



**Universidade de Brasília**

**Núcleo de Medicina Tropical**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**pHluorin-GRvT, um novo plasmídeo para transformação de  
*Cryptococcus neoformans***

**JACKSON HENRIQUE EMMANUEL DE SANTANA**

**Brasília, DF**

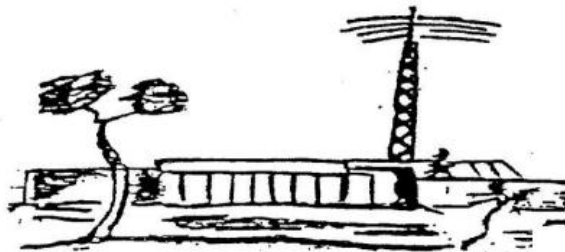
**2024**

**pHluorin-GRvT, um novo plasmídeo para transformação de  
*Cryptococcus neoformans***

**JACKSON HENRIQUE EMMANUEL DE SANTANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

**Orientador:** Prof. Dr. Hugo Costa Paes



**Brasília, DF**

**2024**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SS232p Santana, Jackson Henrique Emmanuel de  
pHluorin-GRvT, um novo plasmídeo para transformação de  
*Cryptococcus neoformans* / Jackson Henrique Emmanuel de  
Santana; orientador Hugo Costa Paes. -- Brasília, 2024.  
46 p.

Dissertação(Mestrado em Medicina Tropical) --  
Universidade de Brasília, 2024.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Virulência. 3. Resposta  
Imune. I. Paes, Hugo Costa, orient. II. Título.

# COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Jackson Henrique Emmanuel de Santana

pHluorin-GRvT um novo plasmídeo para transformação de *Cryptococcus neoformans*

Universidade de Brasília

Medicina Tropical: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

Data da defesa da dissertação

19 de janeiro de 2024

Banca Examinadora

Prof. Dr Hugo Costa Paes

Universidade de Brasília (Presidente)

Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos

Universidade de Brasília (Examinadora externa ao programa)

Profa. Dra. Rosângela Vieira de Andrade

Universidade Católica de Brasília (Examinadora externa à instituição)

Profa. Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola

Universidade de Brasília (Suplente)

*“Você atingirá o sucesso quando apresentar com orgulho as cicatrizes que adquiriu ao longo da sua jornada”.*

- Autor Desconhecido

## DEDICATÓRIA

A toda e qualquer pessoa com que cruzei até hoje e impactaram positivamente a minha vida, seja academicamente ou em minha vida pessoal, permitindo que eu renovasse as forças necessárias para seguir em frente, mesmo diante das situações mais adversas. Cada ser humano com que cruzei até hoje foi um universo novo de ideias, apoio, aprendizado e renovação.

## AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha madrinha, Eliene, que me forneceu apoio emocional e psicológico em vários momentos ao longo de minha vida com o seu imenso amor e carinho. À minha mãe, Adenise, pela confiança depositada em mim mesmo diante das adversidades e frustrações que a vida por vezes nos impõe. Ao meu pai, Edson, pelo apoio financeiro. Ao meu sobrinho, Miguel, por deixar sempre claro a admiração que ele tem por mim (o que me motiva a buscar minha melhor versão), me tornando sempre a sua primeira opção para tirar todas as dúvidas na expectativa de que eu sempre terei as respostas, mesmo que eu não as tenha; sinto-me honrado. Aos colegas do Lab 3 do setor de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UnB, que me apoiaram e auxiliaram muito durante os experimentos em bancada. E, claro, ao meu orientador Prof. Dr. Hugo Paes, pelo suporte intelectual e ensinamentos que levarei por toda a vida.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Casos estimados de criptococose em 2020 .....	16
<b>Figura 2</b> - Comparativo global de casos anuais de meningite criptocócica por região do globo em 2020 .....	16
<b>Figura 3</b> – Expectativa e observação real da correlação entre cepas ambientais e de isolados clínicos .....	19
<b>Figura 4</b> – Correlação entre os sorotipos, espécies e tipos moleculares ....	19
<b>Figura 5</b> - Esquema resumido da polarização de macrófagos M1 por IFN- $\gamma$ e M2 por IL-4 .....	26
<b>Figura 6</b> – Plasmídeo pHluorin-GRvT construído no SnapGene .....	30
<b>Figura 7</b> – Observação das bandas do plasmídeo pH-GRvT em gel de agarose após digestão .....	34
<b>Figura 8</b> – Intensidade da fluorescência de GRvT e pHluorin por citometria de fluxo .....	36
<b>Figura 9</b> – Relação de intensidade de fluorescência entre os controles negativos e as cepas mutantes .....	37



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais regiões do plasmídeo pHluorin-GRvT .....	31
Tabela 2 - Intensidade de fluorescência das células mutantes e seus respectivos controles negativos .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - Por cento

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

DNA - Ácido desoxirribonucleico

GXMGal - Galactoxilomanana

GXM - Glicuronoxilomanana

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IFN - Interferon

IL - Interleucina

mL - Mililitros

°C - Graus Celsius

pH - Potencial hidrogeniônico

RPM - Rotações por minuto

SNC - Sistema nervoso central

TNF - Fator de Necrose Tumoral

UnB - Universidade de Brasília

μL – Microlitro

CO<sup>2</sup> – Dióxido de Carbono

C3 – Componente 3 do sistema complemento

CR – Receptores do Complemento

IB – Instituto de Biologia

Biomol – Biologia Molecular

pH-GRvT – pHluorin-GRvT

## FINANCIAMENTO

Apoio financeira por meio da bolsa de mestrado de Demanda Social da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por 3 meses e auxílio financeiro da FAP/DF projeto 451/2021 Processo nº 00193-00001530/2021-51.

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. A Criptococose .....	15
1.2. Patogenia da Criptococose .....	17
1.3. <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	18
1.4. A Virulência do <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	20
1.5. Resposta Imune Contra o Fungo .....	24
<b>2.JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3.HIPÓTESE</b> .....	27
<b>4.OBJETIVO</b> .....	28
4.1. Objetivo Geral .....	28
4.2. Objetivos Específicos .....	28
<b>5.METODOLOGIA</b> .....	28
Considerações Gerais.....	28
5.1. <i>C. neoformans</i> : cepa selvagem e mutantes .....	28
5.2. Macrófagos Imortalizados .....	29
5.3. Plasmídeos para transformação (Amplificação) .....	30
5.4. Digestão dos Plasmídeos .....	32
5.5. Transformação por Biobalística .....	32
5.6. Citometria de Fluxo .....	33
<b>6.RESULTADOS</b> .....	33
<b>7.DISSCUSSÃO</b> .....	37
<b>8.CONCLUSÃO</b> .....	38
<b>9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39
<b>Anexo 1</b> .....	44

## RESUMO

A infecção por *Cryptococcus neoformans* tem grande relevância global, configurando-se como a principal causa de meningite fúngica no mundo. A criptococose acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, como pessoas com AIDS e também indivíduos saudáveis. Os mecanismos de evasão e a virulência do fungo tornam possível que este atravesse a barreira hematoencefálica e cause inflamação nas meninges cerebrais. Uma das hipóteses de como essa evasão ocorre é pelo controle da acidificação do microambiente, evitando-se o aumento do pH. Para melhor entender como ocorre a sobrevivência e morte do *C. neoformans* quando fagocitado por macrófagos foi construído um plasmídeo contendo dois genes que expressam proteínas de fluorescência. O gene pHluorin-SE expressa uma proteína sensível ao pH, enquanto o GRvT expressa uma proteína resistente ao pH, permitindo a documentação da morte e sobrevivência do fungo quando da interação com macrófagos e processo de acidificação. Após a utilização do método de biobalística o plasmídeo foi eficiente para transformação do *C. neoformans*, contudo a não expressão das proteínas de fluorescência revelaram a necessidade de melhor compreender o comportamento das proteínas de fluorescência em sistemas heterólogos.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*; Virulência; Resposta Imune.

## ABSTRACT

The infection caused by *Cryptococcus neoformans* has a big global relevance, being set as the main cause of fungal meningitis around the world. The cryptococcosis mainly affects immunocompromised individuals, such as people with AIDS and healthy people. The evasion mechanisms and the virulence of this fungus makes possible that it trespasses the blood-brain barrier and cause inflammation of the cerebral meninges. One of the hypotheses on how this evasion occurs is by controlling acidification of the microenvironment, preventing the increase of pH. To better understand how the survival and death of the *C. neoformans* occurs when phagocytosed by macrophages, a plasmid containing two genes that express fluorescent proteins was made. The pHluorin-SE gene expresses a protein that is sensitive to the pH, while the GRvT gene expresses a protein that is resistant to the pH making documentation of death and survival of the fungus possible, when phagocytosed by macrophages and the acidification process occurs. After using the bioballistic method, the plasmid that was built was efficient for transforming *C. neoformans*, however the non-expression of fluorescence proteins revealed the need to better understand the behavior of fluorescence proteins in heterologous systems.

Key words: *Cryptococcus neoformans*; Virulence; Immune Response.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A Criptococose

A criptococose é uma micose que se engloba no grupo das micoses sistêmicas. Esta patologia é causada por uma levedura do gênero *Cryptococcus*, podendo afetar qualquer indivíduo, mas acometendo com maior frequência indivíduos imunocomprometidos, seja por possuírem alguma doença de base imunodepressora como o HIV/AIDS, quanto pacientes que realizam quimioterapia e/ou passam por transplante de órgãos (Bastos et al., 2022)

Apesar da criptococose ter sua manifestação clínica mais recorrente em pacientes portadores de HIV, outros fatores estão associados a um aumento na predisposição de ser acometido por essa infecção, como: pacientes transplantados, indivíduos com síndrome de falência de órgãos, doenças hematológicas malignas, doenças pulmonares crônicas, doenças reumatológicas e diabetes mellitus (Pappas, 2013; Oliveira, 2019).

No Brasil, a infecção por *Cryptococcus* ocupa espaço como a micose sistêmica de maior letalidade em indivíduos HIV positivos, manifestando uma realidade preocupante dessa doença em países subdesenvolvidos. Neste país, a taxa de letalidade por criptococose em pacientes soropositivos varia de 30% a 70% (Firacative et al., 2018; Oliveira, 2019).

Dentre as espécies causadoras da criptococose, o *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) é o mais prevalente, sendo um patógeno oportunista, o que explica o porquê desta doença se manifestar principalmente em pacientes imunocomprometidos. Além disso, este fungo é capaz de invadir o sistema nervoso central, configurando-se como o principal agente etiológico causador de meningoencefalite fúngica no mundo (Maziarz; Perfect, 2016).

A criptococose possui relevante incidência global. Dados recentes mostram que somente em 2020 houve globalmente, em média, 179.000 casos de pacientes com antigenemia criptocócica, ou seja, indivíduos com antígenos de *Cryptococcus neoformans* presentes no organismo. A estimativa de casos para pacientes com criptococose meningocócica também é

alarmante, tendo uma média de 152.000 casos globais por ano, sendo que cerca de 112.000 resultam em morte associada à infecção por *Cryptococcus* (figura 1) (Rajasingham et al., 2022).

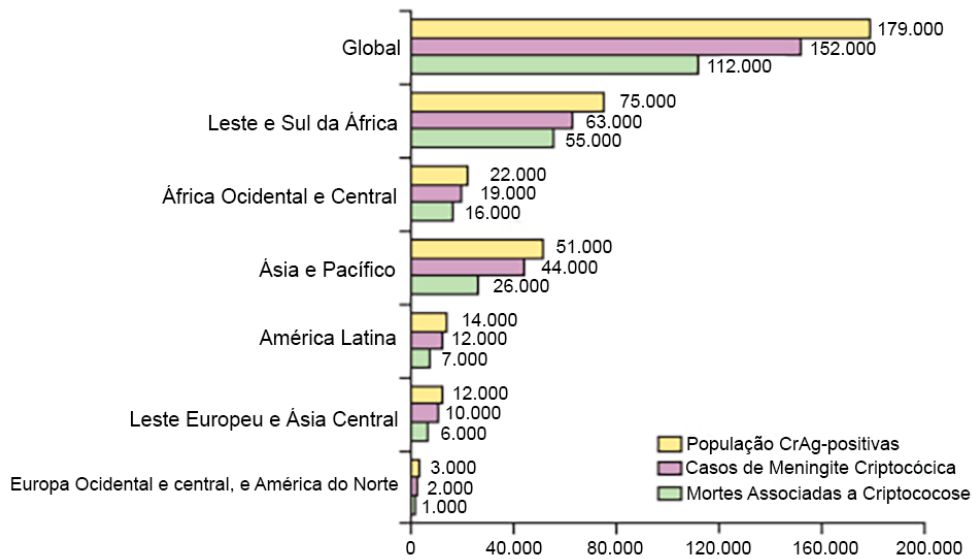


Figura 1 – Casos estimados de criptococose em 2020. Em amarelo claro número de antigenemia criptocócica; em roxo número de casos de meningoencefalite criptocócica e em verde claro número de mortes associadas à criptococose. (adaptado e traduzido de Rajasingham et al., 2022).

Quando comparamos os dados de diversas regiões do globo, a África Subsaariana recebe especial atenção por concentrar a grande maioria dos casos de meningite associada à criptococose. Como é possível observar na figura 2 que apresenta o gráfico comparativo apresentado pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention):

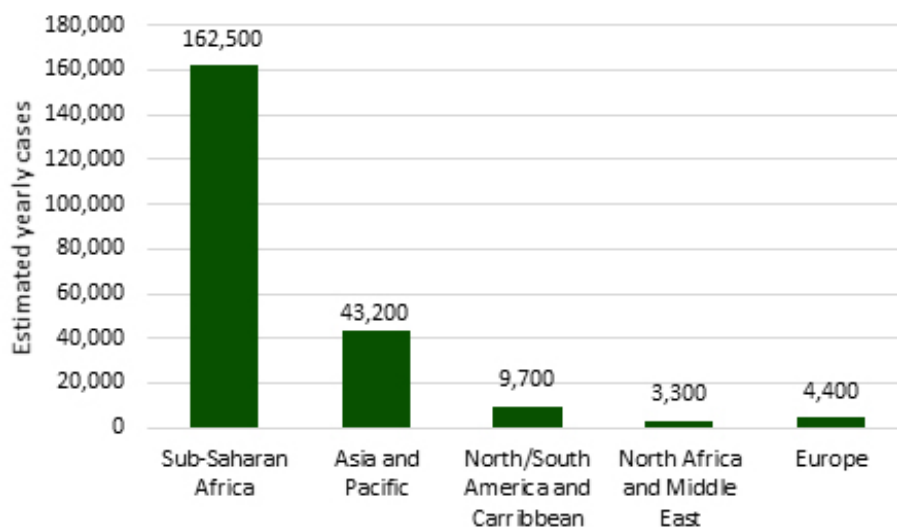




Figura 2 – Comparativo global de casos de meningite criptocócica por região do globo em 2020. (Adaptado pelo Centers for Disease Control and Prevention de Rajasingham et al., 2022).

## 1.2. Patogenia da Criptococose

Por ser frequentemente encontrado na forma de levedura, a infecção por *Cryptococcus* ocorre por inalação dessas leveduras ou de esporos presentes no ambiente. Após inalação estes ficam armazenados nos pulmões sendo naturalmente erradicados pelo sistema imune, mas em pessoas imunocomprometidas esta eliminação pode não ocorrer da forma esperada, fazendo com que o fungo permaneça latente o que acarreta a formação de nódulos denominados de granulomas. Essas leveduras ou esporos que permanecem latentes no organismo do indivíduo podem sofrer reativação com consequente acometimento sistêmico, podendo o sistema nervoso central ser afetado pela infecção (Leopold Wager et al., 2016).

A variedade de fatores de risco para o acometimento por criptococose se baseia em três principais fatores determinantes, sendo o primeiro o estado imunológico do indivíduo. Isso torna muito mais evidente o porquê de pacientes HIV-positivos comporem o grupo mais afetado, mas um segundo fator justifica o acometimento de outros grupos, como até mesmo de indivíduos saudáveis, qual seja: a virulência da cepa do fungo. O terceiro fator corresponde à quantidade inoculada. (Wang et al., 2022).

Uma das características associadas à virulência das espécies patogênicas de *Cryptococcus* é a nutrição do fungo, pois como este encontra-se amplamente disseminado no ambiente ele compete com outras espécies por nutrientes, o que pode ser determinante na sobrevivência e capacidade de causar doença da cepa (Watkins et al., 2017)

A capacidade do *Cryptococcus* de invadir o sistema nervoso central é o que possibilita causar a inflamação das meninges cerebrais (meningoencefalite criptocócica), aumentando os riscos para o paciente que tende a apresentar os seguintes sintomas clínicos: dor de cabeça, desorientação, febre, tontura, rigidez da nuca e diminuição do movimento reflexo (hiporreflexia), além de outros sintomas. Estes sintomas ocorrem

devido ao aumento da pressão intracraniana ocasionado pela infecção e consequente inflamação que se estabelece nas meninges encefálicas (Watkins et al., 2017).

### 1.3. *Cryptococcus neoformans*

Os dois principais complexos de espécies causadoras de criptococose e de grupos filogenéticos correspondentes são o *C. neoformans* e o *C. gattii*, mas o *C. neoformans* protagoniza com maior frequência as micoses causadas por fungos desse gênero. Os fungos deste gênero são leveduras que possuem uma cápsula de polissacarídeos (levedura encapsulada) o que confere maior resistência às condições do microambiente, bem como à resposta imune do hospedeiro (Lin et al., 2007).

Considerando fatores genéticos e propriedades sorológicas de sua capsula, o *C. neoformans* originalmente era dividido em três sorotipos: *C. neoformans* var *neoformans* (sorotipo D), *C. neoformans* var *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var *gattii* (sorotipos B e C), além de um sorotipo híbrido (AD) totalizando cinco possibilidades de sorotipagens distintas (Enache-Angoulvant et al., 2007). Porém, o acúmulo de dados genéticos e fisiológicos permitiu definir a variedade *gattii* como uma espécie, conforme mencionado acima (Maziarz e Perfect, 2023).

O *C. neoformans* possui uma distribuição urbana (cosmopolita) em diferentes fontes do ambiente, sendo um dos principais focos de contaminação as fezes de pombos em que as leveduras deste fungo podem ser encontradas, constituindo um importante fator de disseminação. Apesar da expectativa de que todos os isolados clínicos do *C. neoformans* sejam provenientes do ambiente, Gerstein e Nielsen (2017) levantam uma importante questão ao verificarem que geneticamente poucos isolados clínicos de pacientes correspondem às cepas encontradas em fontes naturais (figura 3).

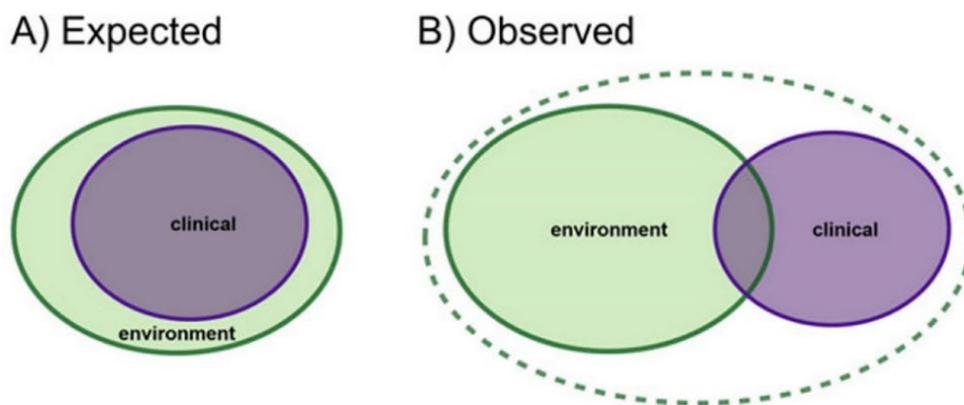


Figura 3 – Expectativa e observação real da correlação entre cepas ambientais e de isolados clínicos. A) A correlação esperada entre cepas do ambiente e isolados clínicos. B) A real relação entre cepas e isolados clínicos observada nos estudos epidemiológicos considerando a genotipagem das cepas e isolados (Gerstein e Nielsen, 2017).

O *Cryptococcus* possui sua taxonomia definida pela sorotipagem e diferenças genéticas evidenciadas por meio do mapeamento do DNA das espécies deste fungo, porém ainda há divergências entre pesquisadores, em que alguns propõem a existência de mais espécies considerando as diferenças genéticas entre elas. Contudo, o conceito mais atual predominante é de que as espécies patogênicas são divididas, do ponto de vista taxonômico, em dois grandes complexos de espécies: *C. neoformans* e *C. gattii*. A figura 4 apresenta a correlação entre os sorotipos e espécies de criptococos patogênicos (Maziarz e Perfect, 2023).

Sorotipo	Espécies e variedades	Tipos Moleculares
A	<i>C. neoformans</i>	VN I, VN II, VNBI, VNBII
B	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III, VG IV, VGV
C	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III, VG IV
D	<i>C. deneoformans</i>	VN IV
AD	<i>C. neoformans</i>	VN III

Figura 4 – Correlação entre os sorotipos, espécies e tipos moleculares. Coluna 1: Sorotipos definidos pela composição da cápsula do fungo. Coluna 2: Espécies correspondentes a cada sorotipo. Coluna 3: Subclassificação das espécies definida por diferenças moleculares (adaptado e traduzido de Maziarz e Perfect, 2023).

As principais manifestações clínicas da criptococose são apresentadas por sintomas característicos do comprometimento das vias aéreas (pulmões) e do sistema nervoso central (SNC). Contudo, essa doença pode acometer

outras regiões do corpo, uma vez que a doença afeta na maioria das vezes indivíduos imunocomprometidos, esse déficit na imunidade permite que o fungo migre e se prolifere em vários órgãos ao mesmo tempo, tornando a patogenia mais complexa (Marziarz e Perfect, 2023).

#### **1.4. A Virulência do *Cryptococcus neoformans***

Virulência é um termo amplamente utilizado para se referir aos fatores que aumentam a capacidade de um determinado microrganismo de causar doença a um determinado hospedeiro, seja por aumentar a sobrevivência e consequente proliferação do microrganismo, seja por aumentar a capacidade dele de causar dano. O *C. neoformans* possui diversos fatores de virulência que aumentam a sua sobrevivência e capacidade de causar dano ao hospedeiro, tais como capacidade de melanização, cápsula polissacarídica, termotolerância, urease etc. (Casadevall et al., 2019).

##### **1.4.1. Processo de Melanização**

A melanina designa uma família de pigmentos fenólicos presente em diversos organismos, a exemplo do ser humano. No entanto, a melanina não é um componente importante apenas ao organismo humano, mas outras espécies têm a melanina como um fator de proteção importante, como é o caso do *C. neoformans* (Wang et al., 1995).

No *C. neoformans* a melanina é produzida por intermédio da lacase, uma enzima importante na metabolização de substratos fenólicos e aminofenólicos. Existem diversos tipos de melanina e o seu tipo é determinado pelos substratos utilizados para sua síntese. Como a lacase possui especificidade por uma quantidade maior de substratos quando comparado com a tirosinase, isso permite que o *C. neoformans* consiga produzir melanina com maior eficiência (Williamson, 1997).

A melanina é um importante fator de adaptação a condições ambientais desfavoráveis ao *C. neoformans*, por isso ela constitui não só um fator de virulência importante, mas também um fator de sobrevivência do fungo no meio ambiente externo ao hospedeiro. A melanina está associada a uma

maior resistência do fungo ao estresse oxidativo e à capacidade de regular a resposta imune do hospedeiro, no entanto a melanina aumenta a afinidade do fungo por drogas como a trifluoperazina, ou seja, apesar da importância que esta proteína tem na proteção do fungo, ela mesma e sua biossíntese apresentam potencial abordagens terapêuticas (Cordero et al., 2020)

A despeito da literatura relatar que a melanina confere uma maior proteção contra o estresse mecânico ao fungo, os estudos acerca da função da melanina no *C. neoformans* permanece em constante evolução e aprofundamento. Um exemplo dos avanços na investigação dessa característica é o trabalho experimental que Mattoon (2023) e seu grupo realizaram com cepas melanizadas e não melanizadas, as submetendo a estresses mecânicos. Esse experimento permitiu evidenciar que cepas não melanizadas tinham maior chance de terem sua membrana rompida, enquanto as cepas melanizadas possuíam maior capacidade de se manterem íntegras, quando expostas ao estresse mecânico.

#### **1.4.2. Cápsula de Polissacarídeos**

A cápsula do *C. neoformans*, estrutura que envolve a parede celular, é composta por diversos polissacarídeos, sendo o principal e mais abundante a glucuronoxilomanana (GXM). Esses polissacarídeos são produzidos no interior das células e transportadas pela parede celular, num processo em que vesículas extracelulares têm grande importância, pois são elas as responsáveis por transportar esses polissacarídeos complexos que compõem a cápsula do fungo. Apesar de o GXM compor cerca de 90% da cápsula do *C. neoformans*, outro importante componente é a glucuronoxilomanogalactana (GXMGal) (O'Meara e Alspaugh, 2012).

A cápsula do *C. neoformans* tem importância diagnóstica, pois devido às variações na sua composição (número e ordem dos polímeros) é possível diferenciar os fungos em sorotipos. Dependendo do hospedeiro no qual o fungo está presente e do local (diferentes órgãos, por exemplo) é possível evidenciar diferenças na composição da cápsula que confere ao fungo a capacidade de escapar da resposta imune, bem como se evadir a ela por se adaptar ao microambiente (O'Meara e Alspaugh, 2012).

Os polímeros que compõem a cápsula polissacarídica do *C. neoformans* são grandes e, portanto, eles necessitam de transporte ativo para serem carregados através da parede celular. Alguns estudos revelaram que a quantidade de vesículas próximas a parede celular se apresenta aumentada *in vivo*, quando comparado aos fungos *in vitro*, evidenciando, assim, a importância que essas partículas têm no transporte de precursores que formarão a cápsula (Sakaguchi, 1993).

Diversos genes estão envolvidos na produção da cápsula do *C. neoformans*, porém é atribuída maior importância para o gene *CAP59* que tem papel de destaque na composição da cápsula regulando o transporte para o espaço extracelular das partículas que formam a estrutura em volta da parede celular. Outros genes que podem apresentar alterações na cápsula quando modificados, demonstrando assim uma relação dos mesmos com composição dessa estrutura são: *CAP10*, *CAP60*, *CAP64*, *CAS1*, *CAS35* e *UXS1* (Bose et al., 2003).

#### **1.4.3. Resistência à Temperatura**

A termotolerância é um fator essencial para que o fungo tenha atividade patogênica no hospedeiro humano, afinal ele tem que ser capaz de crescer na temperatura do hospedeiro para sobreviver. As espécies patogênicas de *Cryptococcus* crescem bem num ambiente com temperatura de 37° (temperatura corporal). Deste modo, os mecanismos de termotolerância que permitem a este fungo sobreviver são importantes tanto para entender o progresso da infecção quanto para definir abordagens terapêuticas (Perfect, 2006).

Além da temperatura, há outras condições às quais o fungo deve sobreviver para ser capaz de causar infecção no organismo humano, condições tais como: sobreviver numa atmosfera de aproximadamente 5% de dióxido de carbono (CO<sup>2</sup>), além do pH ligeiramente alcalino dos tecidos de mamíferos. Resistindo a tais condições o *C. neoformans* é capaz de proliferar e por isso constitui um dos principais patógenos estudados para entender a termotolerância de fungos em hospedeiros humanos (Benjamin et al., 2022).

A calcineurina é uma fosfatase chave na termotolerância do *C. neoformans* e consequente capacidade de crescer à temperatura do corpo

humano. Stempinski e colaboradores (2021) realizaram um estudo robusto no qual identificaram 46 genes associados à termotolerância do fungo, o que demonstra que a genética envolvida no crescimento do fungo em altas temperaturas é determinada de forma poligênica. Além disso, o estudo revelou que genes associados à síntese de septina, tais como *CDC11* e *CDC12*, têm papel importante na sobrevivência do *C. neoformans* ao limite superior da sua faixa de termotolerância.

Outra via de transdução de sinal importante para que o *C. neoformans* sobreviva em temperaturas altas é a Ras1-Cdc24, pois o Cdc24 atua como um efetor da proteína Ras1 neste fungo, sendo que esta proteína está associada, além da termotolerância, com a diferenciação e consequente patogenia do fungo. Outra evidente importância da Ras1 é notada quando sua deleção gera cepas avirulentas e incapazes de crescer a 37°C (Nichols et al., 2007; Alspaugh et al., 2000).

#### **1.4.4. A Importância da Urease**

A urease é uma enzima com capacidade de promover a hidrólise de ureia, resultando em produtos de carbamato e amônia, o que resulta em uma alcalinização do microambiente em que o fungo cresce, além de servir como fonte de nitrogênio para o fungo. Esta enzima tem importância na capacidade do fungo de infectar o sistema nervoso central. Apesar do foco de atuação da urease do fungo seja na ureia exógena, acredita-se que a ureia produzida pela própria levedura possa funcionar como um importante substrato para a urease (Toplis et al., 2020).

Outra importante função da urease enquanto fator de virulência do *C. neoformans*, e que já era descrita na literatura, foi mais explorada em um estudo conduzido por Olszewski et al. (2004) no qual os pesquisadores utilizaram cepas selvagens de H99, cepas mutantes com deleção do gene precursor da urease no fungo (*URE1*) e cepas com urease restaurada (*ure1+URE1*). Os resultados permitiram que os autores evidenciassem experimentalmente a importância que a urease tem na invasão das leveduras no sistema nervoso central, pois esta enzima aumenta a capacidade do fungo de invadir os microcapilares permitindo que as leveduras invadam o SNC.

Além da capacidade de neutralizar o pH fagolisossomal do hospedeiro, outra função que foi teorizada por Fu, et al. (2018) é a de que a urease tem papel importante na nutrição do fungo, pois eles observaram a incapacidade da cepa mutante com deleção de *URE1* de proliferar na ureia como única fonte de nitrogênio. Os autores observaram, também, que a urease atrasa o ciclo de replicação intracelular por promover exocitose não lítica, o que permite a manutenção da integridade da membrana celular do fagócito.

#### **1.4.5. Vesículas Extracelulares**

O *C. neoformans* tem capacidade de produzir vesículas extracelulares. Essas microvesículas são importantes para a progressão da infecção causada pelo fungo, pois diversos fatores intracelulares do fungo podem ser enviados para o ambiente extracelular para influenciar o meio no qual as leveduras proliferam. Estas vesículas têm grande impacto na virulência do fungo transportando fatores de virulência intracelular para o meio extracelular e permitindo a formação da cápsula polissacarídica do fungo por meio do transporte do principal componente da cápsula: o polissacarídeo GXM, que se ancora ao redor da parede celular das leveduras (Rodrigues et al., 2008).

Outra importante função atribuída às vesículas extracelulares produzidas pelo *C. neoformans* é a imunomodulação, pois as vesículas carregam fatores (lacase e urease, por exemplo) que podem modular o ambiente extracelular, impactando a resposta imune do hospedeiro. A disponibilidade de nutrientes presentes no microambiente está relacionada com alterações na produção das vesículas e aumento da virulência. As cepas em microambiente com pouca disponibilidade de nutrientes produzem vesículas maiores e com maior carga de fatores de virulência, enquanto cepas em um microambiente rico em nutrientes tendem a ir no sentido contrário, secretando menos fatores de virulência (Marina et al., 2020).

### **1.5. Resposta Imune Contra o Fungo**

A resposta imune iniciada contra o fungo é polarizada para o tipo Th1 ou Th17 e envolve a ativação de diversos tipos de leucócitos como macrófagos, células dendríticas e linfócitos, e a consequente produção de



citocinas. As principais citocinas secretadas são TNF- $\alpha$ , Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-12 (Cheng; Sham; Kronstad, 2009; Guillot et al., 2008).

A fagocitose é um dos principais meios pelo qual a resposta imune reage à infecção por *C. neoformans*, sendo as proteínas do sistema complemento indispensáveis neste contexto, atuando como elementos opsonizantes, pois elas permitem que o componente 3 (C3) do complemento se deposite na cápsula do fungo (Taborda; Casadevall, 2002). O reconhecimento destas leveduras opsonizadas se dá por meio dos receptores do complemento (CR) que se encontram na superfície dos fagócitos que internalizarão as leveduras. Além da via do sistema complemento, a fagocitose pode se dar por meio dos receptores Fc-gamma (Fc- $\gamma$ R) que se ligam a leveduras opsonizadas por anticorpos. Os anticorpos possuem uma região Fc que é reconhecida pelos receptores Fc das células fagocitárias permitindo que estas se liguem e internalizem (fagocitem) as leveduras (Netski; Kozel, 2002; Zaragoza; Taborda; Casadevall, 2003).

As diferentes formas de opsonização, via complemento ou via subclasse de anticorpo, determinarão a ativação de diferentes receptores. O complemento ativa receptores do complemento e os anticorpos ativam receptores Fc, porém um estudo demonstrou que a presença de anticorpos pode mudar a localização em que o complemento se liga à cápsula de *C. neoformans*, demonstrando uma interação entre componentes e receptores, respectivamente: C3-CR3 e C3-CR4. As diferentes opsoninas e receptores ativados neste contexto podem então influenciar como a resposta imune ocorre nos macrófagos com as leveduras internalizadas (Zaragoza; Casadevall, 2006).

Como protagonistas na resposta imune contra o *C. neoformans* os macrófagos também são alvos de estudos e isso levou a entender que o fungo reage de forma diferente dependendo da polarização da resposta imune. Os macrófagos M1 sintetizam uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias e se a resposta está polarizada para macrófagos M1 estes possuem atuação protetora eficiente. Já os macrófagos M2 estão associados à uma resposta não-protetora contra o *C. neoformans* (figura 5) e essa interação é importante, pois o fungo pode utilizar estes macrófagos para se evadir à resposta imune e perpetuar a infecção (Davis et al., 2013)

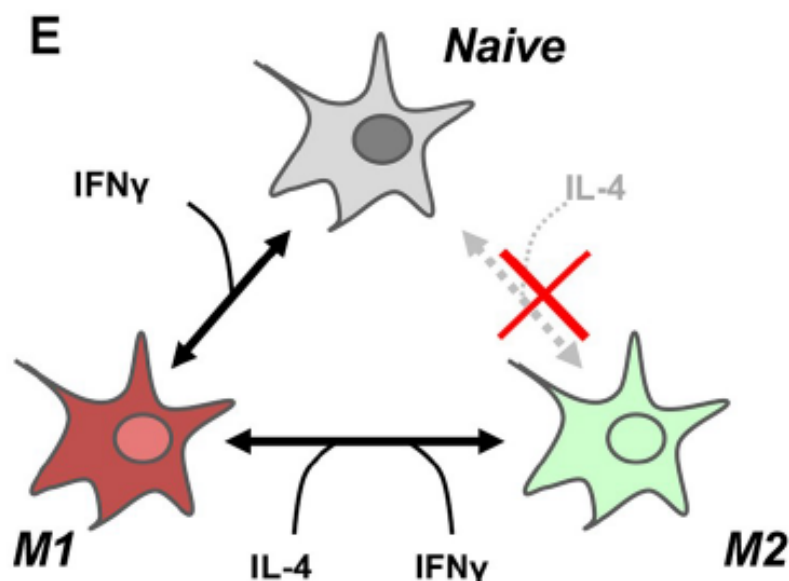


Figura 5 – Esquema resumido da polarização de macrófagos M1 por IFN- $\gamma$  e M2 por IL-4 (Subramani et al., 2020).

A capacidade do *C. neoformans* de se evadir à resposta imune e se esconder em células fagocíticas é tratado por alguns autores como mecanismo de “cavalo de Tróia”. Este mecanismo é um dos principais meios pelo qual as células fúngicas conseguem invadir o sistema nervoso central, pois ao sobreviver a fagocitose e permanecer dentro das células fagocitárias, o fungo chega aos capilares cerebrais onde causarão a infecção e inflamação das meninges (Casadevall, 2010).

### 1.5.1. Fagocitose do *C. neoformans*

A literatura sugere que o *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo, pois ele é frequentemente encontrado nos fagossomos de macrófagos durante a fase crônica da criptococose. A interação dos macrófagos com o fungo é alvo de muitos estudos e se sabe que no início da fagocitose o fagossomo contendo as leveduras sofre acidificação e fusão com lisossomos, além disso o fagossomo amadurece normalmente, não havendo interferência do fungo neste processo. Todavia, o *C. neoformans* não morre no vacúolo acidificado gerado no fagossomo maduro; pelo contrário, ele consegue se proliferar. Apesar de os mecanismos para essa sobrevivência não serem totalmente elucidados, acredita-se que envolvam danos às

membranas fagossomais, bem como liberação de moléculas antioxidantes diminuindo, assim, a acidez (Nicola et al., 2011).

Após a sobrevivência e proliferação do fungo no interior do fagossomo, o *C. neoformans* consegue escapar da célula do hospedeiro por exocitose não-lítica, evitando dano à célula e garantindo a sobrevivência tanto do fungo quanto da célula hospedeira, pois neste tipo de exocitose o mecanismo utilizado pelo microrganismo para sair do interior do macrófago não causa ruptura da membrana celular (Alvarez e Casadevall, 2006).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Por todo o contexto apresentado acerca da alta incidência, inclusive com acometimento global, e estando associada com uma alta taxa de letalidade, os estudos envolvendo o principal agente causador da criptococose se revelam importantes. Considerando, ainda, que a criptococose é a micose com maior letalidade dentre as doenças fúngicas que causam meningite. A criptococose é mais endêmica em países subdesenvolvidos, como o Brasil em que a taxa letalidade pode chegar até 70% em indivíduos HIV positivos, portanto o maior entendimento do principal patógeno associado a esta doença pode auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e sobrevivência dos grupos de risco.

## **3. HIPÓTESE**

No mecanismo de fagocitose e acidificação do fagolisossomo ocorre alteração do pH que fica altamente ácido de forma a promover a morte do fungo. A sobrevivência do *C. neoformans* está associada com algum mecanismo de resistência e evasão dessa acidificação promovida no meio intracelular das células fagocíticas.

## 4. OBJETIVO

### 4.1. Objetivo Geral

Construir um novo plasmídeo com proteínas de fluorescência eficiente para transformação de *Cryptococcus neoformans*.

### 4.1.2. Objetivos Específicos

- Verificar a eficiência de transformação do novo plasmídeo pHluorin-GRvT.
- Observar as diferentes fluorescências emitidas pelas proteínas do plasmídeo.
- Promover ensaio de fagocitose para documentar a interação do fungo transformado com os macrófagos.

## 5. METODOLOGIA

### Considerações Gerais

Todos os meios de cultura utilizados foram preparados seguindo a receita padrão segundo o livro de “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition*” realizando os devidos ajustes para a quantidade de meio que se objetivou preparar, exceto se mencionado o contrário. Todos os procedimentos de cultura e troca de meio foram realizados em cabine de fluxo laminar para evitar contaminação das amostras.

### 5.1. *C. neoformans*: cepa selvagem e mutantes

A cepa de *C. neoformans* utilizada foi a H99 também conhecida como “cepa selvagem”. A H99 é uma variante pertencente ao sorotipo A e estava disponível em estoque próprio do laboratório de Biologia Molecular (Biomol) do Instituto de Biologia (IB) gerido pela Profa. Dra. Ildinete Pereira. A cepa mutante utilizada foi a “*rcv1*Δ”, ou seja, uma cepa com deleção do fator de transcrição Rcv1. A escolha dessa mutante se deu para melhor investigar as

funções relacionadas ao fator deletado, considerando descobertas já documentadas acerca desse fator, quais sejam:

A proteína nomeada “*Required for Cytokinesis and Virulence 1*” (Rcv1), cujo nome está diretamente relacionado com as alterações fenotípicas do fungo quando da ausência desta proteína e em tradução livre significa Requirida para citocinese e virulência 1. Em termos estruturais a Rcv1 possui similaridade com a Wor1 de *Candida albicans* e assim como sua homóloga está associada a fatores de sobrevivência essenciais ao fungo. A deleção da Rcv1 apresenta alguns prejuízos ao *C. neoformans* como uma cápsula reduzida, o que sugere uma importância dessa proteína na indução da cápsula. Além disso, cepas nocaute para Rcv1 apresentam defeitos de citocinese e de crescimento a temperatura de 37°C demonstrando-se avirulentas em camundongos (Paes et al., 2018).

Com isso, sabe-se que esta proteína configura como um importante regulador de fenótipos essenciais para adaptação do *C. neoformans*. A *rcv1Δ* e a reconstituída *rcv1+RCV1* também já estavam disponíveis em estoque. Os estoques encontravam-se adequadamente acondicionados por criopreservação em freezer à -80 °C. As amostras de colônia foram obtidas de cada tubo de criopreservação, correspondente a cada cepa, com um palito de madeira e estricado em placas de cultura contendo meio YPD sólido (20 g/L peptona, 10 g/L extrato de levedura, 20 g/L dextrose e 15 g/L de ágar).

## **5.2. Macrófagos imortalizados**

Os macrófagos escolhidos para posterior ensaio de fagocitose, após a transformação do fungo, foram os macrófagos imortalizados da linhagem J774. Os macrófagos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) para crescimento das células em placa petri própria para a aderência das células. A cada dois dias foi realizada a troca do meio e a passagem das células (não superando a décima passagem) para uma nova placa visando manter o correto crescimento das células e evitar contaminações.

### 5.3. Plasmídeo para transformação (amplificação)

O plasmídeo foi desenhado utilizando como base o vetor pUC57-Kan ao qual se adicionou dois genes de fluorescência para a marcação de morte e sobrevivência do fungo (figura 6) quando fagocitado tendo em vista a sensibilidade das proteínas ao pH.

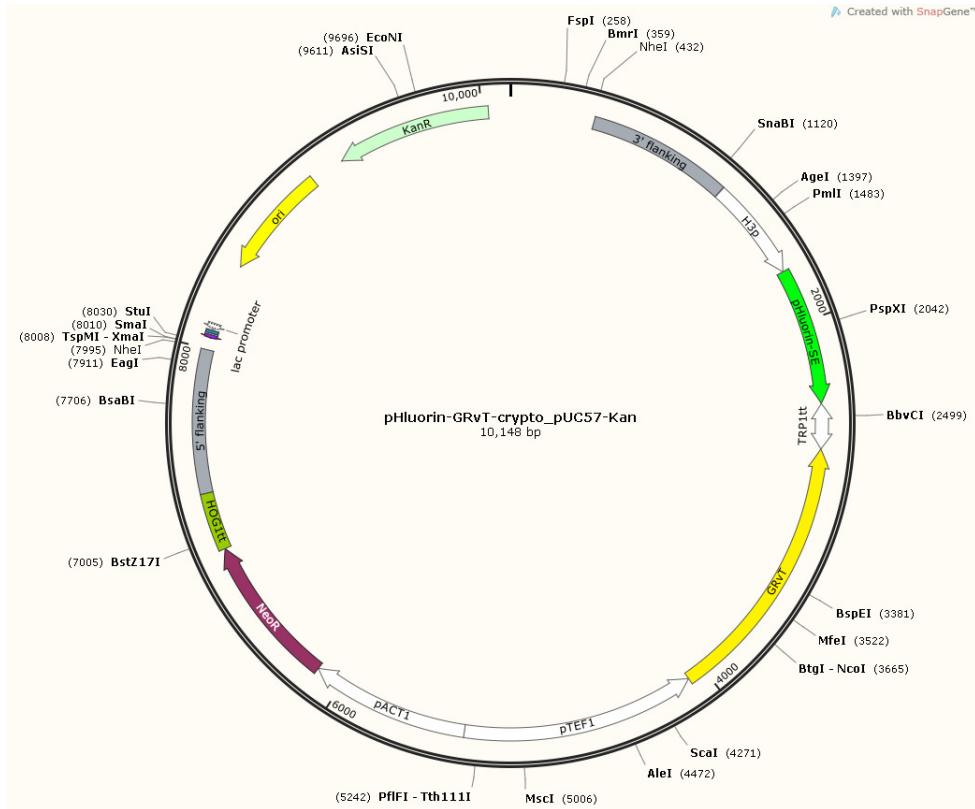


Figura 6 – Plasmídeo pHluorin-GRvT construído no SnapGene. O plasmídeo contém dois marcadores (genes) de fluorescência para documentação da morte e sobrevivência do *C. neoformans*. O gene pHluorin-SE corresponde à proteína fluorescente sensível ao pH. O gene GRvT corresponde à proteína fluorescente resistente ao pH.

Conforme pode ser observado na tabela 1, algumas características na montagem do plasmídeo são essenciais para os ensaios de fagocitose, como a proteína pHluorin-SE que perde a fluorescência em pH ácido, o que remove a cor verde de sua emissão caso o fungo esteja morto e seu citosol seja acidificado pela incapacidade de mantê-lo neutro. Já a proteína com fluorescência amarela foi denominada como GRvT e é resistente ao pH ácido, o que significa que células vivas fluorescerão nos dois espectros, enquanto que mortas apenas no espectro de emissão da GRvT. O gene de seleção atribuído ao plasmídeo foi o NeoR (gene de resistência ao G418/geneticina).

O plasmídeo contendo as duas proteínas de fluorescência foi denominado como: pHluorin-GRvT-crypto\_pUC57-Kan (pH-GRvT). Como o plasmídeo chegou intacto da fabricante ele foi amplificado pelo método de Amplificação em Círculo Rolante (RCA), seguindo o protocolo disponibilizado pela fabricante do kit (EquiPhi29 Thermo Fisher Scientific), com a seguinte alteração:

- i. Foi preparado dNTP colocando 5 µL de cada um dos 4 (quatro) reagentes para uma diluição de 4x. Os reagentes foram dATP, dTTP, dCTP e dGTP. A concentração inicial dos reagentes foi de 100 mM, então foi obtida uma concentração final de 25 mM.

Tabela 1: Principais regiões do plasmídeo pHluorin-GRvT

<b>Região</b>	<b>Função/Descrição</b>	<b>Referência</b>
H3p	Promotora de histona H3.	Georgiadis et al., 2023
pHluorin-SE	Variante de GFP altamente suscetível ao pH com fluorescência quase completamente ausente em pH ácido.	Tanida; Ueno & Uchiyama, 2014
GRvT	Uma variante de tdTomato que é muito resistente ao pH ácido e à lise lisossomal. Proteína com dois grupamentos para emissão final por FRET, em que a emissão da primeira excita a segunda, que pode ser vista num comprimento de onda de 557 nm.	Wiens et al., 2016
pTEF1	Promotor TEF1 com eficiência para edição genômica.	Huang et al., 2022
pACT1	O mesmo promotor <i>ACT1</i> encontrado em pCN19 com uma pequena diferença de cinco nucleotídeos, mas praticamente a mesma sequência.	Wang et al., 2016

NeoR	Gene de resistência para seleção das cepas mutantes com neomicina (G418/geneticina).	de Castro et al., 2022
------	--	------------------------

#### 5.4. Digestão dos plasmídeos

O produto da amplificação por RCA do plasmídeo pH-GRvT foi digerido com a enzima NheI-HF, uma enzima de alta fidelidade que permite maior eficiência na digestão que seguiu os seguintes passos:

- i. A cada um dos produtos de RCA (pH-GRvT e rCV1) foram adicionados 1 µL da enzima NheI-HF para clivar os segmentos de DNA do plasmídeo de forma a linearizá-lo.
- ii. Foram acrescidos à mistura 10 µL do tampão rCutSmart.
- iii. O volume total foi completado para 100 µL com água Mili-Q.
- iv. A reação foi levada ao termobloco a 37 °C pernoite.

O resultado da digestão foi verificado em gel de agarose 1% corado com 2 µL de brometo de etídio no dia seguinte.

#### 5.5. Transformação por biobalística

Um dia antes da semeadura em meio líquido foi preparada culturas jovens em meio YPD sólido seguindo os passos mencionados no item 5.1 da metodologia. Uma colônia de cada cepa (H99 e *rcv1Δ*) foi inoculada em erlenmeyers de 250 mL diferentes contendo 50 mL de YPD líquido. Culturas líquidas foram incubadas à 30 °C por dois dias sob agitação constante de 150 rpm. Enquanto incubadas as culturas, um dia antes da transformação foram preparados os demais materiais necessários, incluindo as placas YPD ágar + 1M sorbitol, bem como a esterilização das partículas de tungstênio e das membranas carreadoras e de pressão. A suspensão de leveduras cultivadas foi espalhada nas placas de YPD ágar + 1M Sorbitol e deixadas para secar por 2 horas. Um volume final de 5 µL do plasmídeo foi utilizado para a transformação que se seguiu com ajuste dos seguintes parâmetros: A distância do alvo foi ajustada para 6 mm; a pressão de gás hélio para 1200 psi



e a pressão de vácuo para 27 mmHg. As células foram então bombardeadas e incubadas pernoite (por mais de 12h). No dia seguinte, as células bombardeadas foram recuperadas procedendo com a raspagem das células com YPD líquido. O volume recuperado foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos para diminuir o volume do sobrenadante. As duas cepas transformadas (H99+pH-GRvT, *rcv1*Δ+pH-GRvT) foram plaqueadas em duplicata, totalizando 4 placas contendo meio de seleção (geneticina) e ampicilina para garantir que não houvesse crescimento de outros microrganismos (bactérias).

### 5.6. Citometria de fluxo

Para a análise em citometria de fluxo, os transformantes foram semeados em placas Petri contendo 25 mL de meio YPD ágar + geneticina e com malha para repique de colônias. A cepa selvagem H99 (sem transformação) foi utilizada como controle negativo. Após o crescimento das colônias na placa com malha (numerada), foram realizados os repiques das colônias de cada número para placa de 96 poços estéril com tampa e sem tratamento para culturas de células. O repique das placas numeradas com malha para a placa de 96 poços seguiu a seguinte organização: em A1 foi semeado o controle negativo H99; de A2 a D12 foram semeados os transformantes de H99 (H99+pH-GRvT); no poço E1 semeou-se a cepa *rcv1*Δ como controle negativo e de E2 a H12 foram semeados os transformantes fluorescentes de *rcv1*Δ (*rcv1*Δ+pH-GRvT). Então foi realizada a análise das amostras por citometria de fluxo.

## 6. RESULTADOS

A amplificação por RCA teve grande eficácia. Após a digestão com a enzima adequada (NheI-HF), a análise em 20 mL de gel de agarose 1%, corado com 2 µL de brometo de etídio revelou que o plasmídeo foi adequadamente amplificado e apresentou as duas bandas que se objetivava observar referentes aos genes de fluorescência (figura 7).

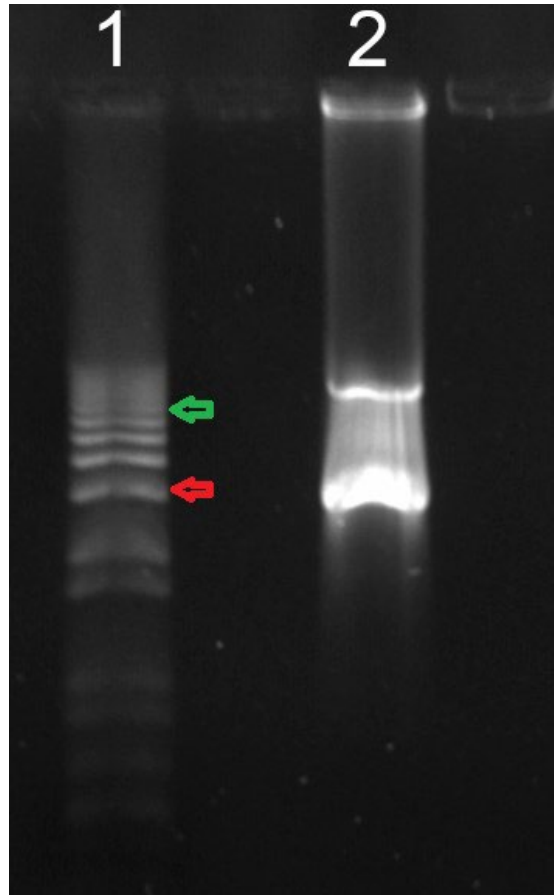


Figura 7 – Observação das bandas do plasmídeo pH-GRvT em gel de agarose após digestão. O poço 1 corresponde ao marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen), a seta verde identifica a banda de 7000 bp no marcador enquanto a seta vermelha identifica a banda de 3000 bp do marcador de peso molecular. O poço 2 corresponde ao plasmídeo e mostra as bandas do pH-GRvT digerido, sendo o tamanho estimado da banda inferior equivalente a 2585 bp e o tamanho estimado da banda superior de 7563 bp.

Apesar da tentativa de transformação por outros métodos, apenas a transformação por biobalística foi eficiente. Após os procedimentos adequados seguindo os protocolos apresentados (vide metodologia) os transformantes apresentaram crescimento em meio de seleção contendo geneticina e ampicilina. A escolha da adição de ampicilina no meio foi para garantir que não houvesse crescimento de bactérias (contaminantes) após a transformação.

Como as colônias apresentaram crescimento mais rápido que o esperado e estavam pequenas inicialmente, foi realizado o isolamento de um fragmento das colônias e levado ao microscópio para observar se, de fato, se

tratava de leveduras ou bactérias. Desta forma, foi possível observar que apesar do rápido crescimento as colônias que foram observadas eram leveduras de *C. neoformans*, pois o meio de cultura foi preparado com antibiótico de seleção (G418/geneticina) não havendo possibilidade de outras leveduras crescerem no meio, apenas as com o gene de resistência.

Após a confirmação das colônias serem dos transformantes das cepas fúngicas, as placas foram incubadas mais um dia para melhor crescimento das colônias que, apesar de numerosas, estavam pequenas. As placas contendo as colônias de mutantes foram observadas com frequência para que as mesmas não confluíssem.

Após o adequado crescimento das colônias as mesmas foram plaqueadas em placa com malha numerada e levadas a placa de 96 poços para análise da fluorescência por citometria de fluxo. A análise da citometria revelou uma grande quantidade de células únicas (ou seja, sem células-filhas aderidas; células específicas de H99, *rcv1* $\Delta$  e suas transformações com o plasmídeo pHluorin-GRvT) (fig. 8A gráficos 1 e 2). Todavia, todas as células apresentaram fluorescência negativa tanto para GRvT quanto para pHluorin (fig. 8A gráfico 3) o que pode ser evidenciado pela presença de células no Q4 que indica duplo negativo para os marcadores analisados. A figura 8B apresenta a dupla negatividade diferenciada por células controle (H99 e RCV1) e suas respectivas versões transformadas com pHluorin-GRvT.

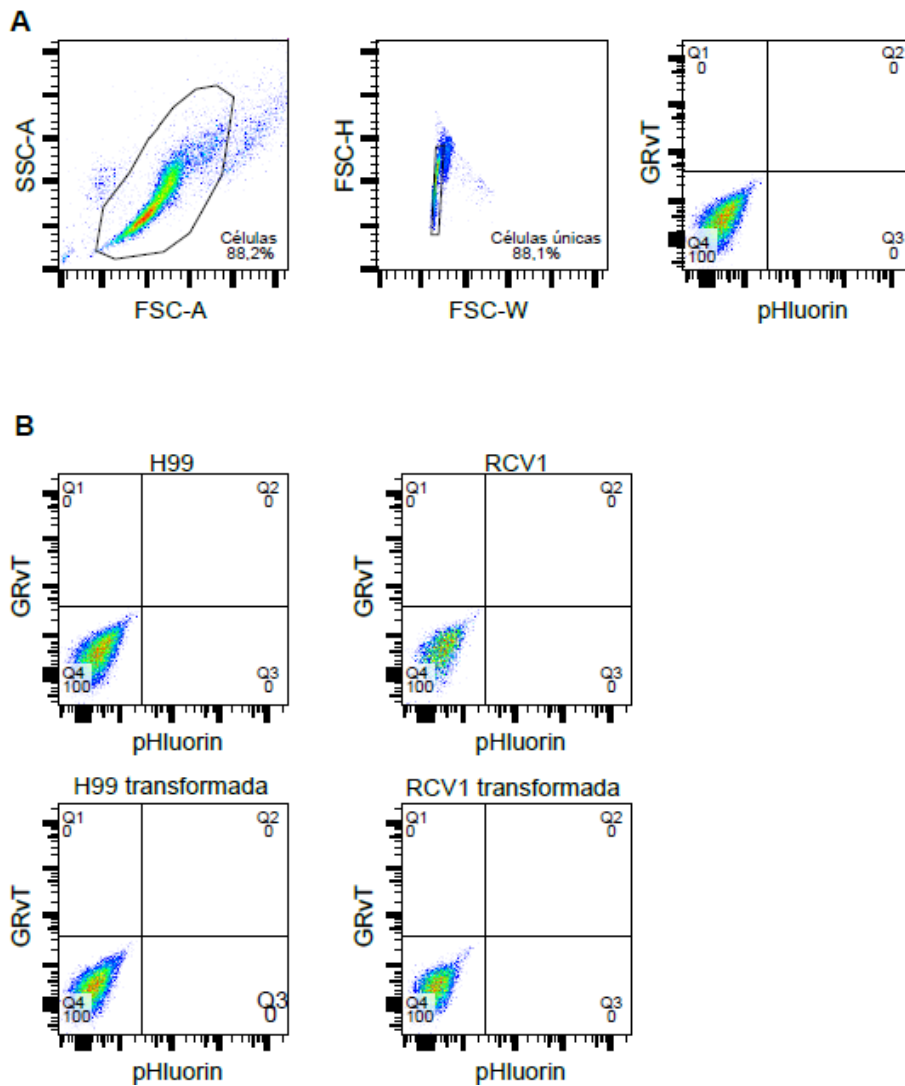


Figura 8 – Intensidade da fluorescência de GRvT e pHluorin por citometria de fluxo. A) demonstra a porcentagem de células únicas nos dois primeiros gráficos, já o terceiro gráfico indica duplo negativo para GRvT e pHluorin. B) cada gráfico indica que todas as células controle negativo e transformadas de H99 e RCV1 foram negativas para as proteínas de fluorescência GRvT e pHluorin.

Numa comparação das fluorescências máxima e mínima entre os controles negativos e as células transformadas foi possível notar que, apesar da fluorescência máxima da H99 transformada (44,4) superar a do controle, isso só se demonstrou em uma única amostra ficando todas as outras com fluorescência abaixo do controle negativo (35,7). A fluorescência máxima da RCV1 transformada (27,2) ficou abaixo do controle negativo (36,6). O mesmo é observado na análise da fluorescência de GRvT das células transformadas de H99 e *rcv1Δ* (fig. 9). As intensidades de fluorescência de cada mutante e dos controles podem ser observadas de forma completa no Anexo I – Tabela 2.

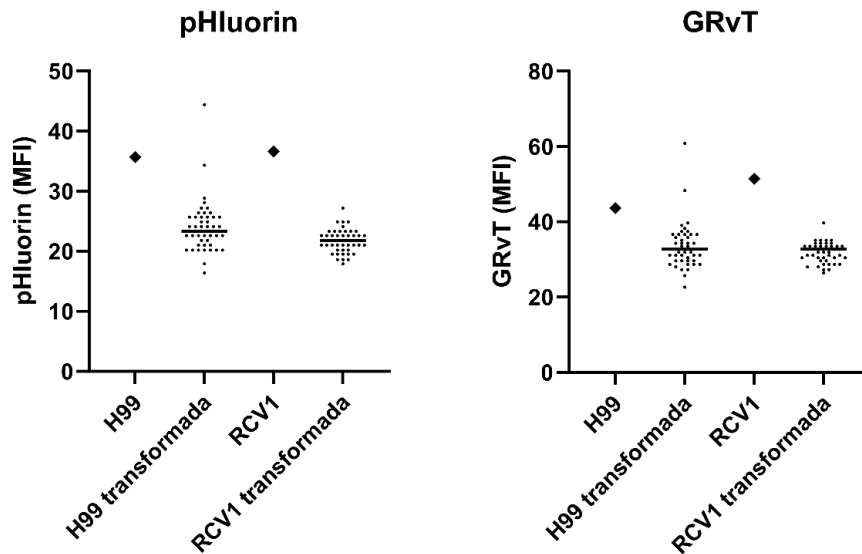


Figura 9 – Relação de intensidade de fluorescência entre os controles negativos e as cepas mutantes. H99 e RCV1 representam os controles negativos utilizados e H99 transformada e RCV1 transformada são as cepas mutantes com o plasmídeo pHluorin-GRvT inserido em seu genoma. No primeiro gráfico é comparada a fluorescência no comprimento de onda da pHluorin, já no segundo gráfico é comparada a fluorescência no comprimento de onda da GRvT.

## 7. DISCUSSÃO

Foram realizados diferentes ensaios de transformação com este plasmídeo, utilizando-se métodos de choque térmico e eletroporação, contudo estes métodos não se revelaram eficientes para a transformação do *C. neoformans* o que permitiu identificar uma complexidade ao se trabalhar com o novo plasmídeo denominado pHluorin-GRvT. Contudo, a transformação foi possível pelo método de biobalística, solucionando a dificuldade de transformação do fungo.

Apesar da transformação bem-sucedida, após a análise da citometria de fluxo, não foi possível identificar diferença significativa entre o controle negativo e os transformantes. A fluorescência do controle é normal, tendo em vista que as leveduras possuem um valor de autofluorescência, porém foi esperado se observar uma diferença de intensidade de pelo menos 10 vezes mais intensidade nas cepas mutantes quando comparadas a autofluorescência dos controles negativos, o que não ocorreu.

Foram discutidas algumas hipóteses para a não diferença de fluorescência observada, sendo uma delas devido a problemas de dobramento em sistemas heterólogos que fazem com que a proteína se torne insolúvel devido a diferença de maquinaria molecular de células eucariontes e procariontes (Chang et al., 2014). Elas podem se tornar insolúveis por degradação ou agregação, em ambos os casos pode-se haver prejuízos na função e ou estrutura das proteínas. Uma possível edição no plasmídeo utilizando ferramentas de predição de solubilidade em bioinformática pode ser promissora para aumentar a eficiência das proteínas de fluorescência.

Outra possibilidade da não observação de diferença significativa na fluorescência dos transformantes pode estar relacionada a problemas na expressão dos genes das proteínas fluorescentes. Os genes de *C. neoformans* em geral possuem íntrons, e embora a expressão de cassetes gerados a partir de cDNA possa funcionar (Paes et al., 2018), já se observou que a presença de íntrons pode ser necessária para a expressão de certos genes (Goebels et al., 2013). Futuramente, esta construção poderá ser editada para tentar solucionar este problema.

## 8. CONCLUSÃO

A transformação do *Cryptococcus neoformans* com o plasmídeo que foi construído foi bem-sucedida e apesar de não ter sido observada diferença na fluorescência dos mutantes comparado aos controles, a ideia que norteou a construção deste plasmídeo é inovadora e a documentação da sobrevivência e morte do *Cryptococcus neoformans* por marcadores de fluorescência é promissora, não havendo nenhum registro desse tipo de experimento na literatura até o momento. A continuidade deste estudo permitirá uma maior compreensão dos mecanismos de evasão da resposta imune, bem como a invasão do sistema nervoso.

Conclui-se, no entanto, a necessidade de melhor compreender o comportamento das proteínas de fluorescência em sistemas heterólogos como é o caso do fungo aqui estudado.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSPAUGH, J. A. et al. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 352–365, 2000.
- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2161–2165, 2006.
- BASTOS, A. L. DE et al. Perfil clínico-epidemiológico da criptococose associada e não associada à infecção pelo HIV na região Centro-Oeste do Brasil / Clinical and epidemiological aspects of cryptococcosis associated and non-associated to HIV infection in Central Western region of Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, p. 18214–18230, 2022.
- CHADWICK, B. J. et al. The RAM signaling pathway links morphology, thermotolerance, and CO<sub>2</sub> tolerance in the global fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **eLife**, v. 11, 2022.
- BOSE, I. et al. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 4, p. 655–663, 2003.
- CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1389–1392, 2010.
- CASADEVALL, A. et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822–831, 2018.
- CHANG, C. C. H. et al. Bioinformatics approaches for improved recombinant protein production in *Escherichia coli*: protein solubility prediction. **Briefings in Bioinformatics**, v. 15, n. 6, p. 953–962, 2013.
- CHENG, P.-Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* Isolates from the British Columbia Cryptococcosis Outbreak Induce Less Protective Inflammation in a Murine Model of Infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4284–4294, 2009.
- CORDERO, R. J. B.; CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Melanization in *Cryptococcus neoformans* Requires Complex Regulation. **mBio**, v. 11, n. 1, 2020.

DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. **mBio**, v. 4, n. 3, 2013.

DE CASTRO, A. et al. Engineered Fluorescent Strains of *Cryptococcus neoformans*: a Versatile Toolbox for Studies of Host-Pathogen Interactions and Fungal Biology, Including the Viable but Nonculturable State. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 5, 2022.

ENACHE-ANGOULVANT, A. et al. Molecular Identification of *Cryptococcus neoformans* Serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1261–1265, 2007.

FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 2018.

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

GEORGIADIS, I. et al. Identification and Construction of Strong Promoters in *Yarrowia lipolytica* Suitable for Glycerol-Based Bioprocesses. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1152–1152, 2023.

GERSTEIN, A. C.; NIELSEN, K. It's not all about us: evolution and maintenance of *Cryptococcus* virulence requires selection outside the human host. **Yeast**, v. 34, n. 4, p. 143–154, 2017.

GOEBELS, C. et al. Introns Regulate Gene Expression in *Cryptococcus neoformans* in a Pab2p Dependent Pathway. **PLOS Genetics**, v. 9, n. 8, p. e1003686–e1003686, 2013.

HUANG, M. Y. et al. Short homology-directed repair using optimized Cas9 in the pathogen *Cryptococcus neoformans* enables rapid gene deletion and tagging. **Genetics**, v. 220, n. 1, 2021.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 69–105, 2006.



LIN, X. et al.  $\alpha$ AD $\alpha$  Hybrids of *Cryptococcus neoformans*: Evidence of Same-Sex Mating in Nature and Hybrid Fitness. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 10, p. e186, 2007.

MARINA, C. L. et al. Nutritional Conditions Modulate *C. neoformans* Extracellular Vesicles' Capacity to Elicit Host Immune Response. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1815, 2020.

MATTOON, E.R.; CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A. Melanization Reduces *Cryptococcus neoformans* Susceptibility to Mechanical Stress. **mSphere**, v. 8, n. 1, 2023.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.

MAZIARZ, E.K., PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Springer eBooks**, p. 245–265, 2023.

NETSKI, D.; KOZEL, T. R. Fc-Dependent and Fc-Independent Opsonization of *Cryptococcus neoformans* by Anticapsular Monoclonal Antibodies: Importance of Epitope Specificity. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2812–2819, 2002.

NICHOLS, C. B.; PERFECT, Z. H.; J. ANDREW ALSPAUGH. A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1118–1130, 2006.

NICOLA, A. M. et al. Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from Macrophages Occurs In Vivo and Is Influenced by Phagosomal pH. **mBio**, v. 2, n. 4, 2011.

DE OLIVEIRA, Lidiane. Fatores microbiológicos da criptococose e sua importância na carga da doença em pacientes atendidos em um hospital de referência do Estado de São Paulo. 2019. *Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo*, São Paulo, 2019.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012.

PAES, Hugo Costa et al. A Wor1-Like Transcription Factor Is Essential for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, 2018.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61–79, 2013.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 463–468, 2006.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837–874, 2002.

RAJASINGHAM, R. et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, 2022.

RODRIGUES, M. L. et al. Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 1, p. 58–67, 2007.

SAKAGUCHI, N. et al. Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. **Mycopathologia**, v. 121, n. 3, p. 133–141, 1993.

STEMPINSKI, P. R. et al. Genetic contribution to high temperature tolerance in *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 217, n. 1, 2020.

SUBRAMANI, A. et al. Intracellular *Cryptococcus neoformans* disrupts the transcriptome profile of M1- and M2-polarized host macrophages. **PLOS ONE**, v. 15, n. 8, p. e0233818, 2020.

TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) Are Involved in Complement-Independent Antibody-Mediated Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 791–802, 2002.

TANIDA, I.; UENO, T.; UCHIYAMA, Y. A Super-Ecliptic, pHluorin-mKate2, Tandem Fluorescent Protein-Tagged Human LC3 for the Monitoring of Mammalian Autophagy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110600, 2014.

- TOPLIS, B. et al. The virulence factor urease and its unexplored role in the metabolism of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 4, 2020.
- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131–3136, 1995.
- WANG, Y. et al. A “suicide” CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.
- WANG, Y. et al. Macrophage Mediated Immunomodulation During *Cryptococcus* Pulmonary Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.
- WATKINS, R.; KING, J.; JOHNSTON, S. Nutritional Requirements and Their Importance for Virulence of Pathogenic *Cryptococcus* Species. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 65, 2017.
- WIENS, M. D. et al. A Tandem Green-Red Heterodimeric Fluorescent Protein with High FRET Efficiency. **ChemBioChem**, v. 17, n. 24, p. 2361–2367, 2016.
- WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, n. 5, p. e99-107, 1997.
- ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibodies can affect complement deposition on the capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* by both classical pathway activation and steric hindrance. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1862–1876, 2006.
- ZARAGOZA, O.; TABORDA, CARLOS P.; CASADEVALL, A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 7, p. 1957–1967, 2003.

## ANEXO 1

Tabela 2 – Intensidade de fluorescência das células mutantes e seus respectivos controles negativos.

	Células/Células únicas   Median (FITC-A)	Células/Células únicas   Median (PE-A)
15-3-2023_H99 transformada_022.fcs	16,4	22,6
15-3-2023_H99 transformada_029.fcs	17,9	25,7
15-3-2023_H99 transformada_002.fcs	20,2	28,7
15-3-2023_H99 transformada_003.fcs	20,2	29,6
15-3-2023_H99 transformada_009.fcs	20,2	28,7
15-3-2023_H99 transformada_016.fcs	20,2	29,6
15-3-2023_H99 transformada_025.fcs	20,2	27,3
15-3-2023_H99 transformada_039.fcs	20,2	27,3
15-3-2023_H99 transformada_047.fcs	20,2	28
15-3-2023_H99 transformada_006.fcs	21	28,7
15-3-2023_H99 transformada_013.fcs	21	28,7
15-3-2023_H99 transformada_043.fcs	21	31,1
15-3-2023_H99 transformada_015.fcs	21,8	29,6
15-3-2023_H99 transformada_020.fcs	21,8	31,1
15-3-2023_H99 transformada_004.fcs	22,6	32,7
15-3-2023_H99 transformada_008.fcs	22,6	31,1
15-3-2023_H99 transformada_010.fcs	22,6	33,5
15-3-2023_H99 transformada_012.fcs	22,6	31,1
15-3-2023_H99 transformada_017.fcs	22,6	30,4
15-3-2023_H99 transformada_018.fcs	22,6	31,1
15-3-2023_H99 transformada_046.fcs	22,6	29,6
15-3-2023_H99 transformada_023.fcs	23,3	31,9
15-3-2023_H99 transformada_037.fcs	23,3	31,9
15-3-2023_H99 transformada_044.fcs	23,3	32,7
15-3-2023_H99 transformada_001.fcs	24,1	34,3
15-3-2023_H99 transformada_024.fcs	24,1	32,7
15-3-2023_H99 transformada_030.fcs	24,1	32,7
15-3-2023_H99 transformada_033.fcs	24,1	31,9
15-3-2023_H99 transformada_034.fcs	24,1	34,3
15-3-2023_H99 transformada_045.fcs	24,1	33,5
15-3-2023_H99 transformada_027.fcs	24,9	35,8
15-3-2023_H99 transformada_038.fcs	24,9	34,3
15-3-2023_H99 transformada_005.fcs	25,7	36,6
15-3-2023_H99 transformada_007.fcs	25,7	35,8
15-3-2023_H99 transformada_021.fcs	25,7	36,6
15-3-2023_H99 transformada_031.fcs	25,7	36,6
15-3-2023_H99 transformada_036.fcs	25,7	34,3
15-3-2023_H99 transformada_040.fcs	25,7	36,6
15-3-2023_H99 transformada_011.fcs	26,4	36,6
15-3-2023_H99 transformada_028.fcs	26,4	39
15-3-2023_H99 transformada_041.fcs	26,4	35,1
15-3-2023_H99 transformada_026.fcs	27,2	38,2
15-3-2023_H99 transformada_042.fcs	27,2	37,4
15-3-2023_H99 transformada_032.fcs	28,1	39,7
15-3-2023_H99 transformada_035.fcs	28,8	37,4
15-3-2023_H99 transformada_019.fcs	34,3	48,3

15-3-2023_H99 transformada_014.fcs	44,4	60,8
15-3-2023_H99.fcs	35,7	43,6
15-3-2023_RCV1 transformada_006.fcs	17,9	26,4
15-3-2023_RCV1 transformada_010.fcs	18,6	28,7
15-3-2023_RCV1 transformada_013.fcs	18,6	27,3
15-3-2023_RCV1 transformada_022.fcs	18,6	28
15-3-2023_RCV1 transformada_014.fcs	19,5	27,3
15-3-2023_RCV1 transformada_019.fcs	19,5	28,7
15-3-2023_RCV1 transformada_028.fcs	19,5	28,7
15-3-2023_RCV1 transformada_034.fcs	19,5	28
15-3-2023_RCV1 transformada_039.fcs	19,5	29,6
15-3-2023_RCV1 transformada_004.fcs	20,2	32,7
15-3-2023_RCV1 transformada_027.fcs	20,2	31,1
15-3-2023_RCV1 transformada_044.fcs	20,2	30,4
15-3-2023_RCV1 transformada_001.fcs	21	31,1
15-3-2023_RCV1 transformada_002.fcs	21	30,4
15-3-2023_RCV1 transformada_011.fcs	21	30,4
15-3-2023_RCV1 transformada_018.fcs	21	29,6
15-3-2023_RCV1 transformada_025.fcs	21	31,9
15-3-2023_RCV1 transformada_030.fcs	21	28,7
15-3-2023_RCV1 transformada_037.fcs	21	32,7
15-3-2023_RCV1 transformada_041.fcs	21	30,4
15-3-2023_RCV1 transformada_043.fcs	21	32,7
15-3-2023_RCV1 transformada_020.fcs	21,8	31,9
15-3-2023_RCV1 transformada_021.fcs	21,8	33,5
15-3-2023_RCV1 transformada_029.fcs	21,8	33,5
15-3-2023_RCV1 transformada_031.fcs	21,8	32,7
15-3-2023_RCV1 transformada_032.fcs	21,8	30,4
15-3-2023_RCV1 transformada_033.fcs	21,8	32,7
15-3-2023_RCV1 transformada_003.fcs	22,6	33,5
15-3-2023_RCV1 transformada_005.fcs	22,6	34,3

15-3-2023_RCV1		
transformada_007.fcs	22,6	33,5
15-3-2023_RCV1		
transformada_009.fcs	22,6	33,5
15-3-2023_RCV1		
transformada_012.fcs	22,6	31,9
15-3-2023_RCV1		
transformada_015.fcs	22,6	32,7
15-3-2023_RCV1		
transformada_017.fcs	22,6	31,1
15-3-2023_RCV1		
transformada_042.fcs	22,6	33,5
15-3-2023_RCV1		
transformada_047.fcs	22,6	33,5
15-3-2023_RCV1		
transformada_008.fcs	23,3	35,1
15-3-2023_RCV1		
transformada_016.fcs	23,3	34,3
15-3-2023_RCV1		
transformada_023.fcs	23,3	31,1
15-3-2023_RCV1		
transformada_024.fcs	23,3	32,7
15-3-2023_RCV1		
transformada_026.fcs	23,3	33,5
15-3-2023_RCV1		
transformada_045.fcs	23,3	35,1
15-3-2023_RCV1		
transformada_036.fcs	24,1	34,3
15-3-2023_RCV1		
transformada_035.fcs	24,9	35,1
15-3-2023_RCV1		
transformada_038.fcs	24,9	35,1
15-3-2023_RCV1		
transformada_046.fcs	24,9	34,3
15-3-2023_RCV1		
transformada_040.fcs	27,2	39,7
15-3-2023_RCV1.fcs	36,6	51,4
Mean	23,1	33
SD	3,98	5,11

Esta coluna mostra a mediana de intensidade de fluorescência de pHLuorin.

Esta coluna mostra a mediana de intensidade de fluorescência de GRvT.