding module for HSP90, implying that CS domain-containing proteins are involved in recruiting heat shock proteins to multiprotein assemblies. Moreover, Crestani and colleagues (2011) [36] found a similar fold change in the expression of the conserved hypothetical protein CNBG_3266 in iron starvation, condition which, like the high temperature, is found in the host environment.



A- Biological process categorization of proteins up-regulated at 25°C



B- Biological process categorization of proteins up-regulated at 37°C

Figure 2. Representation of the main biological process involved in the response of *C. gattii* growth at 25°C (A) or 37°C (B). Proteins were annotated according to biological process terms (level 3) using Blast2GO platform. The parentheses show the number of proteins present in each biological process (each protein can be present in more than one biological process). Note that each processing was done independently and therefore the color codes do not necessarily correspond.

Molecular function categorization of *C. gattii* temperature regulated proteins according with molecular function terms - using the Blast2GO platform is represented in Figure 6. In up regulated proteins in response to growth at 25°C the major percentage of molecule binding include ion binding followed by nucleotide binding and cofactor binding. In up regulated proteins in response to the growth at 37°C nucleotide binding represent the major class of binding function followed by protein binding and nucleic acid and cofactor binding. The oxidoreductase activity is the class of molecular function that includes the largest number of proteins up regulated in growth at 25°C followed by ion binding and hydrolase activity. On the other hand, in growth at 37°C the nucleotide binding molecular function was predominant followed by oxidoreductase activity and protein binding. The majority of proteins included in nucleotide binding has activity on ATP binding, that is the main energy source for the majority of cellular functions, including the synthesis of macromolecules like DNA, RNA, and proteins.

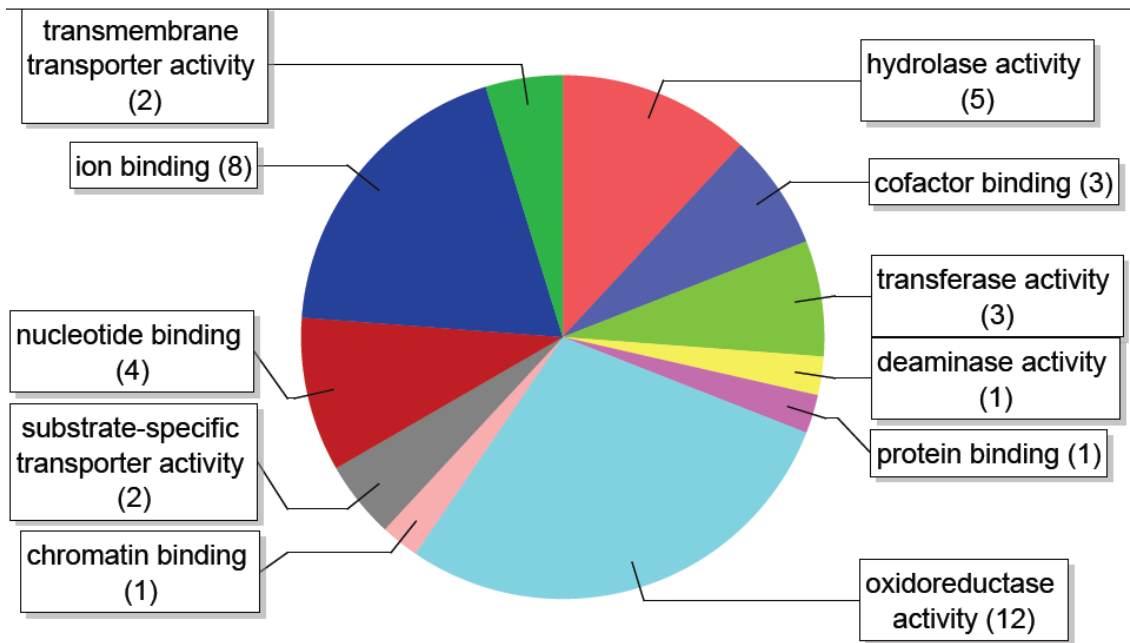
In *C. gattii* growth at 25°C the increase in the expression of hydroxymethylglutaryl-CoA synthase CNBG_2289, and NAD-aldehyde dehydrogenase CNBG_4577, related to lipid metabolism and fatty acid metabolism, respectively, were in accordance with studies involving *C. neoformans* transcriptional analysis, that revealed an increased expression of genes related to fatty acid, lipid and phospholipid metabolism in growth at 25°C [22; 23]. Nevertheless, in this condition, for *C. gattii*, the most representative molecular functions were oxidoreductase activity and ion binding. The redox reaction was important for many biological processes, among them the cellular respiration and free radical reactions. The evidence of increase in expression of CNBG_4559 cytochrome c oxidase polypeptide IV and CNBG_5600 cytochrome c oxidase chain VI which are involved in cellular respiration, could be linked with this observation.

When *C. gattii* was grown at 37°C we found proteins like MMS2 protein and carboxyl-terminal proteinase involved in proteolysis, the luminal binding protein involved in response to unfolded protein and three conserved hypothetical proteins, CNBG_5573, CNBG_4499 and CNBG_0453, with conserved domains involved in protein folding. This findings are in agreement with results found by Katrin

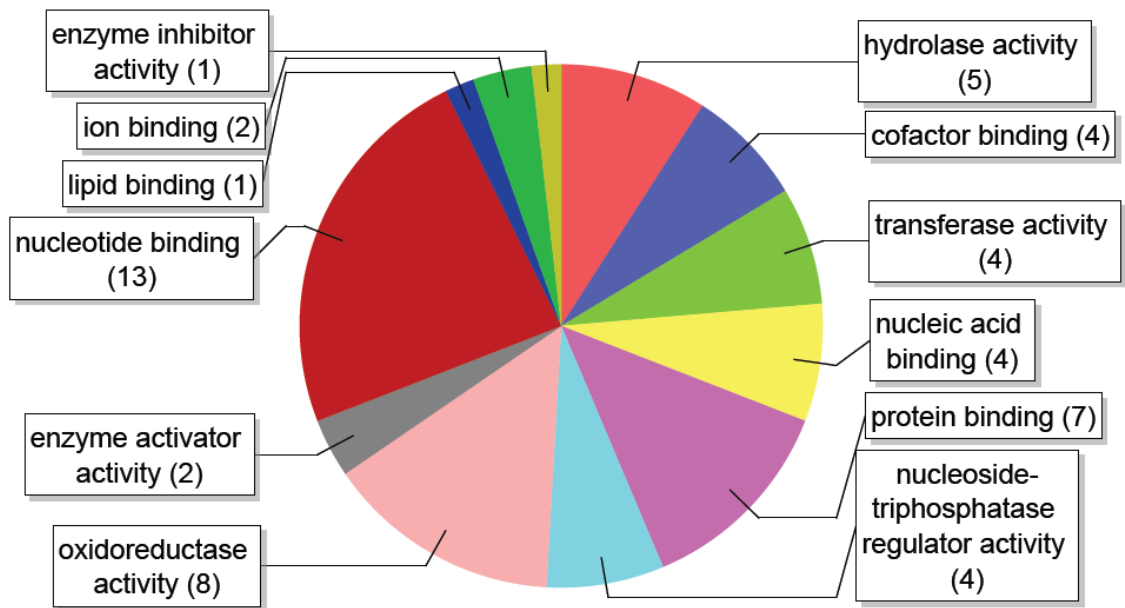
Strassburg and coworkers (2010) [37] that described 427 *Saccharomyces cerevisiae* genes induced early under heat stress involved in protein folding, protein-bound amino acid phosphorylation, cell wall organization and biogenesis. Additionally, *C. neoformans* *MGA2* plays an important role in cell growth, particularly at high growth temperatures [22] and *S. cerevisiae* *MGA2* expression is induced by the unfolded protein response. Increased expression of *MGA2* in *C. neoformans* may be a consequence of the unfolded protein response or endoplasmic reticulum-mediated protein degradation, both of which are activated by heat stress in *S. cerevisiae* [38].

Ngamskulrungraj and colleagues (2011) [39] conducted a comparative transcriptional study between a representative highly virulent VGIIa strain, R265, and a representative lower virulent VGIIb strain, R272, and identified numerous differences in gene regulation. Among these differences, they observed reduction in the transcription of cell cycle associated genes in strain R265. However, in this study we verified an up-regulation of proteins like the MMS2 protein and Hob 3 protein involved in cell cycle and cell division just at infection temperature. In addition, the increased expression of proteins such as the elongation factor 1-beta, 6-phosphogluconolactonase, uracil phosphoribosyltransferase 1, phosphoglycerate kinase and carboxyl-terminal proteinase may indicate that *C. gattii* has more intense transcriptional activity and control of gene expression as well as post-translational modification process when exposed to the infection temperature.

Kraus and coworkers (2004) [22] observed a significant reduction in expression of genes involved in isoleucine or valine biosynthesis and pyrimidine biosynthesis after a shift to 37°C in *C. neoformans*. This expression pattern may not occur for all amino acid biosynthetic pathways, as genes encoding homologs of lysine and threonine biosynthetic enzymes are induced rather than repressed at 37°C. For *C. gattii* we found a somewhat different scenario where proteins involved in purine and pyrimidine metabolism and in arginine, proline, glycine, serine and threonine amino acid biosynthetic pathways are up-regulated at 37°C. These proteins include the D-amino-acid oxidase, nucleoside-triphosphatase, uracil phosphoribosyltransferase and 6-phosphogluconolactonase.



A- Molecular function categorization of proteins with increased expression at 25°C



B- Molecular function categorization of proteins with increased expression at 37°C

Figure 3. Comparison of molecular function involved in the response of *C. gattii* growth at 25°C (A) and 37°C (B). Proteins were annotated according to molecular function terms (level 3) using Blast2GO tool. The parentheses show the number of protein sequences present in each molecular function (each protein can be present in more than one molecular function). Note that each processing was done independently and therefore the color codes do not necessarily correspond.

Correlation of transcript levels with proteomic findings

In order to determine the correlation of transcript levels with our proteomic results quantitative RT-PCR was used. Eight gene products were selected for this analysis: conserved hypothetical protein (CNBG_3408), cellulase (CNBG_5365), conserved hypothetical protein (CNBG_0134), conserved hypothetical protein (CNBG_3221), conserved hypothetical protein (CNBG_0223), conserved hypothetical protein (CNBG_5573) and zinc finger domain-containing protein (CNBG_4629). Figure 4 shows the fold changes related to each transcript analyzed, which represent the average of transcript levels observed in the two biological replicates.

Transcript levels of CNBG_3408 conserved hypothetical protein, CNBG_3221 conserved hypothetical protein and CNBG_0223 conserved hypothetical protein were similar to those observed in proteomic results, but CNBG_5365 cellulase, CNBG_0134 conserved hypothetical protein, CNBG_5573 conserved hypothetical protein and CNBG_4629 zinc finger domain-containing protein shows the inverse relation found in proteomic analysis. One possibility to justify this observation can take place in the methodology used to prepare the fungi cells to the RNA or protein extraction. The cultivation and cell preparation procedure was the same for the two analyses, the culture was removed from the shaker, being exposed to ambient temperature ranging from 22 to 25°C, and cells were centrifuged, washed three times and lyophilized to proceed with the extraction of global proteins. This procedure normally takes around 20 minutes. Strassburg and coworkers (2010) [37] found a great number of temperature regulated genes that respond fast to temperature shifts.

Frequently, mRNA levels are used as representatives of protein abundance. However, this relationship is not fully known and two genes with equal mRNA level may have different protein abundances, showing low correlation coefficients of protein-mRNA expression and coexpression [40]. Jon Laurent et al. (2010) [41] analyzed data sets in large scale of mRNA and corresponding proteins expression of seven different species and observed that the abundance of proteins presents a significantly larger correlation between different taxa compared to the levels of

corresponding mRNAs. These data support the presence of a strong selective pressure for the maintenance of protein abundances during evolution, even when mRNA levels differ.

Destabilizing and stabilizing elements can be responsible for the degradation or maintenance of mRNA, they act mainly in facilitate or avoid the degradation machinery assemble or in the recruitment of enzymes that signal to this function. A genomic analysis of yeast 3'UTRs has identified 53 sequence elements that correlate with the half-lives of mRNAs containing them. Microarray studies have shown that almost 50% of changes in mRNA levels stimulated by cellular signals are due to mRNA stabilization or destabilization events, not to transcriptional changes [42]. Additionally, some mRNAs are translated only at specific sites, though their translation is repressed until they reach their destinations [43]. Based on that, the mRNA level and the protein profile can differ and we can interpret that transcript analysis and proteomic analysis can be complementary but not necessarily correlated.

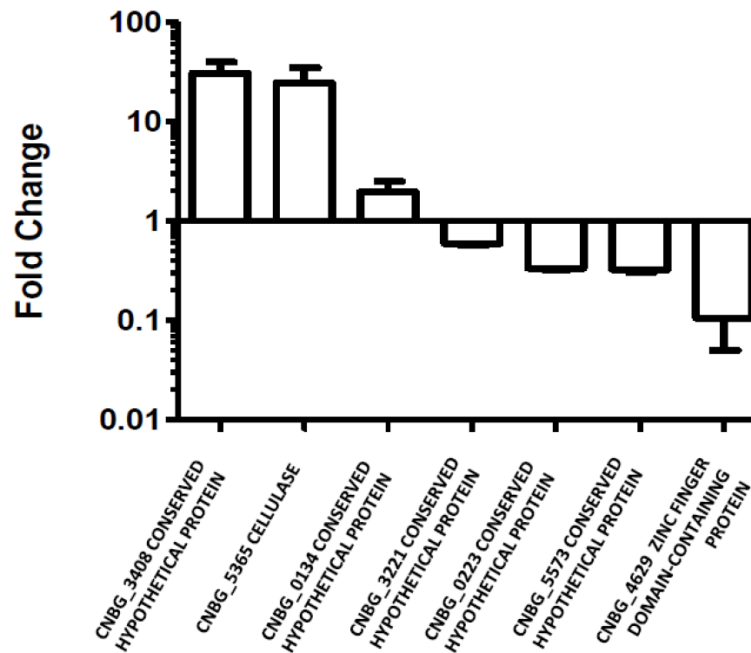


Figure 4. Transcript levels of *C. gattii* selected genes in response to temperature variation. Quantitative RT-PCR was utilized to determine *C. gattii* transcript levels of CNBG_3408 conserved hypothetical protein, CNBG_5365 cellulase, CNBG_0134 conserved hypothetical protein, CNBG_3221 conserved hypothetical protein, CNBG_0223 conserved hypothetical protein, CNBG_5573 conserved hypothetical protein and CNBG_4629 zinc finger domain-containing protein in response to growth at 25°C and 37°C. Data were normalized to the actin transcript and presented as log₁₀ (fold change). The values represent the number of times (relative fold change) that a selected gene is expressed in *C. gattii* growth at 37 °C compared to *C. gattii* growth at 25 °C. Error bars represent standard deviation from two biological replicates.

CONCLUSION

For human fungal pathogens, the requirement for environmental adaptation is extreme, since the transition from a saprophytic lifestyle in the environment to a parasitic lifestyle within a mammalian host entails abrupt changes in a number of environmental parameters. By considering the host as an environment with its own set of abiotic parameters we can outline a different set of host factors that pathogens must adapt in order to successfully colonize their new niche. As saprophytes, fungi survive in an environment with a moderate ambient temperature. Upon invasion of a human host, ambient temperature is suddenly replaced with the restrictively high temperature of the human body [44]. In this

study, we investigate metabolic processes and molecular functions that possibly integrate the response of *C. gattii* to this temperature variation by analyzing protein expression profiling.

Our data demonstrated some similarities with transcriptional analysis of temperature regulated genes with the correlated specie *C. neoformans*. Both show an increase in genes and proteins related to the fatty acid and lipid metabolism in growth at 25°C and show up-regulation of genes and proteins related to stress response and protein and nucleic acids metabolism in growth at 37°C. Additionally, proteins up-regulated at 25°C act mainly in protein, carbohydrate, lipid, organic acid and amino acid metabolic processes and proteins up-regulated at 37°C participate mostly in processes that include phosphorylation, methylation, ketone body, GTP and ATP catabolic process and nucleoside metabolic process. The most striking difference between the conditions tested is the prevalence of proteins involved in oxidation-reduction in *C. gattii* growth at 25°C and the presence of a relevant number of proteins involved in stress response and catabolic process in *C. gattii* growth at 37°C.

In brief, this study is the first proteomic analysis to provided information about proteins regulated by the infection temperature and the first description of the response of the *C. gattii* high virulent strain R265 to this condition. Further studies are needed to better understand the response of *C. gattii* to the temperature variation experimented when the fungus leaves the environment, to survive in the host and how it relates to the pathogen virulence, maybe allowing the identification of new specific targets for treatment and prevention of the cryptococcosis.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

JFC carried out the culture of the fungus, protein extractions, proteomic experiments, RT-PCR experiments, designed the study and drafted the manuscript. JC participated in proteomic experiments, data analysis and interpretation and helped designed the study. LK participated in RT-PCR experiments and its data analysis and helped write the manuscript and revised it. VB participated in RT-PCR experiments. CCS performed LC-MS analysis, participated in RT-PCR experiment and its analysis and interpretation and revised the manuscript. AS and MHV conceived of the study, and participated in its design and coordination. All authors read and approved its final version.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Mass spectrometry analysis was performed by the UNIPROT-MS at the Center of Biotechnology. CBiot-UFRGS-RS. We sincerely thank Jozi Fernanda Rodrigues Estanislau for technical assistance with the mass spectrometer, Natully Fogaça for assistance in RT-PCR experiments and Claudia Bemfica for assistance in culture of the fungus and proteomic experiments.

REFERENCES

- [1] Kidd SE *et al*: **A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada)**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004, 101: 17258-17263.
- [2] Fraser JA *et al*: **Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak**. *Nature* 2005, 437: 1360-1364.

- [3] Byrnes III EJ, Heitman J: ***Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences.** *Biology Reports* 2009, 17: 1-7.
- [4] MacDougall L *et al*: **Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA.** *Emerging Infectious Disease* 2007, 13: 42-50.
- [5] Casadevall A, Perfect JR: ***Cryptococcus neoformans*.** ASM Press, Washington, D.C. 1998.
- [6] Chen J *et al*: ***Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China.** *Emerging Infectious Diseases* 2008, 14: 755–762.
- [7] Choi YH *et al*: **Prevalence of the VNlc genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV-associated cryptococcosis in the Republic of Korea.** *FEMS Yeast Research* 2010, 10: 769–778.
- [8] Kronstad JW *et al*: **Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box.** *Nature Reviews in Microbiology* 2011, 9(3): 193-203.
- [9] Park BJ *et al*: **Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS.** *AIDS* 2009, 23(4): 525-530.
- [10] Ellis DH, Pfeiffer TJ: **Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.** *Journal of Clinical Microbiology* 1990, 28: 1642–1644.
- [11] Kwon-Chung KJ, BENNETT JE: **Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*.** *American Journal of Epidemiology* 1984, 120: 123–130.
- [12] Granados DP, Castaneda E: **Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004.** *FEMS Yeast Research* 2006, 6: 636–644.
- [13] Trilles, L *et al*: **Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2008, 103(5): 455-462.
- [14] Martins, LM *et al*: **Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil).** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011, 106(6): 725-730.

- [15] D'Souza CA *et al*: **Genome Variation in *Cryptococcus gattii*, an Emerging Pathogen of Immunocompetent Hosts.** *mBIO* 2011, 2(1): 1-12.
- [16] Perfect JR: ***Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot.** *FEMS Yeast Research* 2006, 6: 463-468.
- [17] Odom A *et al*: **Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*.** *The EMBO Journal* 1997, 16(10): 2576-2589.
- [18] Kozubowski L *et al*: **Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*.** *Cellular Microbiology* 2009, 11: 370-380.
- [19] Kozubowski L *et al*: **Association of calcineurin with the COPI protein Sec28 and the COPII protein Sec13 revealed by quantitative proteomics.** *PLoS One* 2011, 6(10): e25280.
- [20] Kozubowski L *et al*: **Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*.** *Eukaryotic Cell* 2011, 10(11): 1396-1402.
- [21] Kraus, PR *et al*: **The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function.** *Molecular Microbiology* 2003, 48: 1377-1387.
- [22] Kraus PR *et al*: **Identification of *Cryptococcus neoformans* Temperature-Regulated Genes with a Genomic-DNA Microarray.** *Eucaryotic Cell* 2004, 3(5): 1249-1260.
- [23] Rosa e Silva LK *et al*: **Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis.** *Research in microbiology* 2008, 159: 221-229.
- [24] Perfect JR: ***Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2005, 45: 395-404.
- [25] Conesa A *et al*: **Blast2GO : a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** *Bioinformatics* 2005, 21(18): 3674-3676.
- [26] Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- delta, delta CT Method.** *METHODS* 2001, 25: 402-408.

- [27] López JL: **Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis.** *Journal of chromatography B* 2007, 849: 190-202.
- [28] Perdew GH, Schaup HW, Seliconchick DP: **The Use of a Zwitterionic Detergent in Two-Dimensional Electrophoresis of Trout Liver Microsomes.** *Analytical Biochemistry* 1983, 135: 453-455.
- [29] Luche S, Santoni V, Rabilloud T: **Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis.** *Proteomics* 2003, 3: 249-253.
- [30] **Cryptococcus gattii Sequencing Project**, Broad Institute of Harvard and MIT [<http://www.broadinstitute.org/>]
- [31] Conibear E, Stevens TH: **Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi.** *Molecular Biology of the Cell* 2000, 11: 305-323.
- [32] Steen BR *et al*: **Temperature-Regulated Transcription in the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*.** *Genome Research* 2002, 12: 1386-1400.
- [33] Gasch AP *et al*: **Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes.** *Molecular Biology of the Cell* 2000, 11: 4241-4257.
- [34] Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M. **Stress-induced Gene Expression in *Candida albicans*: Absence of a General Stress Response.** *Molecular Biology of the Cell* 2003, 14: 1460-1467.
- [35] Prasad TK, Stewart CR: **cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock.** *Plant Molecular Biology* 1992, 18(5): 873-885.
- [36] Crestani J *et al*: **Proteomic profiling of the influence of iron availability on *Cryptococcus gattii*.** *Journal of proteome research* 2012, 11: 189-205.
- [37] Strassburg K *et al*: **Dynamic Transcriptional and Metabolic Responses in Yeast Adapting to Temperature Stress.** *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 2010, 14(3): 249-259.
- [38] Travers KJ *et al*: **Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation.** *Cell* 2000, 101: 249-258.

- [39] Ngamskulrungrroj P *et al*: ***Cryptococcus gattii* virulence composite: candidate genes revealed by microarray analysis of high and less virulent Vancouver Island outbreak strains.** *PloS One* 2011, 6(1): 1-12.
- [40] Östlund G, Sonnhammer ELL: **Quality criteria for finding genes with high mRNA-protein expression correlation and coexpression correlation.** *Gene* 2012, 497: 228-236.
- [41] Laurent J *et al*: **Protein abundances are more conserved than mRNA abundances across diverse taxa.** *Proteomics* 2010, 10(23): 4209-4212.
- [42] Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST: **LEWIN'S GENES X.** JONES AND BARTLETT PUBLISHERS 2009, 930p.
- [43] Martin KC, Ephrussi A: **mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension,** *Cell* 2009, 136(4): 1-21.
- [44] Cooney NM, Klein BS: **Fungal Adaptation to the Mammalian Host: It's a New World, After All.** *Current Opinion in Microbiology* 2008, 11(6): 511-516.

SUPPLEMENTAR INFORMATION

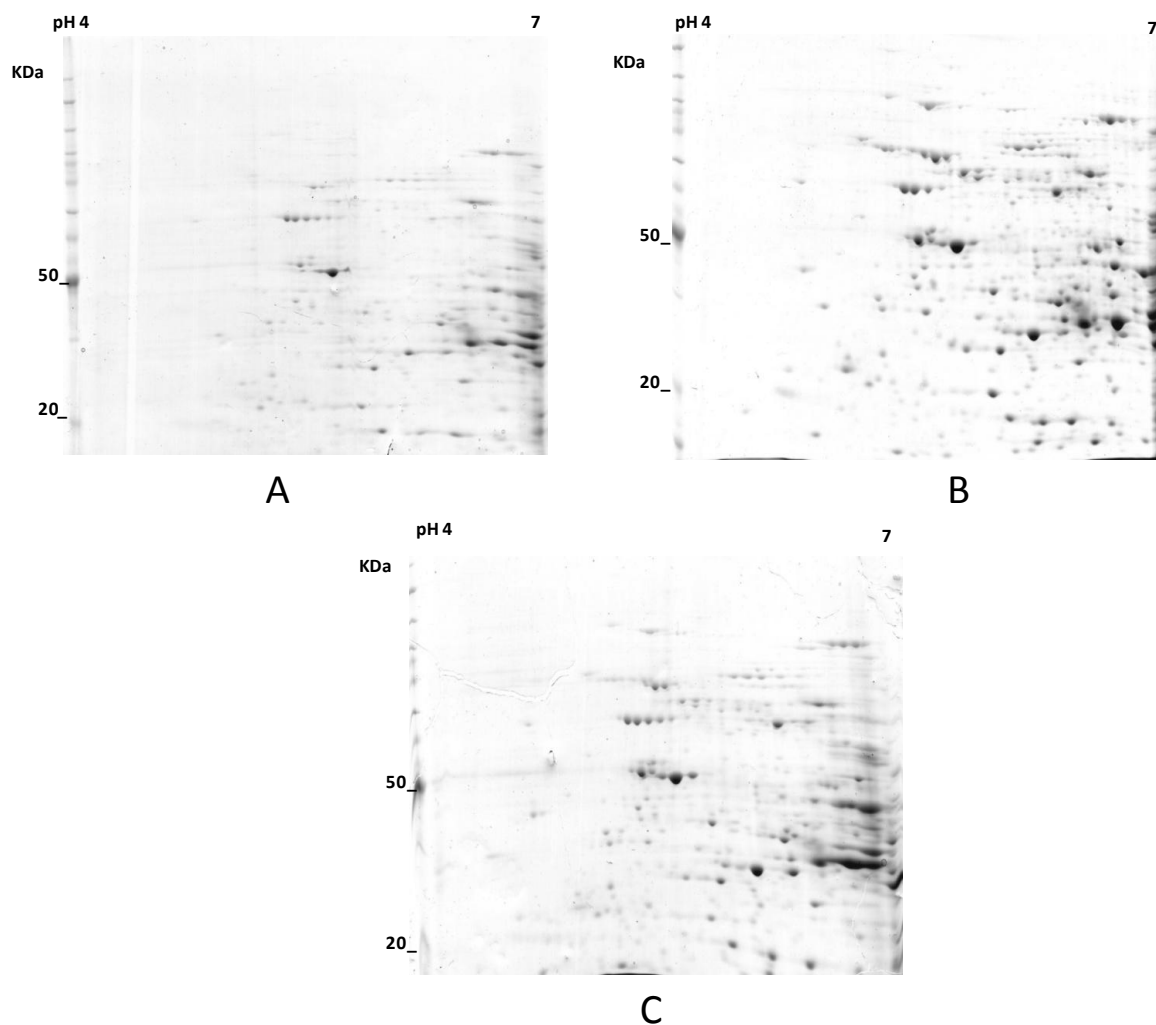


Figure S1: Representative 2D profiles of *C. gattii* proteins. Lyophilized *C. gattii* cells were disrupted with mortar and pestle in liquid nitrogen and suspended in buffer containing: (A) 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM TPCK, 1 mM PMSF, 5 mM iodoacetamide; (B) 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM TPCK, 1 mM PMSF, 5 mM iodoacetamide plus 2% CHAPS; (C) 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM TPCK, 1 mM PMSF, 5 mM iodoacetamide and submitted to sonication of the suspension. Gels performed in 12% acrylamide with 1.2 mg of proteins loaded in IPG strips of 17 cm with pH range 4-7.

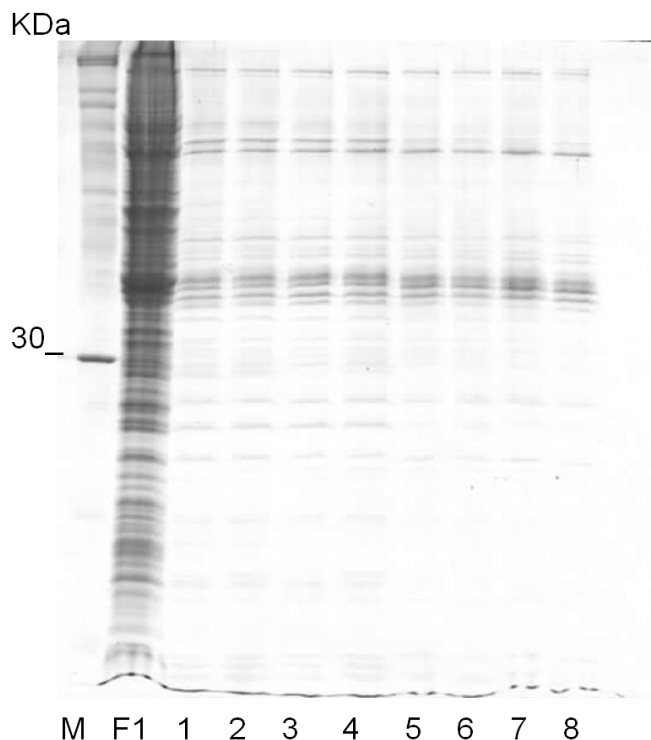


Figure S2. Solubilization of *C. gattii* more insoluble proteins. After the initial solubilization step, a new buffer with another combination of agents was tested to achieve proteins not initially solubilized. The cell debris resulting of the first step was resuspended to eight variations of different buffers (1-8 shown below). SDS-PAGE 12% with 50 μ g of proteins showing the bands of proteins solubilized by each buffer tested.

(M) Molecular weight marker.

(F1) Protein fractions of the initial extraction step.

(1) Buffer containing Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.1 M; DTT 10 mM; SDS 2%.

(2) Buffer containing Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.1 M; SDS 2%.

(3) Buffer containing Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.1 M; DTT 10 mM; Triton 0.25%.

(4) Buffer containing Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.1 M; Triton 0.25%.

(5) Buffer containing Tris-HCl 50 mM; Triton 0.25%.

(6) Buffer containing Tris-HCl 50 mM; SDS 2%.

(7) Buffer containing Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM; TPCK 50 mM; PMSF 1 mM; Iodacetamida 5 mM; CHAPS 2%.

(8) Buffer containing Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM; DTT 10 mM; TPCK 50 mM; PMSF 1 mM; Iodacetamida 5 mM; CHAPS 2%.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo é a primeira análise proteômica realizada a fim de fornecer informação sobre proteínas reguladas pela temperatura e a primeira descrição da resposta da linhagem hipervirulenta R265 de *Cryptococcus gattii* a esta condição. Nossos dados apresentaram semelhanças com análises de transcriptomas de genes regulados pela temperatura com a espécie *Cryptococcus neoformans*, mas além disso, descrevem diferentes funções moleculares envolvidas na resposta de *C. gattii* à temperatura, sendo assim, muito satisfatórios no acréscimo de informação a respeito desse patógeno.

Através unicamente da análise proteômica comparativa não é possível inferir com precisão a real influência das proteínas identificadas neste trabalho no desenvolvimento do fungo quando submetido à temperatura de infecção e, por conseguinte, se são essenciais ou não para a manutenção da virulência. Para tanto, estudos com mutantes que apresentem os genes que codificam essas proteínas deletados e, logo, complementados seriam necessários para estabelecer essa relação.

Algumas proteínas hipotéticas conservadas identificadas também aparecem com expressão diferencial em outras condições que simulam o ambiente de infecção. Essas proteínas podem ser interessantes para estudos que buscam novos alvos para tratamento e prevenção da criptococose até mesmo pelo fato de algumas delas serem bem específicas deste fungo ou presentes em poucos organismos relacionados evolutivamente. A caracterização e descrição dos genes que as codificam também se faz necessária para melhor compreensão de suas funções.

Em suma, este trabalho serve como base para posteriores estudos, que são necessários para entender a resposta de *Cryptococcus gattii* à temperatura de infecção e como essa resposta se relaciona com a virulência e patogenicidade desse microrganismo, para o qual tem se identificado características muito peculiares em sua relação com o hospedeiro.

6. REFERÊNCIAS

BC Centre for Disease Control. BC *Cryptococcus gattii* Surveillance Summary, 1999-2006, 2007.

BODASING, N. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an HIV-positive patient: first observation in the United Kingdom. *Journal of Infection*, 49: 253-255, 2004.

BOEKHOUT, T. *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 147: 891-907, 2001.

BOSE, I. *et al.* A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2(4):655-663, 2003.

BYRNES III, E. J. & HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *Biology Reports*, August, 17: 1-7, 2009.

CASADEVALL, A., ROSAS, A.L. & NOSANCHUK, J.D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, 2000(3): 354-358, 2000.

CHANG, Y. C. & KWON-CHUNG, K. J. Isolation, Characterization, and Localization of a Capsule-Associated Gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*, 181(18): 5636-5643, 1999.

CHARLIER, C. *et al.* Capsule Structure Associated with *Cryptococcus neoformans* Crossing of the Blood-Brain Barrier. *American Journal of Pathology*, 166 (2): 421-432, 2005.

CHATURVEDI, V. & CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends in Microbiology*, 19(11): 564-571, 2011.

CHEN, S. *et al.* Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clinical Infection and Disease*, 31: 499-508, 2000.

COONEY, N. M. & KLEIN, B. S. Fungal Adaptation to the Mammalian Host: It's a New World, After All. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6): 511-516, 2008

DEL POETA. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 3: 1067-1075, 2004.

DIXIT, A., CARROLL, S. F. & QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2000: 1-13, 2009.

DOMON, B. & AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312: 212-217, 2006.

D'SOUZA, C. A. *et al.* Genome Variation in *Cryptococcus gattii*, an Emerging Pathogen of Immunocompetent Hosts. *mBIO*, 2(1): 1-12, 2011.

EDMAN, J. C. & KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the *URA5* Gene from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and Its Use as a Selective Marker for Transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 10(9): 4538-4544, 1990.

ELLIS, D. H. & PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 1642-1644, 1990.

FELDMESSER *et al.* *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and Immunity*, 68: 4225-4237, 2000.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of

macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, 9: 273-278, 2001.

GALANIS, E. & MACDOUGAL, L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (2): 251-257, 2010.

GOLDMAN, D.L. *et al.* *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infection and Immunity*, 68: 832-838, 2000.

GÖRG, A., WEISS, W. & DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4: 3665-3685, 2004.

HAN, X.; ASLANIAN, A. & YATES III, J. R. Mass Spectrometry for Proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5): 483-490, 2008.

IDNURM, A. *et al.* Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews. Microbiology*, 3: 753-64, 2005.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-*neoformans* Cryptococcal Infections: a Systematic Review. *Infection*, 35: 51-58, 2007.

KIDD, S. E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 17258-17263, 2004.

KIDD, S. E. *et al.* Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1433-1443, 2007.

KRAUS, P. R. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Molecular Microbiology*, 48: 1377-1387, 2003.

KRAUS, P. R. *et al.* Identification of *Cryptococcus neoformans* Temperature-Regulated Genes with a Genomic-DNA Microarray. *Eucaryotic Cell*, 3(5): 1249-1260, 2004.

KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(3): 193-203, 2011.

KWON-CHUNG, K. J. & RHODES, J.C. Encapsulation and Melanin Formation as Indicators of Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 51(1): 218-223, 1986.

LATOUCHE, G. N. *et al.* PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2080-2086, 2003.

LAURENT, J. *et al.* Protein abundances are more conserved than mRNA abundances across diverse taxa. *Proteomics*, 10(23): 4209-4212, 2010.

LESTER, S. J. *et al.* Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases (January to July 2003). *Journal of The American Veterinary Medical Association*. 225: 1716-1722, 2004.

LIN, X. & HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annual Review of Microbiology*, 60: 69-105, 2006.

LITVINTSEVA, A. P. *et al.* Multilocus Sequence Typing Reveals Three Genetic Subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), Including a Unique Population in Botswana. *Genetics*, 172: 2223-2238, 2006.

LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of chromatography. B*, 849: 190-202, 2007.

MA, H. & MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology*, 67: 131-190, 2009.

MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J. & CASADEVALL. A. *Cryptococcus neoformans* var . *neoformans* (Serotype D) Strains Are More Susceptible to Heat than *C . neoformans* var . *grubii* (Serotype A) Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9): 3365-3367, 2001.

McFADDEN, D. C. & CASADEVALL, A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, 39(1): 19-30, 2001.

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*, 20: 1790-1799, 1999.

MEYER, *et al.* Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Disease*, 9: 189-195, 2003.

MOYRAND, F. *et al.* Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 45(3): 837-849, 2006.

MUYEMBE TAMFUM, J. J. *et al.* Cryptococcosis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. A case associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Kinshasa, Zaire. *Médecine Tropicale*, 52(4): 435-438, 1992.

NGAMSKULRUNGROJ, P. *et al.* Genetic Diversity of the *Cryptococcus* Species Complex Suggests that *Cryptococcus gattii* Deserves to Have Varieties. *Plos One*. 4 (6): 1-18, 2009.

NICHOLS, C. B., PERFECT, Z. H. & ALSPAUGH, J. A. A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 63(4): 1118-1130, 2007.

NICOL, A. M. *et al.* Communicating the Risks of a New, Emerging Pathogen: The Case of *Cryptococcus gattii*. *Risk Analysis*, 28 (2): 373-386, 2008.

NIELSEN, K. *et al.* *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryotic Cell*. 6: 949-959, 2007.

NISAMEDTINOV, I. *et al.* The response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to sudden vs . gradual changes in environmental stress monitored by expression of the stress response protein Hsp12p. *FEMS Yeast Research*, 8: 829-838, 2008.

NOSANCHUK, J. D. *et al.* Evidence That *Cryptococcus neoformans* Is Melanized in Pigeon Excreta : Implications for Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 67(10): 5477-5479, 1999.

ODOM, A. *et al.* Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO Journal*, 16(10): 2576-2589, 1997.

O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 250 (10): 4007-4021, 1975.

ÖSTLUND, G. & SONNHAMMER, E. L. L. Quality criteria for finding genes with high mRNA-protein expression correlation and coexpression correlation. *Gene*, 497: 228-236, 20120.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45: 395-404, 2005.

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

RABILLOUD, T. *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of proteomics*, 73: 2064-2077, 2010.

RAKESH, V. *et al.* Finite-element model of interaction between fungal polysaccharide and monoclonal antibody in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(29): 8514-8522, 2009.

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

ROSAS, A. L. & CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiology Letters*. 153: 265-272, 1997.

SALAS, S. D. *et al.* Effect of the laccase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Experimental Medicine*. 184: 377-386, 1996.

SORREL, T. C. *et al.* Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 1261-1263, 1996.

SORREL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology*, 39: 155-168, 2001.

SPRINGER, D. J. & CHATURVEDI, V. Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (1): 14-20, 2010.

STENNERBERGEN, J. N. & CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and infection*, 5: 667-675, 2003.

STRASSBURG, K. *et al.* Dynamic Transcriptional and Metabolic Responses in Yeast Adapting to Temperature Stress. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(3): 249-259, 2010.

VOELZ, K.; LAMMAS, D. A & MAY, R.C. Cytokine Signaling Regulates the Outcome of Intracellular Macrophage Parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(8): 3450-3457, 2009.

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

ZARAGOZA, O. *et al.* Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLOS Pathogens*, 6(6): 1-18, 2010.

CURRICULUM VITAE

CORREA, J. F.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Juliana Ferraz de Correa

Local e data de nascimento: Tapes, RS, Brasil, 01/07/1985

Endereço profissional: FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

Av. Ipiranga 5400, Bairro Jardim Botânico, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: (51) 3288 4020

E-mail: juferraz_17@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2005 – 2010)

Pós-graduação *stricto sensu* – Mestrado em Biologia Celular e Molecular – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2010 – 2012)

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

XIII Curso de Técnicas Histológicas – Extensão universitária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (05/2005 – 06/2005)

4. ESTÁGIOS

Estágio não remunerado – 10/2005 – 03/2006 – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientadora: Dra. Marilene H. Vainstein. Acompanhamento de projetos envolvendo o isolamento de fungos de importância médica em fontes ambientais e aprendizado de técnicas de microbiologia.

Bolsista de Iniciação Científica – 04/2006 – 04/2007 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientadora: Dra. Marilene H. Vainstein. Bolsista FAPERGS. Atuação na padronização de testes diagnósticos para criptococose e candidemias, aplicação de técnicas de microbiologia e biologia molecular.

Estágio não remunerado – 01/2007 – 02/2007 – Laboratório de Micologia, Complexo Hospitalar Santa Casa. Orientador: Dr. Luiz Carlos Severo. Acompanhamento de técnicas de rotina laboratorial no diagnóstico de micoses superficiais e sistêmicas.

Bolsista de Iniciação Científica – 08/2007 – 12/2009 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientadora: Marilene H. Vainstein. Bolsista CNPq. Atuação na padronização de testes diagnósticos para criptococose, identificação de proteínas imunogênicas e antigênicas de *Cryptococcus neoformans*, estudos proteômicos envolvendo *Cryptococcus gattii*, aplicação de técnicas de análise proteômica e biologia molecular.

Estágio curricular – 01/2009 – 07/2009 – Laboratório de Terapia Gênica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Orientadora: Dra. Ursula Matte. Atividades com cultura celular, identificação de marcadores genéticos para doenças hereditárias, pesquisas envolvendo tratamentos com terapia gênica.

5. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Destaque na Sessão MICROBIOLOGIA B – XX Salão de Iniciação Científica/PROPESQ – UFRGS, 2008.

6. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Técnica em Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde) (10/2010 – atualmente).

7. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

VARGAS, A. E.; CECHIM, G.; CORREA, J.F.; GOMES, P. A.; MACEDO, G. S.; MEDEIROS, R. M.; PEROTONI, G., RAUBER, R.; VILLODRE, E. S.; CHIES, J. A. Pros and cons of a missing chemokine receptor--comments on "Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-D32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?" by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6): 864-874, 2008.

8. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

CORREA, J. F., POLESE, M., GOEBEL, C. S., VAINSTEIN, M. H. Padronização da técnica imuno-enzimática (ELISA) para criptococose humana: ferramenta de diagnóstico laboratorial. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2006.

POLESE, M.; CORREA, J. F.; LEAL, A. L.; FERREIRA, H. B.; VAINSTEIN, M. H. Padronization of an Enzyme-linked Immunosorbent assay for Diagnosis of human Cryptococcosis: a laboratorial tool. In: XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba/Argentina. 2007.

CORREA, J. F.; POLESE, M.; VAINSTEIN, M. H. Identificação de proteínas imunogênicas para padronização da técnica imuno-enzimática (ELISA) como ferramenta de diagnóstico da criptococose humana. In: XIX Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 2007.

POLESE, M.; CORREA, J. F.; COUTINHO, C. E.; FERREIRA, H. B.; VAINSTEIN, M. H. Identificação de proteínas imunogênicas para padronização da técnica de ELISA para diagnóstico da criptococose humana. In: XII Encontro Gaúcho de Imunologia da PUCRS. Porto Alegre/RS, 2008.

POLESE, M.; AZEVEDO, L. G.; CORREA, J. F.; STAATS, C. C.; LEAL, A.L.; SCHRANK, A.; FERREIRA, H. B.; VAINSTEIN, M. H. Padronização of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of human cryptococosis: a laboratorial tool. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, Salvador/BA, 2008.

CORREA, J. F.; POLESES, M.; VAINSTEIN, M. H. Identificação de proteínas imunogênicas para padronização da técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) como ferramenta para diagnóstico da criptococose humana. In: XX Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2008.

CORREA, J. F.; CRESTANI, J.; VAINSTEIN, M. H. Análise proteômica do fungo *Cryptococcus gattii* em diferentes temperaturas. In: XX Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2009.

CORREA, J. F.; CRESTANI, J.; VAINSTEIN, M. H. Comparação de métodos de solubilização de proteínas para análise proteômica de *Cryptococcus gattii*. In: 25° Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas/PE, 2009.

CORREA, J. F.; CRESTANI, J.; VAINSTEIN, M. H. Proteômica comparativa de *Cryptococcus gattii* a temperatura de infecção e ambiente. In: 25° Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas/PE, 2009.

CORREA, J. F.; STAATS, C.; SHRANK, A.; VAINTEINS, M. H. Método de extração e solubilização de proteínas solúveis e insolúveis de *Cryptococcus gattii* para análise proteômica. In: 27ª Reunião de Genética de Microrganismos, Guarujá/SP, 2010.

CORREA, J. F.; STAATS, C.; SHRANK, A.; VAINSTEIN, H. M. Identificação de proteínas envolvidas na resposta de *Cryptococcus gattii* à temperatura de infecção. In: XX Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Montevideo/Uruguay, 2010.

CORREA, J. F.; STAATS, C.; SHRANK, A.; VAINSTEIN, H. M. Estudo proteômico da resposta de *Cryptococcus gattii* ao COCl₂, agente mimético da condição de hipóxia. In: XX Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Montevideo/Uruguay, 2010.