



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ELIANDRO REIS TAVARES

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME FORMADO POR  
*Cryptococcus gattii* UTILIZANDO ABORDAGENS  
FENOTÍPICAS E MOLECULARES**

---

Londrina  
2016

ELIANDRO REIS TAVARES

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME FORMADO POR  
*Cryptococcus gattii* UTILIZANDO ABORDAGENS  
FENOTÍPICAS E MOLECULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada  
Ogatta

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Tavares, Eliandro Reis.

Caracterização do biofilme formado por *Cryptococcus gattii* utilizando abordagens fenotípicas e moleculares / Eliandro Reis Tavares. - Londrina, 2016.

111 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Leveduras (Fungos) - Engenharia genética - Tese. 2. Fungo - Genética - Tese. 3. Biofilme - Tese. 4. Criptococose - Tese. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ELIANDRO REIS TAVARES

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME FORMADO POR *Cryptococcus gattii* UTILIZANDO ABORDAGENS FENOTÍPICAS E MOLECULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientadora: Profa. Dra. Profa. Dra. Sueli  
Fumie Yamada Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa Dra Kelly Ishida  
Universidade de São Paulo – USP

---

Prof. Dr. Fabrício Martins Lopes  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

---

Prof. Dr. Renata Katsuko Takayama Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Sérgio Paulo Dejato da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de setembro de 2016.

Aos meus familiares, especialmente à minha avó Irene.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, compreensão e por acreditar em mim.

Aos programas CAPES, CNPq e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, e seus membros.

Ao departamento de Microbiologia, seus membros, e em especial aos técnicos Jussevania Pereira Santos Rubro de Sá, Ediel Clementino da Costa e Luiz Ricardo Alves, pela solicitude.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos – NIP5, por ser minha segunda casa.

Ao Laboratório de Ecologia Microbiana e seus membros, pela solicitude e amizade, especialmente o professor Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Jr, Ana Carolina Polano Vivan e Ane Simionato.

Ao professor Dr. Emerson José Venâncio, por ter me ensinado os primeiros passos nessa caminhada.

À professora Dr<sup>a</sup>. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, por ser grande responsável à pessoa que me tornei.

Ao professor Dr. Alexandre Tadachi Morey, pela amizade, conselhos.

Aos meus pais, que mesmo de longe, sempre me deram forças.

Ao meu irmão, o maior entusiasta desse título.

À Bárbara Gionco, que, além de ter feito parte desse trabalho, tem a grande missão de cuidar da minha alma.

À todos os meus amigos que fiz, ao longo do tempo no laboratório.

À todos os demais amigos aqui não citados, por serem muitos.

A todos os meus alunos, em especial, por fazer-me querer sempre ser um professor melhor.

*Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.*

Leonardo da Vinci

TAVARES, Eliandro Reis. **Caracterização do biofilme formado por *Cryptococcus gattii* utilizando abordagens fenotípicas e moleculares**. 2016.111 f. Tese (Doutorado:em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

A criptococose é uma doença infecciosa fúngica potencialmente fatal, cosmopolita, que acomete mamíferos domésticos, animais silvestres e o homem; os sintomas clínicos podem variar de infecção pulmonar assintomática à doença disseminada e meningite. A criptococose é causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, pertencentes aos complexos *C. gattii sensu lato (s.l.)* e *C. neoformans sensu lato (s.l.)*. Esta enfermidade constitui-se em uma das principais causas de morbidade e mortalidade de indivíduos imunocomprometidos, principalmente aqueles portadores de HIV/AIDS. Entretanto, esses patógenos também são agentes oportunistas importantes em pacientes com câncer e naqueles que se submetem às terapias imunossupressoras, procedimentos médicos invasivos ou utilizam antibióticos de amplo espectro. Além disso, relatos de criptococoses em indivíduos imunocompetentes têm emergido mundialmente. Embora não seja um fator de virulência clássico, a capacidade de formar biofilme tem contribuído consideravelmente na virulência de muitas espécies de fungos, sendo relacionado com a persistência de infecções e diminuição da sensibilidade aos agentes antimicrobianos. Apesar da importância de *C. gattii s.l.* na perspectiva clínica, o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na formação de biofilme por este complexo é escasso. Diante disso, este trabalho teve como objetivo determinar a capacidade de formação de biofilme por *C. gattii s.l.*, a caracterização fenotípica e a identificação de possíveis genes envolvidos no seu desenvolvimento. A capacidade de formação do biofilme foi avaliada em superfície de poliestireno a 37 °C por 48 horas em isolados clínicos e ambientais de *C. gattii s.l.*, e a biomassa foi determinada por coloração com cristal violeta. A cinética do desenvolvimento do biofilme foi determinada em superfície de poliestireno e vidro nos tempos de 6, 12, 48, 72 e 96 horas por *C. gattii* ATCC 24065, determinada pela quantificação da biomassa e da atividade metabólica, por cristal violeta e redução do XTT, respectivamente. A estrutura do biofilme foi determinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de varredura confocal a laser (MVCL). Para a identificação de genes envolvidos na formação do biofilme, *C. gattii* ATCC 24065 foi incubado a 37 °C por 48 horas, e utilizado para obtenção do RNA para determinar o perfil transcricional durante o desenvolvimento do biofilme por sequenciamento de RNA (RNA-seq). Nossos resultados mostraram que *C. gattii s.l.* apresenta a capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies; além disso, a cinética da formação apresentou um aumento exponencial da biomassa entre os tempos de incubação de 24 e 96 horas, enquanto que a atividade metabólica teve o seu aumento entre 24 e 72 horas. Os resultados de MEV mostraram que entre 0 e 12 horas as células leveduriformes encontraram-se aderidas à superfície, com aumento gradativo de densidade celular; em 24 horas houve o início da formação de matriz exopolissacarídica (EPS); e em 96 horas o biofilme apresentou-se como agregado celular embebido na EPS. Imagens de MVCL, em 72 horas de incubação, mostraram o biofilme como uma monocamada de 8 micrômetros de espessura, composto por células metabolicamente ativas envoltas pela EPS. A avaliação do

perfil transcricional, após o tratamento estatístico, mostrou um total de 321 genes diferencialmente expressos durante a formação do biofilme. Destes, 98 genes apresentaram-se como hiperexpressos, enquanto 223 estavam subexpresso. Dos 98 genes, com expressão aumentada, após análise das possíveis funções, 38 corresponderam a proteínas não caracterizadas, 35 corresponderam a proteínas ribossomais e proteínas componentes da estrutura do ribossomo e 25 corresponderam a proteínas caracterizadas. Sendo assim, nossos resultados mostraram que, além da capacidade de formar biofilme, o complexo *C. gattii s.l.* apresenta um aparato de regulação consistente, indicando centenas de genes envolvidos no desenvolvimento desta estrutura.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus gattii s.l.* Formação de biofilme. Estrutura. Genes diferencialmente expressos.

TAVARES, Eliandro Reis. **Characterization of *Cryptococcus gattii* (ATCC 24065) biofilm by phenotypical and molecular approaches**. 2016.111 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a fungal disease, potentially fatal, that affect domestic mammals, wild animals and humans. Clinical symptoms diverge from asymptomatic infection to disseminated lung disease, and meningitis. Cryptococcosis is caused by encapsulated yeast of *Cryptococcus* genus, belonging to complex *C. gattii sensu lato* (*s.l.*) and *C. neoformans sensu lato* (*s.l.*). This disease is one of the main causes of morbidity and mortality in immunocompromised individuals, particularly those with HIV / AIDS. However, these pathogens are also important opportunistic agents in cancer patients and those submitted to immunosuppressant therapies, invasive medical procedures or use broad-spectrum antibiotics. In addition, reports of cryptococcosis in immunocompetent individuals have emerged worldwide. The ability to form biofilm has contributed considerably to virulence in many species of fungi, associated with persistent infections, and sensitivity reduction of antimicrobial agents. Despite the clinical importance of *C. gattii s.l.*, knowledge about the mechanisms involved in biofilm formation by this complex is scarce. Thus, this study aimed to determine the ability of *C. gattii s.l.* to form biofilm, phenotypic characterization and identification of involved genes in its development. The ability of biofilm formation by environmental and clinical isolates of *C. gattii s.l.* was evaluated in polystyrene surface at 37 ° C for 48 hours, and biomass was determined by Crystal Violet staining. The kinetics of biofilm development was determined in polystyrene and glass surfaces at times of 6, 12, 48, 72 and 96 hours by *C. gattii* ATCC 24065, determined by biomass quantification and metabolic activity, by crystal violet staining and XTT reduction, respectively. The biofilm structure was determined by scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). To identify genes involved in biofilm formation, *C. gattii ATCC 24065* was incubated at 37 ° C for 48 hours and used to obtain the RNA to determine the transcriptional profile during biofilm development by RNA sequencing (RNA-seq). Our results showed that *C. gattii s.l.* has the ability to form biofilms on different surfaces. In addition, the kinetics of biofilm formation showed an exponential biomass between 24 and 96 hours of incubation, whereas the metabolic activity had its increase between 24 and 72 hours. SEM results showed that between 0 and 12 hours, the yeast cells were found adhered to the surface with a gradual increase in cell density; 24 hours t was observed the beginning of exopolysaccharide (EPS) matrix formation; and within 96 hours the biofilm presented itself as a cell aggregated embedded in EPS. CLSM images, in 72 hours of incubation, showed biofilm as a monolayer of 8 micrometers thick, composed of metabolically active cells surrounded by EPS. The evaluation of transcriptional profile, after statistical analysis, showed a total of 321 differentially gene expressed during biofilm formation. Of these, 98 genes were presented as overexpressed, while 223 were underexpressed. Of the 98 genes with increased expression, after possible functions analysis, 38 corresponded to uncharacterized proteins, 35 corresponded to ribosomal proteins and structural components of the ribosome and 25 corresponded to characterized proteins. Thus, our results showed that, in addition to ability to form biofilms, the *C. gattii s.l.* complex presents a

consistent control apparatus, indicating hundreds of genes involved in the structural developing of biofilm.

**Key-words:** *Cryptococcus gattii s.l.* Biofilm development. Structure. Differential gene expression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1:</b> Distribuição mundial da prevalência de criptococose. Adaptado de MAY et al., 2015.....	19
<b>Figura 2:</b> Estimativa global de números de casos de meningite causada por <i>Cryptococcus</i> spp. Adaptado de CDC, 2015.....	19
<b>Figura 3:</b> Número e causa de óbitos na África Subsaariana; notar que a criptococose é a quarta causa de morte nessa região. Adaptado de CDC, 2015.....	20
<b>Figura 4:</b> Modelo de um ciclo de vida de <i>C. neoformans</i> ; ciclo reprodutivo sexuado entre células com MAT- diferentes. Adaptado de IDNURM et al., 2005 .....	29
<b>Figura 5:</b> Modelo de um ciclo de vida de <i>C. neoformans</i> ; ciclo reprodutivo sexuado monocariótico. Adaptado de IDNURM et al., 2005 .....	30
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática dos componentes de um biofilme (Adaptado de RABIN et al., 2015) .....	48

## ARTIGO

- Figura 1:** Formação de biofilme por *Cryptococcus gattii sensu lato* em superfície de poliestireno incubado em caldo *Sabouraud* durante 96 horas a 37 °C. A biomassa do biofilme foi determinada após coloração das células aderidas com cristal violeta. O corante ligado foi eluído com metanol e a densidade óptica determinada em 595 nm. CG03, LCF-312, 840244 e 62452 representam isolados clínicos e 1A2, 3A1, 3A4 e 2B4, isolados ambientais. Os valores com letras iguais representam diferenças significativas entre os isolados ( $P < 0,05$ ) ..... 75
- Figura 2:** Cinética da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 em poliestireno a 37 °C, conforme determinado pelo método de cristal violeta. Os valores representam a média  $\pm$  DP e são representativos de três experimentos independentes ..... 76
- Figura 3:** Cinética da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 em poliestireno a 37 °C, conforme determinado pelo método de redução do XTT. Os valores representam a média  $\pm$  DP e são representativos de três experimentos independentes ..... 76
- Figura 4:** Cinética da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 em vidro a 37 °C, conforme determinado pelo método de cristal violeta. Os valores representam a média  $\pm$  DP e são representativos de três experimentos independentes ..... 77
- Figura 5:** Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura dos estágios de formação do biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 sobre a superfície de vidro ao longo de um período de tempo (12, 24, 48, 72 e 96 h) a 37 °C. .... 78
- Figura 6:** Imagens representativas de microscopia de varredura confocal a laser do biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 a 37 °C. .... 79
- Figura 7:** Diferenças da expressão gênica, entre as duas condições de crescimento, planctônico e biofilme, determinada a partir de valores de RPKM (*Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads*) ..... 82
- Figura 8:** Ontologia dos 98 genes hiperexpressos anotados para os processos biológicos ..... 82

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela 1:** Nomenclatura, sinônimos e classificação propostos por diferentes autores ao longo do tempo, desde a descoberta de *Cryptococcus* sp. até os dias atuais. Adaptado de BARNETT (2010).....23
- Tabela 2:** Características do Biofilme formado por fungos de importância médica (Adaptado de DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014) .....59

### ARTIGO

- Tabela 1:** Tamanho e número de reads e media de cobertura do genoma de referência .....80
- Tabela 2:** Categorias funcionais dos genes hiperexpressos estatisticamente significantes submetidos aos programas de anotação BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e UNIPROT (*Universal Protein Resource*) ..... 83

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 CRIPTOCOCOSE E <i>Cryptococcus</i> spp .....	18
2.1.1 Criptococose.....	18
2.1.2 <i>Cryptococcus</i> spp .....	21
2.2 BIOFILME .....	43
2.2.1 Estrutura do biofilme.....	46
2.2.2 Mecanismo de controle do biofilme: <i>quorum sensing</i> .....	50
2.2.3 Técnicas e métodos para estudo e quantificação de biofilme .....	53
2.2.4 Biofilmes formados por fungos.....	58
3. JUSTIFICATIVA .....	62
4. OBJETIVOS .....	64
4.1 OBJETIVO GERAL .....	64
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	64
5. ARTIGO.....	65
6. CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	95

## INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença cosmopolita (HONSHO et al., 2003; REOLON; PEREZ; MEZZARI, 2004), potencialmente fatal (MALIK et al., 1997; SPIES et al., 2015), que acomete mamíferos domésticos, principalmente o gato e o cão (HEADLEY et al., 2015; LARSSON et al., 2003; MALIK et al., 1997), animais silvestres e o homem (DEL POETA; CASADEVALL, 2012; HONSHO et al., 2003). Esta enfermidade constitui-se em uma das principais causas de morbidade e mortalidade de indivíduos imunocomprometidos, principalmente aqueles portadores de HIV/AIDS (*human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome*) (DEL POETA; CASADEVALL, 2012; GULLO et al., 2013; LEAL et al., 2008). Entretanto, esses patógenos também são agentes oportunistas importantes em pacientes com câncer e naqueles que se submetem às terapias imunossupressoras, procedimentos médicos invasivos ou utilizam antibióticos de amplo espectro (FERNANDES et al., 2000; SPIES et al., 2015). Além disso, relatos de criptococoses em indivíduos imunocompetentes têm emergido mundialmente (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; MARTINS et al., 2011; PINTO JUNIOR et al., 2010).

Algumas espécies do gênero *Cryptococcus* têm sido descritas como agentes etiológicos de infecções em humanos, porém a maioria dos casos de criptococose reportados é causada por um dos dois principais complexos: *Cryptococcus gattii* sensu lato (s.l.) e *Cryptococcus neoformans* sensu lato (s.l.) (GULLO et al., 2013; HAGEN et al., 2015; MEYER et al., 2003; SLOAN; PARRIS, 2014). Estudos de caracterização genotípica e fenotípica permitiram a

reclassificação dos complexos em espécies distintas: *C. gattii* s.l. foi classificado em *C. gattii* (genótipo AFLP4/VGI), *C. bacillisporus* (genótipo AFLP5/VGIII), *C. deuterogattii* (genótipo AFLP6/VGII), *C. tetragattii* (genótipo AFLP7/VGIV) e *C. decagattii* (genótipo AFLP10/VGIV); *C. neoformans* s.l. em *C. neoformans* (genótipo AFLP1/VNI, AFLP1A/VNB/VNII and AFLP1B/VNII) and *C. deneoformans* (genótipo AFLP2/VNIV) (HAGEN et al., 2015; MEYER et al., 2003).

No Brasil, a criptococose não é uma doença de notificação compulsória, o que dificulta o estabelecimento da taxa de ocorrência real desta enfermidade. Entretanto, isolados ambientais e clínicos (tanto do homem como de animais) de *C. neoformans* e *C. gattii* têm sido reportado no país (ANZAI et al., 2014; BRITO-SANTOS et al., 2015; COGLIATI, 2013; COSTA et al., 2009; FAVALESSA et al., 2014; HEADLEY et al., 2015; LEAL et al., 2008; MARTINS et al., 2011; MATOS et al., 2012; PINTO JUNIOR et al., 2010; SANTOS et al., 2008; TAKAHARA et al., 2013; TRILLES et al., 2008).

A infecção por *Cryptococcus* spp. inicia-se no trato respiratório causando um quadro de doenças que varia desde infecções assintomáticas à doença grave, incluindo pneumonia e infecção disseminada em vários sítios, como sistema nervoso central, olhos e pele (GOLDMAN; VOLLMER; LUKS, 2010). As infecções causadas por *C. gattii* são mais agressivas, quando comparadas àquelas causadas por *C. neoformans*. Em infecções por *C. gattii* observa-se uma maior frequência de hidrocefalias e lesões cerebrais focais (SORRELL, 2001), maior predominância de criptococomas no pulmão e no cérebro, resposta mais lenta a terapia com os antifúngicos, ocorrência de um maior número de sequelas, bem como a necessidade de intervenções cirúrgicas (BARTLETT et al., 2012; SORRELL, 2001).

Em geral, *Cryptococcus* spp. apresenta uma cápsula rica em polissacarídeo, principal fator de virulência, que contribui para adesão a diferentes superfícies (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007) e evasão da resposta imune do hospedeiro (ZARAGOZA et al., 2009). Outros fatores associados à virulência dessas espécies são: enzima fenoxidase que participa da síntese da melanina e outros pigmentos a partir de precursores fenólicos, a enzima urease que é responsável pela hidrólise da uréia e a termotolerância à 37° C (FEDER et al., 2015; TAYLOR-SMITH; MAY, 2016).

Embora não seja um fator de virulência clássico, a capacidade de formar biofilme tem contribuído consideravelmente na virulência de muitas espécies de fungos (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; RAMAGE et al., 2012; SARDI et al., 2014). Em muitos casos a persistência da infecção microbiana está relacionada com a capacidade de alguns fungos em formar biofilme em superfície biótica, bem como em vários dispositivos médicos implantados, sendo considerado um importante problema clínico e econômico (MARTINEZ; FRIES, 2010).

O conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na formação de estruturas complexas como o biofilme por *C. gattii* é limitado. Portanto, o entendimento da estrutura e dos padrões genéticos e moleculares envolvidos na formação de biofilme por *C. gattii* s.l. pode contribuir para o estudo e desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por esta levedura.

Sequenciamento de próxima geração (*Next-Generation sequencing*) de DNAs complementares (DNAC) provenientes de amostras de RNA pode contribuir não só para o entendimento dos mecanismos envolvidos na expressão de genes, bem como elucidar as estruturas e relações entre centenas de genes (LINDE et al.,

2015; MUTZ et al., 2013). Estudos de transcriptoma envolvendo RNA-seq têm evoluído como uma potente ferramenta para determinar a abundância de RNAs transcritos. Além disso, a técnica pode ser aplicada em estudos de expressão gênica diferencial entre duas populações em situações distintas. Assim, os estudos genéticos sobre a formação de biofilme pode fornecer ferramentas úteis para manipulação genética, seleção e desenvolvimento de vacinas e substâncias antibiofilme, que podem impactar positivamente no controle de infecções associadas a essa comunidade.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CRIPTOCOCOSE E *Cryptococcus* spp.

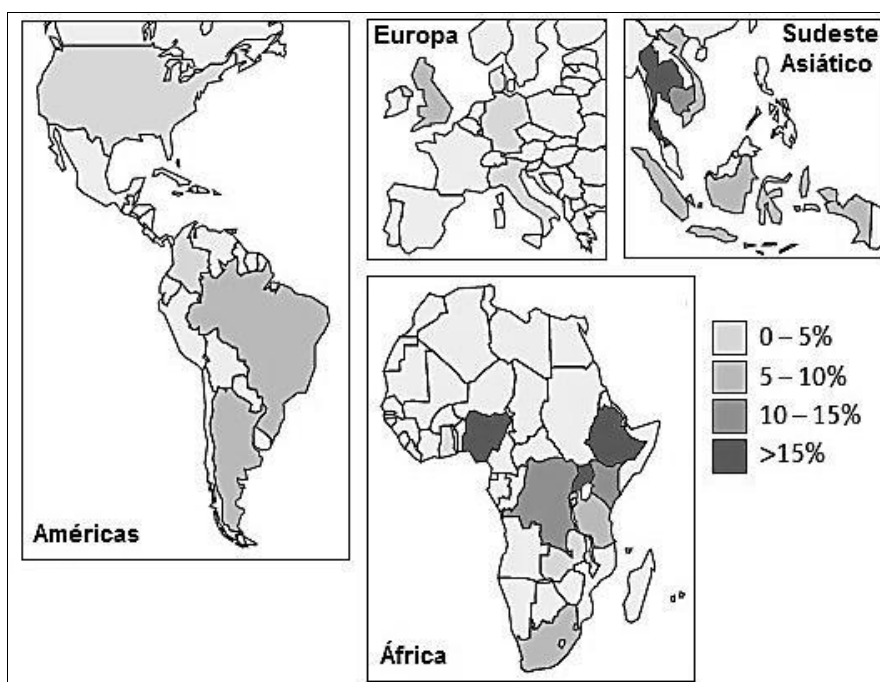
#### 2.1.1 Criptococose

A criptococose é uma doença cosmopolita (HONSHO et al., 2003; REOLON; PEREZ; MEZZARI, 2004), potencialmente fatal, que acomete mamíferos domésticos, principalmente o gato e o cão (MALIK et al., 1997), animais silvestres e o homem (GULLO et al., 2013). Esta doença, também conhecida como torulose ou blastomicose europeia, é causada pelos fungos encapsulados pertencentes aos complexos *Cryptococcus gattii* sensu lato (*C. gattii* s.l.) e *Cryptococcus neoformans* sensu lato (*C. neoformans* s.l.). A infecção por *Cryptococcus* spp. inicia-se no trato respiratório causando um quadro de doenças que varia desde infecções assintomáticas à doença grave, incluindo pneumonia e infecção disseminada em vários sítios, como sistema nervoso central, olhos e pele (GOLDMAN; VOLLMER; LUKS, 2010; MAZIARZ; PERFECT, 2016)

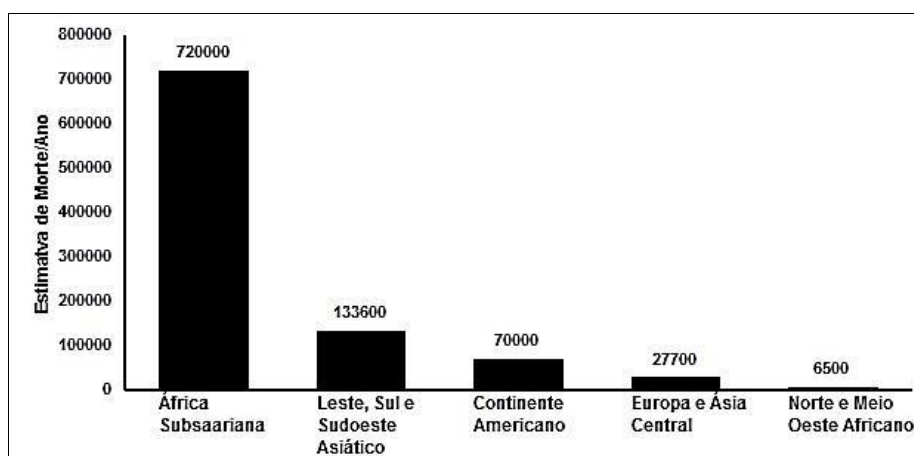
*Cryptococcus* spp. é uma das principais causas de infecções oportunistas em pacientes imunodeprimidos. Estes patógenos são responsáveis por cerca de 1 milhão de casos de meningite por ano em pacientes com AIDS. O Centro para Controle de Doenças dos Estados Unidos estima mais de um milhão de novos casos por ano em todo o mundo, causando cerca de 937.800 óbitos de pacientes portadores de HIV (CDC, 2015; DEL POETA; CASADEVALL, 2012; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A maior prevalência de criptococose no mundo ocorre na África Sub-Saariana (Figura 1), com aproximadamente 720.000 novos casos com mortes por

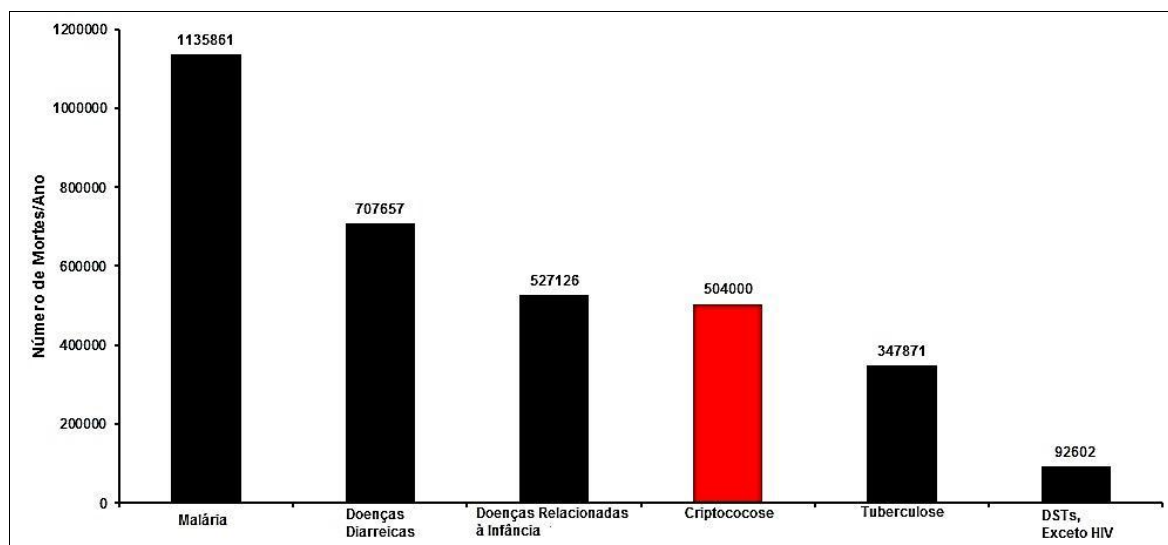
ano (Figura 2). Esse fato correlaciona com os números referente à incidência de infecções por HIV, que também ocorre no mesmo local. Nesta região, a criptococose representa a quarta causa de morte entre pacientes portadores de HIV (Figura 3) No continente Americano, estima-se que ocorram 70.000 mortes ao ano, em decorrência da criptococose (Figura 2) (CDC, 2015)



**Figura 1:** Distribuição mundial da prevalência de criptococose. Adaptado de MAY et al., 2015



**Figura 2:** Estimativa global de números de casos de meningite causada por *Cryptococcus* spp. Adaptado de CDC, 2015



**Figura 3:** Número e causa de óbitos na África Subsaariana; notar que a criptococose é a quarta causa de morte, em pacientes com HIV, nessa região. Adaptado de CDC, 2015

No Brasil, o aumento do número de pacientes portadores de HIV, foi acompanhado por um aumento no número de infecções oportunistas causadas por *Cryptococcus* spp.. Segundo o Ministério da Saúde – Coordenação Nacional de DST/AIDS, no período entre 1980 e 1997, a incidência dessas infecções, associadas a pacientes com HIV, foi 4,3% (Revisto por CASALI et al., 2001). E entre 1996 a 2006, a criptococose foi responsável por 50,9% das mortes ocorridas em pacientes HIV positivos no nosso país (PRADO et al., 2009). Entretanto, esses patógenos também são agentes oportunistas importantes em pacientes com câncer e naqueles que se submetem às terapias imunossupressoras, procedimentos médicos invasivos, ou utilizam antibióticos de amplo espectro (FERNANDES et al., 2000).

## 2.1.2 *Cryptococcus* spp.

### 2.1.2.1 HISTÓRIO E NOMENCLATURA DE *Cryptococcus* spp.

*Cryptococcus* spp. refere-se a um grupo de leveduras encapsuladas responsáveis por causar vários tipos de manifestações clínicas em mamíferos. A maioria dos casos de criptococose reportados são causados por um dos dois principais complexos: *C. gattii* s.l. e *C. neoformans* s.l. (GULLO et al., 2013; HAGEN et al., 2015; MEYER et al., 2003; SLOAN; PARRIS, 2014).

*Cryptococcus* spp. pertencem ao Domínio ou Superreino Eukarya, Reino Fungi, Sub-reino Dikarya, Filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, Classe Tremellomycetes, Ordem Filobasidiales, Família Filobasidiaceae e Gênero *Cryptococcus* (FINDLEY et al., 2009).

A primeira descrição de *Cryptococcus* spp. data no século XIX. Entre os anos de 1894 e 1895, um professor de patologia alemão chamado Otto Busse descreveu um organismo extremamente virulento, isolado da tíbia de uma mulher, com morfologia semelhante a *Saccharomyces* sp.; por essa razão, ele nomeou a doença como “*Saccharomycosis hominis*”. A mesma levedura foi observada e descrita pelo cirurgião Abraham Buschke, colega de Busse, na mesma infecção; porém nenhum dos dois profissionais propuseram um nome para a referida levedura (Revisto por BARNETT, 2010).

Na década anterior (1884 e 1885), na Universidade de Cagliari, Itália, Francesco Sanfelice isolou uma levedura semelhante, de um suco fermentado de pêsego. Este pesquisador observou que a levedura isolada do suco apresentava morfologia celular similar a *Saccharomyces cerevisiae*, porém diferia deste último em

relação à morfologia das colônias, levando-o a propor o nome *Saccharomyces neoformans* (nova forma) (Revisto por BARNETT, 2010).

Já em 1901, na Universidade de Nanci, na França, Jean-Paul Vuillemin descreveu que tanto a “levedura de Busse” quanto a “levedura de Sanfelice”, não produziam ascósporos, não sendo possível nomeá-las como *Saccharomyces*; este fato, levou a renomeação das leveduras em *Cryptococcus hominis* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente (Revisto por BARNETT, 2010).

Com o passar do tempo, várias outras leveduras semelhantes foram isoladas e descritas de diferentes fontes, onde cada autor propunha um nome. Nessa época, a doença causada por este fungo ficou conhecida como torulose, em consequência do nome proposto por Joseph Weis, *Torula neoformans*, em 1902 e *Torula histolytica*, em 1916 (LODDER; KREGER-VAN RIJ, 1953).

Entre 1934 e 1935, Rhoda Benham, nos Estados Unidos da América, e Jacomina Lodder, na Holanda, observaram que as diversas leveduras identificadas anteriormente com diferentes nomes pertenciam à mesma espécie. Entretanto, Benham classificou-as como *C. neoformans* e Lodder como *Torulopsis neoformans*. No entanto, em 1952, Lodder adotou a nomenclatura proposta por Benham, *C. neoformans* (LODDER; KREGER-VAN RIJ, 1953).

Em 1970, (GATTI; EECKELS, 1970), Vanbreuseghem e Takashio (VANBREUSEGHEM; TAKASHIO, 1970) e de Vroey e Gatti (DE VROEY; GATTI, 1989), estudando uma linhagem de *C. neoformans*, obtida de um paciente portador de leucemia, observaram que as células dessa linhagem apresentavam-se alongadas, o que levou a descrição dessa cepa como *C. neoformans* variedade *gattii*. Em 2002, June Kyong Kwon-Chung e colaboradores, baseados em características filogenéticas, observaram que *C. neoformans* var. *gattii* não era

apenas uma variedade, mas sim uma espécie distinta, estabelecendo, assim, a nova espécie *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG et al., 2002).

Em 2015, estudos relacionados com características genótípicas e fenotípicas permitiram a classificação dos complexos *Cryptococcus* em espécies distintas: *C. gattii* s.l. foi classificado em *C. gattii* (genótipo AFLP4/VGI), *C. bacillisporus* (genótipo AFLP5/VGIII), *C. deuterogattii* (genótipo AFLP6/VGII), *C. tetragattii* (genótipo AFLP7/VGIV) e *C. decagattii* (genótipo AFLP10/VGIV); *C. neoformans* s.l. em *C. neoformans* (genótipo AFLP1/VNI, AFLP1A/VNB/VNII e AFLP1B/VNII) e *C. deneoformans* (genótipo AFLP2/VNIV) (HAGEN et al., 2015; MEYER et al., 2003).

A Tabela 1 mostra a evolução da identificação, nomenclatura e descrição dos complexos *C. gattii* s.l. e *C. neoformans* s.l. ao longo do tempo, desde a sua descoberta, até os dias atuais.

**Tabela 1** Nomenclatura, sinônimos e classificação propostos por diferentes autores ao longo do tempo, desde a descoberta de *Cryptococcus* sp. até os dias atuais. Adaptado de BARNETT (2010)

Ano	Nome/Sinônimo	Isolamento/Características	Autor
1885	<i>Saccharomyces neoformans</i>	Isolado de suco de fruta, forma semelhante à <i>Saccharomyces</i> , porém uma nova forma de colônia ('neoformans'). Leveduras encapsuladas.	Sanfelice
1885	<i>Saccharomyces litogenes</i>	Isolado do sistema linfático de <i>Bos taurus</i> (Boi)	Sanfelice
1885	<i>Megelococcus myxoides</i>	Isolado de paciente morto por meningite.	Curtis
1886	<i>Saccharomyces subcutaneous</i> <i>Tumefaciens</i>	Isolado de um tumor da região lombar. Registro, em desenho, da cápsula.	Curtis
1901	<i>Cryptococcus hominis</i>	Levedura de Busse, nomeada e ilustrada.	Vuillemin
1901	<i>Cryptococcus lithogenes</i>	Renomeado a partir de <i>Saccharomyces litogenes</i> , isolado por Sanfelice.	Vuillemin
1901	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Renomeado a partir de <i>Saccharomyces neoformans</i> , isolado por Sanfelice, já que este	Vuillemin

		a espécie não forma ascósporos, uma característica do gênero <i>Saccharomyces</i> .	
1901	<i>Saccharomyces hominis</i>	Isolado de pele.	Costantin
1901	<i>Saccharomyces plimmeri</i>	Isolado de paciente portador de câncer.	Costantin
1902	<i>Torula klein</i> , <i>Torula neoformans</i> , <i>Torula plimmeri</i>	Características observadas na aparência das colônias e das células.	Weis
1904	<i>Cryptococcus kleinii</i>	Descrição morfológica e registro em desenho da amostra; a mesma já havia sido descrita e ilustrada por Erich Cohn, porém não havia sido publicada.	Guéguen
1908	<i>Cryptococcus plimmeri</i>		Neveu-Lemaire
1909	<i>Atelosaccharomyces busse-buschki</i>	Presença de todas as características de <i>Saccharomyces</i> , exceto o asco.	de Beurmann and Gougerot
1910	<i>Saccharomyces blanchardii</i>	Isolado de tumor, uma massa com aparência gelatinosa, rodeadas por algumas leveduras.	Guiart
1912	<i>Cryptococcus gottii</i>	Isolado de nariz de cavalo, anteriormente, em 1897; havia sido descrito, porém não nomeado.	Neveu-Lemaire
1912	<i>Cryptococcus guilliermondii</i>	Isolado de escarro humano.	Beauverie and Lesieur
1913	<i>Atelosaccharomyces breweri</i>	Isolado de abscesso de coluna vertebral.	Verdun
1913	<i>Atelosaccharomyces Hominis</i>	Sinônimo de <i>Cryptococcus hominis</i> , sem informação adicional.	Verdun
1916	<i>Torula histolytica</i>	Células leveduriformes, responsável por infecção sistêmica e destruição tecidual, descritas e ilustradas, com menção da presença de cápsula.	Stoddard and Cutler
1918	<i>Cryptococcus costantini</i>	Nome proposto para evitar confusão entre <i>Atelosaccaromyces hominis</i> proposto por Vuillemin e <i>Saccharomyces hominis</i> , por Klein et Gordon	Klein et Gordon
1919	<i>Cryptococcus breweri</i>	Sinônimo do nome <i>Cryptococcus breweri</i> , proposto por Verdun; sem informações adicionais.	Castellani and Chalmers
1921	<i>Saccharomyces breweri</i>	Sinônimo do nome de <i>Atelosaccaromyces breweri</i> , proposto por Verdun; sem informações adicionais.	Neveu-Lemaire
1922	<i>Blastomyces lithogenes</i>	Breve descrição citológica e ilustração das células.	Sasakawa

1927	<i>Cryptococcus histolyticus</i>	Substituição do nome <i>Torula histolytica</i> proposto por Stoddard and Cutler	Castellani
1928	<i>Torula nasalis</i>	Isolado de tumor nasal de cavalo ( <i>Equus caballus</i> ). Breve descrição do isolado.	Harrison
1930	<i>Criptococcus psicrofilicus</i>	Descrição e ilustração da levedura e seus efeitos clínicos.	Llambías, Niño, Parodi and Speroni
1931	<i>Cryptococcus cerebrioculosis</i>	Agente etiológico de meningite; descrição da histologia e ilustração das leveduras.	Freeman
1931	<i>Torulopsis hominis</i>	Sinônimo de <i>Cryptococcus hominis</i> , proposto por Vuillemin; sem informações adicionais.	Redaelli
1933	<i>Torulopsis breweri</i> <i>Torulopsis costantini</i> <i>Torulopsis lithogenes</i> <i>Torulopsis plimmeri</i>	Sinônimo dos nomes propostos por Verdun, Vuillemin, Sanfelice e Costantin, respectivamente; substituição do epíteto genérico e manutenção do epíteto específico. Sem informações adicionais.	de Almeida
1933	<i>Cryptococcus hondurianus</i>	Breve descrição informativa da levedura.	Castellani
1933	<i>Torulopsis histolytica</i>	Sinônimo de <i>Torula hstolytica</i> , proposta por Stoddard e Cutler; sem informações adicionais.	Castellani and Jacono
1934	<i>Blastomyces neoformans</i> <i>Torulopsis neoformans</i>	Desenho ilustrativo das células e informações nutricionais adicionais. Considerada idênticas à <i>Cryptococcus hominis</i> e <i>Saccharomyces neoformans</i> .	Lodder
1935	<i>Cryptococcus meningitidis</i>	Sinônimo de <i>Torula hstolytica</i> , proposta por Stoddard e Cutler. Breve descrição da morfologia da colônia e informações nutricionais.	Dodge
1935	<i>Cryptococcus nasalis</i>	Sinônimo de <i>Torula nasalis</i> , proposta por Harrison. Breve descrição da morfologia da colônia e informações nutricionais.	Dodge
1936	<i>Debaryomyces hominis</i>	Leveduras isoladas de fluido espinhal. Suposta formação de ascósporos ilustrada com microfotografias.	Herrmann e Todd
1937	<i>Debaryomyces neoformans</i>	Exame nutricional e morfológico; formação de ascósporos reportada, porém não ilustrada.	Ciferri, Giordano e Redaelli
1954	<i>Rhodotorula histolytica</i>	Sinônimo de <i>Torula histolytica</i> , proposta por Stoddard e Cutler. Poucas informações adicionais agradadas.	Kursanov et al.
1954	<i>Torulopsis nasalis</i>	Sinônimo de <i>Torula nasalis</i> , proposta por Harrison. Poucas informações adicionais agregadas.	Kursanov et al.
1960	<i>Lipomyces</i>	Consideração que a levedura produziria	Ciferri

	<i>neoformans</i>	ascósporos.	
1970	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>	Um isolado de <i>Cryptococcus neoformans</i> , onde as células apresentam-se alongadas.	Gatti e Eeckels; Vanbreuseghem e Takashio; De Vroey and Gatti
1975	<i>Filobasidiella neoformans</i>	Descrição da reprodução sexuada encontrada em <i>Cryptococcus neoformans</i> .	Kwon-Chung
1976	<i>Filobasidiella bacillispora</i>	Estado sexuada dos sorotipos B e C, de <i>Cryptococcus neoformans</i> , onde os basidiósporos apresentam-se em formato de haste ('Bacillispora')	Kwon-Chung
1978	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	Estado assexuado dos sorotipos B e C.	Kwon-Chung et al.
1982	<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>	Baixo crescimento a 37 °C e não infectante em ratos.	Kwon-Chung et al.
1999	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	Nome dado ao sorotipo A, em homenagem à David Gruby (1810-1898), considerado fundador da microbiologia médica.	Franzot et al.
1999	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Nome dado ao sorotipo A, de <i>C. neoformans</i> .	Franzot et al.
2002	<i>Cryptococcus gattii</i>	Nome dado aos sorotipos B e C.	Kwon-Chung et al.
2015	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Nome proposto para <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> , nomeado por Franzot et al.	Hagen et al.
2015	<i>Cryptococcus deneoformans</i>	Nome proposto para <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> nomeado por Franzot et al.	Hagen et al.
2015	<i>Cryptococcus gattii</i>	Nome proposto para <i>C. gattii</i> (Kwon-Chung et al., 2002) sorotipo B, Genótipo VGI	Hagen et al.
2015	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	Nome proposto para <i>C. gattii</i> (Kwon-Chung et al., 2002) sorotipo B, Genótipo VGII.	Hagen et al.
2015	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	Nome proposto para <i>C. gattii</i> (Kwon-Chung et al., 2002) sorotipo C, Genótipo VGIII.	Hagen et al.
2015	<i>Cryptococcus tetragattii</i>	Nome proposto para <i>C. gattii</i> (Kwon-Chung et al., 2002) sorotipo C, Genótipo VGIV.	Hagen et al.
2015	<i>Cryptococcus decagattii</i>	Nome proposto para <i>C. gattii</i> (Kwon-Chung et al., 2002), Genótipo AFLP 10.	Hagen et al.

### 2.1.2.2 *Cryptococcus* spp.: BIOLOGIA E ECOLOGIA

*Cryptococcus* spp. são encontrados no ambiente, principalmente como leveduras saprófitas em diferentes nichos ecológicos, como solos ricos em matéria orgânica em decomposição, composta predominantemente por material vegetal morto (serrapilheira) e excretas de aves (CHOWDHARY et al., 2012; MAY et al., 2015).

Alguns pesquisadores observaram que *C. gattii* s.l. preferencialmente coloniza árvores que apresentam cobertura cuticular rica em cera, enquanto *C. neoformans* s.l. colonizam regiões ricas em produtos nitrogenados, como solo rico em excretas aviárias. Por essa particularidade conferida a *C. neoformans*, espécies desse complexo têm sido associadas como maior fonte de infecção em regiões onde há alta densidade populacional de seres humanos e aves coexistindo, principalmente pombos (CHOWDHARY et al., 2012). Recentemente, Spina-Tensini e colaboradores (SPINA-TENSINI et al., 2016) reportaram uma associação entre os casos de meningite por *C. neoformans* e a presença de pombos na região de Curitiba, Paraná, Brasil.

Em geral, a distribuição de *C. neoformans* é de ordem mundial, enquanto *C. gattii* apresenta distribuição em locais com climas quente ou temperado, em regiões tropicais e subtropicais. Entretanto, nas últimas décadas têm-se observado a sobrevivência de espécies do complexo *C. gattii* s.l. em regiões com climas mais frios, como identificado nos Estados Unidos, Canadá e norte europeu (SPRINGER et al., 2014; UEJIO et al., 2015).

Característica interessante observada nessas leveduras reside no fato de as mesmas infectarem hospedeiros alternativos na natureza, tais como amebas

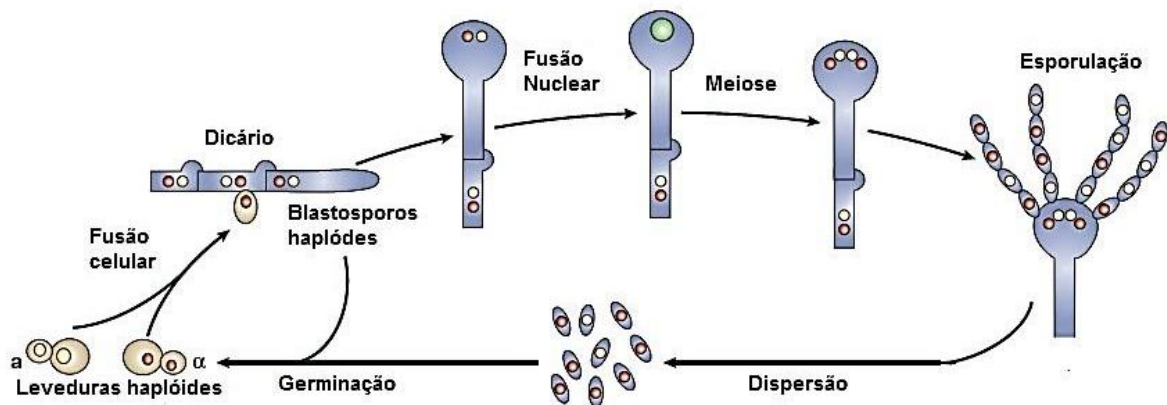
de vida livre e nematelmintos encontrados no solo. Segundo a evolução da patogenia das duas espécies essas relações interespecíficas foram cruciais para o desenvolvimento de diversos fatores envolvidos na virulência de *Cryptococcus* spp. e da patogenia da criptococose. Fatores de virulência, como produção de urease, melanina e síntese da cápsula estão diretamente relacionadas com a interação do fungo com o ambiente, como sobrevivência às pressões ambientais protegendo-o contra a dessecação e radiação ultravioleta (MAY et al., 2015).

Além disso, a evolução paralela entre a levedura e protozoários ambientais permitiram que a primeira resistisse às enzimas digestivas encontradas no vacúolo fagocítico dos protozoários, dando origem aos mecanismos de resistência ao sistema imunológico de hospedeiros mamíferos. Isso se deve ao fato de os mecanismos de digestão de amebas serem semelhantes aos processos de eliminação de patógeno por células fagocitárias do sistema imunológico, onde há produção de espécies reativas de oxigênio e secreção de peptídeos antimicrobianos, em ambos os casos (HILL et al., 2015; MAY et al., 2015; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

Acredita-se que ambos os complexos, *C. gattii* s.l. e *C. neoformans* s.l. tenham surgido há cerca de 30 e 40 milhões de anos atrás, de um ancestral saprofítico comum. Porém, o evento de cladogênese específico, que deu origem aos dois complexos, data cerca de aproximadamente 30 e 40 mil anos atrás (LITVINTSEVA et al., 2007; LITVINTSEVA; MITCHELL, 2012; MAY et al., 2015). Ambos os complexos contêm um sistema de *Mating* bipolar, apresentando linhagens com *Mating Type* a (MATa) e *Mating Type*  $\alpha$  (MAT $\alpha$ ). Esse sistema bipolar pode ser compreendido como um sistema genético determinado por um par de alelos onde indivíduos de uma mesma espécie pode conter, em seu genoma, um desses alelos,

gerando, efetivamente, espécie com dois tipos sexuais. Sendo assim, MAT $\alpha$  ou MAT $\alpha$  confere a identidade sexual do fungo, o que influenciará diretamente no tipo de ciclo reprodutivo apresentado por essas leveduras (IDNURM et al., 2005; MAY et al., 2015).

Em um ciclo reprodutivo clássico, leveduras  $a$  e  $\alpha$  fundem-se, estimuladas por sinalizadores secretados por elas mesmas, gerando células diploides. A partir de então, a nova linhagem será formada por segregação alélica mendeliana normalmente, gerando novas células haploides. Esse evento apresenta importância elevada, do ponto de vista adaptativo, pois permite a troca de material genético, gerando maior variabilidade e diversidade genética (IDNURM et al., 2005). A figura 4 ilustra o ciclo de vida sexual proposto para *C. neoformans*.

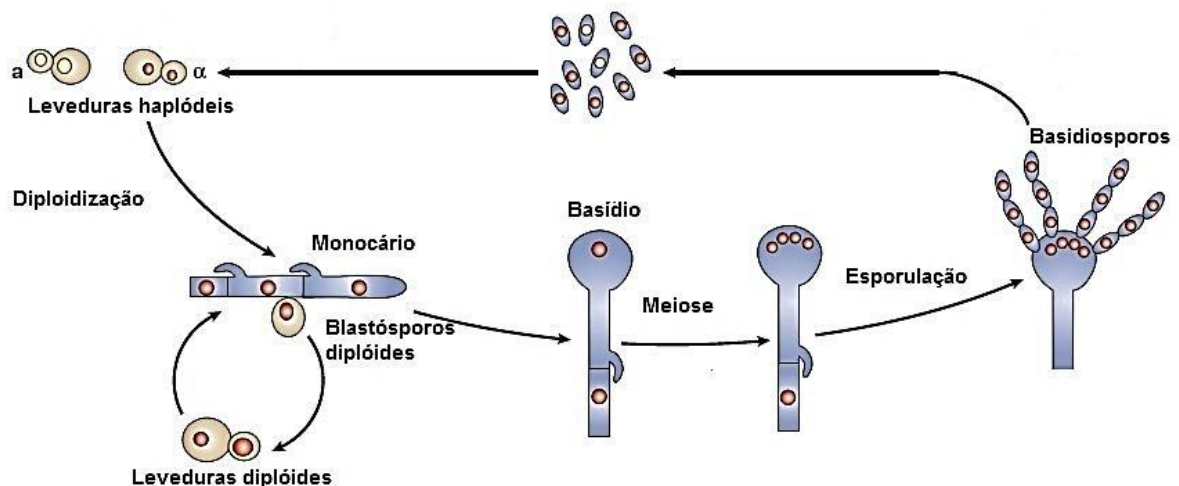


**Figura 4:** Modelo de um ciclo de vida de *C. neoformans*; ciclo reprodutivo sexuado entre células com MAT-diferentes. Adaptado de IDNURM et al., 2005

Em alguns casos, dependendo do estímulo ambiental, linhagens de um mesmo *Mating Type* podem diferenciar-se e entrar em um ciclo de vida conhecido como ciclo monocariótico. Apesar de ocorrer entre células de um mesmo *Type*, o

ciclo é conhecido como um ciclo sexuado, pois ocorre divisão meiótica, recombinação ou permuta gênica, gerando uma linhagem-filha diferente das células parentais. Quando esse tipo de reprodução é comparado com a reprodução do tipo *Mating*, observa-se grande semelhança na morfologia e fisiologia celular entre ambos. O diferencial reside no fato de a fusão nuclear (Cariogamia), ocorrer no início da filamentação. A figura 5 ilustra o ciclo monocariótico descrito para *C. neoformans* (IDNURM et al., 2005).

Apesar de ter sido descrito a capacidade de formação de hifas por *Cryptococcus* spp., uma vez colonizando ou infectando determinado hospedeiro, este muda para, ou mantém a forma de levedura. As células, quando cultivadas em laboratório, apresentam um diâmetro variando entre 5 e 7 micrômetros. Entretanto, este tamanho é extremamente variável, quando parasitando determinado hospedeiro (MAY et al., 2015).



**Figura 5:** Modelo de um ciclo de vida de *C. neoformans*; ciclo reprodutivo sexuado monocariótico. Adaptado de IDNURM et al., 2005.

O tipo celular melhor descrito é uma célula de tamanho aumentado, com diâmetro maior que 12 micrômetros, excluído a cápsula, conhecidas como células titãs. Essa célula apresenta-se como poliploide e com uma parede mais espessa, com grande quantidade de quitina. Interessantemente, a quitina é hidrolisada por quitinases produzidas pelo hospedeiro, fato que leva a uma diminuição da resposta imune adaptativa. Além disso, a poliploidia promove a formação de progênie haploide e aneuploide, um mecanismo adaptativo frente ao estresse promovido pelo sistema imune do hospedeiro (OKAGAKI et al., 2010; ZARAGOZA et al., 2010; ZARAGOZA; NIELSEN, 2013).

Outra mudança morfológica menos frequente, é a diminuição do diâmetro celular, que neste estado, passa a ter medidas da ordem de 2 e 4 micrômetros. Assim como as células titãs, estas células também apresentam parede celular espessa. Pouco se conhece sobre a biologia e fisiologia desse tipo celular, porém sabe-se que esta célula confere a capacidade de sobrevivência dentro de macrófagos. Além do mais, acredita-se que esta célula desempenha um importante papel em casos de criptococose latente, já que ela passa por períodos metabolicamente inativas (ALANIO et al., 2015; FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2001).

As leveduras do gênero *Cryptococcus* apresentam características celulares excepcionais, o que permitiu adaptação aos diferentes nichos ecológicos colonizados, desde o ambiente, até o corpo de um hospedeiro (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Apesar de os complexos *Cryptococcus* apresentarem características biológicas semelhantes, existem diferenças significativamente relevantes, quanto à distribuição geográfica e manifestações clínicas.

Em geral, *Cryptococcus* spp. apresenta uma cápsula rica em polissacarídeo, sendo considerada uma característica distintiva entre as demais leveduras de importância médica (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009). Outros fatores associados à virulência dessas espécies são: enzima fenoloxidase que participa da síntese da melanina e outros pigmentos a partir de precursores fenólicos; a enzima urease que é responsável pela hidrólise da ureia; a capacidade de crescimento à 37° C e formação de biofilme (CASALI et al., 2001; JOHANNSSON; CALLAGHAN, 2009; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; RAVI et al., 2009).

### 2.1.2.3 CÁPSULA POLISSACARÍDICA EM *Cryptococcus* spp.

A sobrevivência dos microrganismos aos mais diferentes nichos ecológicos está relacionada com a aquisição de vários atributos adaptativos, que resultam em modificações nos padrões de expressão gênica e na atividade metabólica. É comum observar mudanças morfológicas celulares, bem como o desenvolvimento de estruturas especializadas que promovem a sobrevivência do microrganismo, além de benefícios ao longo do seu ciclo de vida.

Dentro do gênero *Cryptococcus*, algumas estruturas foram selecionadas ao longo do tempo, o que permitiu a existência desses fungos em diferentes ambientes. A estrutura celular mais conhecida é a cápsula, composta por polissacarídeo, que as define como as únicas leveduras de interesse médico encapsuladas. A cápsula formada por *Cryptococcus* spp. é composta, principalmente pelos carboidratos Glucoronoxilomanana (GXM) e Galactoxilomanana (GalXM). GXM compreende cerca de 90% e 95% de massa seca do total de polissacarídeos capsulares. GalXM representa cerca de 5% a 8%; além de manoproteínas em pequenas quantidades (menor que 1%) (O'MEARA; ANDREW, 2012; ZARAGOZA et al., 2009).

Um fato importante observado foi a reação entre a cápsula e soro policlonal de coelho. Pesquisadores constataram que havia variação nessa interação, dependendo da linhagem e ao longo do curso da infecção. Esses resultados permitiram a classificação tradicional do antigo complexo *C. neoformans* em cinco sorotipos diferentes: A, B, C, D e AD. Vale ressaltar que, ao longo do tempo, foram observadas diferenças além do sorotipo, principalmente diferenças

genéticas, o que permitiu a divisão do complexo em sete novas espécies (HAGEN et al., 2015).

Estruturalmente, GXM é um polímero linear, formado por uma cadeia principal de mananas ligadas entre si por ligações do tipo  $\alpha$ -(1,3). Ainda compondo o esqueleto central, em cada primeiro resíduo de manose ligam-se resíduos de ácido glucorônico com ligações do tipo  $\beta$ -(1,2). Esse padrão é encontrado em quaisquer sorotipos, porém, dependendo do sorotipo, resíduos de manose sofrem acetilação e são substituídas por xilose, em ligações do tipo  $\beta$ -(1,2) ou  $\beta$ -(1,4) (Revisto por ZARAGOZA et al., 2009).

GalXM é formada por um esqueleto de  $\alpha$ -(1,6)-galactana, de onde partem quatro diferentes ramificações formadas por cadeias pequenas de carboidratos. As ramificações são compostas de  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4)-mananas, um trissacarídeo de  $\beta$ -galactose e pequenas quantidades de  $\beta$ -(1,2) e  $\beta$ -(1,3)-xilose (ZARAGOZA et al., 2009).

Uma das principais características da cápsula é a sua alta hidrofiliabilidade, devido ao seu caráter polar, conferido por cargas negativas, em virtude de resíduos de ácido glucorônico. Por ser hidrofílica, a visualização da cápsula torna-se impossível em microscopia convencional padrão, devido às altas quantidades de água. Paradoxalmente, do ponto de vista evolutivo, a cápsula confere proteção contra dessecação em ambientes com baixo teor de água (MAXSON et al., 2007; O'MEARA; ANDREW, 2012; ZARAGOZA et al., 2009).

Estudos em modelo de *C. neoformans*, mostraram que a cápsula é uma estrutura modificável em resposta aos sinais do ambiente no qual a levedura está colonizando. Sinais como baixas concentrações de ferro, alterações nos níveis de CO<sub>2</sub> no hospedeiro, pH, baixas concentrações de glicose, nitrogênio e oxigênio

são fundamentais como estímulos para produção e alteração capsular. A plasticidade capsular reflete diretamente na adaptação do microrganismo frente às defesas produzidas por determinado hospedeiro, durante a infecção ou colonização (O'MEARA; ANDREW, 2012).

Sob a perspectiva clínica, a cápsula é considerada como um dos principais fatores de virulência em *Cryptococcus* spp. A ela é conferida a capacidade de resistência à fagocitose, por modificar os padrões celulares do hospedeiro, alterando a movimentação intracelular do fagossoma e, conseqüentemente, o escape da célula hospedeira (MAY et al., 2015). Além disso, a cápsula tem sido utilizada como um padrão de diagnóstico dessas leveduras, pois a presença de células encapsuladas em líquido e escarro é indicativo de criptococose (O'MEARA; ANDREW, 2012).

#### 2.1.2.4 MELANINA

Outra característica marcante em *Cryptococcus* spp. é a presença de melanina, como uma proteção contra radiações de alta energia, como raios ultravioletas (UV) e moléculas reativas de oxigênio. Por ser primariamente um microrganismo ambiental, este fenótipo desempenha papel importante na sobrevivência do fungo no ambiente (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; MAY et al., 2015).

A melanina é um pigmento insolúvel em solventes orgânicos ou inorgânicos, de alto peso molecular, produzida a partir de compostos indólicos e fenólicos. Usualmente é um composto de cor preta ou marrom, mas pode apresentar-se em outras colorações (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

A descoberta da produção de melanina por *Cryptococcus* spp. foi descrita por Staib em 1962, onde foi observado que *C. neoformans*, quando crescido em meio ágar alpiste (*Phalaris canariensis*), produziam colônias de cor marrom. A catálise da síntese de melanina é realizada pela enzima lacase; esta usa substratos exógenos e converte-os no pigmento (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; POLACHECK, 1991).

A utilização de substratos exógenos explica o neurotropismo observado em *Cryptococcus* spp. já que o sistema nervoso apresenta altas concentrações de catecolaminas difenólicas. Aliado a este fato, a melanina ainda protege a levedura frente ao estresse oxidativo do hospedeiro, o que explica a alta incidência de neuroinfecções, quadro clínico padrão, principalmente em espécies do complexo *C. gattii* s.l. (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

### 2.1.2.5 BIOFILME

Embora não seja um fator de virulência clássico, a capacidade de formar biofilme tem contribuído consideravelmente na virulência de muitas espécies de fungos (Revisto por RAMAGE et al., 2012). Em muitos casos a persistência da infecção microbiana está relacionada com a capacidade de alguns fungos em formar biofilme em superfície biótica, bem como em dispositivos médicos implantados, sendo considerado um importante problema clínico e econômico (MARTINEZ; FRIES, 2010). *C. neoformans* pode formar biofilme em diferentes superfícies, tais como vidro, poliestireno e materiais médicos (JOHANNSSON; CALLAGHAN, 2009; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; RAVI et al., 2009). Além do mais, estudos experimentais têm mostrado que o biofilme formado por *Cryptococcus* sp. possui uma menor sensibilidade aos antifúngicos e a moléculas antimicrobianas produzidas pelo sistema imunológico (RAVI et al., 2009).

Este tema será abordado com mais detalhes no capítulo Biofilme, descrito mais adiante.

### 2.1.2.6 COMPLEXO *Cryptococcus gattii* sensu lato (s.l.)

O complexo *C. gattii* s.l. é composto por leveduras encapsuladas capazes de infectar tanto indivíduos imunocomprometidos quanto saudáveis (BIELSKA; MAY, 2015; CHEN; MEYER; SORRELL, 2014).

Historicamente, a primeira descrição de infecção em seres humanos por *C. gattii*, data por volta de 1896. Porém, nessa época a levedura foi nomeada como *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens*. Em 1970, um estudo com um isolado de um paciente africano portador de leucemia mostrou células em formatos diferentes daquela descrita por Sanfelice; esta apresentava formato elíptico. Por isso, a levedura foi reconhecida como sendo *C. neoformans* var. *gattii* (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; DE VROEY; GATTI, 1989; HAGEN et al., 2015; VANBREUSEGHEM, R; TAKASHIO, 1970).

Como mencionado anteriormente, a partir da distinção entre as duas variedades de *C. neoformans*, vários estudos mostraram diferenças significativas entre elas, tais como características fenotípicas, nicho ecológico, epidemiologia, manifestações clínicas e resposta aos antifúngicos (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011).

Em 2002, a descrição do ciclo sexuado, juntamente com diferenças existentes entre as duas variedades, *C. neoformans* var. *gattii* foi reconhecida como uma espécie separada de *C. neoformans*, sendo renomeada como *C. gattii*. Em experimentos conduzidos por Kuon-Chung e colaboradores, foi observada a produção de basidiósporos a partir de cruzamento de linhagens de diferentes MAT; esses esporos apresentavam parede lisa e formato de bastão. Baseado nessas características, linhagens provenientes do ciclo sexuado foram reconhecidas como

*Filobasidiella bacillispora* (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; KWON-CHUNG et al., 2002).

A distribuição mundial de *C. gattii* s.l. ocorre, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, como no sudoeste da Califórnia, Havaí, Brasil, Austrália, Sudeste Asiático e África Central. Porém, outros estudos mostraram a presença da levedura em climas temperados, como Vancouver e regiões do Nordeste pacífico dos Estados Unidos e parte do continente Europeu. Esses achados indicam uma mudança no nicho ecológico da espécie, além de apontar para mudanças climáticas do globo terrestre (BYRNES III et al., 2009; HARRIS et al., 2013; KIDD et al., 2004; MAY et al., 2015).

Dentro do complexo, *C. gattii* tem sido considerada como a espécie mais comum, sendo encontrada em diferentes partes do globo. Isolados da espécie foram encontrados em países da Europa (Áustria, Bélgica, Alemanha, Grécia, Itália, Suíça, Reino Unido, Portugal, Espanha e Holanda), Ásia (China, Índia, Japão, Malásia, Papua Nova Guiné, Sudeste Asiático, Taiwan, Tailândia e Vietnã), Oceania (Austrália e Nova Zelândia), África (Congo e Sul da África), América do Norte (Canadá e Estados Unidos) e América do Sul (Brasil, Argentina, Peru, Colômbia, Cuba, Equador, Venezuela, Honduras, México e Paraguai) (COGLIATI, 2013; COGLIATI et al., 2016; HAGEN et al., 2015).

*C. bacillisporus* compreende cerca de 9% dos isolados de *C. gattii* s.l.; a espécie é frequentemente isolada de pacientes portadores de HIV. Relatos apontaram para isolamento da espécie em diferentes países, como Bélgica, Papua Nova Guiné, Índia, Coreia do Norte, África do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Botsuana, Tanzânia, Malawi, Canadá, Estados Unidos, Argentina, Brasil, Colômbia, Guatemala, México e Venezuela (HAGEN et al., 2015).

*C. deuterogattii* é um dos principais patógenos emergentes causadores da criptococose, principalmente em indivíduos imunocompetentes. É a espécie responsável por causar surtos de infecções, como as que ocorreram em Vancouver e Nordeste do Pacífico. Diversos estudos, ainda, relataram a presença da espécie colonizando diferentes espécies de plantas, e infectando diferentes espécies e mamíferos (BARTLETT et al., 2012; BYRNES III et al., 2009; HAGEN et al., 2015).

*C. tetragattii* e *C. decagattii* têm sido consideradas como espécies raras dentro do complexo. Além disso, a distinção entre as duas espécies é bastante laboriosa, o que dificulta os estudos epidemiológicos. Estas espécies acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos (COGLIATI et al., 2016). De modo geral, a criptococose causada por *C. gattii* s.l. tem sido relacionada com indivíduos imunologicamente saudáveis. Entretanto, algumas características têm sido apontadas como fatores de risco, principalmente estados de supressão imunológica subclínica (KWON-CHUNG; SAIJO, 2015).

As infecções causadas por *C. gattii* são mais agressivas, quando comparadas àquelas causadas por *C. neoformans*. De acordo com a literatura, as manifestações clínicas podem variar em diferentes regiões geográficas, por exemplo na Austrália e Nova Zelândia. Assim, em infecções por *C. gattii* observa-se uma maior frequência de hidrocefalias e lesões cerebrais focais (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009; SORRELL, 2001), maior predominância de criptococomas no pulmão e no cérebro, resposta mais lenta a terapia com os antifúngicos, ocorrência de um maior número de sequelas, bem como a necessidade de intervenções cirúrgicas (revisto por BARTLETT et al., 2012; revisto por CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; SORRELL, 2001).

Estudos utilizando modelo murino têm mostrado diferenças nos perfis de respostas do hospedeiro contra as infecções por *C. gattii* quando comparado a *C. neoformans*. Cheng e colaboradores (CHENG; SHAM; KRONSTAD, 2009) mostraram que a virulência depende da cepa de *C. gattii* analisada, sendo um isolado ambiental (VGI) menos virulento, quando comparado tanto com *C. neoformans* quanto com isolados humano de *C. gattii* (VGIIa e VGIIb), *in vitro*. Entretanto, nas infecções por *C. gattii* em camundongos C57BL/6 ocorre menor migração de neutrófilos para o sítio, bem como menor produção de citocinas, induzindo uma menor resposta inflamatória protetora. A deacetilação de resíduos de manose da estrutura de GXM da cápsula permite a evasão de *C. gattii* do sistema imune, prevenindo dessa forma a sua eliminação (URAI et al., 2016). Outra diferença notável, evidenciada por estudos em animais, entre estas duas espécies é que *C. gattii* mostra menor propensão para a disseminação ao sistema nervoso central (SNC) em comparação com *C. neoformans*, quando a infecção se inicia pela corrente sanguínea, indicando não ser alvo primário do mesmo (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012).

*C. gattii* apresenta um arsenal de virulência semelhante a *C. neoformans*, que incluem cápsula polissacarídica que contribui para a evasão do sistema imune; habilidade para crescer a 37 °C; expressão de lacase (enzima responsável pela produção de melanina), superóxido dismutase e trealose que protegem o fungo contra espécies reativas de oxigênio; expressão de fosfolipase e urease que auxiliam na invasão tecidual (revisto por MA; MAY, 2009). Embora os dois complexos possam compartilhar fatores de virulência em comum, vários importantes processos celulares, tais como atividade antioxidante da superóxido dismutase, via biossintética da trealose e via de regulação de *mating-type*

influenciam a expressão desses fatores somente em *C. gattii* (revisado por BARTLETT et al., 2012). Além disso, em contraste a *C. neoformans*, o conhecimento sobre os mecanismos empregados por *C. gattii* na patogênese da infecção, bem como aqueles envolvidos na formação de estruturas complexas, como biofilme é limitado.

## 2.2 BIOFILME

A microbiologia, ciência que estuda os seres vivos microscópicos, iniciou há cerca de 400 anos atrás, quando o mercador e cientista holandês Anton Van Leeuwenhoek, com a ajuda do primeiro microscópio, observou os primeiros microrganismos, o qual chamou de “*animaculos*” (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). Apesar de os microrganismos terem sido primariamente descritos como células livres, baseadas em seus padrões de crescimento e exigências nutricionais, Leeuwenhoek já havia observado que estes estavam aderidos em um pedaço do seu próprio dente, o que lhe conferiu o crédito de descobridor do biofilme microbiano (DONLAN, 2002; DONLAN; COSTERTON, 2002).

Cerca de 95% dos microrganismos encontrados na natureza apresentam-se aderidos, formando biofilme (SARDI et al., 2014). A definição de biofilme evoluiu em paralelo com o avanço do conhecimento da microbiologia, ecologia e tecnologias aplicadas às ciências (VILA; ROZENTAL, 2016). De maneira simplista, biofilme pode ser definido como uma comunidade de células microbianas (células sésseis) crescendo aderidas sobre uma superfície, e embebidas em uma matriz polimérica extracelular (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978). Quando comparadas com células de vida livre (células planctônicas), o biofilme apresenta uma maior tolerância às intempéries do ambiente, tais como radiação solar, predação, resistência a agentes antimicrobianos e resposta imunológica do hospedeiro (BURMØLLE et al., 2010).

Apesar das observações comprovadas de adesão bacteriana em superfícies sólidas datarem da década de 40 (HEUKELEKIAN; HELLER, 1940; ZOBELL, 1943), apenas em 1969 foi possível observar a estrutura do biofilme. Com

o surgimento da microscopia eletrônica, Jones e colaboradores (JONES HC., ROTH IL., 1969) analisaram o biofilme formado em uma estação de tratamento de águas residuais, mostrando que estes eram compostos por uma variedade de microrganismos. Além do mais, utilizando-se o corante vermelho de rutênio, combinado com a fixação em tetróxido de ósmio, esses autores foram capazes de mostrar que o material no qual as células estavam embebidas era composto por carboidratos.

Characklis (CHARACKLIS, 1973) mostrou que além da resistência à fricção, o biofilme apresentou-se resistente aos agentes antimicrobianos, como o cloro. Cinco anos após, Costerton e colaboradores (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978) apresentaram a teoria de que em todo sistema aquático com concentrações adequadas de nutrientes todas as bactérias crescem aderidas a uma superfície e embebidas em um glicocálice. Além disso, o crescimento em modo de biofilme sempre constitui a população fisiologicamente dominante em qualquer ecossistema.

Inicialmente, os estudos sobre biofilme eram baseados na detecção de microrganismos capazes de formar essa comunidade em diversas superfícies, e em presença de diferentes condições físico-químicas. Atualmente, os estudos têm sido focados na elucidação de fatores envolvidos neste fenótipo, nas mais diferentes áreas, tais como ecologia, indústria e saúde pública. Devido ao surgimento das diferentes técnicas de microscopia, como a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia de varredura confocal a laser, estas foram utilizadas para a descrição da organização do biofilme, tendo grande impacto no entendimento da sua estrutura (LAWRENCE et al., 2003). Além do mais, as técnicas de biologia molecular têm

servido como grande aliada para o entendimento dos padrões genéticos envolvidos na formação e manutenção deste fenótipo.

### 2.2.1 Estrutura do biofilme

Como mencionado anteriormente, o biofilme é composto basicamente por células aderidas a uma superfície e embebidas em uma matriz exopolimérica constituída, em sua maioria, principalmente por polissacarídeos. A matriz pode ser considerada como o componente encontrado em maior quantidade em um biofilme maduro, variando entre 50 e 90% do total de carbono orgânico (DONLAN, 2002; MAZZA, 2016).

A matriz dos biofilmes microbianos pode variar tanto na sua composição quanto nas suas propriedades físico-químicas. Alguns tipos de exopolissacarídeos (EPS) apresentam características neutras, porém a maioria é polianiónica, devido a presença de ácidos urônicos (ácido D-glucurônico, D-galacturônico e D-manurônico), ácido pirúvico, além de resíduos inorgânicos, como fosfato e sulfato (SUTHERLAND, 2001). Ainda, algumas EPSs podem apresentar propriedades policatiônicas como aquelas obtidas de linhagens de *Staphylococcus epidermidis* (MACK et al., 1996). Determinadas EPS podem estar associadas com diferentes moléculas, tais como proteínas, DNA, lipídeos e outras substâncias húmicas (Figura 6) (DONLAN, 2002; RABIN et al., 2015; SENA-VÉLEZ et al., 2016).

Os polissacarídeos apresentam um papel importante no estabelecimento do biofilme, já que são responsáveis pela adesão, coesão, estabilidade estrutural, hidratação, estoque de nutrientes, reserva enzimática, proteção contra íons tóxicos e antimicrobianos e estoque de excesso de carbono (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; FLEMMING; WINGENDER, 2010; MAZZA, 2016).

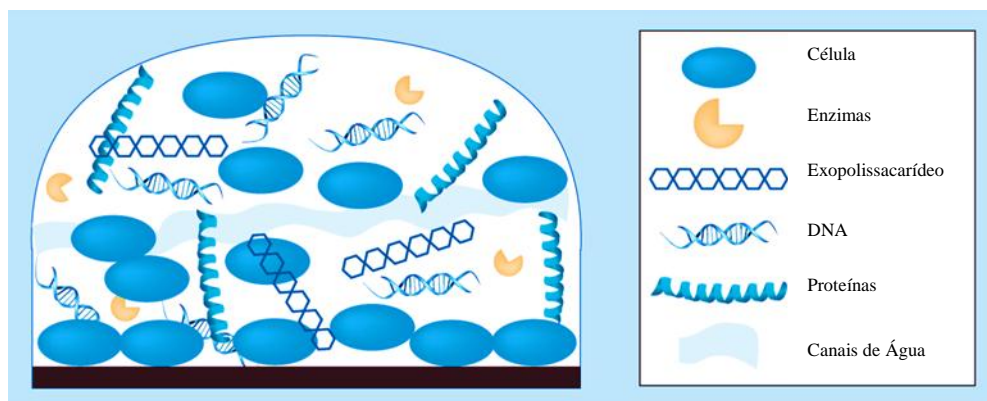
As proteínas encontradas na matriz apresentam diversas funções: compor um sistema de digestão extracelular atuando na quebra de biopolímeros em unidades menores que podem ser utilizadas pelas células; algumas proteínas com atividade enzimática podem atuar na degradação da matriz ou conferir proteção contra agentes oxidantes; as proteínas não enzimáticas apresentam um papel importante na manutenção da integridade do biofilme, promovendo a interação entre a superfície celular e os polissacarídeos da matriz (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; FLEMMING; WINGENDER, 2010; MAZZA, 2016).

O DNA extracelular encontrado como componente da matriz atua principalmente na formação e manutenção da estrutura do biofilme. Além disso, o DNA pode atuar como adesina devido à sua carga negativa, e conferir resistência antimicrobiana devido a sua capacidade de sequestrar e ligar-se a íons catiônicos, e, assim, promover alterações físicas na membrana celular (DAS; SEHAR; MANEFIELD, 2013; MAZZA, 2016; MONTANARO et al., 2011; VILAIN et al., 2009).

A presença de lipídios na matriz interfere na hidrofobicidade, alterando os padrões de adesão celular. Além disso, pode ser uma vantagem contra a interação com outras células, como, por exemplo, evasão de células fagocitárias e promoção de antibiose (MAZZA, 2016; RIVARDO et al., 2009; SRIRAM et al., 2011).

De modo geral, a conformação primária do biofilme é determinada pela composição e estrutura dos polissacarídeos, que se apresentam como cadeias longas e finas, formando uma rede complexa ao redor das células. As ligações glicosídicas podem ser do tipo  $\beta$ -1,3 ou  $\beta$ -1,4, conferindo uma maior rigidez para a matriz, além de se apresentar menos solúvel em água (DONLAN, 2002). Em outros casos, uma estrutura mais flexível pode ser observada quando os monossacarídeos

são ligados entre si através de ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6. (RABIN et al., 2015; SUTHERLAND, 2001).



**Figura 6:** Representação esquemática dos componentes de um biofilme (Adaptado de RABIN et al., 2015)

A “super estrutura” formada pela rede de polissacarídeos apresenta-se permeada por “canais de água”, o que permite a circulação da água, nutrientes e oxigênio. Essa característica confere uma hidratação elevada, prevenindo a dessecação do biofilme, fato extremamente importante, principalmente em biofilmes formados em ambientes naturais (DONLAN, 2002).

Apesar de todas as espécies apresentarem propriedades únicas quanto ao seu biofilme, alguns atributos permanecem como padrões, sendo considerados como características universais (TOLKER-NIELSEN; MOLIN, 2000). Alguns pesquisadores consideram o termo biofilme como impróprio, já que este não se apresenta como uma camada uniforme depositada em determinada superfície sólida. Longe disso, a sua arquitetura pode ser descrita como altamente heterogênea, contendo microcolônias embebidas em EPS e separadas entre si pelos canais de água (DAVEY; O’TOOLE, 2000; DONLAN, 2002).

Assim como qualquer comunidade biológica, o desenvolvimento do biofilme ocorre de maneira gradual em relação ao tempo, podendo ser divididos em

três fases. A primeira é conhecida como associação e aderência; nesta fase as células em suspensão (planctônicas) aderem à superfície e sua ativação, geralmente, está associada com mudanças ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes, mudança da temperatura, concentrações de oxigênio, osmolaridade e mudança de pH (APARNA; YADAV, 2008; MORENO-GARCÍA et al., 2016; TOYOFUKU et al., 2015; VILA; ROZENTAL, 2016). Os minutos iniciais são cruciais para o desenvolvimento do biofilme, e em muitos casos, essa etapa é reversível, onde é observado o desprendimento de algumas células; estas assumem o estado planctônico novamente (GUPTA et al., 2016; VILA; ROZENTAL, 2016).

A segunda etapa consiste na formação do biofilme, e é marcada pela multiplicação celular, síntese e secreção de EPS. Após a adesão, a comunicação celular é iniciada; esses sinais químicos são essenciais para a ativação de genes que regulam a produção de polissacarídeos que compõem a matriz (APARNA; YADAV, 2008; GUPTA et al., 2016; VILA; ROZENTAL, 2016). Nesta fase, a motilidade celular é diminuída drasticamente, e a agregação celular é visível, e progressivamente aumentada. Em muitos biofilmes o agregado celular se dispõe em camadas, tornando-se estratificado, enquanto outros apresentam apenas uma única camada de células. Em todos os casos, a estrutura assume uma arquitetura tridimensional (APARNA; YADAV, 2008; GUPTA et al., 2016).

A última etapa, denominada maturação e dispersão, é marcada pelo desenvolvimento completo da matriz e a movimentação de células superficiais do biofilme que deixam este, para colonizar outras superfícies ao redor (GUPTA et al., 2016; VILA; ROZENTAL, 2016).

### 2.2.2 Mecanismo de controle do biofilme: *quorum sensing*

*Quorum sensing* (QS) é definido como o processo de comunicação entre células, principalmente quando crescidas sob a forma sésil. As células são capazes de produzir, secretar e interpretar sinalizadores, mediados por pequenas moléculas, conhecidas, também, como autoindutoras. Esses sinais permitem às células monitorar as condições ambientais para o seu crescimento, modificando os padrões de expressão gênica pertinentes à adaptação ao meio. Esse fato confere vantagens adaptativas importantes para a sobrevivência em ambientes onde há inúmeras espécies coexistindo (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; BASSLER, 2016; EVEN-TOV et al., 2016; LAZAR, 2011).

A comunicação intercelular pode ser dividida em duas categorias: a primeira compreende a comunicação entre células de uma mesma espécie, sobrevivendo em um mesmo nicho. Essa sinalização é crucial para a expressão do fenótipo adequado para determinada condição ambiental. A segunda compreende a comunicação entre células de diferentes espécies, como ocorre nos biofilmes encontrados na natureza. Neste caso, a comunicação é de extrema importância, permitindo a coexistência de diferentes espécies, incluindo procariontes e eucariontes, em um mesmo *habitat* (JAYARAMAN; WOOD, 2008; LAZAR, 2011).

A secreção de autoindutores é diretamente proporcional à densidade celular; assim, a sua concentração pode ser indicativa do número de células colonizando determinado local. Além disso, o controle da expressão gênica depende da quantidade de moléculas sinalizadoras secretadas. Sendo assim, um limiar deve ser atingido para o desencadeamento da indução ou supressão da expressão de

determinado gene (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; EVEN-TOV et al., 2016; LAZAR, 2011).

Durante um processo infeccioso, o QS desempenha papel importante, pois, a secreção ordenada de moléculas sinais confere a capacidade de resistir à resposta de defesa do hospedeiro, pois permite a coordenação da expressão de genes codificantes de fatores de virulência (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; LAZAR, 2011).

QS foi inicialmente descrito em espécies bacterianas na década de 70, especificamente em *Streptococcus pneumoniae* e espécies marinhas do gênero *Vibrio*. Após essa data, diferentes espécies foram descritas como capazes de produzir moléculas sinalizadoras, regulando diversos processos fisiológicos, tais como produção de fatores de virulência, motilidade, resistência ao sistema imunológico de hospedeiros infectados, produção de biofilme e esporulação (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; HOLBAN; GESTAL; GRUMEZESCU, 2016).

Hornby e colaboradores (HORNBY et al., 2001) foram os primeiros a descrever uma molécula mediadora de QS em células eucarióticas, o sesquiterpeno farnesol acíclico denominado farnesol. A produção desta molécula ocorre continuamente durante o crescimento de *Candida albicans* em diferentes meios de cultura, em temperatura entre 23 a 43 °C, e em quantidade proporcional a densidade celular. Além disso, esses autores mostraram que a presença desta molécula no meio de crescimento inibia a transição da forma leveduriforme para a forma micelial, quando a população atingia alta densidade celular. Ramage e colaboradores (RAMAGE et al., 2002) mostraram que o farnesol interfere na formação de biofilme de *C. albicans* de maneira dependente de concentração e estágio de

desenvolvimento desta comunidade. A adição deste mediador na fase inicial da adesão, em concentração de 300  $\mu$ M foi capaz de inibir completamente a formação do biofilme. Em adição, o sobrenadante do biofilme maduro foi capaz de inibir a transição levedura/hifa de células planctônicas, indicando que o farnesol era produzido também durante esse modo de crescimento.

Após a descrição em *C. albicans*, a descoberta dos efeitos de QS foi descrita para outras espécies de fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Cryptococcus neoformans* (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012).

O conhecimento acerca dos processos envolvidos na formação de biofilme, tal como QS, pode ser a chave para estudo e desenvolvimento de medidas de controle da sua formação.

### 2.2.3 Técnicas e métodos para estudo e quantificação de biofilme

A estimativa do número de células em um biofilme tem sido considerada um grande desafio para os microbiologistas. Diante deste fato, várias tecnologias têm sido desenvolvidas para esse fim.

O primeiro método para quantificação de biofilme foi descrito por Christensen e colaboradores (CHRISTENSEN et al., 1985) e modificado por Stepanovic e colaboradores (STEPANOVIĆ et al., 2000). Este método quantitativo baseia-se na detecção indireta da biomassa do biofilme após a coloração das células fixadas com metanol com cristal violeta. O corante, cujo cromóforo é carregado positivamente, tem afinidade pela célula e matriz exopolissacarídica devido às suas cargas negativas. Após a coloração, o corante ligado é eluído em etanol absoluto ou em ácido acético, e quantificado espectrofotometricamente (BIZERRA et al., 2008; CHANDRA et al., 2001).

A principal limitação do método consiste no fato de este não discriminar entre células vivas ou mortas. Por esse motivo, esta técnica não é apropriada para determinar atividade de substâncias anti-biofilme, sendo necessária a utilização de técnicas complementares, como determinação de unidades formadoras de colônia (UFC) (COENYE; NELIS, 2010; PANTANELLA et al., 2013; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008).

Com o intuito de obter a discriminação entre células vivas e não vivas, foram desenvolvidos compostos a base de sais de tetrazólio, tais como o CDT (*5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride*), XTT (*2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide*) e o MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (GABRIELSON et al., 2002)).

Estes compostos, originalmente incolores, são convertidos em formazana, por ação de desidrogenases de células metabolicamente ativas. Por ser um produto colorido, a formazana pode ser detectada espectrofotometricamente. O teste é utilizado, principalmente, em ensaios de citotoxicidade e determinação de atividade de compostos anti-biofilme (BIZERRA et al., 2008; GABRIELSON et al., 2002; HONRAET; GOETGHEBEUR; NELIS, 2005; PANTANELLA et al., 2013; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008; ROEHM et al., 1991).

Pelo mesmo princípio, o composto incolor fluoresceína diacetato (3',6'-diacetil-fluoresceína) é hidrolisado por enzimas intracelulares ou ligas à membrana celular de células metabolicamente ativa, liberando o produto colorido fluoresceína (GUILBAULT; KRAMER, 1964). Este composto tem sido utilizado para quantificação de viabilidade celular para diversos microrganismos, como aqueles presentes solo e lixo, e quantificação de biomassa de biofilme, como em *C. albicans* (ADAM; DUNCAN, 2001; HONRAET; GOETGHEBEUR; NELIS, 2005; PANTANELLA et al., 2013; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008; PRIETO; SILVA; LANTES, 2004).

Ensaio genéticos baseados em reação em cadeia pela polimerase (PCR) têm sido amplamente utilizados para a detecção de genes envolvidos na produção do biofilme e seus padrões de regulação. A análise da expressão gênica quantitativa por PCR acoplada à transcrição reversa (RT-qPCR) em tempo real tem sido a técnica mais utilizada para a análise de genes envolvidos na formação de biofilmes em diferentes espécies de microrganismos (BIZERRA et al., 2008; PANTANELLA et al., 2011, 2013; TSANG; BANDARA; FONG, 2012; XIE et al., 2011). A técnica vale-se de sondas fluorescentes para monitoramento dos produtos amplificados em cada ciclo de reação. Sendo assim, o resultado obtido determina não só a identificação dos genes envolvidos na formação do biofilme, mas também

quantifica a sua expressão (ADIL et al., 2014; BUSTIN et al., 2005; PANTANELLA et al., 2013; WONG; MEDRANO, 2005). A grande limitação da técnica reside no fato de o trabalho com RNA ser laborioso, pois o material genético alvo deve ser livre de contaminantes. Além do mais, a técnica apresenta-se com alto custo, exigindo equipamentos caros e um corpo técnico pessoal altamente treinado.

Durante um estudo de biofilme formado por qualquer que seja o microrganismo, a documentação visual dessa comunidade permite detectar seus componentes, bem como sua organização estrutural. A arquitetura apresentada em diferentes biofilmes, bem como a composição química da matriz fornecem dados que podem contribuir para um melhor entendimento deste fenótipo.

Os estudos sobre a matriz exopolimérica é de suma importância, visto que a característica está relacionada com o aumento da resistência diante de diversos antimicrobianos. A sonda intercalante Azul 1,9- dimetil-metileno (*DMMB – Dimethyl Methylene Blue*), originalmente utilizada para a quantificação de glicosaminoglicanas sulfatadas em culturas de condrócitos, foi utilizada para a quantificação de matriz de biofilme formado por *Staphylococcus aureus*. O princípio da técnica é baseado na complexação do DMMB com a matriz, seguido da descomplexação e quantificação por espectrofotometria (FARNDALÉ; BUTTLE; BARRETT, 1986; PANTANELLA et al., 2013; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008; TOTÉ et al., 2008).

A espectrometria de massa (MS – *Mass Spectrometry*) é uma metodologia utilizada para quantificação e estudo de propriedades químicas de diferentes moléculas. O princípio da técnica baseia-se em medições de índices de massa e cargas iônicas formadas durante a ionização de determinada amostra e sua abundância relativa. Os resultados obtidos fornecem dados de espectros de massas

típicos para determinadas moléculas relacionando-os com sua estrutura química (PANTANELLA et al., 2013).

Devido às condições de processamento da amostra durante a análise de espectros de massa, algumas propriedades são perdidas, principalmente em decorrência de ambiente a vácuo e solventes orgânicos fortes. Por essa razão, uma variação dessa técnica, conhecida como DESI (*Desorption Electro Spray Ionization*), foi padronizada para que a amostra seja submetida a condições ambientais normais, durante a análise, o que permite a conservação das suas características originais. Esta metodologia permite a análise minuciosa das características químicas do biofilme, possibilitando comparações em diferentes condições e estados de crescimento (FIGUEROA et al., 2014; PANTANELLA et al., 2013; TAKÁTS et al., 2004; VERTES; HITCHINS; PHILLIPS, 2012; WATROUS; DORRESTEIN, 2011). A limitação da técnica reside no fato de esta apresentar alto custo, exigir equipamentos caros, bem como pessoal técnico altamente capacitado.

A microscopia confocal de varredura a laser (*CLSM – Confocal laser Scanning Microscopy*) foi uma técnica desenvolvida por Houpt e Draaijer (HOUP, PIETER M; DRAAIJER, 1989) envolvendo a microscopia óptica acoplada a uma fonte de laser (*Light Amplification by Stimulated Emission Radiation*). A técnica permite a varredura de amostras biológicas nos eixos X, Y e Z, resultando em resolução e contraste suficiente para obtenção de informações visuais do objeto em três dimensões (3D) (HOUP; DRAAIJER, 1989; PADDOCK, 1999). Esta técnica é a mais utilizada em estudos de arquitetura de biofilmes microbianos (PANTANELLA et al., 2013; YANG et al., 2016).

A microscopia eletrônica permite a obtenção de imagens de alta resolução, em virtude da utilização de um feixe de elétrons de pequenos

comprimentos de onda e alta radiatividade. A microscopia eletrônica de transmissão permite a análise ultraestrutural, enquanto que a microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta de grande valia para a descrição de superfícies das células, das microcolônias e do biofilme. Ambas as técnicas apresentam limitações referentes ao preparo das amostras, em decorrência dos processos de desidratação e submissão a um sistema de vácuo. Porém, esse processo tem sido substituído por congelamento, o que caracteriza a técnica como sendo crio-eletrônica. Esta se baseia no método de congelamento das amostras em temperaturas criogênicas, permitindo a manutenção da estrutura celular, a constatação do papel da água na dinâmica celular sem a necessidade de fixação da amostra e utilização de sondas (BAI; MCMULLAN; SCHERES, 2015; DUBOCHET et al., 1988; PANTANELLA et al., 2013).

#### 2.2.4 Biofilmes formados por fungos

Os fungos, assim como as bactérias, também exibem a capacidade de se organizar e diferenciar em comunidades multicelulares, como os biofilmes (BIZERRA et al., 2008; PALKOVÁ; VÁCHOVÁ, 2016; SARDI et al., 2014). A capacidade de formar biofilmes pelos fungos, assim como os demais microrganismos, está diretamente relacionada com a persistência de infecções no ambiente hospitalar (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014; SHEPPARD; HOWELL, 2016; ZARNOWSKI et al., 2014).

Várias espécies de fungos têm sido descritas como hábeis para a formação de biofilme, tais como *C. albicans* (CHANDRA et al., 2001), *C. tropicalis* (BIZERRA et al., 2008), *C. neoformans* (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005), *A. fumigatus* (MOWAT et al., 2007) *P. brasiliensis* (HANNA; MONTEIRO DA SILVA; GIANNINI, 2000), *H. caspulum*, dentre outras (SARDI et al., 2014).

Como observado na literatura, biofilmes bacterianos são extensivamente estudados, quando comparado com estudos envolvendo fungos, apesar de várias espécies terem sido descritas como formadoras de biofilmes. Espécies do gênero *Candida* têm sido o principal fungo utilizado como modelo para o estudo de diferentes características observadas em biofilmes e suas implicações, tanto para o microrganismo, quanto para o hospedeiro, ou até mesmo nas relações entre diferentes espécies na natureza.

Seguindo a mesma definição mencionada anteriormente, biofilmes formados por fungos também compreendem células aderidas a um substrato envolto em uma matriz exopolimérica (SHEPPARD; HOWELL, 2016; ZARNOWSKI et al., 2014). Embora a composição básica da matriz apresente como componentes

polissacarídeos, proteínas, alguns íons e moléculas de ácidos nucleicos, a estrutura do biofilme é variável entre as diferentes espécies de fungos (ZARNOWSKI et al., 2014). A tabela 2 apresenta dados referentes ao biofilme formado por diferentes espécies de fungos, evidenciando as principais diferenças encontradas quanto a sua estrutura.

Estudos da matriz de biofilme formado por *C. albicans* têm revelado uma cooperação funcional entre ligações beta 1-3 glucana e manana-glucana para o desenvolvimento e manutenção de sua estrutura. Embora o padrão de ligação entre os monômeros de carboidratos sejam encontrados, também, na parede celular, a síntese da matriz é regulada por diferentes genes, e independe daqueles envolvidos na síntese da parede celular. Vale ressaltar que, em *C. albicans*, beta 1-3 glucanos, dentro da matriz apresenta uma importante propriedade sequestrante de agentes antifúngicos, além de conferir resistência quanto ao reconhecimento por parte de neutrófilos (MITCHELL et al., 2015; ZARNOWSKI et al., 2014).

**Tabela 2:** Características do Biofilme formado por fungos de importância médica (Adaptado de DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014)

Espécie	Características do biofilme	
	Componentes de Matriz	Morfologia do Biofilme
<i>Candida albicans</i>	Glicose, DNA, hexosamina em pequenas quantidades, proteínas em baixa concentração, fósforo e ácido urônico.	Comunidade contendo blastosporos e hifas, embebidas em matriz extracelular.
<i>Candida parapsilosis</i>	Carboidratos, com pouca proteína.	A morfologia do biofilme é dependente da amostra estudada; Blastosporos agrupados embebidos em matriz extracelular.
<i>Candida glabrata</i>	Maiores concentrações de carboidratos, quando comparado com biofilme formado por <i>C. parapsilosis</i> .	Camadas agrupadas de blastosporos, embebidas em matriz extracelular.
<i>Candida dubliniensis</i>	-	Morfologia complexa, com blastosporos, pseudo-hifas e hifas, embebidos em matriz extracelular.

<i>Candida tropicalis</i>	Hexosamina, pequenas quantidades de proteínas, fósforo, e maiores quantidades de ácido urônico, comparado com <i>C. albicans</i> .	Blastosporos e hifas embebidos em matriz extracelular.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Glucoronoxilomanana, xilose, manose, glicose e galactoxilomanana.	Leveduras embebidas em matriz extracelular.
<i>Trichosporon asahii</i>	-	Leveduras e hifas embebidas em matriz extracelular.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Galactomanana, $\alpha$ -1,3-glucanas, monossacarídeos, polissacarídeos, poliois, proteínas e DNA.	Hifas embebidas em matriz extracelular.

Em contrapartida, o biofilme formado por *A. fumigatus* apresenta dependência da síntese de Galactosaminogalactano (GAG), visto que este heteropolímero confere a capacidade de adesão em diferentes superfícies, além de conferir resistência ao sistema imune do hospedeiro (GRAVELAT et al., 2013; LEE et al., 2015; LOUSSERT et al., 2010). Isolados deficientes na síntese deste polissacarídeo não foram capazes de aderir tanto em superfícies abióticas quanto bióticas (LOUSSERT et al., 2010).

Polissacarídeos que apresentam ligações do tipo alfa são encontrados em abundância em matriz de biofilmes fúngicos, porém a sua importância para a formação e manutenção do biofilme ainda não foi elucidada (DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014; MITCHELL et al., 2015).

Diversos eventos fisiológicos são alterados enquanto o microrganismo está crescendo sob a condição aderida. Sendo assim, pode-se afirmar que a heterogeneidade físico-química da matriz, bem como a estrutura da comunidade refletem os padrões de expressão gênica, que pode variar mesmo em microrregiões de um mesmo biofilme (revisto por STEWART; FRANKLIN, 2008). Como será discutido posteriormente no artigo, uma análise comparativa entre células livres (planctônicas) e aderidas (sésseis) dentro de uma mesma espécie, evidencia uma significativa reprogramação da expressão gênica durante a formação do biofilme.

Este evento permite o estabelecimento de diferentes fenótipos entre essas duas populações celulares, que também difere das células que se desprendem do biofilme e colonizam outras superfícies (GUILHEN et al., 2016; IRAOLA et al., 2016). Os estudos genéticos sobre a formação de biofilme pode fornecer ferramentas úteis para manipulação genética, seleção e desenvolvimento de vacinas e substâncias antibiofilme, que podem impactar positivamente no controle de infecções associadas a essa comunidade.

### 3. JUSTIFICATIVA

Algumas espécies do gênero *Cryptococcus* têm sido descritas como agentes etiológicos de infecções em humanos, porém a maioria dos casos de criptococose reportados é causada por um dos dois principais complexos: *Cryptococcus gattii* sensu lato (s.l.) e *Cryptococcus neoformans* sensu lato (s.l.). No Brasil, a criptococose não é uma doença de notificação compulsória, o que dificulta o estabelecimento da taxa de ocorrência real desta enfermidade. Entretanto, isolados ambientais e clínicos (tanto do homem como de animais) de *C. neoformans* e *C. gattii* têm sido reportado no Brasil.

Em geral, *Cryptococcus* spp. apresenta uma cápsula rica em polissacarídeo, sendo considerada uma característica distintiva entre as demais leveduras de importância médica. Outros fatores associados à virulência dessas espécies são: enzima fenoxidase que participa da síntese da melanina e outros pigmentos a partir de precursores fenólicos, a enzima urease que é responsável pela hidrólise da uréia e a termotolerância à 37° C.

Em muitos casos a persistência da infecção microbiana está relacionada com a capacidade de alguns fungos em formar biofilme em superfície biótica, bem como em vários dispositivos médicos implantados, sendo considerado um importante problema clínico e econômico. Embora não seja um fator de virulência clássico, a capacidade de formar biofilme tem contribuído consideravelmente na virulência de muitas espécies de fungos. A maioria do conhecimento sobre biofilmes fúngicos vem de estudos com *Candida albicans*. Alguns estudos mostram a capacidade de *Cryptococcus neoformans* em formar

biofilme em diferentes superfícies, tais como vidro, poliestireno, polivinil e cateteres, além de outros dispositivos médicos. Porém, estudos acerca de biofilme formado por *C. gattii s.l.* é extremamente escasso.

A compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na formação do biofilme microbiano é crucial para o seu controle. Assim, a caracterização de genes que possam estar envolvidos no processo de formação do biofilme de *C. gattii s.l.* podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias para o seu controle.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a importância clínica de *C. gattii* e o conhecimento escasso sobre sua virulência, principalmente em relação à capacidade de formar biofilme o objetivo principal desse trabalho foi iniciar um estudo de caracterização do biofilme desta espécie, utilizando abordagens fenotípicas e moleculares. formação.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho foram:

#### 1. Caracterização fenotípica do biofilme de *C. gattii*

- Analisar a capacidade de formação de biofilme, em superfície abiótica, de amostras de *C. gattii* s.l. isoladas do ambiente e de mamíferos;
- Realizar a cinética de formação do biofilme;
- Analisar a estrutura do biofilme utilizando a microscopia eletrônica de varredura e microscopia de varredura confocal a laser.

2. Caracterização de genes diferencialmente expressos durante a formação de biofilme de *C. gattii* ATCC 24056, por RNA-seq.

- Isolar RNA de células planctônicas e sésseis de *C. gattii* ATCC 24065;
- Submeter o RNA ao sequenciamento utilizando a plataforma MiSeq Illumina.

## 5. ARTIGO

## INTRODUÇÃO

A incidência de infecções humanas invasivas por fungos tem aumentado paralelamente com o aumento das populações em risco (PILMIS et al., 2016). A criptococose, uma doença cosmopolita potencialmente fatal (SPIES et al., 2015) constitui-se em uma das principais causas de morbidade e mortalidade de indivíduos imunossuprimidos, principalmente aqueles portadores de HIV/AIDS (*Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome*) (DEL POETA; CASADEVALL, 2012; GULLO et al., 2013; LEAL et al., 2008; PILMIS et al., 2016). Espécies dos complexos *Cryptococcus gattii sensu lato (s.l.)* e *Cryptococcus neoformans s.l.* são consideradas os principais agentes etiológicos de criptococose, sendo responsáveis por cerca de um milhão de casos de meningite por ano em pacientes com AIDS. O Centro para Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) estima que mais de um milhão de novos casos por ano sejam relatados em todo o mundo, causando cerca de 650.000 óbitos entre os pacientes portadores de HIV (CDC, 2015).

Embora *C. neoformans s.l.* seja responsável pela maioria dos casos de criptococose nessa população em risco, *C. gattii s.l.* tem emergido como importante agente etiológico de criptococose também em hospedeiros imunocompetentes, resultando em alta taxa de mortalidade dos indivíduos acometidos (CHEN et al., 2012; CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; LIZARAZO et al., 2014a, 2014b; MCCULLOH et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2014; SAIJO et al., 2014; TRILLES et al., 2008). De acordo com características genéticas, recentemente espécies de *C. gattii s.l.* foram reclassificadas como *C. gattii* (genótipo AFLP4/VGI), *C. bacillisporus* (genótipo AFLP5/VGIII), *C. deuterogattii* (genótipo AFLP6/VGII), *C. tetragattii*

(genótipo AFLP7/VGIV) e *C. decagattii* (genótipo AFLP10/VGIV) (HAGEN et al., 2015).

*C. gattii* apresenta um arsenal de virulência semelhante a *C. neoformans*, possibilitando a evasão do sistema imune (cápsula polissacarídica); a habilidade para crescer a 37 °C; a proteção contra espécies reativas de oxigênio (produção de melanina, expressão de superóxido dismutase e trealose); a invasão tecidual (expressão de fosfolipase e urease) (TAYLOR-SMITH; MAY, 2016). Embora não seja um fator de virulência clássico, a formação de biofilme contribui significativamente para persistência do microrganismo nos tecidos do hospedeiro (DONLAN; COSTERTON, 2002; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; SARDI et al., 2014). Biofilmes microbianos são comunidades altamente estruturadas de microrganismos aderidos à uma superfície (células sésseis) e embebidos em uma matriz polimérica extracelular e exibem fenótipos distintos em comparação com as células planctônicas (DONLAN, 2002; DONLAN; COSTERTON, 2002). Clinicamente importante, células sésseis exibem sensibilidade reduzida aos antimicrobianos e mecanismos de defesa do hospedeiro (AJESH; SREEJITH, 2012; BIZERRA et al., 2008; DONLAN; COSTERTON, 2002; MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a, 2006b), dificultando o manejo das infecções, e constituindo-se em um fator de risco de mortalidade dos pacientes (RAJENDRAN et al., 2016).

Uma grande variedade de espécies microbianas são capazes de colonizar e formar biofilme em diferentes superfícies bióticas e abióticas (AJESH; SREEJITH, 2012; BIZERRA et al., 2008; DONLAN; COSTERTON, 2002; SARDI et al., 2014). No entanto a maioria do conhecimento sobre biofilmes de fungos vem de estudos com *Candida albicans* (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; RAMAGE; ROBERTSON; WILLIAMS, 2014) e, mais recentemente *Cryptococcus neoformans*

(MARTINEZ; CASADEVALL, 2015). Este último, têm sido associado a infecções de implantes médicos, sendo capaz de formar biofilmes na superfície de cateteres de derivação ventrículo-atrial (WALSH et al., 1986) ou venoso central (TUON et al., 2009), próteses de válvula cardíaca (BANERJEE; GUPTA; VENUGOPAL, 1997), de quadril (JOHANNSSON; CALLAGHAN, 2009) ou de articulação (SHAH; SHOHAM; NAYAK, 2015). Além disso, estas leveduras podem formar biofilme *in vitro* sobre a superfície do vidro, poliestireno, polivinil e policarbonato (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; RAVI et al., 2009).

O conhecimento sobre os mecanismos empregados por *C. gattii* na formação de estruturas complexas como o biofilme é limitado. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar as características do biofilme de *C. gattii* em relação a cinética de formação, morfologia, e expressão gênica diferencial comparada ao crescimento planctônico.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Microrganismos e condições de cultivo**

*C. gattii* sorotipo B ATCC 24065 (gentilmente doado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, Brasil), quatro isolados de *C. gattii* provenientes do ambiente e quatro isolados clínicos, de infecções em seres humanos, provenientes da coleção de microrganismos pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos – NIP5, foram cultivadas em ágar *Sabouraud* a 37 °C e armazenadas a 4 °C para posterior processamento. Os isolados clínicos e ambientais foram previamente identificados por reação em cadeia pela polimerase

(PCR) utilizando iniciadores específicos complementares à região do espaço intergênico 2 (IGS2) do DNA ribossomal (TAVARES et al., 2016). Para obtenção de células planctônicas,  $1,5 \times 10^7$  leveduras foram incubadas a 37 °C por 48 h em meio *Sabouraud* dextrose caldo sob agitação de 200 rotações por minuto (rpm). Após esse período, a cultura foi centrifugada e as células obtidas foram utilizadas para a purificação de RNA total.

### **Formação de biofilme**

A formação de biofilme foi realizada segundo a metodologia proposta por Martinez e Casadevall (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a). O biofilme foi formado em meio líquido *Sabouraud* dextrose (SD), em placas de microtitulação de poliestireno (96 poços) a partir de um inóculo de  $1,5 \times 10^7$  leveduras. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas sem agitação. Após a formação do biofilme, as células não aderidas foram removidas pela lavagem com tampão fosfato salina 0,15 M pH 7,2 (PBS), e o biofilme foi seco. Para determinar a biomassa dos biofilmes formados, estes foram corados com cristal violeta 0,4 % durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, os biofilmes foram lavados com água destilada esterilizada, descorados com metanol 95% por 45 minutos à temperatura ambiente, e 100 µL das soluções descorantes foram transferidos para uma nova placa onde foi feita a leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (*Universal Microplate Reader* modelo *ELx 800*, *Bio-Tek Instruments INC*) em comprimento de onda de 595 nm. Poços sem a adição de leveduras foram usados como controle. As diferenças entre os valores médios de DO obtidos dos biofilmes formados pelos diferentes isolados e cepa de referência de *C. gattii* foram analisados utilizando-se ANOVA *one-way* seguido do teste de

comparação múltipla de Dunnett. A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA) e valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## **Caracterização do biofilme formado por *C. gattii* sorotipo B ATCC 24065**

### ***Cinética da formação do biofilme***

A formação de biofilme foi realizada na superfície de poliestireno e vidro como descrito anteriormente, exceto que as placas foram incubadas por 6, 12, 48, 72 e 96 horas sem agitação. Após a formação do biofilme, as células não aderidas foram removidas pela lavagem com tampão fosfato salina 0,15 M pH 7,2 (PBS), e o biofilme foi seco. A biomassa dos biofilmes foi determinada após coloração com cristal violeta, como descrito anteriormente. A viabilidade do biofilme formado em poliestireno foi determinada pela medida da atividade metabólica celular utilizando o ensaio de redução do XTT (*2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide*), segundo a metodologia proposta por Martinez e Casadevall (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a). Assim, em cada poço da placa de microtitulação foram adicionados 50  $\mu$ L de solução de XTT/menadiona (1 mg/mL em PBS e 1  $\mu$ M menadiona) e a placa foi incubada a 37 °C por 5 horas. A DO foi medida em espectrofotômetro (*Universal Microplate Reader* modelo *ELx 800*, *Bio-Tek Instruments* INC) em comprimento de onda de 492 nm. Em ambos os sistemas, poços sem a adição de leveduras foram usados como controle.

### ***Microscopia eletrônica de varredura (MEV)***

Lamínulas de vidro de 5 mm foram esterilizadas e depositas em placas de 24 poços contendo meio *Sabouraud* dextrose caldo. Um inóculo de  $1 \times 10^7$

leveduras, obtido de um cultivo de 48 horas a 37 °C, foi adicionado ao sistema para a formação do biofilme. O sistema foi incubado a 37 °C em tempos de 12, 24, 48, 72 e 96 horas, sem agitação. Após cada tempo de incubação, as lamínulas foram retiradas e lavadas com PBS. Após a lavagem, o biofilme foi fixado com 2,5% (v/v) de glutaraldeído e 0,1 M de tampão cacodilato de sódio. Em seguida, o material foi desidratado em uma série de lavagens em etanol em diferentes concentrações (15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), submetido ao ponto crítico de CO<sub>2</sub>, recoberto com ouro e examinado com microscópio eletrônico de varredura *FEI Quanta 200*.

### ***Microscopia de varredura confocal a laser***

O biofilme de *C. gattii* foi formado em placa de cultivo celular com fundo de vidro de 35 mm em diferentes tempos a 37 °C como descrito acima. Após o crescimento, os biofilmes foram lavados, uma vez, com PBS e corados por 2 horas, a temperatura ambiente em 4 mL PBS contendo os marcadores fluorescentes FUN-1 (10 mM) (Invitrogen) e Conjugado Concanavalina-A-Alexa Fluor 488 (ConA; 25 mg/mL) (Invitrogen). Os biofilmes foram visualizados em Microscópio Confocal a Laser (Leica) onde, para o corante FUN-1, o comprimento de onda de excitação foi 573 nm e emissão a 592 nm com filtro *long-pass*, e para ConA, 498 nm de excitação e 528 nm de emissão com filtro *long-pass*. A intensidade utilizada para ConA foi de 17,9 e FUN-1 de 14; o ganho foi de 722 e 714 para ConA e FUN-1, respectivamente. O corante FUN-1 foi convertido para laranja avermelhado, pela atividade metabólica de estruturas intracelulares, enquanto ConA liga-se em resíduos de glicose e manose da parede celular e matriz exopolimérica.

### ***Obtenção de RNA total***

O RNA total de células planctônicas e biofilme formado em poliestireno foi isolado utilizando o *kit Illustra RNAspin (Ge Healthcare, Reino Unido)*, segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi determinada em gel de agarose 1,5% em condições desnaturantes como descrito por Lehrach et al, (LEHRACH et al., 1977). O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (Universal *Microplate Reader* modelo *ELx 800, Bio-Tek Instruments INC*). Os dois modos de crescimento (planctônico e biofilme) foram realizados em triplicata biológica: três amostras para cada situação de crescimento, correspondendo a cada um dos três experimentos, separados espacial e temporalmente.

### ***Construção da biblioteca e sequenciamento do RNA***

A construção da biblioteca foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (ICBUFGM), Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Belo Horizonte, Minas Gerais. Para a síntese do DNA complementar (DNAc) a partir dos RNAs totais obtidos, foi utilizado o *TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v.2* (Illumina, USA), segundo recomendações do fabricante. O agrupamento das bibliotecas em *clusters* e *paired-ends* foi realizada com *TruSeq® PE Cluster Kit v.2* (Illumina, USA) e quantificação, obtida por PCR em tempo-real utilizando o *KAPA Library Quantification kit Illumina® platforms* (KAPA Biosystems). Em seguida as bibliotecas foram normalizadas para a concentração de 4 nM e unidas para a realização do sequenciamento, em plataforma MiSeq (Illumina) com o *kit MiSeq Reagent v3* (600 ciclos) em estratégia *paired-end 2x300*.

### ***Qualidade e mapeamento das reads***

A qualidade das *reads* foi avaliada pela ferramenta *FastQC* (*Fast Quality Control*) para determinar o *Phred Quality Scores* (Q). O mapeamento das *reads* foi realizado a partir do genoma de referência anotado de *C. gattii* WM276 (NCBI *Reference Sequence*: GCA\_000185945.1), utilizando os parâmetros padrões da plataforma computacional *CLC Genomics Workbench* versão 8.5.1 (CLC bio, Denmark).

### ***Medida dos níveis de expressão e análise da expressão diferencial***

Os dados gerados foram analisados pela plataforma *CLC Genomics Workbench* versão 8.5.1 (CLC bio, Denmark) para a quantificação da expressão por valores de RPKM (*Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads*). Basicamente a plataforma realiza a normalização dos dados mapeados obtidos para comparar as amostras com maior acurácia, calculando os níveis de expressão e, finalmente, realizando os testes estatísticos para verificar as diferenças de expressão. Para determinar os genes que apresentavam diferenças nos níveis de expressão entre as duas situações de crescimento, foi utilizada a ferramenta *Empirical Analysis of DGE27* hospedada na plataforma CLC. Na mesma plataforma, os genes diferencialmente expressos com significância estatística foram identificados a partir de uma filtragem aplicando-se a correção *Fold Change* (usada para a comparação do nível de expressão de RNAm de um gene entre duas condições distintas) maior que 1,5 e valor de *P* menor que 0,001. A lista de genes com expressões significantes obtidas foi transformada, normalizada e utilizada para confecção dos gráficos de análise de dispersão.

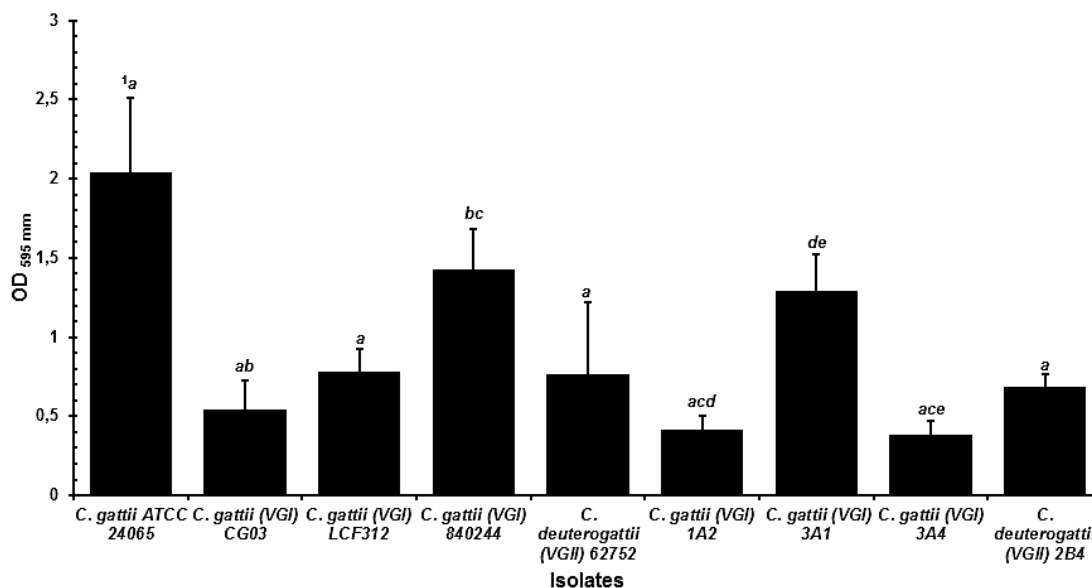
### ***Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos***

Os transcritos mais expressos foram submetidos aos programas de anotação BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e UNIPROT (*Universal Protein Resource*) e individualmente para possível classificação manual em categorias funcionais de acordo com a descrição da sequência baseada em maior similaridade.

## **RESULTADOS**

### **Formação de biofilme por *C. gattii* s.l. em superfície de poliestireno**

Inicialmente, neste trabalho foi analisada a capacidade de isolados ambientais e clínicos do complexo *C. gattii* s.l. e a cepa de referência *C. gattii* ATCC 24065 em formar biofilme sobre a superfície de poliestireno. A biomassa do biofilme fúngico formado sobre esta superfície foi monitorada pelo método do cristal violeta. Como mostra a figura 1, todos isolados e a cepa de referência foram capazes de formar biofilme nesta superfície. Entretanto, diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram observadas na biomassa produzida pelos diferentes *C. gattii*, incluindo entre isolados do mesmo genótipo. A cepa de referência apresentou a maior biomassa, enquanto os isolados ambientais 1A2 e 3A4 apresentaram os menores valores. Assim, a cepa de referência foi escolhida para as análises posteriores.

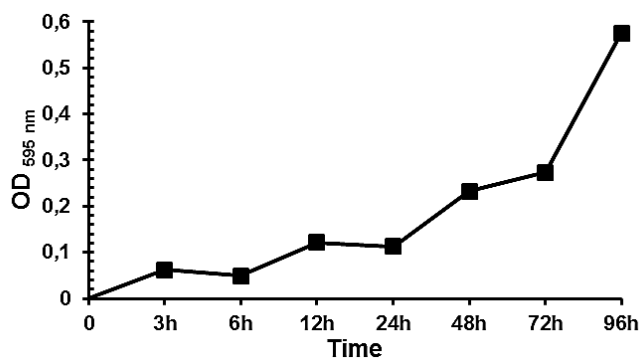


**Figura 1:** Formação de biofilme por *Cryptococcus gattii sensu lato* em superfície de poliestireno incubado em caldo *Sabouraud* durante 72 horas a 37 °C. A biomassa do biofilme foi determinada após coloração das células aderidas com cristal violeta. O corante ligado foi eluído com metanol e a densidade óptica determinada em 595 nm. CG03, LCF-312, 840244 e 62452 representam isolados clínicos e 1A2, 3A1, 3A4 e 2B4, isolados ambientais. Os valores com letras iguais representam diferenças significativas entre os isolados ( $P < 0,05$ ).

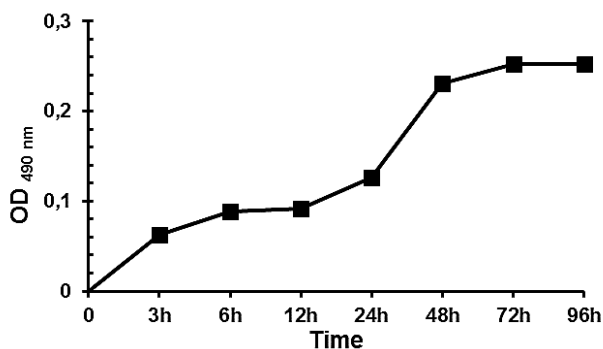
### Características do biofilme de *C. gattii* ATCC 24065 em superfícies abióticas

A cinética da formação de biofilme por *C. gattii*, em superfície de poliestireno foi mensurada pela determinação indireta da biomassa após coloração com cristal violeta e da atividade metabólica utilizando-se o ensaio de redução do XTT. Os resultados são mostrados na figura 1 e 2. Houve um aumento lento e gradual tanto na biomassa quanto na viabilidade do biofilme formado em poliestireno nas primeiras 24 horas de incubação em SD a 37 °C. A partir de 24 horas até 96 horas observou-se um aumento significativo na biomassa do biofilme (Figura 2). Entretanto, embora o aumento da biomassa tenha ocorrido até 96 horas, a atividade metabólica das células sésseis, permaneceu constante após 72 horas de incubação atingindo uma fase estacionária (Figura 3). O cristal violeta tem afinidade tanto pela

célula quanto por moléculas carregadas negativamente presentes na EPS, indicando que a partir de 72 horas ocorre um aumento significativo na produção da matriz do biofilme. Isto pode explicar a diferença observada entre os resultados de biomassa e viabilidade do biofilme.



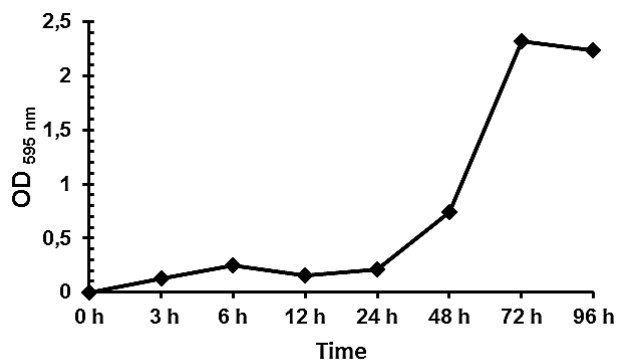
**Figura 2:** Cinética da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 em poliestireno a 37 °C, conforme determinado pelo método de cristal violeta. Os valores representam a média  $\pm$  DP e são representativos de três experimentos independentes.



**Figura 3:** Cinética da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 em poliestireno a 37 °C, conforme determinado pelo método de redução do XTT. Os valores representam a média  $\pm$  DP e são representativos de três experimentos independentes.

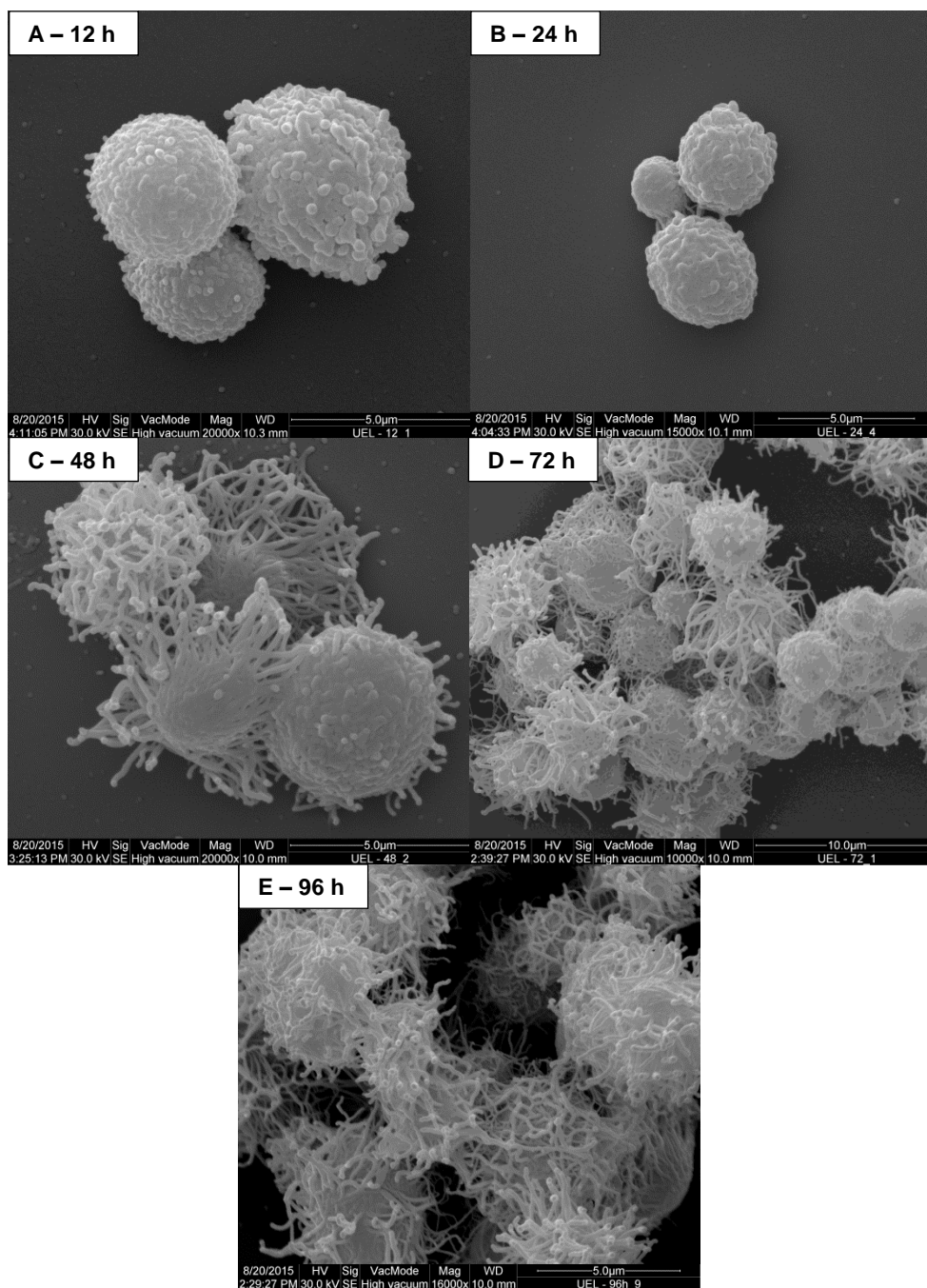
Na superfície de vidro, também foi observado um aumento exponencial da biomassa do biofilme a partir de 24 horas de incubação (Figura 4). Entretanto,

diferentemente do biofilme formado em poliestireno, a biomassa permaneceu constante a partir de 72 horas de incubação.



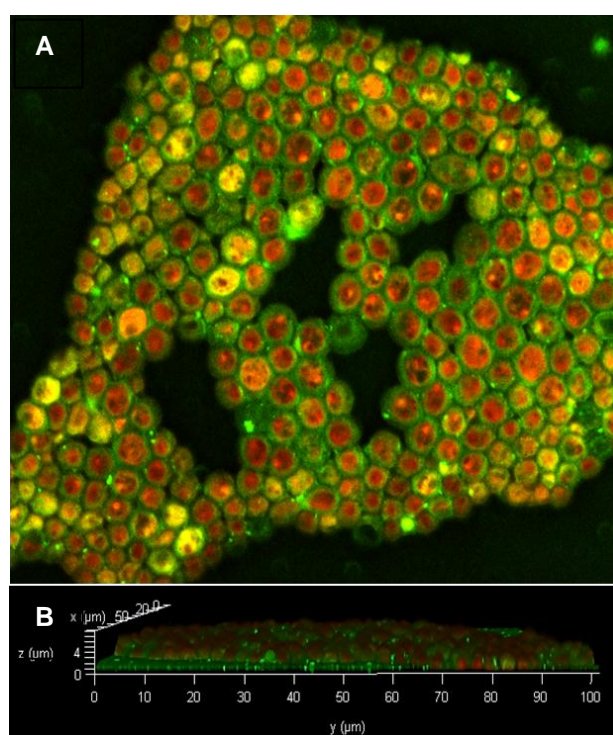
**Figura 4:** Cinética da formação de biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 em vidro a 37 °C, conforme determinado pelo método de cristal violeta. Os valores representam a média  $\pm$  DP e são representativos de três experimentos independentes.

A morfologia e ultraestrutura do biofilme formado na superfície do vidro foi monitorada por MEV (Fig. 5 ). Entre 0 a 12 horas de incubação, as células leveduriformes encontram-se aderidas à superfície abiótica e a densidade celular aumenta gradativamente (Fig. 5A). Em 24 horas (Fig. 5B), pequenas ramificações de substância amorfa podem ser visualizadas entre as células leveduriformes, indicando o início de produção da EPS. Entre 48 e 72 horas (Fig. 5C-D), ocorre um aumento de ambos, densidade celular e quantidade de substância amorfa. Em 96 (Fig. 5E) horas, o biofilme maduro consiste de agregados celulares completamente envoltos pela EPS.



**Figura 5:** Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura dos estágios de formação do biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 sobre a superfície de vidro ao longo de um período de tempo (12, 24, 48, 72 e 96 h) a 37 °C.

Imagens individuais (Figura 6A) e reconstruídas em 3D (Figura 6B) do biofilme de *C. gattii* na superfície de vidro foram obtidas por microscopia de varredura confocal a laser utilizando a combinação de dois corantes fluorescentes, FUN-1 (marcador citoplasmático de viabilidade celular) e Con-A (corante que se liga seletivamente em resíduos de manose e glicose). A Figura 6A mostra uma intensa marcação verde-fluorescente ao redor de células marcadas em vermelho-fluorescente. Assim, o biofilme formado durante 72 horas nesta superfície apresenta-se como uma monocamada de células metabolicamente ativas embebidas em matriz polissacarídica. Além disso, é possível observar canais formados entre os agregados celulares. A visão lateral da imagem reconstruída mostra que o biofilme maduro apresenta cerca de 8 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura (Figura 6B).



**Figura 6:** Imagens representativas de microscopia de varredura confocal a laser do biofilme de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 a 37 °C.

## Análise diferencial do transcriptoma do biofilme maduro de *C. gattii* ATCC 24065 formado na superfície de poliestireno em comparação com células planctônicas

### *Qualidade e mapeamento das Reads*

O RNA total, obtido a partir do biofilme e de células planctônicas, foi analisado quanto a sua integridade, quantidade e pureza, utilizado para a síntese de DNAc e posteriormente para a construção e sequenciamento das bibliotecas de cada população.

Os resultados obtidos mostraram uma quantidade de aproximadamente 27 milhões de reads, com tamanho médio de 301 pares de bases (pb). Destas, 14.140.606 foram correspondentes ao RNA obtido das células planctônicas, e 12.795.000 reads, correspondentes ao RNA obtido do biofilme (Tabela 1).

**Tabela 1:** Tamanho e número de reads e média de cobertura do genoma de referência.

Assay	Reads Length	Number of Reads	Coverage of Genome
Planktonic Growth	301	14.140.606	231,7X
Sessile Growth	301	12.795.000	209,6X

As *reads* obtidas foram analisadas utilizando a ferramenta FastQC, onde foi observado para cada biblioteca que 95% das sequências obtidas apresentaram *Phred Quality Scores* (Q) maior ou igual a 30, representando uma precisão de 99,90% e indicando alta qualidade das sequências. Devido ao resultado obtido, não foi utilizado nenhuma ferramenta de filtragem, garantindo o máximo de informações possíveis a partir das sequências.

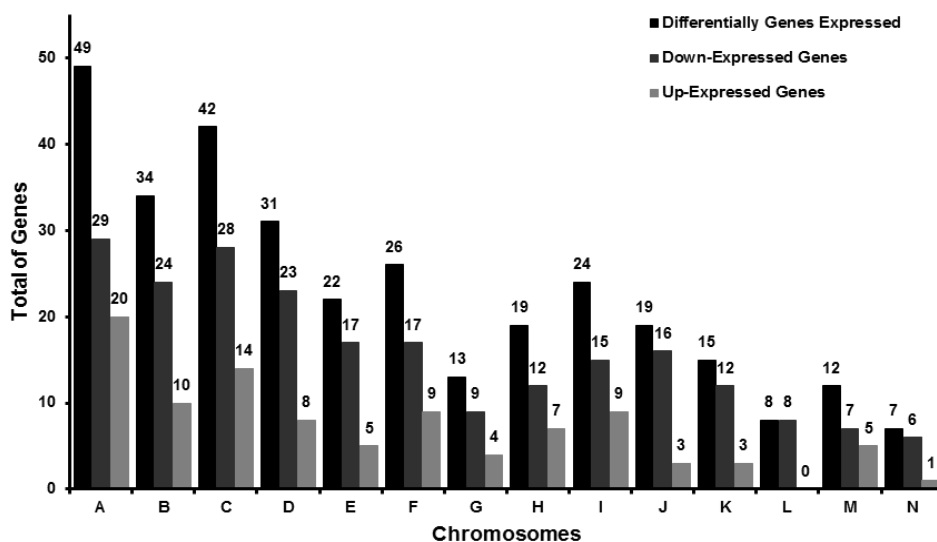
Após o agrupamento das *reads* obtidas das triplicatas nas condições de crescimentos planctônico e biofilme, estas foram mapeadas utilizando o genoma de referência anotado de *C. gattii* WM276 (*NCBI Reference Sequence: GCA\_000185945.1*). Os resultados do mapeamento mostraram um total de 6580 genes mapeados. Os dados referentes ao genoma de referência são apresentados na tabela 2; e referentes ao mapeamento, na tabela 3. A cobertura média sobre o genoma de referência que cada grupamento de *reads* referente às diferentes condições de tratamento foi superior a 200 x, indicando um número de *reads* adequado para análise de expressão (Tabela 1).

#### *Medida dos níveis de expressão e análise da expressão diferencial*

Os dados mapeados adquiridos entre as duas condições de crescimento foram utilizados para obtenção dos valores de RPKM (*Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads*). Estes, por sua vez foram usados para determinar a quantificação, os níveis e as diferenças da expressão gênica, entre as duas condições.

Após a identificação dos níveis e diferenças de expressão e o tratamento estatístico, 321 transcritos estavam diferencialmente expressos no biofilme. Destes, 98 transcritos apresentaram-se como hiperexpressos, enquanto 223 estavam subexpressos (Figura 7). Dos 98 transcritos hiperexpressos, após análise das possíveis funções, 38 (38,78%) correspondiam a genes anotados que codificam proteínas de função desconhecida, e 60 (61,22%) apresentaram homologia com genes que codificam proteínas de funções conhecidas, entre elas 35

(35/60, 58,33%) codificam para proteínas ribossomais e componentes da estrutura do ribossomo, e 25 (25/60, 41,67%) proteínas não-ribossomais (Figura 8).



**Figura 7:** Diferenças da expressão gênica, entre as duas condições de crescimento, planctônico e biofilme, determinada a partir de valores de RPKM (*Reads per Kilobase per Million of Mapped Reads*).



**Figura 8:** Ontologia dos 98 genes hipereexpressos anotados para os processos biológicos.

### *Análise funcional dos genes identificados*

De acordo com a ontologia dos genes anotados para os processos biológicos, os transcritos identificados de *C. gattii* ATCC 24065 foram classificados

em 9 categorias. Dos 60 transcritos hiperexpressos identificados, 35 (58,33%) apresentaram homologia com genes que codificam proteínas estruturais e associadas às funções dos ribossomas. Metabolismo de proteínas (8,33%) e lipídeos (8,33%) consistem nas categorias mais abundantes, sendo representadas por cinco transcritos cada. Três transcritos em cada categoria de reguladores transcricionais (5%), transportadores intermembrana (5%), reparo/proteção do DNA (5%) e metabolismo oxidorredutivo (5%) também foram identificados neste estudo. Um transcrito (1,67%) apresentou homologia com proteína associada a adesão, e outro (1,67%) associado a proteção contra o estresse ambiental (tabela 2).

**Tabela 2:** Categorias funcionais dos genes hiperexpressos no biofilme de *C. gattii* em 72 horas de incubação a 37 °C, estatisticamente significantes submetidos aos programas de anotação BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e UNIPROT (*Universal Protein Resource*)

Category	Genes	BLAST		UNIPROT	
		Accession	Definition	Accession	Definition
Transcriptional regulator	CGB_A3660C	ADV20032	RING zinc finger protein	E6QXK9	RING zinc finger protein
	CGB_A2300C	ADV19517	MAP kinase phosphatase	E6QZE5	MAP kinase phosphatase
	CGB_I1100W	ADV24258	Serine-threonine protein kinase IKS1p	E6RBT8	Serine-threonine protein kinase IKS1
Adhesion	CGB_C9420C	ADV21398	Hmp1 protein	E6R2F0	Hmp1 protein
Proteins Metabolism	CGB_B5300W	ADV20463	Hydrolase	E6R0X7	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase
	CGB_C6460C	ADV21181	aminomethyltransferase, mitochondrial precursor	E6R1S3	Aminomethyltransferase
	CGB_E6750W	ADV22708	Cysteine-type peptidase	E6R6A2	Cysteine-type peptidase
	CGB_F0420C	ADV22795	Allergen	E6R7M3	Allergen
	CGB_I1440W	ADV24273	Translation initiation factor 5a (eIF-5a)	E6R BX1	Eukaryotic translation initiation factor 5A
Lipids Metabolism	CGB_A9490W	ADV24461	Phosphatidylserine decarboxylase	E6QYT2	Phosphatidylserine decarboxylase
	CGB_F1110C	ADV22883	Phosphatidylserine decarboxylase	E6R7Q0	Phosphatidylserine decarboxylase
	CGB_I0350C	ADV24237	squalene monooxygenase	E6RBP8	Squalene monooxygenase
	CGB_D1240C	ADV21594	carnitine acetyltransferase	E6R5G7	Carnitine acetyltransferase
Transporters	CGB_J0030W	ADV24539	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	E6RCH7	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily
	CGB_F0090C	ADV22816	Monocarboxylic acid transporter	E6R7J0	Monocarboxylic acid transporter
	CGB_D0310C	ADV21505	ABC transporter	E6R5A0	ABC transporter
DNA repair/protection	CGB_A0280W	ADV19312	exonuclease	E6QYY1	Exonuclease
	CGB_A3450C	ADV19572	DNA repair protein Rad51	E6QXI8	DNA repair protein Rad51
	CGB_M2010W	ADV25506	dUTP diphosphatase	E6RFA0	DUTP diphosphatase
Oxyreductive metabolism	CGB_B1380C	ADV20191	LSDR Protein	E6R00	LSDR
	CGB_I0500W	ADV24217	oxidoreductase	E6RBR3	Oxidoreductase
	CGB_H2020C	ADV23943	2,4-dichlorophenoxyacetate alpha-ketoglutarate dioxygenase	E6RAL4	2,4-dichlorophenoxyacetate alpha-ketoglutarate dioxygenase
Stress response	CGB_A9610C	ADV19988	LEA domain protein	E6QYU4	LEA domain protein
No described function	CGB_I0490C	ADV24231	cytosine deaminase	E6RBR2	Cytosine deaminase
	CGB_M2040C	ADV25556	E167 tumor protein-like protein	E6RFA3	E167 tumor protein-like protein

## DISCUSSÃO

O crescimento na forma de biofilme confere várias vantagens para o microrganismo, uma vez que permite maior tolerância aos estresses físico-químicos ambientais (DONLAN; COSTERTON, 2002). Na natureza, os biofilmes constituem-se em comunidades polimicrobianas altamente competitivas. Os membros destas comunidades podem exibir propriedades que permitem sua sobrevivência neste nicho, tais como antagonismo microbiano e produção de substâncias poliméricas extracelulares (DONLAN, 2002; OTTO, 2014; RENDUELES; GHIGO, 2015).

No homem, o biofilme pode ser detectado tanto no processo de colonização (OTTO, 2014) como durante a infecção (DONLAN; COSTERTON, 2002; OTTO, 2014; RAJENDRAN et al., 2016; WILLIAMS; RAMAGE, 2015), ocasionando efeitos benéficos ou prejudiciais, respectivamente. De fato, um desequilíbrio da microbiota humana está associada com o desenvolvimento de várias doenças (MARTIN et al., 2014), e cerca de 75% das infecções humanas estão associadas com a formação de biofilmes nas superfícies bióticas ou de materiais médicos implantados (DONLAN; COSTERTON, 2002; GUPTA et al., 2016; WILLIAMS; RAMAGE, 2015).

Neste estudo, todos isolados ambientais e clínicos, bem como a cepa de referência de *C. gattii* foram capazes de formar biofilme na superfície de poliestireno. Como para a maioria dos fungos, foi observado que a formação do biofilme de *C. gattii* ATCC 24065 em uma superfície abiótica exibe fases coordenadas como adesão à superfície, formação de microcolônias, produção de matriz polimérica extracelular e maturação (BIZERRA et al., 2008; CHANDRA et al., 2001; DONLAN, 2002; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). Assim, o biofilme maduro

de *C. gattii* ATCC 24065 crescido sobre a superfície de vidro em meio *Sabouraud* durante 72 horas consistiu de uma rede de células leveduriformes metabolicamente ativas, aderidas e embebidas em uma densa matriz de substância polimérica extracelular.

A adesão microbiana às superfícies envolve a participação de fatores ambientais (temperatura, pH, tempo de exposição, densidade celular, tratamento químico ou presença de antimicrobianos), e fatores relacionados ao microrganismo tanto inespecíficos (hidrofobicidade, forças de van der Waals e cargas eletrostáticas), como específicos associados às estruturas de superfície celular coletivamente denominadas de adesinas (DONLAN, 2002; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; O'TOOLE; WONG, 2016; SILVA et al., 2011).

Em um estudo utilizando um mutante acapsulado de *C. neoformans* com deleção para o gene *cap59*, Matinez e Casadevall (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005) mostraram que a cápsula desempenha um importante papel na formação do biofilme na superfície de poliestireno. Além disso, esses autores mostraram que o tipo de glucuronoxilomanana correlaciona com a habilidade de *Cryptococcus* formar biofilme, sendo os sorotipos D mais aderentes quando comparados com o sorotipo A e B.

Durante a fase intermediária, as células multiplicam-se intensamente formando as microcolônias e canais de água, contribuindo para o estabelecimento de um gradiente de nutrientes e eliminação de metabólitos tóxicos. Concomitantemente, nesta fase ocorre um aumento na produção de matriz polimérica extracelular (BIZERRA et al., 2008; CHANDRA et al., 2001; DONLAN, 2002; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007).

A organização estrutural dos biofilmes também propicia a intensa troca de material genético entre seus componentes. Neste contexto, alguns estudos têm mostrado evidências de que os biofilmes podem representar uma fonte de genes que codificam resistência aos antimicrobianos, contribuindo para a disseminação desse fenótipo (BALCÁZAR; SUBIRATS; BORREGO, 2015).

A partir de estudos de biofilmes de diferentes espécies microbianas foi possível detectar que transição entre o modo de crescimento planctônico e biofilme é governado por uma reprogramação gênica. Em *C. albicans*, expressão gênica diferencial pode ser observada já na fase inicial de formação do biofilme (30 min até 6 horas), principalmente de genes envolvidos na síntese de aminoácidos, proteínas e nucleotídeos; metabolismo de lípidos e carboidratos; transcrição; e controle da organização celular (CAO et al., 2005; GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2004; MURILLO et al., 2005; YEATER et al., 2007). Vários reguladores transcricionais foram identificados como moduladores diretos ou indiretos da formação do biofilme de *C. albicans* (FOX et al., 2015; GULATI; NOBILE, 2016; NOBILE; JOHNSON, 2015). Nove reguladores transcricionais (*BCR1*, *BRG1*, *EFG1*, *NDT80*, *ROB1*, *TEC1* e *FLO8*) controlam positivamente a formação do biofilme desta levedura, afetando a expressão de aproximadamente 1000 genes envolvidos em diferentes processos celulares (FOX et al., 2015; NOBILE et al., 2012). Por outro lado, 6 reguladores transcricionais (*UME6*, *NRG1*, *GAL4*, *RFX2*, *SFP1* e *ZAP1*) modulam negativamente este processo (FOX et al., 2015; FOX; NOBILE, 2012).

Neste estudo, utilizando a metodologia de RNAseq foi analisado e comparado o transcriptoma obtido a partir de RNAs mensageiros purificados de células crescendo nos modos, planctônico e biofilme, durante 48 horas. Este tempo corresponde a fase intermediária de formação do biofilme, bem como fase de

crescimento exponencial das células planctônicas. Dos transcritos hiperexpressos durante a formação do biofilme, 35 apresentaram homologia com genes que codificam prováveis proteínas associadas com a estrutura e função dos ribossomas e 25 associadas com outras funções conhecidas.

Somente um transcrito associado com função de adesão foi identificado como hiperexpresso no biofilme de *C. gattii* neste estudo. O gene *CGB\_C9420C* (cromossomo C) codifica para a proteína *Hmp1*. Esta proteína apresenta similaridade de aminoácidos com  $\alpha$ -cateninas, que em vertebrados parecem mediar a organização da actina próxima à membrana plasmática. As  $\alpha$ -cateninas interagem com as proteínas de membrana caderinas promovendo o contato destas com o citoesqueleto, ou promovendo a interação célula-célula (SHAPIRO; WEIS, 2009). Estudos em *Listeria monocytogenes* mostraram que as  $\alpha$ - e  $\beta$ -cateninas são recrutadas para o local de entrada da bactéria, sendo necessários para os eventos que induzem os rearranjos do citoesqueleto e da membrana plasmática necessários para a internalização bacteriana (LECUIT et al., 2000). *Hmp1* também foi detectada em vesículas extracelulares de *C. neoformans*, muitas das quais comportam moléculas associadas à virulência do fungo (RODRIGUES et al., 2008).

Assim como para *C. albicans*, transcritos com homologia a reguladores transcricionais foram identificados como hiperexpressos no biofilme de *C. gattii* neste estudo. Um transcrito apresentou homologia com o gene *CGB\_A3660C* que codifica para RING *zinc finger protein*, uma metaloproteína (zinco como cofator) que contém o motivo “dedo de zinco” (*zinc finger*), presente em proteínas de ligação do DNA (*DNA binding protein*). Em leveduras, essas proteínas constituem-se como os principais reguladores da transcrição. Em *S. cerevisiae*, essas proteínas foram

relacionadas como ativadoras e repressoras de genes que codificam transportadores de glicose; participam do metabolismo de açúcares e de aminoácidos, síntese de vitaminas, reguladoras da divisão celular, remodelagem da cromatina, formação de peroxissomos e resposta à situação de estresse (MACPHERSON; LAROCHELLE; TURCOTTE, 2006). Em *C. albicans* proteínas com motivo “dedo de zinco” participam da regulação de genes envolvidos no processo de filamentação e metabolismo de sacarose. Além disso, esses fatores transcricionais ativam a expressão de genes que codificam para bombas de efluxo e participam da via biossintética do ergosterol (MACPHERSON; LAROCHELLE; TURCOTTE, 2006). Recentemente, Kakade e colaboradores (KAKADE et al., 2016) identificaram um fator transcricional com denominado *ZCF32*, uma proteína com motivo “dedo de zinco” que modula negativamente a formação de biofilme por reprimir a expressão de adesinas e genes envolvidos com o processo de filamentação. Dois outros transcritos apresentaram homologia com reguladores transcricionais que desempenham papel fundamental no controle do metabolismo celular. O gene *CGB\_A2300C* (cromossoma A) codifica para uma proteína pertencente à família MAP (*Mitogen-activated kinases*) quinase/fosfatase que atua como segundo mensageiro mediando a comunicação entre os meios, externo e interno, e ativando fatores transcricionais relacionados com o ciclo e metabolismo celular (ARIÑO; CASAMAYOR; GONZÁLEZ, 2011; DICKMAN; YARDEN, 1999). O gene *CGB\_I1100W* (Cromossomo I) codifica uma serina-treonina quinase denominada *IKS1p*, associada com a fosforilação de enzimas relacionadas com o ciclo celular e transcrição (DICKMAN; YARDEN, 1999).

Cinco transcritos hiperexpressos no biofilme de *C. gattii* apresentaram homologia com genes cujos produtos estão associados ao metabolismo de

proteínas. O gene *CGB\_B5300W* (cromossomo B) codifica para uma *D-tirosil-tRNA(Tyr) deacilase*, uma enzima que impede a incorporação de D-aminoácidos em proteínas. Todas as células utilizam predominantemente L-aminoácidos. Diferentes D-aminoácidos são produzidos por bactérias e se acumulam durante a fase estacionária de crescimento. Estes D-aminoácidos diminuem o crescimento bacteriano, bem como desempenham um papel importante na remodelagem da parede celular nesta fase (LAM et al., 2009). Além disso, a incorporação de D-aminoácidos (D-leucina, D-metionina, D-tirosina, and D-triptofano) ao meio de cultivo inibe a formação de biofilme de *Bacillus subtilis* (KOLODKIN-GAL et al., 2010) e *S. aureus* (HOCHBAUM et al., 2011) e esse efeito inibitório é resultado da incorporação de D-aminoácidos durante a síntese proteica (LEIMAN et al., 2013). O gene *CGB\_C6460C*, (localizado no cromossomo C) codifica para uma aminometiltransferase, uma enzima que catalisa a oxidação reversível de glicina (MCNEIL et al., 1997). Dois genes codificam para proteínas com atividade de peptidase, *cysteine-like peptidase* e *Allergen*, pertencentes à família das cisteína-peptidases (RAWLINGS; BARRETT, 1993). O papel dessas proteínas em biofilmes microbianos ainda não foi descrito. Entretanto, o nicho natural de *C. gattii* compreende ambientes ricos em matéria orgânica em decomposição, inclusive locais ricos em excretas nitrogenadas de aves. Sendo assim, o aumento de expressão de peptidases durante a formação de biofilme pode indicar uma alternativa de sobrevivência diante de estresse ambiental, visto que estas enzimas podem ser “estocadas” na matriz polissacarídica extracelular, e podem ser utilizadas para a hidrólise do substrato (excretas nitrogenadas) para obtenção de carbono e nitrogênio (MAY et al., 2015; MAZZA, 2016). Finalmente, o gene *CGB\_I1440W* (cromossomo I) que codifica para o fator de iniciação da tradução 5a (*eIF-5a*). Esta

proteína é altamente conservada entre os diferentes táxons e promove a formação da primeira ligação peptídica, durante a síntese proteica.

Compatível com a intensa produção de matriz polimérica extracelular pelo biofilme, três transcritos com homologia a genes que codificam transportadores de moléculas também foram identificados neste estudo. Leveduras de modo geral têm a capacidade de utilizar diversas fontes de carbono para obtenção de energia. Em alguns casos, principalmente em situação de estresse, esses organismos podem utilizar fontes de carbono não usuais, como glicerol, aminoácidos e ácidos carboxílicos, por vias metabólicas alternativas. Neste trabalho, o gene *CGB\_J0030W* (cromossomo J) apresentou-se hiperexpresso e codifica uma proteína pertencente a superfamília de facilitadores (*High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily*), em particular, apresentando alta afinidade por glicose. Essa família de transportadores, presente desde bactérias até mamíferos facilita a passagem transmembrana de diferentes moléculas, incluindo os carboidratos. Exemplos desses transportadores incluem *GalP* em *Escherichia coli*, *Glut1* em animais e *HXT2*, primeiramente identificado em *S. cerevisiae* (KASAHARA; KASAHARA, 2003). O gene *CGB\_F0090C* (cromossomo F) codifica uma proteína transportadora de ácidos monocarboxílicos. Estudos em *S. cerevisiae* mostraram que essa levedura seria capaz de utilizar esse tipo de composto como fonte de biomassa e obtenção de energia (CASAL et al., 2008). O gene *CGB\_D0310C* (cromossomo D) apresenta homologia com transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), uma superfamília de proteínas com diversas funções celulares, entre elas o transporte de moléculas intermembranas (JUNGWIRTH; KUCHLER, 2006).

Cinco genes identificados estão relacionados com o metabolismo de lipídeos: *CGB\_A9490W* e *CGB\_F1110C* (localizados nos cromossomos A e F,

respectivamente) codificam para duas fosfatidilserina descarboxilase; *CGB\_I0350C* (Cromossomo I) codifica para uma *squalene* monooxigenase, uma enzima que participa da síntese de esteroides; e o gene *CGB\_D1240C* (cromossomo D) codifica para uma carnitina acetiltransferase. Estudos em *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram que fosfatidilserinas são enzimas chaves para a biossíntese de fosfolipídeos e aminolipídeos (lipopeptídeos). Lipopeptídeos atuam como biosurfactantes, modificando a hidrofobicidade celular, além de diminuir a tensão superficial entre as leveduras e as superfícies. Além disso, os biosurfactantes atuam como inibidores de microrganismos invasivos durante a formação de biofilme, evitando competição entre os membros da comunidade (MAZZA, 2016; TROTTER et al., 1995). Carnitina acetiltransferases compreendem um grupo de enzimas que participam do transporte de acetil-coenzima A (AcetilCoA), produto do metabolismo de lipídeos, do citoplasma para a mitocôndria (HYNES et al, 2011; STRIJBIS; DISTEL, 2010). Estudos em *C. albicans* mostraram que esse mecanismo de transporte promoveu o crescimento da levedura e favoreceu a formação do biofilme (STRIJBIS et al, 2008).

Três transcritos apresentaram homologia com genes cujas funções estão associadas ao reparo/proteção do DNA. Os genes *CGB\_A3450C* e *CGB\_A0280W* (localizados no cromossomo A) codificam para exonuclease e para proteína *Rad51*, respectivamente. Essas proteínas têm sido associadas à função de proteção de DNA dupla-fita durante a recombinação, tanto mitótica, quanto meiótica (FIORENTINI et al, 1997). A última fase do desenvolvimento de um biofilme é chamada maturação, caracterizada pela dispersão de novas células, capazes de colonizar outras superfícies (GUPTA et al., 2016; VILA; ROZENTAL, 2016). Šťovíček e colaboradores (ŠŤOVÍČEK et al., 2014), ao estudar mudanças nos padrões de

expressão em linhagens selvagens de *S. cerevisiae* durante *switching* fenotípico também observaram um aumento na expressão de genes relacionados com o reparo do DNA. Tanto o *switching* quanto o biofilme são características relacionadas à adaptação em situações de estresse, permitindo a sobrevivência do microrganismo. O gene *CGB\_M2010W* (cromossomo M) codifica para a proteína dUTP (desoxiuridina trifosfatada) difosfatase (dUTPase). Esta enzima catalisa reação de hidrólise de dUTP em dUMP e dois fósforos inorgânicos, prevenindo a incorporação da uracila ao DNA (GADSDEN et al., 1993). Em *S. cerevisiae* o gene que codifica essa enzima é essencial, sendo primordial para prevenir lesões de origem endógena no DNA (GUILLET; VAN DER KEMP; BOITEUX, 2006). Além disso, esta enzima parece atuar como segundo mensageiro, reprimindo o evento de apoptose nesta levedura em resposta ao estresse provocado por peróxido de oxigênio e cádmio de origens endógena ou exógena (WILLIAMS et al., 2011).

Três transcritos apresentando homologia com genes associados ao metabolismo oxidorreduzido foram identificados neste estudo. Dois genes codificam para oxidorreduzidas, *CGB\_B1380C* e *CGB\_I0500W* (cromossomo B e I, respectivamente). O gene *CGB\_B1380C* codifica para um membro da família *short chain dehydrogenases/reductases* (SDR) denominada proteína LSDR. Proteínas SDR são oxidorreduzidas NADPH-dependentes e desempenham um papel importante no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídeos (KAVANAGH et al., 2008). O gene *CGB\_H2020C* codifica para 2,4-diclorofenoxiacetato alfa-cetoglutarato dioxigenase, uma proteína pertencente à família das dioxigenases, enzimas que utilizam 2-oxoglutarato como substrato e ferro como cofator (MANTRI et al., 2012). Em microrganismos, a maioria dessas enzimas catalisa uma ampla variedade de reações oxidativas envolvidas em diferentes processos celulares. Em

bactérias, esta enzima faz parte da via de catabolismo de derivados do ácido 2,4 dicloro-fenoxi-acético, que compõem formulações de determinados herbicidas (SUWA et al., 1996).

Finalmente, o gene *CGB\_A9610C*, localizado no cromossomo A, codifica para a proteína LEA (*Late embryogenesis abundant*), encontrada em diversos táxons, onde a sua principal função está relacionada com a proteção contra a desidratação. Estudos realizados em *S. cerevisiae*, mostraram que esta proteína é encontrada no citoplasma celular, e está relacionada a proteção contra mudanças nas temperaturas de crescimento, atuando como protetoras da integridade de membrana em casos de choques térmicos (SALES et al., 2000).

Em conclusão, os resultados atestam para a capacidade de formação de biofilme por *C. gattii s.l.* em diferentes superfícies. Além disso, essa estrutura apresenta um mecanismo complexo de regulação e metabolismo, existindo dezenas de genes envolvidos na sua regulação. Devido à importância clínica de *C. gattii s.l.* e do biofilme, estes dados fornecem subsídios para uma melhor compreensão do fenótipo formado por essas espécies, além de identificação de possíveis alvos para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que *C. gattii s.l.*, assim como a maioria das espécies de microrganismos, é capaz de crescer sob a forma de biofilme em diferentes superfícies. O tempo de desenvolvimento do biofilme pelo complexo varia entre 72 e 96 horas. Sobre a arquitetura do biofilme, destacaram-se as seguintes características: uma monocamada de células aderidas, embebidas em matriz exopolissacarídica de 8 micrometros de espessura, com canais de água permeando-a.

Ainda, os resultados referentes aos mecanismos genéticos empregados no desenvolvimento do fenótipo, mostraram centenas de RNAs mensageiros diferencialmente expressos entre células planctônicas e sesséis, onde a maioria destes foi suprimida durante a formação do biofilme. Dentre os genes superexpressos, foram detectados genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos, no transporte celular, sinalizadores intracelulares e reparo do DNA. Entretanto, a maioria dos genes não apresentou função anotada nos bancos de dados, criando, assim um grande campo para estudos futuros.

Os resultados obtidos geraram subsídios para compreensão do processo de formação do biofilme de *C. gattii s.l.*, que poderão ser utilizados no desenvolvimento de estratégias para bloquear a sua formação. Além disso, poderão contribuir na identificação de alvos para o desenvolvimento de fármacos mais seguros e de baixo custo contra infecções por *Cryptococcus* spp.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 943–951, 2001.
- ADIL, M. et al. Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 286–292, dez. 2014.
- AJESH, K.; SREEJITH, K. *Cryptococcus laurentii* biofilms: structure, development and antifungal drug resistance. **Mycopathologia**, v. 174, n. 5–6, p. 409–19, dez. 2012.
- ALANIO, A. et al. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: Toward biological evidence of dormancy. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–13, 2015.
- ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. *Quorum sensing* in fungi--a review. **Medical mycology**, v. 50, n. 4, p. 337–45, 2012.
- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526–30, dez. 2008.
- ARIÑO, J.; CASAMAYOR, A.; GONZÁLEZ, A. Type 2C protein phosphatases in fungi. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 1, p. 21–33, jan. 2011.
- BAI, X.; MCMULLAN, G.; SCHERES, S. H. . How cryo-EM is revolutionizing structural biology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 1, p. 49–57, jan. 2015.
- BALCÁZAR, J. L.; SUBIRATS, J.; BORREGO, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1–9, 2015.
- BANERJEE, U.; GUPTA, K.; VENUGOPAL, P. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Journal of medical and veterinary mycology: bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 35, n. 2, p. 139–41, 1997.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 27, n. 11, p. 875–904, nov. 2010.
- BARTLETT, K. H. et al. A decade of experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 311–319, 30 jun. 2012.

BASSLER, B. L. *Quorum Sensing* and its control. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 7, 2016.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.

BIZERRA, F. C. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 3, p. 442–450, 2008.

BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 147, p. 891–907, abr. 2001.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398–403, ago. 2013.

BOVERS, M. et al. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 45, n. 4, p. 400–21, abr. 2008.

BURMØLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 59, n. 3, p. 324–36, ago. 2010.

BUSTIN, S. A. et al. REVIEW Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 597–601, 2005.

BYRNES III, E. J. et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island Outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 7, p. 1081–1086, abr. 2009.

CAO, Y.-Y. et al. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 584–9, fev. 2005.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.

CASAL, M. et al. Transport of carboxylic acids in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 6, p. 974–994, 2008.

CASALI, A. K. et al. *Cryptococcus neoformans*. Apectos moleculares e epidermiológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 20, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *C. neoformans* Infection Statistics. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385–94, set. 2001.

CHARACKLIS, W. G. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. **Water Research**, v. 7, n. 9, p. 1249–1258, 1973.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 564–571, nov. 2011.

CHEN, S. C.-A. et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 6, p. 789–98, set. 2012.

CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

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. 4284–94, out. 2009.

CHOWDHARY, A. et al. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Critical reviews in microbiology**, v. 38, n. 1, p. 1–16, fev. 2012.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of clinical microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996–1006, dez. 1985.

COENYE, T.; NELIS, H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, 2010.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–23, 2013.

COGLIATI, M. et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 4, jun. 2016.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86–95, jan. 1978.

DAS, T.; SEHAR, S.; MANEFIELD, M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 6, p. 778–786, dez. 2013.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular

genetics. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 4, p. 847–67, dez. 2000.

DE VROEY, C.; GATTI, F. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Vanbreuseghem and Takashio, 1970. **Mycoses**, v. 32, n. 12, p. 675, dez. 1989.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten Challenges on *Cryptococcus* and *Cryptococcosis*. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 303–310, 24 jun. 2012.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 10, 2014.

DICKMAN, M. B.; YARDEN, O. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 26, n. 2, p. 99–117, mar. 1999.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–90, set. 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–93, abr. 2002.

DUBOCHET, J. et al. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 21, n. 2, p. 129–228, maio 1988.

EVEN-TOV, E. et al. Social evolution selects for redundancy in bacterial *quorum sensing*. **PLoS Biology**, v. 14, n. 2, p. 1–18, 2016.

FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimica et biophysica acta**, v. 883, n. 2, p. 173–7, 4 set. 1986.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology**, v. 1258, n. 147, p. 33–2355, 2001.

FERNANDES, O. DE F. L. et al. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS (*Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 75–78, 2000.

FIGUEROA, M. et al. Polyhydroxyanthraquinones as *quorum sensing* inhibitors from the guttates of *Penicillium restrictum* and their analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of natural products**, v. 77, n. 6, p. 1351–8, 27 jun. 2014.

FINDLEY, K. et al. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukariotic Cell**, v. 8, n. 3, p. 353–361, 2009.

FIORENTINI, P. et al. Exonuclease I of *Saccharomyces cerevisiae* functions in mitotic recombination *in vivo* and *in vitro*. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 5, p. 2764–73, 1997.

FLEMMING, H.-C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells”. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945–7947, 2007.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623–633, 2 ago. 2010.

FOX, E. P. et al. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. **Molecular microbiology**, v. 96, n. 6, p. 1226–39, jun. 2015.

FOX, E. P.; NOBILE, C. J. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. **Transcription**, v. 3, n. 6, p. 315–22, 2012.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of microbiological methods**, v. 50, n. 1, p. 63–73, jun. 2002.

GADSDEN, M. H. et al. dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 12, n. 11, p. 4425–31, 1993.

GARCÍA-SÁNCHEZ, S. et al. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. **Eukaryotic cell**, v. 3, n. 2, p. 536–45, abr. 2004.

GATTI, F; EECKELS, R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894 Part I. Description of the disease and of the strain. **Annales de la Société Belges de Médecine Tropicale de Parasitologie, et de Mycologie**, v. 50, n. 6, p. 689–693, 1970.

GOLDMAN, J. D.; VOLLMER, M. E.; LUKS, A. M. Cryptococcosis in the immunocompetent Patient. **Resiratory Care**, v. 55, n. 11, p. 1499–1503, 2010.

GRAVELAT, F. N. et al. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal  $\beta$ -glucan from the immune system. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, 2013.

GUILBAULT, G. G.; KRAMER, D. N. Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha-, and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 409–412, fev. 1964.

GUILHEN, C. et al. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 237, 2016.

GUILLET, M.; VAN DER KEMP, P. A.; BOITEUX, S. dUTPase activity is critical to

maintain genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 7, p. 2056–2066, 2006.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, p. 310–321, 2016.

GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 1377–91, nov. 2013.

GUPTA, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. **Archives of microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1–15, 16 jan. 2016.

HAGEN, F. et al. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5139–45, dez. 2010.

HAGEN, F. et al. Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1918–26, jun. 2012.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, 2015.

HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. S. M. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 877–884, 2000.

HARRIS, J. R. et al. *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the US Pacific Northwest. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1620–1626, 2013.

HEUKELEKIAN, H.; HELLER, A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. **Journal of bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 547–558, 1940.

HILL, C. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* species break out of the opportunistic box. **Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering**, v. 73, n. 4, p. 389–400, 2015.

HOCHBAUM, A. I. et al. Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 20, p. 5616–5622, 2011.

HOLBAN, A. M.; GESTAL, M. C.; GRUMEZESCU, A. M. Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 2, p. 409–418, ago. 2016.

HONRAET, K.; GOETGHEBEUR, E.; NELIS, H. J. Comparison of three assays for

the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. **Journal of microbiological methods**, v. 63, n. 3, p. 287–95, dez. 2005.

HONSHO, C. S. et al. Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 155–159, abr. 2003.

HORNBY, J. M. et al. *Quorum sensing* in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982–92, jul. 2001.

HOUPT, PIETER M; DRAAIJER, A. **Confocal Laser Scanning Microscope**, 1989.

HYNES, M. J. et al. Role of carnitine acetyltransferases in acetyl coenzyme A metabolism in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 4, p. 547–55, abr. 2011.

IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753–764, 30 out. 2005.

IRAOLA, G. et al. Transcriptome sequencing reveals wide expression reprogramming of basal and unknown genes in *Leptospira biflexa* biofilms. **mSphere**, v. 1, n. 2, p. 1–16, 2016.

JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 10, n. 1, p. 145–167, ago. 2008.

JOHANNSSON, B.; CALLAGHAN, J. J. Prosthetic hip infection due to *Cryptococcus neoformans*: case report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 1, p. 76–79, maio 2009.

JONES HC., ROTH IL., S. W. Electron microscopic of a slime layer., 1969, 99, 316-25. **J. Bacteriol.**, v. 99, n. 1, p. 316–25, 1969.

JUNGWIRTH, H.; KUCHLER, K. Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. **FEBS letters**, v. 580, n. 4, p. 1131–8, 13 fev. 2006.

KAKADE, P. et al. ZCF32, a fungus specific Zn(II)<sub>2</sub> Cys<sub>6</sub> transcription factor, is a repressor of the biofilm development in the human pathogen *Candida albicans*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 8 ago. 2016.

KASAHARA, T.; KASAHARA, M. Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* Hxt2 transporter. **The Biochemical journal**, v. 372, p. 247–52, 15 maio 2003.

KAVANAGH, K. L. et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 24, p. 3895–906, dez. 2008.

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**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 7 dez. 2004.

KOLODKIN-GAL, I. et al. D-Amino acids trigger biofilm disassembly. **Science**, v. 328, n. 5978, p. 627–629, 30 abr. 2010.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* ( Basidiomycota , Tremellomycet- idae ). **Taxon**, v. 51, n. 4, p. 804–806, 2002.

KWON-CHUNG, K.; SAIJO, T. Is *Cryptococcus gattii* a primary pathogen? **Journal of Fungi**, v. 1, n. 2, p. 154–167, 2015.

LAM, H. et al. D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5947, p. 1552–5, 18 set. 2009.

LAWRENCE, J. et al. Scanning transmission X-ray , laser scanning , and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5543–5554, 2003.

LAZAR, V. *Quorum sensing in biofilms--how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?* **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 280–5, dez. 2011.

LEAL, A. L. et al. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, n. 2, p. 71–5, ago. 2008.

LECUIT, M. et al. A role for  $\alpha$ - and  $\beta$ -catenins in bacterial uptake. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10008–10013, 2000.

LEE, M. J. et al. The fungal exopolysaccharide galactosaminogalactan mediates virulence by enhancing resistance to neutrophil extracellular traps. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1–22, 2015.

LEHRACH, H. et al. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. **Biochemistry**, v. 16, n. 21, p. 4743–51, 18 out. 1977.

LEIMAN, S. A. et al. D-amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 23, p. 5391–5, dez. 2013.

LITVINTSEVA, A. P. et al. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 8, p. 1109–1117, 2007.

LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G. Population genetic analyses reveal the African origin and strain variation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 2, p. 1–4, fev. 2012.

LIZARAZO, J. et al. Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997-2011. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 11, p. e3272, 2014a.

LIZARAZO, J. et al. Cryptococcosis in Colombian children and literature review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 797–804, set. 2014b.

LODDER, J.; KREGER-VAN RIJ, N. J. W. The yeasts: a taxonomic study. **Science**, v. 117, n. 3035, p. 237–237, 27 fev. 1953.

LOUSSERT, C. et al. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 405–410, 2010.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in applied microbiology**, v. 67, p. 131–90, 2009.

MACK, D. et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 175–83, jan. 1996.

MACPHERSON, S.; LAROCHELLE, M.; TURCOTTE, B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 70, n. 3, p. 583–604, 2006.

MALIK, R. et al. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 35, n. 1, p. 27–31, 1997.

MANTRI, M. et al. Autocatalysed oxidative modifications to 2-oxoglutarate dependent oxygenases. **The FEBS journal**, v. 279, n. 9, p. 1563–75, maio 2012.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6350–6362, 2005.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–33, mar. 2006a.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infection and immunity**, v. 74, n. 11, p. 6118–23, nov. 2006b.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–11, jun. 2015.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 266–275, 24 dez. 2010.

MAXSON, M. E. et al. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 44, n. 3, p. 180–6, mar. 2007.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 106–117, 2015.

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

MAZZA, M. G. The physics of biofilms—an introduction. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 49, n. 20, p. 203001, 25 maio 2016.

MCCULLOH, R. J. et al. *Cryptococcus gattii* genotype VGI infection in New England. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 30, n. 12, p. 1111–1114, dez. 2011.

MCNEIL, J. B. et al. Cloning, and molecular characterization of the GCV1 gene encoding the glycine cleavage T-protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 186, n. 1, p. 13–20, 20 fev. 1997.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 2, p. 189–95, fev. 2003.

MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical mycology**, v. 47, n. 6, p. 561–70, 2009.

MEYER, W. et al. Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. In: HEITMAN, J. et al. (Eds.). . **Cryptococcus**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2011. p. 327–357.

MITCHELL, K. F. et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 13, p. 4092–7, 2015.

MONTANARO, L. et al. Extracellular DNA in biofilms. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 824–831, 2011.

MORENO-GARCÍA, J. et al. Stress responsive proteins of a flor yeast strain during the early stages of biofilm formation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 578–588, maio 2016.

MOWAT, E. et al. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of**

**Medical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 1205–1212, 2007.

MURILLO, L. A. et al. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 9, p. 1562–73, set. 2005.

NASCIMENTO, E. et al. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus gattii* molecular type VGI in Brazil: a case report and review of literature. **Mycoses**, v. 57, n. 7, p. 442–447, jul. 2014.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e5862, 2009.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **mBio**, v. 3, n. 3, p. e00103-12-e00103-12, 8 maio 2012.

NOBILE, C. J. et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell**, v. 148, n. 1–2, p. 126–38, 20 jan. 2012.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 71–92, 2015.

O'MEARA, T. R.; ANDREW, A. J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012.

O'TOOLE, G. A.; WONG, G. C. L. Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 30, p. 139–46, abr. 2016.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, 2010.

OTTO, M. Physical stress and bacterial colonization. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 6, p. 1250–70, nov. 2014.

PADDOCK, S. W. Confocal laser scanning microscopy. **BioTechniques**, v. 27, n. 5, p. 992–6, 998–1002, 1004, nov. 1999.

PALKOVÁ, Z.; VÁCHOVÁ, L. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 57, p. 110–9, set. 2016.

PANTANELLA, F. et al. Quantitative evaluation of bacteria adherent and in biofilm on single-wall carbon nanotube-coated surfaces. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

PANTANELLA, F. et al. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Annali di igiene : medicina preventiva e di comunità**, v. 25, n. 1, p. 31–42, 2013.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of microbiological methods**, v. 72, n. 2, p. 157–65, fev. 2008.

PILMIS, B. et al. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 8, p. 681–7, ago. 2016.

POLACHEK, I. The discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence. **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, v. 276, n. 1, p. 120–3, dez. 1991.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–21, maio 2009.

PRIETO, B.; SILVA, B.; LANTES, O. Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods. **The Science of the total environment**, v. 333, n. 2004, p. 1–7, 15 out. 2004.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medical Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 493–512, 2015.

RAJENDRAN, R. et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 87–93, jan. 2016.

RAMAGE, G. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5459–63, nov. 2002.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International journal of microbiology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida biofilms* on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 7, p. 979–86, nov. 2006.

RAMAGE, G.; ROBERTSON, S. N.; WILLIAMS, C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 2, p. 114–20, fev. 2014.

RAVI, S. et al. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. **Mycopathologia**, v. 167, n. 6, p. 307–314, 2009.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical journal**, v. 290, p. 205–18, 15 fev. 1993.

RENDUELES, O.; GHIGO, J.-M. Mechanisms of competition in biofilm communities. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 0–0, jun. 2015.

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 293–298, out. 2004.

RIVARDO, F. et al. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 541–553, 3 jun. 2009.

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, 2008.

ROEHM, N. W. et al. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of immunological methods**, v. 142, n. 2, p. 257–65, 13 set. 1991.

SAIJO, T. et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **mBio**, v. 5, n. 2, p. 0–0, 2014.

SALES, K. et al. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1463, n. 2, p. 267–78, 15 fev. 2000.

SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 22–29, 2014.

SENA-VÉLEZ, M. et al. Presence of extracellular DNA during biofilm formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Strains with different host range. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. e0156695, 2016.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3 - Criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, p. 1136–1144, 2009.

SHAH, N. B.; SHOHAM, S.; NAYAK, S. *Cryptococcus neoformans* prosthetic joint infection: case report and review of the literature. **Mycopathologia**, v. 179, n. 3–4, p. 275–8, abr. 2015.

SHAPIRO, L.; WEIS, W. I. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 3, p. 1–21, 2009.

SHEPPARD, D. C.; HOWELL, P. L. Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: lessons from Bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 24, p. 12529–12537, 10 jun. 2016.

SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241–7, maio 2011.

SLOAN, D.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, p. 169, maio 2014.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical mycology**, v. 39, n. 2, p. 155–68, abr. 2001.

SPIES, F. S. et al. Cryptococcosis in patients living with hepatitis C and B viruses. **Mycopathologia**, v. 179, n. 3–4, p. 307–12, abr. 2015.

SPINA-TENSINI, T. et al. Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. **Mycoses**, 26 ago. 2016.

SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, 2014.

SRIRAM, M. I. et al. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 174–181, jul. 2011.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15245–50, 2001.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199–210, mar. 2008.

ŠTOVIČEK, V. et al. Global changes in gene expression associated with phenotypic switching of wild yeast. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 136, 2014.

STRIJBIS, K. et al. Carnitine-dependent transport of acetyl coenzyme A in *Candida albicans* is essential for growth on nonfermentable carbon sources and contributes to biofilm formation. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 4, p. 610–618, 2008.

STRIJBIS, K.; DISTEL, B. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 12, p. 1809–1815, 2010.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3–9, 2001.

- SUWA, Y. et al. Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/alpha-ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2464–9, jul. 1996.
- TAKÁTS, Z. et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5695, p. 471–3, 15 out. 2004.
- TAVARES, E. R. et al. Accurate and sensitive real-time PCR assays using intergenic spacer 1 region to differentiate *Cryptococcus gattii* sensu lato and *Cryptococcus neoformans* sensu lato. **Medical mycology**, v. 54, n. 1, p. 89–96, 21 jan. 2016.
- TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Current opinion in microbiology**, v. 34, p. 67–74, 11 ago. 2016.
- TOLKER-NIELSEN, T.; MOLIN, S. Spatial organization of microbial biofilm communities. **Microb Ecol**, v. 40, n. 2, p. 75–84, 2000.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- TOTÉ, K. et al. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 2, p. 249–54, fev. 2008.
- TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 7–12, 2015.
- TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–62, ago. 2008.
- TROTTER, P. J. et al. Phosphatidylserine decarboxylase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning and mapping of the gene, heterologous expression, and creation of the null allele. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 11, p. 6071–80, 17 mar. 1995.
- TSANG, P. W.-K.; BANDARA, H. M. H. N.; FONG, W.-P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. 0-0, 2012.
- TUON, F. F. et al. Central venous catheter-related bloodstream infection and *Cryptococcus neoformans*. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 317–8, ago. 2009.
- UEJIO, C. K. et al. Climatic influences on *Cryptococcus gattii* populations, Vancouver Island, Canada, 2002–2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 11, p. 1989–1996, nov. 2015.

- VANBREUSEGHEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. **Annales de la Société Belges de Médecine Tropicale de Parasitologie, et de Mycologie**, v. 50, n. 6, p. 695–702, 1970.
- VERTES, A.; HITCHINS, V.; PHILLIPS, K. S. Analytical challenges of microbial biofilms on medical devices. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 3858–3866, 1 maio 2012.
- VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm formation as a pathogenicity factor of medically important fungi. In: **Fungal Pathogenicity**. [s.l.] InTech, 2016. p. 1–24.
- VILAIN, S. et al. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2861–2868, 2009.
- WALSH, T. J. et al. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 373–5, mar. 1986.
- WATROUS, J. D.; DORRESTEIN, P. C. Imaging mass spectrometry in microbiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 683–694, 8 ago. 2011.
- WILLIAMS, C.; RAMAGE, G. Fungal biofilms in human disease. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 831, p. 11–27, 2015.
- WILLIAMS, D. et al. Evidence for a second messenger function of dUTP during Bax mediated apoptosis of yeast and mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 2, p. 315–321, 2011.
- WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 75–85, jul. 2005.
- XIE, Z. et al. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 93, 2011.
- YANG, Y. et al. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. **Journal of endodontics**, v. 42, n. 8, p. 1246–50, ago. 2016.
- YEATER, K. M. et al. Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. **Microbiology (Reading, England)**, v. 153, n. Pt 8, p. 2373–85, ago. 2007.
- ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 68, p. 133–216, 2009.
- ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, 2010.

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: Cells with a giant impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 409–413, ago. 2013.

ZARNOWSKI, R. et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **mBio**, v. 5, n. 4, 2014.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 39–56, 1943.