

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

CAROLINE MAGALHÃES JUNQUEIRA

**Da micologia clássica à nanotecnologia: aumento da eficiência para detecção de micoses sistêmicas e aplicação de um novo teste rápido e de baixo custo para diagnóstico de criptococose**

**Belo Horizonte**

**2020**

CAROLINE MAGALHÃES JUNQUEIRA

**Da micologia clássica à nanotecnologia: aumento da eficiência para detecção de micoses sistêmicas e aplicação de um novo teste rápido e de baixo custo para diagnóstico de criptococose**

**Versão Final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Ary Corrêa Júnior

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Livia Síman Gomes

**Belo Horizonte**

**2020**

043 Junqueira, Caroline Magalhães.

Da micologia clássica à nanotecnologia: aumento da eficiência para detecção de micoses sistêmicas e aplicação de um novo teste rápido e de baixo custo para diagnóstico de criptococose [manuscrito] / Caroline Magalhães Junqueira. - 2020.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos. Co-orientador: Prof. Dr. Ary Corrêa Júnior; Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Livia Síman Gomes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Criptococose. 3. Nanotecnologia. 4. Óptica e Fotônica. I. Santos, Daniel de Assis. II. Corrêa Júnior, Ary. III. Gomes, Livia Síman. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Caroline Magalhães Junqueira  
Nº REGISTRO: 2018 684 480

Às 9 horas do dia 6 de Março de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Dr(a). Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Ana Maria de Paula e o Prof. Daniel de Assis Santos - Orientador(a), para julgar o trabalho final "Da micologia clássica à nanotecnologia: aumento da eficiência para detecção de micoses sistêmicas e aplicação de um novo teste rápido e de baixo custo para diagnóstico de criptococose", da aluna Caroline Magalhães Junqueira requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A)**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dr(a). Nalu Teixeira de Aguiar Peres Nalu Teixeira

Dr(a). Ana Maria de Paula Ana Maria de Paula

Prof(a). Daniel de Assis Santos - Orientador

PROF. LUIA SIMAN Luia Siman

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador do PPGM/UFMG

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus por ter possibilitado força e dedicação frente a inúmeras barreiras e dificuldades que enfrentei ao longo desses quase dois anos,

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel de Assis Santos e meus co-orientadores Prof. Dr. Ary Corrêa Junior e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lívia Síman Gomes pela oportunidade e confiança depositada ao longo do tempo,

E a mim mesma, pela força e perseverança.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Luiz e Hebe e à minha irmã, Thayná, por todo apoio, paciência e boa vontade em me incentivar a realizar esse sonho.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro do projeto.

Aos professores e alunos do Laboratório de Micologia e aos professores do Laboratório de Física e Sistemas Biológicos, por todo apoio e atenção durante a realização dos experimentos.

Aos colegas do Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno (CTNano), por todo apoio e esclarecimentos para utilização dos equipamentos.

E especialmente à equipe da NEOTEK, Prof. Ary Corrêa; Prof. Livia Síman; Prof. Luiz Orlando e Prof. Oscar Mesquita pelas oportunidades e apoio ao longo dessa jornada.

Muito obrigada!

*“O grande inimigo do conhecimento não é a ignorância, é a ilusão de ter conhecimento.”*

Stephen Hawking.

## RESUMO

A criptococose é uma doença causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, principalmente pelas espécies *neoformans* e *gattii*. No Brasil, essa doença apresenta o maior número de casos de toda América Latina, sendo a infecção fúngica que mais acomete o sistema nervoso central. Em relação ao diagnóstico, os métodos imunológicos como por exemplo, o método ELISA, é bastante laborioso, exige fino treinamento de pessoal e disponibilidade de equipamentos onerosos para a obtenção de resultados. O teste imunocromatográfico possui execução mais rápida e simples, porém pode gerar resultados falso-positivos devido à ocorrência de reação cruzada com outros microrganismos. Considerando as lacunas importantes no diagnóstico da criptococose causadas pelas falhas inerentes a cada método, é de grande importância o desenvolvimento e aplicação de testes rápidos, sensíveis, específicos, de fácil manuseio e acessíveis em ambientes distantes de grandes centros. Assim, esse trabalho visa a combinação de fotônica e nanotecnologia para um novo método de diagnóstico através da geração de nanosensores (NSs) capazes de se ligar a antígenos criptocócicos e de medidas óticas que possibilitem a detecção e caracterização dessas ligações. Para tal finalidade, nanobastões de ouro (NBs) foram sintetizados e funcionalizados com o anticorpo monoclonal 18B7, uma molécula capaz de reconhecer fragmentos da cápsula polissacarídea criptocócica, especificamente fragmentos de glucoroxilomanana (GXM). Os nanobastões funcionalizados (nanosensores) foram testados utilizando soros de camundongos infectados e de camundongos sadios através de medidas realizadas por um espectrômetro portátil de espalhamento de luz (EPEL). O instrumento ótico utiliza medidas de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*) e é capaz de detectar, em minutos, a presença de fragmentos da cápsula criptocócica, além de estimar a massa molecular dos mesmos e medir a constante de afinidade química com os anticorpos. Sendo assim, nesse trabalho demonstra-se a prova de conceito de uma tecnologia do tipo *point of care* de alta acurácia para o diagnóstico de criptococose.

**Palavras - chave:** *Cryptococcus*. Diagnóstico de criptococose. Nanotecnologia. Fotônica.



## ABSTRACT

Cryptococcosis is a disease caused by yeasts of the *Cryptococcus* genus, mainly by *neoformans* and *gattii* species. In Brazil, this disease has the largest number of cases in all of Latin America, being the fungal infection that most affects the central nervous system. In relation to diagnosis, immunological methods have low sensitivity, for example, the ELISA detection method is quite laborious, requires fine training of personnel and availability of expensive equipment to obtain results. The immunochromatographic test is faster and simpler to perform, but fails to generate false-positive results due to the occurrence of cross-reaction with other microorganisms. Considering the important gaps in the diagnosis of cryptococcosis caused by the flaws inherent to each method, it is of great importance to develop and apply rapid, sensitive, specific tests, which are easy to handle and accessible in environments far from large centers. Thus, this work aims to use photonics and nanotechnology for a new diagnostic method through generation of nanosensor capable of binding to cryptococcal antigens and photonics measures that enable the detection and characterization of these bindings. For this purpose, gold nanorods (GNRs) have been synthesized and functionalized with monoclonal antibody 18B7, capable of recognizing fragments of the cryptococcal polysaccharide capsule, specifically fragments of glucoroxylomannan (GXM). The nanorods functionalized (nanosensors) were tested using serum from infected mice and healthy mice by a portable light-scattering spectrometer (EPEL). The optical instrument uses measurements of dynamic light scattering and is able to detect, in a few minutes, presence of fragments cryptococcal polysaccharide capsule. Thus, in this work proof of concept is demonstrated of a *point of care* technology for diagnostics of cryptococcosis.

**Keywords:** *Cryptococcus*. Cryptococcosis diagnosis. Nanotechnology. Photonics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Cryptococcus</i> ..	22
Figura 2. Lavado broncoalveolar de camundongos infectados com <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	27
Figura 3. Ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i> .....	29
Figura 4. Mecanismos de invasão do SNC utilizados por <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	31
Figura 5. Leitura e interpretação do teste rápido para detecção do antígeno CrAg LFA .....	35
Figura 6. Interpretação do teste de aglutinação em látex. ....	36
Figura 7. Coloração Tinta Nanquim. ....	38
Figura 8. Radiografia de tórax de paciente com suspeita de criptococose .....	41
Figura 9. Escala nanométrica.....	42
Figura 10. Cálice de Licurgo.. .....	43
Figura 11. Diferentes formatos de nanopartículas metálicas.....	44
Figura 12. Esquemática dos tipos de LSPR em nanobastões e nanoesferas metálicas.....	46
Figura 13. Síntese de nanobastão de ouro mediada por semente.. .....	52
Figura 14. Microscopia eletrônica dos nanobastões de ouro produzidos pelo método sem semente. ....	53
Figura 15. Representação esquemática da cadeia química do ácido – 11 – mercaptoundecanóico (MUA). ....	54
Figura 16. Esquema da modificação química mediada por EDAC/NHS.....	55
Figura 17. Esquema do aparato experimental utilizado em medidas de espalhamento de luz. ....	56
Figura 18. Análise de flutuações de intensidade de luz espalhada pelas nanopartículas.. .....	57
Figura 19. Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz (EPEL). ....	58

Figura 20. Esquema da técnica de UV- VIS.....	62
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxonomia clássica para espécies patogênicas do gênero <i>Cryptococcus</i> .....	20
Tabela 2. Comparação <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	21
Tabela 3. Óbitos e taxa de mortalidade de meningite criptocócicas e de outras meningites, no Brasil, entre o ano de 2000 a 2012. ....	33
Tabela 4. Comparação entre os principais métodos de coloração histopatológica e suas limitações para identificação de <i>Cryptococcus</i> spp.....	40
Tabela 5. Grupos experimentais. Os camundongos utilizados foram separados em 2 grupos, cada um infectado com uma linhagem distinta, o grupo 2 foi denominado controle, uma vez que se utilizou camundongos saudáveis, não infectados por linhagens de <i>C. neoformans</i> . ....	51
Tabela 6. Características físico - químicas dos Nbs sintetizados. ....	65

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Função de autocorrelação temporal de intensidades ao longo do tempo. ....	59
Gráfico 2. Funções de autocorrelação temporal do nanobastão. ....	61
Gráfico 3. Espectroscopia de UV - VIS dos nanobastões de ouro sintetizados. ....	64
Gráfico 4. Sínteses de NBs com baixa eficiência. ....	66
Gráfico 5. Sínteses de NBs com baixa eficiência, após alguns ajustes. ....	67
Gráfico 6. Análise por espectroscopia de UV- VIS ....	68
Gráfico 7. Análise por espectroscopia de UV- VIS dos NBs funcionalizados na concentração 1:1. ....	70
Gráfico 8. Análise por UV – VIS dos nanosensores na concentração 0,2:1. ....	71
Gráfico 9. Estudo de concentrações de BSA para impedir ligações não específicas em soros negativos para FeLV. ....	72
Gráfico 10. Estudo de concentrações de BSA para impedir ligações não específicas em soros positivos para FeLV. ....	73
Gráfico 11. Avaliação eficiência 3000 BSA por nanosensor, titulado em soro negativo. ....	75
Gráfico 12. Avaliação eficiência 3000 BSA por nanosensor, titulado em soro positivo. ....	76
Gráfico 13. Titulação do soro positivo e controle a partir da funcionalização dos NBs na concentração 1:1. ....	77
Gráfico 14. Titulação do soro negativo e controle a partir da funcionalização dos NBs na concentração 0,2:1. ....	78
Gráfico 15. Titulação do soro positivo e controle a partir da funcionalização dos Nbs na concentração 0,2: 1. ....	79
Gráfico 16. Comparação antes e após o aquecimento do soro H2 positivo. ....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A.C.:** Antes de Cristo

**AIDS:** Síndrome da imunodeficiência humana

**ASD:** Ágar Sabouraud Dextrose

**AuNPs:** Nanopartículas de ouro

**BHE:** Barreira hematoencefálica

**BSA:** Albumina sérica bovina

**CDC:** Centro de Controle e Prevenção de Doenças

**Con - A:** Concavalina A

**CTAB:** Brometo de cetiltrimetilamônio

**CTIT:** Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica

**CrAg:** Antígenos capsulares criptocócicos

**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais

**D.C.:** Depois de Cristo

**DLS:** Espalhamento dinâmico de luz

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**DNase:** Desoxirribonuclease

**ELISA:** Enzyme Linked Immunonorbent Assay

**EUA:** Estados Unidos da América

**EDAC:** 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida

**EPEL:** Espectrômetro portátil de espalhamento de luz

**FM:** Fontana Masson

**G:** Força centrífuga relativa (RCF)

**GalXM:** Galactoxilomanana

**GDP- manose:** Difosfato de guanosina manose

**GMS:** Grocott prata

**GNR:** Gold Nanorods

**GXM:** Glucoronoxilomanana

**HE:** Hematoxilina eosina

**HIV:** Vírus da imunodeficiência humana

**IBM:** International Business Machines

**IgM:** Imunoglobulina M

**IL:** Interleucina

**LAT:** Teste de aglutinação em látex

**LCR:** Líquido Cefalorraquidiano

**LPB:** Ressonância plasmônica longitudinal

**LSPR:** Ressonância plasmônica de superfície localizado

**MAT:** *mating type*

**MAP QUINASE:** Proteína-quinases ativadas por mitógenos

**MES:** 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

**MM:** Mayer mucicarmim

**MPs:** Manoproteínas

**MUA:** Ácido-11- mercaptoundecanóico

**Nb:** Nanabastão de ouro

**NHS:** N-hidroxisuccinimida

**NPM:** Nanopartículas Metálicas

**ONGs:** Organizações Não Governamentais

**PBS:** Tampão fosfato- salino

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**RPM:** Rotações por minuto

**SERS:** Surface-enhanced Raman spectroscopy

**SOD:** Superóxido Dismutase

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**STM:** Microscópio eletrônico de tunelamento

**SUS:** Sistema Único de Saúde

**TNF:** Fator de necrose tumoral

**TPB:** Ressonância plasmônica transversal

**UDP:** Glicuronil transferase

**UV-VIS:** Espectroscopia UV/visível

**WHO:** World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<i>1.1 Leveduras criptocócicas – primeiros relatos e taxonomia.....</i>	<i>19</i>
<i>1.2 Características das espécies de Cryptococcus.....</i>	<i>21</i>
<i>1.3 Fatores relacionados à virulência.....</i>	<i>23</i>
1.3.1 Cápsula polissacarídica .....	23
1.3.2 Termotolerância.....	24
1.3.3 Melanização.....	25
1.3.4 Produção de enzimas .....	26
1.3.5 Alterações fenotípicas .....	26
<i>1.4 Criptococose.....</i>	<i>28</i>
1.4.1 Patogênese .....	28
1.4.2 Criptococose pulmonar.....	29
1.4.3 Meningoencefalite criptocócica.....	30
1.4.4 Epidemiologia.....	31
<i>1.5 Diagnóstico de Cryptococcus spp .....</i>	<i>34</i>
1.5.1 Diagnóstico laboratorial .....	35
1.5.2 Diagnóstico radiológico: comprometimento pulmonar.....	40
1.5.3 Diagnóstico molecular.....	41
<i>1.6 Nanotecnologia - conceito.....</i>	<i>42</i>
1.6.1 Histórico .....	42
<i>1.7 Nanopartículas metálicas.....</i>	<i>44</i>
1.7.1 Nanopartículas de ouro.....	45
1.7.2 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) e outras propriedades ópticas .....	45
<i>1.8 Aplicações em nanobiotecnologia.....</i>	<i>46</i>
1.8.1 Biosensoriamento .....	47

<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>48</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
3.1	<i>Objetivo geral.....</i>	49
3.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	49
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>50</b>
4.1	<i>Repike de linhagens de Cryptococcus.....</i>	50
4.2	<i>Obtenção de amostras clínicas.....</i>	50
4.2.2	<i>Obtenção de soros.....</i>	51
4.3	<i>Nanobastões de ouro.....</i>	51
4.3.1	<i>Síntese.....</i>	51
4.3.2	<i>Funcionalização.....</i>	53
4.4	<i>MEDIDAS ÓTICAS.....</i>	56
4.4.1	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz.....</i>	56
4.4.2	<i>Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz.....</i>	57
4.4.3	<i>Espectroscopia UV-Visível.....</i>	61
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
5.1	<i>Síntese dos nanobastões de ouro.....</i>	63
5.1.1	<i>Caracterização dos nanobastões de ouro.....</i>	63
5.1.2	<i>Problemas com resveratrol.....</i>	65
5.2	<i>Conjugação de Ácido – 11 – mercaptoundecanóico.....</i>	67
5.2.1	<i>Caracterização de Ácido – 11 – mercaptoundecanóico.....</i>	67
5.3	<i>Funcionalização dos nanobastões de ouro.....</i>	68
5.3.1	<i>Caracterização nanobastões de ouro funcionalizados na concentração 1:1.....</i>	69
5.3.2	<i>Caracterização nanobastões de ouro funcionalizados na concentração 0,2:1.....</i>	70
5.4	<i>Blocker (BSA).....</i>	71
5.5	<i>Titulação do soro H2 positivo aos nanosensores na concentração 1:1.....</i>	76

<i>5.6 Titulação dos soros H2 positivo e N1 negativo aos nanosensores na concentração 0,2:1</i> .....	77
<i>5.7 Avaliação da especificidade do nanosensor.....</i>	80
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Leveduras criptocócicas – primeiros relatos e taxonomia

O primeiro relato de criptococose data o ano de 1894, por Otto Busse e Abraham Buschke. Esses pesquisadores observaram corpúsculos ovais a partir de uma lesão decorrente de sarcoma da tíbia de uma paciente de 31 anos. Busse confirmou a patogenicidade desse microrganismo a partir da reinoculação na pele de outro paciente. Em seguida, Buschke cultivou o patógeno presente na erupção cutânea e concluiu que se tratava de um coccídeo (Heitman *et al.*, 2011). Praticamente no mesmo período, na Itália, o pesquisador San Felice, isolou a partir de um suco de pêssigo, o fungo causador de uma infecção, sendo inicialmente denominada como *Saccharomyces neoformans* (Lacaz, 2002).

Alguns anos mais tarde, em 1901, Vuilleman, reclassificou esses isolados após determinar que não eram capazes de fermentar carboidratos e não produziam artrósporos, que são características típicas de leveduras do gênero *Saccharomyces*, assim o transferiu para o gênero *Cryptococcus* (Heitman *et al.*, 2011).

A partir dos estudos de Evans (1950) foram comprovados a existência da heterogeneidade antigênica criptocócica, onde se identificou três sorotipos diferentes: A, B e C, e em 1968 foi descoberto o sorotipo D por Wilson *et al.* (1968).

Após os estudos de Kwon-Chung *et al.* (1978), concluiu-se que os isolados *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* se diferenciavam em relação às suas características morfológicas, bioquímicas e sorológicas. Portanto, foi observado que a variedade *gattii* constitui um grupo monofilético distinto da variedade *neoformans*, justificando o reconhecimento da variedade *gattii* como uma espécie. Assim, *C. neoformans* var. *gattii* foi renomeado para *C. gattii*.

Conforme Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), o complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, no estado teleomórfico, é classificado em:

- Reino Fungi;
- Filo Basidiomycota;
- Ordem Tremellales;

- Família Tremellaceae;
- Gênero *Filobasidiella*.

Espécie:

- *Filobasidiella neoformans* variedade *neoformans* (sorotipos A e D);
- *Filobasidiella neoformans* variedade *bacillispora* (sorotipos B e C);

No estado anamorfo as espécies são:

- *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A e D);
- *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C).

Através de informações moleculares e estudos evolutivos foi possível distinguir essas duas espécies anamórficas em quatro tipos moleculares, onde a espécie *C. neoformans* compreende os tipos VNI a VNIV e, a espécie *C. gattii*, VGI a VGIV, como demonstrado na tabela 1 (Severo *et al.*, 2009; Hagen *et al.*, 2015).

Tabela 1. Taxonomia clássica para espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*

Sorotipo	Espécies e variedade	Tipo molecular
A	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VN I, VN II
B	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III e VG IV
C	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III e VG IV
D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VN IV
AD	<i>C. neoformans</i>	VN III

Fonte: Adaptado de Severo *et al.*, 2009; Hagen *et al.*, 2015.

De acordo com Hull e Heitman (2002), o sorotipo A é predominantemente isolado de pacientes infectados por *Cryptococcus*, sendo responsável por aproximadamente 95% das infecções causadas por *Cryptococcus neoformans* (Bovers *et al.*, 2006).

O sorotipo D está relacionado com 30% das infecções relatadas na Europa por *Cryptococcus*, sendo encontrado preferencialmente em áreas de clima temperado (Dromer *et al.*, 1996). Conforme os estudos de Martinez e colaboradores (2001), as linhagens pertencentes ao sorotipo D são mais susceptíveis ao calor quando comparadas às linhagens do sorotipo A, devido à sua distribuição restrita.

Em relação ao *C. gattii*, o tipo molecular VGI é encontrado mundialmente; VGII encontrado principalmente na Austrália e na América; VGIII predominantemente em países Ibero – americanos; enquanto o tipo VGIV está associado à infecções em pacientes HIV positivos, sendo encontrado em países como o Sul da África e na América Central (Ma e May, 2009).

## 1.2 Características das espécies de *Cryptococcus*

Atualmente, existem aproximadamente 68 outras espécies de *Cryptococcus* e são encontradas em uma ampla variedade de ambientes (Heitman *et al.*, 2011). Contudo, a maioria dessas espécies não consegue sobreviver em tecidos de animais de sangue quente, devido à elevadas temperaturas e um sistema imunológico presente nesses animais. *C. neoformans* e *C. gattii* são as únicas espécies capazes de causar patologia em humanos (Anaissie; McGinnis e Pfaller, 2009).

As espécies de *Cryptococcus* são leveduras encapsuladas com o diâmetro em torno de 2 a 20 micrometros, dependendo da espessura da cápsula polissacarídica; possuem formato oval a esférico (Murray *et al.*, 2006), são saprófitos ubiqüitários (Murray, 2006) e as espécies *neoformans* e *gattii* se diferem em relação à suas propriedades bioquímicas, ecológicas e epidemiológicas, conforme a tabela 2.

Tabela 2. Comparação *C. neoformans* e *C. gattii*.

Características	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
Ecologia	Solos e fezes de aves	Árvores de eucalipto
Distribuição Geográfica	Mundial	Tropical (Califórnia, Austrália, Ásia e África)
Cápsula	Sim	Sim
Produção de Fenoxidase	Sim	Sim
Suscetibilidade a cavananina	Sim	Não
Assimilação de malato	Não	Sim
Assimilação de glicina (% de cepas)	10 a 20	100
Sorotipos	A, D e AD	B e C

Fonte: Adaptado de Mitchell e Perfect, 1995.

Essas leveduras podem se multiplicar sexuada ou assexuadamente (Figura 1). A forma sexuada, que ocorre em variedade teleomórficas, *mating type* (MAT) ocorre através da fusão de células haploides diferentes, A e  $\alpha$ , que resulta na formação de corpos de frutificação, essas estruturas se diferenciam formando os basídios, nos quais ocorre fusão nuclear e meiose originando os basidiósporos, que serão dispersos no meio ambiente (Lin e Heitman, 2006).

Essa forma de reprodução garante a variabilidade genética da levedura, levando ao surgimento de novas linhagens (Lin e Heitman, 2006). Além disso, esse processo em *C. neoformans* é controlado pela presença de feromônios e seus receptores; proteína G e via MAP quinase (Lin, Hull e Heitman, 2005).

A reprodução assexuada é um processo de frutificação monocariótica (brotamento), onde ocorre um prolongamento da célula mãe e a divisão do núcleo para a formação de células filhas geneticamente idêntica à célula mãe. Os basidiósporos formados medem cerca de 1 a 2 micrometros de diâmetro, facilitando a deposição do microrganismo nos alvéolos pulmonares (Lin e Heitman, 2006; Kronstand *et al.*, 2011).

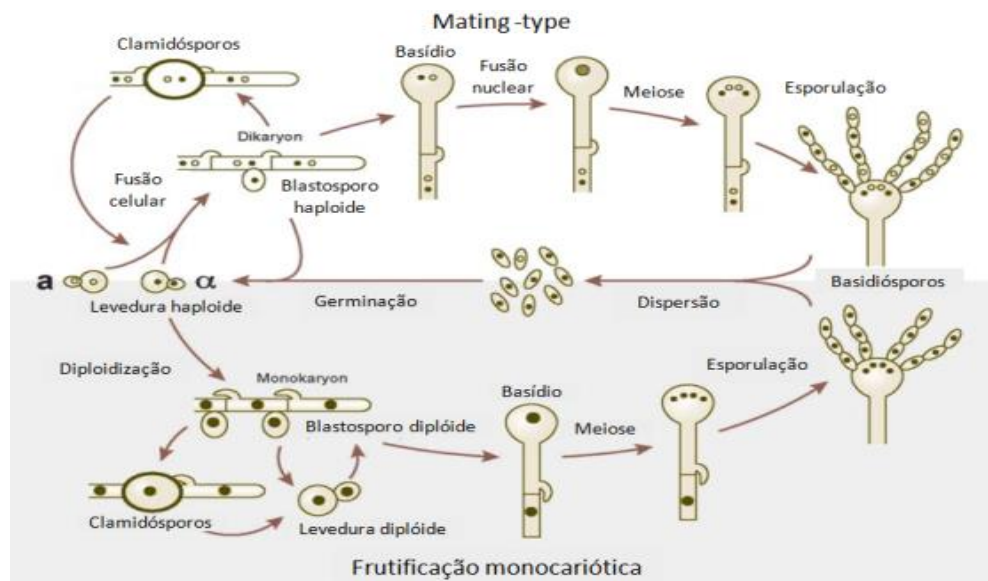


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *Cryptococcus*. (1) *Mating type*: quando há limitações nutricionais, as células *a* e  $\alpha$  secretam feromônios, ocorrendo fusão celular. Dependendo das condições ambientais que em o microrganismo está presente, pode ser induzido a formar clamidósporo ou basídio, onde ocorre a fusão nuclear e susceptíveis divisões meióticas para a formação de esporos, na qual constituem os basidiósporos. (2) Frutificação monocariótica: esse processo ocorre a partir de células do mesmo tipo, por exemplo, entre duas células do tipo A ou duas do tipo  $\alpha$ , verificando-se a diploidização dessas células através de fusão nuclear. Forma-se um septo rudimentar, não totalmente fechado. Esse processo gera basidiósporos. (3) os esporos formados tanto na reprodução por *mating type* como por frutificação são liberados no meio onde são germinados e induzidos a iniciar um novo ciclo celular. Fonte: Adaptado de Lin e Heitman, 2006.

### 1.3 Fatores relacionados à virulência

Essas leveduras possuem diversos fatores de virulência que facilitam sua sobrevivência e multiplicação no organismo hospedeiro. Estudos recentes revelam que espécies de *Cryptococcus* podem passar por uma série de adaptações morfológicas, que levam a formação de células gigantes e alterações genômicas, que potencializam seus fatores de virulência e a resistência a drogas antifúngicas (Li e Mody, 2010; Chen *et al.*, 2014).

#### 1.3.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é altamente hidrofílica (Fernandes *et al.*, 2016) e está associada à parede celular fúngica garantido ao microrganismo flexibilidade nos organismos hospedeiros (Deoring, 2009), caracteriza-se como um importante fator de virulência para *Cryptococcus*, sendo responsável pela inibição da fagocitose mediada por macrófagos (Chow e Casadevall, 2011); redução da resposta imune mediada por citocinas inflamatórias e pela inibição da capacidade de apresentação de antígenos mediada por monócitos (O'Meara, Alspaugh, 2012); além de proteger a célula de mecanismos de estresse, como a geração de espécies reativas de oxigênio (SOD) por macrófagos (Esher *et al.*, 2018); e de predadores naturais como nematoides e amebas (O'Meara e Alspaugh; 2012). A cápsula é capaz de fornecer uma proteção contra a ação efetiva de anticorpos, resultando na ativação da via clássica do sistema de complemento (Olszewski *et al.*, 2010).

A espessura da cápsula pode variar tanto no momento da infecção como através do estresse sofrido pela levedura no organismo hospedeiro. Cápsulas com diâmetro maior podem impedir a fagocitose dessas células. Por outro lado, as células com o diâmetro menor podem se disseminar com maior facilidade para os pulmões e atravessar a barreira hematoencefálica (Fernandes *et al.*, 2016). De acordo com os estudos *in vitro* de Olszewski *et al.* (2010), sob condições experimentais que mimetizavam as condições teciduais de hospedeiros mamíferos, as linhagens de *Cryptococcus* que não eram capazes de aumentar a espessura da cápsula se tornavam menos patogênicas quando comparadas com as cepas que eram capazes.



Estruturalmente é composta por polissacarídeos sintetizados na própria célula fúngica, como glicoronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas (MPs) (O'Meara e Alspaugh; 2012). A glicoronoxilomanana (GXM) compõe cerca de 90% da massa capsular com peso molecular entre 1700 a 7000 KDa (O'Meara e Alspaugh; 2012). De acordo com Tissi *et al* (2004), a GXM é capaz de afetar as funções de monócitos e macrófagos através da inibição de citocinas pró-inflamatórias, interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), inibe a migração de neutrófilos e atrasa a translocação de leucócitos para a barreira hematoencefálica (BHE), impedindo a ação tanto da resposta imune humoral quanto celular.

O composto uridina difosfato de ácido glicurônico é essencial para a síntese da cápsula polissacarídica, juntamente com composto GDP-manose sendo precursor para a síntese de GXM e GalXM, cujas deleções nesse composto pode causar cepas menos virulentas de *Cryptococcus* e anormalidade do formato da célula. E por fim, o composto UDP-galactofuranose é requerido para a síntese de GalXM (Doering, 2009).

### 1.3.2 Termotolerância

A capacidade de *C. neoformans* e *C. gattii* em se multiplicar a temperaturas entre 35 a 37 °C permite que esses microrganismos sejam patogênicos para hospedeiros mamíferos (Kronstand *et al.*, 2011), por outro lado, outras espécies como *C. aldidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus* não são capazes de crescer às temperaturas fisiológicas de mamíferos, tornando – se menos virulentas (Ma e May, 2009).

A termotolerância envolve a expressão de diferentes genes, dentre os quais a proteína calcineurina fosfatase dependente de cálcio e proteínas Ras1, estando envolvida na resposta ao estresse do fungo (Chen *et al.*, 2013). Conforme os estudos de Fernandes e colaboradores (2016), a espécie de *C. gattii* (VG II) é capaz se desenvolver melhor na temperatura de 37 °C, quando comparada com os tipos moleculares VG III e VG IV. E de acordo Oldom *et al.* (1997), esses tipos moleculares apresentam mutações nesses genes que os torna incapazes de crescer a 37 °C.

### 1.3.3 Melanização

Melanina é uma macromolécula de alto peso molecular, caracterizada como um pigmento marrom ou preto, hidrofóbico e negativamente carregada (Nosanchuk *et al.*, 1999). Produção de melanina por *Cryptococcus* foi descrita pela primeira vez em 1960 por F. Staib, onde ele observou o crescimento de colônias desse fungo que apresentavam coloração marrom, em ágar contendo extrato de semente de *Guizotia abyssinica* (Casadevall, 2000).

Em *Cryptococcus* spp, a melanização ocorre pelo processo de polimerização oxidativa de composto fenólicos, mediada pela enzima lacase, através da conversão de catecolaminas, que são neurotransmissores, em melanina. Como os gânglios basais, situados no cérebro, possuem altas concentrações desses neurotransmissores, o Sistema Nervoso Central está mais sujeito à infecção por *Cryptococcus* spp (Nosanchuk *et al.*, 1999). Linhagens não melanizadas de *Cryptococcus* são menos virulentas (Kwon- Chung *et al.*, 1982).

Duin *et al.* (2002), verificaram que a melanina é capaz de afetar a suscetibilidade do *Cryptococcus* a certos antifúngicos. Esse pigmento age neutralizando a ação de neutrófilos defensivos e limitando a atividade da anfotericina B e caspofungina, que são as drogas antifúngicas mais utilizadas para o tratamento de infecção por *Cryptococcus* (Mednick *et al.*, 2005). Jacobson e Tinnell (1993) sugerem que a melanina possui efeitos antioxidantes devido à presença de resíduos semelhantes à quinona e à hidroquinona, que são capazes de consumir superóxidos e outros oxidantes.

A melanina estando localizada na parede celular fúngica confere proteção contra ação de raios ultravioletas e, conseqüentemente, contra possíveis danos celulares (Nosanchuk *et al.*, 1999). Pereira *et al.* (2009), demonstraram que após o crescimento de *Cryptococcus neoformans* na presença de L- dopa, os efeitos da luz ultravioleta foram reduzidos, ocasionando menos danos à célula fúngica.

A produção de melanina garante ao microrganismo maior patogenicidade, sendo capaz de torná-lo menos susceptível à ação do mecanismo de defesa do hospedeiro e, portanto, interrompendo respostas imunes normais (Salas *et al.*, 1996).

#### 1.3.4 Produção de enzimas

O gênero *Cryptococcus* é capaz de produzir várias fosfolipases, como fosfolipases B, C, lisofosfolipases e aciltransferase, estando localizadas na parede celular da levedura sendo responsável pela degradação dos componentes da membrana celular, contribuindo para a ligação fúngica à célula hospedeira através da destruição de substâncias surfactantes (Campos e Baroni, 2010). Já as proteinases são responsáveis por degradar tecidos hospedeiros e proteínas imunologicamente importantes (Campo e Baroni, 2010), auxiliando no processo de invasão tecidual durante a infecção (Almeida; Wolf e Casadevall, 2015, Pinti *et al.*, 2009).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima responsável por facilitar a sobrevivência e o crescimento da levedura no interior dos macrófagos (Hamilton e Holdom, 1996), uma vez que a produção dessa enzima é regulada pela temperatura, sendo mais prevalente a 37 °C (Jacobson *et al.*, 1994). O processo de síntese de SOD ocorre através da neutralização dos níveis tóxicos de oxigênio que são gerados pelo hospedeiro durante o processo apoptótico das células de defesa, através da conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Cox *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2013).

De acordo com Sánchez e Colom (2010), a enzima DNase tem um importante papel na patogenia do *C. neoformans* e o *C. gattii* podendo ser produzida tanto por isolados clínicos como por ambientais, sendo responsável pela degradação do DNA do hospedeiro, além de melhorar a evasão de sistema imunológico inato através do bloqueio da morte de *Cryptococcus* causada por neutrófilos.

Além disso, a produção de enzima urease é um importante fator de patogenicidade em *Cryptococcus*, devido à capacidade de invasão do Sistema Nervoso Central (Sánchez e Colom, 2010), através da catalisação da ureia em amônia e carbonato (Ma e May, 2009).

#### 1.3.5 Alterações fenotípicas

Como um mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, leveduras do gênero *Cryptococcus* podem sofrer alterações em seu fenótipo habitual. Dentre essas alterações pode-se observar a formação de pseudohifas e o aumento ou diminuição do tamanho das células leveduriformes (Oliveira e Melhem, 2014).

As células anãs ou microformas medem cerca de um  $\mu\text{m}$  de diâmetro e geralmente são encontradas no interior de macrófagos (Oliveira e Melhem, 2014). São importantes para a patogenicidade de *Cryptococcus*, uma vez que auxiliam para transpor as barreiras do trato respiratório e depositar – se nos alvéolos pulmonares, medindo cerca de quatro  $\mu\text{m}$  (Reolon; Perez; Mezzari, 2004).

Por outro lado, as células gigantes ou titãs (Figura 2), produzidas por *C. neoformans*, possuem um diâmetro entre 10 e 100  $\mu\text{m}$ , são poliploides, contendo até 64 cópias de seu genoma. Apresentam algumas alterações em suas organelas, onde a cápsula polissacarídica é mais densa e reticulada, o que aumenta a resistência dessas células à radiação; solventes orgânicos e a dimetilsulfóxido (DMSO). A parede celular é mais espessa, medindo em torno de 2 a 3 micrometros. A formação dessas células gigantes garante ao microrganismo uma melhor sobrevivência, disseminação e patogenicidade no organismo hospedeiro, uma vez que as células do sistema imunológico não conseguem fagocitar essas células gigantes (Zaragoza e Nielsen, 2013).

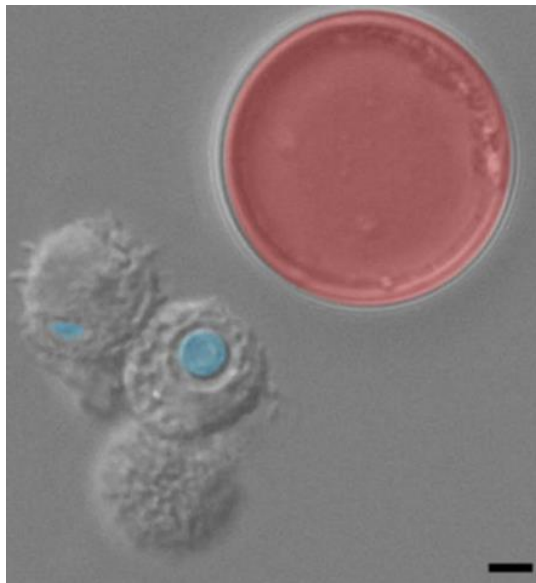


Figura 2. Lavado broncoalveolar de camundongos infectados com *Cryptococcus neoformans*. Em azul, representa o tamanho típico dessas células leveduriformes, rapidamente fagocitadas pelas células mononucleares do hospedeiro. Em vermelho, está representada a formação de células titãs, que não são capazes de serem fagocitadas pelas células de defesa do hospedeiro. Escala = 5  $\mu\text{m}$ . Fonte: Adaptado de Zaragoza; Nielsen; 2013.

De acordo com os estudos de Van Gelderen e Kelsteman (2012), formas atípicas de *C. neoformans* foram encontradas no fígado, baço, rim e tecido cerebral de um paciente do sexo

masculino, observando-se a presença de células leveduriformes com diâmetro em torno de 40 a 50  $\mu\text{m}$ .

## 1.4 Criptococose

### 1.4.1 Patogênese

A criptococose, conhecida também por blastomicose europeia ou torulose, é caracterizada como uma micose oportunista causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, sendo uma das principais doenças invasivas em humanos e animais domésticos, como cães e gatos (Queiroz *et al.*, 2008). Apresenta-se na forma de infecção pulmonar, sendo essa a mais frequente e, na forma de meningoencefalite criptocócica, correspondendo à forma mais letal da doença (Oliveira e Malhem, 2014).

Há três fatores cruciais para determinar a patogenia da criptococose: a carga inalada de esporos; a patogenicidade da linhagem de *Cryptococcus* inalada e o sistema imunológico do hospedeiro. Devido a isso, alguns indivíduos podem ser potencialmente resistentes à infecção enquanto outros podem ser susceptíveis (Mitchell e Perfect, 1995).

A contaminação ocorre através da inalação de células fúngicas, conhecida como basidiósporos (Figura 3). Essas células medem cerca de 4 a 10  $\mu\text{m}$  (Kronstand *et al.*, 2011) e a espécie *C. neoformans* é encontrada em excrementos de pombos, principalmente pertencentes à espécie *Columba livia domestica*, ou em solos contaminados. Por outro lado, a espécie *C. gattii* pode ser encontrada em associação com ocos de árvores ou em madeiras em decomposição (Esher *et al.*, 2018).

Devido à presença de compostos nitrogenados nas fezes desses animais, os esporos de *Cryptococcus* podem permanecer viáveis por mais de dois anos (Baltazar e Ribeiro, 2008), além disso, como essas aves possuem alta temperatura corporal, em torno de 41,5 – 43,3°C, não são capazes de desenvolver a doença, comportando-se apenas como um reservatório para a dispersão e disseminação da criptococose (Esher *et al.*, 2018). A transmissão entre humanos e animais ainda não foi comprovada (Queiroz *et al.*, 2008).

Como as células leveduriformes são pequenas, os macrófagos alveolares rapidamente as reconhecem, ocorrendo o recrutamento de outras células imunes e citocinas e quimiocinas pró inflamatórias e granulomatosa (Kwon- Chung *et al*, 2014).

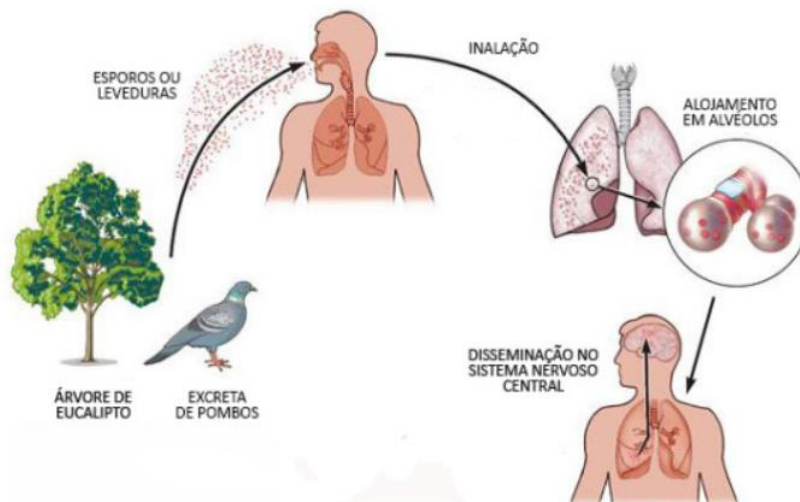


Figura 3. Ciclo de infecção de *Cryptococcus*, estando presente em diversos ambientes, como árvores e solo contaminado com excretas de pombos. A contaminação humana ocorre pela inalação dos esporos causando desde uma infecção assintomática até uma forma mais grave como a meningoencefalite criptocócica, através da disseminação para o sistema nervoso central. Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2018.

Os inúmeros fatores de patogenicidade que *Cryptococcus* apresentam o protegem da fagocitose e proporciona sua sobrevivência no interior de macrófagos, através da neutralização do pH e de espécies reativas de oxigênio (Coelho; Bocca; Casadevall, 2014). Conforme os estudos de Nicola *et al* (2011), essas leveduras podem apresentar outro mecanismo de resistência à fagocitose, denominado de vomocitose ou extrusão. Esse processo consiste na indução da fusão do fagossoma com a membrana citoplasmática, resultando na expulsão dos fungos do interior dos macrófagos.

#### 1.4.2 Criptococose pulmonar

Ao ser inalado, os esporos de *Cryptococcus neoformans* ou *C. gattii* penetram nos pulmões chegando até os alvéolos pulmonares, causando uma infecção primária nesse sítio (Kronstand *et al.*, 2011).

Em indivíduos imunocompetentes, na maioria dos casos, não ocorre o desenvolvimento de sintomas ou apresenta sintomas gripais, como tosse e febre, podendo evoluir para sintomas

mais sérios como pneumonia ou síndrome aguda do estresse respiratório (Ma e May, 2009), uma vez que o microrganismo pode ser eliminado pela ação do sistema imunológico hospedeiro ou podendo entrar em estado de dormência. No entanto, o estado de dormência em pacientes imunocomprometidos pode ser reativado e ocasionar patologia em diversos órgãos como a pele, ossos, olhos, articulações, ou trato urinário e, principalmente, o SNC (Lin e Heitman, 2006).

#### *1.4.3 Meningoencefalite criptocócica*

Na ausência de um sistema imunológico eficaz, essas leveduras podem se disseminar para o sistema nervoso central, via hematogênica e atravessando a barreira hematoencefálica, causando uma patologia mais grave, conhecida como meningoencefalite criptocócica (Kronstand *et al.*, 2011). O tropismo do fungo pelo SNC está relacionado ao fato de que o cérebro apresenta altos níveis de cetecolaminas, um precursor para a síntese de melanina em *Cryptococcus* (Lin e Heitman, 2006).

Em contrapartida, os estudos de Casadevall (2010) sugerem que para conseguir se disseminar para o SNC, *Cryptococcus neoformans* utiliza uma estratégia específica, denominada como “Cavalo de Tróia” (Figura 4). Nesse processo, as leveduras utilizam como agente transportador as próprias células do organismo hospedeiro, como os macrófagos, que fagocitam as células criptocócicas e as liberam após atravessar a barreira hematoencefálica, chegando até o cérebro. Por outro lado, conforme Kronstand e colaboradores (2011) as células criptocócicas podem atravessar a BHE por meio de um processo de transcitose através das células epiteliais, atingindo o SNC.

Ao atingir o SNC, os principais sintomas relatados são fortes dores de cabeça; febre; desorientação; vertigem; ambliopia; rigidez na nuca; tonteiras; hiporreflexia; sonolência; vômitos; afasia e paralisia dos nervos cranianos. Essa doença pode acarretar em óbito devido ao aumento da pressão intracraniana com redução da circulação sanguínea nessa local (Molloy *et al.*, 2017).

Em pacientes imunocomprometidos, principalmente HIV positivos, e infectados com *Cryptococcus*, as manifestações clínicas do SNC são mais frequentes que nos pulmões, uma

vez que cerca de 90% dos pacientes que apresentavam criptococose pulmonar já apresentam sinais de comprometimento do SNC em decorrência dessa infecção (Severo *et al.*, 2009).

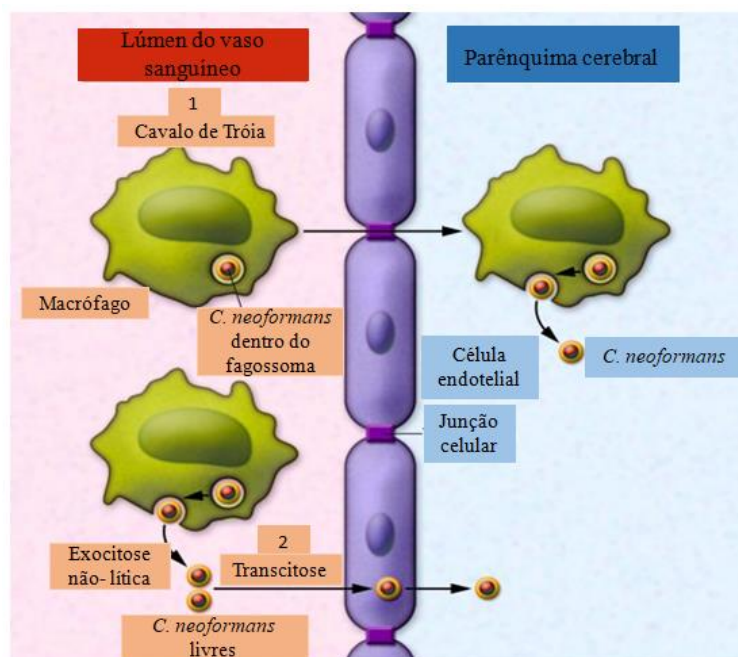


Figura 4. Mecanismos de invasão do SNC utilizados por *Cryptococcus neoformans*. Em (1) observa-se o mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia” e em (2) o processo de transcitose. Fonte: Casadevall (2010).

#### 1.4.4 Epidemiologia

Leveduras da espécie *C. neoformans* possui duas variações, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), apresentando os genótipos moleculares VNI e VNII, respectivamente (Hagen *et al.*, 2015), possui distribuição mundial, e são encontradas principalmente, em excrementos secos de pombos e em solos contaminados com as fezes dessas aves (Baltazar e Ribeiro, 2008). Enquanto *C. gattii* é encontrado em regiões de clima tropical e subtropical (Li e Mody, 2010). Em conformidade com os estudos de Baltazar e Ribeiro (2008), no Brasil, *C. gattii* pode ser encontrado nas regiões Sul, Sudeste e, principalmente, Norte onde pode estar presente em várias árvores características da Floresta Amazônica estando presente em diversas espécies de árvores, como *Marlierea tomentosa* e *Guettarda acreana* (Lin e Heitman, 2006).

A criptococose causada por *C. neoformans* (80 %) é mais prevalente quando comparada com *C. gattii* (20%) (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Como essa doença não é considerada de notificação compulsória pela Organização Mundial da Saúde (WHO), o número de casos diagnosticados anualmente pode ser ainda maior (Soares *et al.*, 2019).



Em meados dos anos 80, a criptococose era considerada uma doença rara e de ocorrência esporádica. Com o surgimento da imunodeficiência humana adquirida (AIDS) e em paralelo com outros fatores que modificam a imunocompetência do indivíduo, essa doença passou a ser considerada epidêmica em algumas regiões (Contin *et al.*, 2011). Anualmente são relatados em torno de 215 mil novos casos de infecção causada por *Cryptococcus* spp., gerando aproximadamente 180 mil mortes, caracterizando-se como a quinta doença infecciosa mais letal (Esher, 2018).

No ano de 2008, aproximadamente um milhão de novos casos de meningite criptocócica foram diagnosticados em todo o mundo, em pacientes HIV/AIDS, dos quais 625 mil evoluíram para óbito (Soares *et al.*, 2019).

No Brasil, de acordo com os dados do SUS, a criptococose é a micose sistêmica com a maior taxa de internação entre os anos de 2000 a 2007 (Ministério da Saúde, 2012). Segundo os estudos de Lin e Heitman (2006), a meningite criptocócica é a infecção fúngica que mais acomete o sistema nervoso central e a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes HIV positivos. Essa doença possui alta taxa de mortalidade, onde aproximadamente 60% dos casos que recebem tratamento evoluem para óbito e, os casos sem tratamento, a mortalidade chega a 100% (Molloy *et al.*, 2017).

Do ponto de vista social, é de extrema relevância mencionar que as micoses sistêmicas acometem, em sua grande proporção, indivíduos em situação de maior vulnerabilidade social. Considerando que o Brasil é marcado por discrepâncias em termos de distribuição de renda, o diagnóstico e tratamento dessas doenças não são de fácil acesso a todos, pois equipamentos de média e grande complexidade estão concentrados nos grandes centros, regiões metropolitanas e alguns polos regionais, o que resulta em grande variação de fluxo de pacientes para ter acesso aos serviços. Por isso é fácil afirmar que os dados epidemiológicos atuais não refletem a realidade das micoses sistêmicas no Brasil (Costa *et al.*, 2019).

Conforme os estudos de Soares *et al.* (2019), a criptococose, principalmente na forma de acometimento do sistema nervoso central (SNC), pode ser considerada como o maior problema de saúde pública do Brasil, uma vez que os números de casos reportados e de óbitos são desconhecidos, já que não é uma doença de notificação compulsória. A taxa de mortalidade devido à criptococose é substancial, chegando a 45 a 65% dos casos diagnosticados associados aos pacientes HIV positivos.

Conforme a Secretaria Estadual do Rio Grande do Sul, entre o período de 1999 a 2004, 430 novos casos de criptococose foram notificados, sendo que esse número pode ser maior devido ao fato dessa doença não ser de notificação compulsória (Contin *et al.*, 2011).

A meningite criptocócica é a meningite fúngica mais letal, onde ocasionou 892 óbitos no período de 2000 a 2012, no Brasil (tabela 3) e em comparação a outras meningites, está em segundo lugar com a maior taxa de mortalidade. Em relação às regiões brasileiras mais pobres, como o norte e nordeste, observa-se uma taxa maior de mortalidade, aproximadamente 13% e 5 %, respectivamente (Soares *et al.*, 2019).

Nos Estados Unidos, um quarto dos casos de internação e um terço dos casos de morte são devido à meningite criptocócica em não soropositivos. Por outro lado, em relação a pacientes HIV - positivos, o número de novos casos relacionados a essa doença diminuiu drasticamente após a introdução efetiva da terapia antirretroviral (Williamson *et al.*, 2016).

Na África Subsaariana, conforme o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em 2009, o número de novos casos de meningite criptocócica alcançou um milhão de pacientes acometidos, dos quais 500 mil casos evoluíram para óbito. Devido ao fato de que a terapia antirretroviral não foi extremamente efetiva nesse continente, uma vez que o número de pacientes que abandonam o tratamento é alto, resultando na contínua imunossupressão desses pacientes, estando mais vulneráveis à contaminação e desenvolvimento de meningite criptocócica nesses pacientes (Williamson *et al.*, 2016).

Tabela 3. Óbitos e taxa de mortalidade de meningite criptocócicas e de outras meningites, no Brasil, entre o ano de 2000 a 2012.

Meningites	Óbitos	%
Meningite meningocócica	1830	8,6
Meningite tuberculosa	624	2,9
Outras meningites bacterianas	10813	50,7
<b>Subtotal de meningites bacterianas</b>	<b>13267</b>	<b>62,2</b>
Meningite criptocócica	895	4,2
Meningite causada por <i>Candida</i>	10	0,05
Meningite coccidioidomicose	1	0,005
<b>Subtotal de meningites fúngicas</b>	<b>906</b>	<b>4,2</b>
Meningite causada por Herpes vírus	51	0,2

Meningite causada por Varicella virus	9	0,04
Meningite causada por Mumps virus	2	0,009
Outras meningites virais	691	3,2
<b>Subtotal de meningites virais</b>	<b>753</b>	<b>3,5</b>
Infecção de SNC por <i>Toxoplasma</i>	806	3,8
Outras meningites	5601	26,2
<b>Subtotal de outras meningites</b>	<b>6407</b>	<b>30</b>
<b>Total</b>	<b>21333</b>	<b>100</b>

Fonte: Adaptado de Soares *et al.*, 2019.

### 1.5 Diagnóstico de *Cryptococcus spp*

O diagnóstico de criptococose pode ser realizado laboratorialmente através de achados fúngicos, a partir da análise de fluidos biológicos como líquido; sangue; urina; fragmentos de tecidos, dentre outros (Williamson *et al.*, 2016). O processo baseia-se em três fundamentos: demonstração da presença da levedura em materiais clínicos; isolamento em cultura; provas bioquímicas e pesquisa de antígenos circulantes (Contin *et al.*, 2011).

A identificação fúngica é considerada extremamente complexa, exigindo dos profissionais de saúde um grande conhecimento micológico que inclui a biologia, morfologia e ecoepidemiologia dos fungos patogênicos e sintomatologia dos processos micóticos, além de um amplo domínio das técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial. Assim, o laboratório clínico faz parte da assistência à saúde, fornecendo informações importantes para a tomada de decisões clínicas. Este deve assegurar que os resultados produzidos reflitam, de forma precisa e consistente à situação clínica apresentada pelos pacientes, garantindo que não representem o resultado de alguma interferência no processo. A informação produzida deve possibilitar o correto tratamento e prognóstico das doenças (Chaves, 2010).

Os principais testes de triagem realizados são o teste rápido, teste sorológico, exame direto e diagnóstico radiológico. Já os testes confirmatórios realizados são a cultura da amostra, ensaio imunoenzimático (ELISA), histopatologia e diagnóstico molecular (Nesser *et al.*, 2011).

O diagnóstico micológico clássico das micoses baseia-se na identificação dos fungos por meio da observação de suas características morfológicas. As leveduras têm como estrutura

primária, visível ao microscópio óptico a partir de material clínico ou colônias em cultura, células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, em geral de forma arredondada. Os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada ou não septada (cenocítica), hialina (hifomicetos) ou demáceas (feohifomicetos). A classificação de fungos filamentosos é feita, em geral, pela associação de características morfológicas macroscópicas, microscópicas e de velocidade de crescimento (ANVISA, 2013).

### 1.5.1 Diagnóstico laboratorial

#### 1.5.1.1 Teste rápido– CrAg LFA (Ensaio de Fluxo Lateral para detecção do Antígeno Criptocócico)

O teste rápido para a detecção de *Cryptococcus* se baseia na imunocromatografia onde são detectados os antígenos capsulares criptocócicos (CrAg) de forma qualitativa ou semi-quantitativa, utilizando amostras de soro ou líquido cefalorraquidiano. Esse teste é de rápida execução, alta sensibilidade para todos os sorotipos de *Cryptococcus*, possui baixo custo e não requerer pré-tratamento da amostra. São utilizadas fitas testes, semelhantes às utilizadas em testes rápidos de gravidez, que são sensibilizadas com uma combinação de dois anticorpos monoclonais juntamente com nanoconjugados de ouro que apresentam superfícies com alta afinidade para proteínas e biomoléculas, consequentemente aumenta o sinal de imunoensaio e permite um fluxo regular através da tira teste. Caso o antígeno criptocócico estiver presente haverá a formação de uma linha vermelha na banda teste, como demonstrado na figura 5 (Vidal e Boulware, 2015).

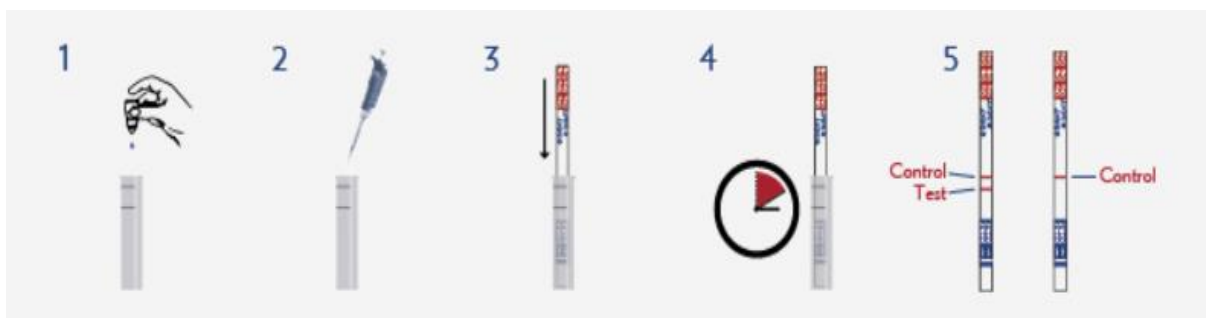


Figura 5. Leitura e interpretação do teste rápido para detecção do antígeno CrAg LFA. (1) Adiciona-se o diluente no tubo (2) Adiciona-se 40  $\mu$ l da amostra do paciente no tubo (3) Inserir a tira Teste (4) Aguardar 10 minutos (5) A amostra é considerada positiva para *Cryptococcus* quando a tira teste apresenta duas faixas (faixa teste e

controle), independente da intensidade da cor. A amostra considerada negativa apresenta apenas a faixa controle na tira teste, e o resultado inválido apresenta apenas a faixa da tira teste. Fonte: Adaptado de Vidal e Boulware, 2015; IMMY, 2018. Disponível em: <<http://www.immy.com/products/lateral-flow-assays/crag-lfa/>>.

Conforme Backes e colaboradores (2016), este é um teste muito sensível e específico, porém pode gerar resultados falso-positivos devido à ocorrência de reação cruzada, comum em pacientes imunocomprometidos, entre *Cryptococcus* e *Trichosporon* spp. e *Stomacoccus mucilaginosus*, em caso de infecção disseminada por esses microrganismos, sendo indicado apenas quando há evidência clínica de criptococose. Além disso, a presença de cepas de *Cryptococcus* não capsuladas é um agravante para a geração de resultados falso-positivos, podendo gerar uma concentração de antígenos abaixo do nível detectável pelo kit.

#### 1.5.1.2 Teste sorológico – Aglutinação em látex

O teste de aglutinação em látex (LAT) é método qualitativo e semi- quantitativo, onde é detectada a presença do antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans* em amostras de LCR ou soro. Esse teste se baseia em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais do tipo IgM provenientes de camundongos que sofrem aglutinação visível ao entrar em contato com os antígenos capsulares polissacarídeos (CrAg) de *Cryptococcus neoformans* (Figura 6). Altos títulos de antígenos, observado pela presença de aglutinação, está relacionada com a gravidade da doença (Pedroso e Candido, 2007).

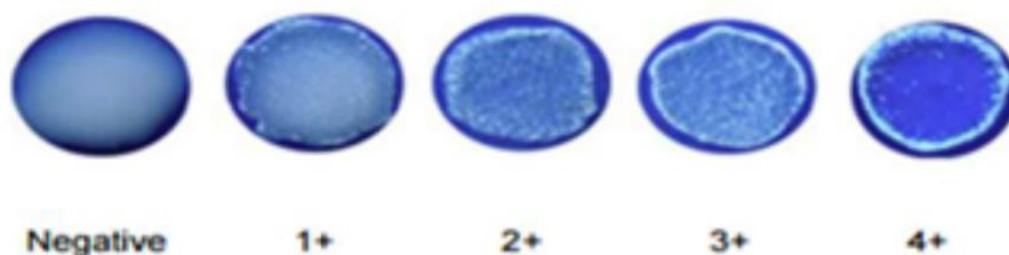


Figura 6. Interpretação do teste de aglutinação em látex. Resultado negativo: ausência de agregação ou aglutinação das partículas. Resultado positivo: (1+) Fina granulação contra um fundo leitoso. (2+) Presença de suspensão com pequenos grumos contra um fundo levemente turvo. (3+) Presença de suspensão com grandes e pequenos grumos contra um fundo claro. (4+) Suspensão com grandes grumos contra um fundo muito claro. Fonte: Adaptado de UK NEQAS for Microbiology, 2018.

Esse teste apresenta algumas limitações como resultados falso-positivos em caso de amostras de pacientes que possuem alguma alteração imunológica ou em caso de infecções não criptocócicas, ou resultados falso-negativos devido à presença do fator reumatoide ou dos complexos imunes (Gray; Roberts, 1988). De acordo com Williamson *et al.* (2016), em casos onde há alta carga fúngica, esse método pode apresentar sensibilidade reduzida.

Devido a isso, antes de realizar o teste, as amostras clínicas necessitam de tratamento prévio com pronase, uma protease não específica derivada de *Streptomyces griseus*, com o objetivo de reduzir os fatores de interferência e aumentar a sensibilidade para detecção do antígeno capsular criptocócico (Gray; Roberts, 1988).

De maneira geral, os kits comerciais para detecção de CrAg detectam a partir de 10 ng de antígeno por mL de fluido biológico, assim caso haja infecções por linhagem deficientes de cápsula polissacarídica, haverá uma produção deficiente do antígeno capsular, sendo indetectável pelos kits. Além disso, pacientes com infecção pulmonar primária sem disseminação também podem apresentar resultados falso – negativos, uma vez que a infecção está limitada à único órgão (Gazzoni *et al.*, 2009).

#### 1.5.1.3 Coloração por Tinta Nanquim e cultivo de amostra

De acordo com Kon *et al.* (2008), o exame direto consiste na visualização ao microscópio, a partir da coloração por tinta Nanquim ou tinta da China, do microrganismo proveniente tanto de material biológico, como pus de abscesso; escarro; lavado brônquico; líquido cefalorraquidiano (LCR); aspirados de medula óssea e fragmentos de tecido. As amostras provenientes de escarro e/ou amostras purulentas são pré- tratadas com uma solução de KOH 10% para eliminar a maioria das células do hospedeiro e artefatos que possivelmente podem ser confundidos com leveduras de *Cryptococcus*, e para as amostras de LCR analisa-se o sedimento obtido após a centrifugação (Pedroso e Candido, 2006). Esse método apresenta sensibilidade de 70 a 90% e para resultados negativos é necessária realização de teste de detecção do antígeno criptocócico e cultivo (Williamson *et al.*, 2016).

Como resultado observa-se a presença de células leveduriformes com diâmetro entre 5 a 20 µm com ou sem a presença de brotamento, envolvidas pela cápsula polissacarídica (Nesser *et al.*, 2011) (Figura 7). Alguns estudos têm demonstrado que *Cryptococcus* spp. pode sofrer

algumas alterações fenotípicas ou polimorfismo, o que dificulta o correto diagnóstico (Murray *et al.*, 2006; Oliveira e Malhem, 2014; Pedroso e Candido, 2006).

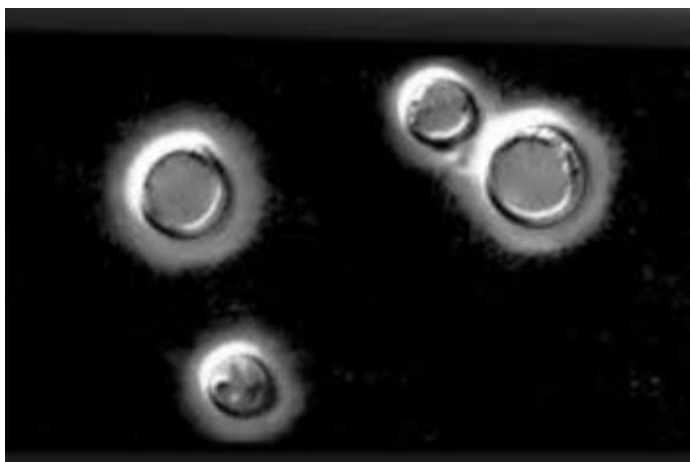


Figura 7. Coloração Tinta Nanquim. Observa-se em evidência a presença de leveduras criptocócicas capsuladas contrastadas sob um fundo preto, corado pela tinta Nanquim. Fonte: Adaptado de Nesser *et al.*, 2011.

Para confirmar o diagnóstico de criptococose é realizada a cultura desse microrganismo em Ágar Sabouraud Dextrose, com adição de antibióticos para inibir o crescimento de bactérias, e incubação entre 25 e 37 °C, em condições aeróbias (Levitz, 1991), durante 48 a 72 horas, onde será observada a presença de colônias mucóides e arredondadas. A prova da urease positiva auxilia no diagnóstico de criptococose, mas não é capaz de identificar a levedura em nível de espécie (Pedroso e Candido, 2006).

A principal limitação do cultivo microbiológico é o tempo necessário para o desenvolvimento das colônias, que pode tardar a instalação da terapia antifúngica. No contexto da meningoencefalite criptocócica, o rápido início do tratamento é crucial para salvar a vida do paciente (Costa *et al.*, 2019).

Para a identificação em nível de espécie, é realizado o cultivo da amostra em Agar Níger ou pela atividade de fenoloxidade, onde o *C. neoformans* apresenta coloração marrom a preto e possui atividade positiva, respectivamente (Murray *et al.*, 2006). O cultivo em meio de cavananina – glicina – azul de bromotimol (CGB) também é utilizado para diferenciar espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, onde *C. gattii* utiliza a glicina como única fonte de carbono e é resistente à cavananina, assim essa espécie é capaz de crescer no meio CGB, modificando a coloração do meio para azul cobalto (Kwon-Chung, Polacheck, Bennett, 1982).

#### 1.5.1.4 Ensaio Imunoenzimático- ELISA

O Ensaio Imunoenzimático, conhecido como ELISA, é responsável pela detecção do antígeno polissacarídeo presente na cápsula de *Cryptococcus* em amostra de soro e líquido cefalorraquidiano, através de uma reação colorimétrica (Illnait *et al.*, 2001). Esse método é bastante sensível e não exige pré-tratamento da amostra, o resultado é obtido entre 30 a 45 minutos e apresenta em valor bem distinguível entre amostras positivas e negativas. Por outro lado, possui sensibilidade reduzida para os sorotipos C e D de *Cryptococcus neoformans*, além de essa técnica necessitar de treinamento técnico avançado e possuir alto custo (Backes *et al.*, 2016).

#### 1.5.1.5 Histopatologia

Para Gazzoni *et al.* (2009), a histopatologia consiste na observação microscópica de fragmentos de tecido onde se podem analisar morfologicamente as estruturas características de *Cryptococcus* spp. A coloração por Hematoxilina - Eosina (HE) visa contrastar as estruturas teciduais, ou seja, é responsável por proporcionar o rastreamento de reações teciduais. Essa técnica não evidencia claramente as estruturas características de *Cryptococcus*, assim o padrão histológico para identificá-lo será a presença de resposta tecidual provocada por esse fungo.

A técnica Grocott prata (GMS), muito utilizada para visualização fúngica de tecidos fixados em formol, onde se observa a parede celular dos fungos a partir de uma coloração que varia de amarelo ao negro (Lacaz *et al.*, 2002). A coloração de Mucicarmim de Mayer (MM) é utilizada para confirmar o diagnóstico de criptococose, sendo responsável pelo reconhecimento da cápsula polissacarídica (Lazcano *et al.*, 1993). Esse método é muito utilizado para distinguir as leveduras criptocócicas de outros fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida* spp, *Coccidioides immitis* (Kwon-Chung *et al.*, 1981).



A técnica de Fontana Masson (FM) é capaz de detectar a melanina presente na cápsula polissacarídica dessa levedura, sendo visualizado pela presença de uma coloração marrom-avermelhada, caracterizando-se como diagnóstico diferencial (Gazzoni *et al.*, 2009).

Contudo, a histopatologia pode apresentar alguns problemas no momento da interpretação de resultados como, por exemplo, a impregnação excessiva pode corar outras estruturas celulares além das fúngicas, o que dificulta a visualização do patógeno, e as técnicas que utilizam prata requerem uma maior qualificação dos profissionais visto que uma coloração inespecífica é capaz de gerar lâminas impossíveis de serem interpretadas (Murray *et al.*, 2006), além de possíveis resultados falso-negativo quando a linhagem de *Cryptococcus* é deficiente de cápsula polissacarídica (Kwon-Chung *et al.*, 1981). A tabela 4 faz uma comparação entre os métodos de coloração histológica, evidenciando as principais finalidades e limitações de cada.

Tabela 4. Comparação entre os principais métodos de coloração histopatológica e suas limitações para identificação de *Cryptococcus* spp.

Técnicas de Coloração	Finalidade	Limitações
Hematoxilina- eosina (HE)	Avaliação de padrões de reações teciduais	Não é capaz de evidenciar as estruturas fúngicas
Grocott- methenamine silver (GMS)	Coloração da parede celular fúngica	Técnica com alta complexidade e alto custo
Mucicarmim de Mayer (MM)	Coloração da cápsula polissacarídica	Insuficiente no diagnóstico de <i>Cryptococcus</i> deficiente de cápsula polissacarídica
Fontana- Masson (FM)	Coloração da melanina presente na parede celular fúngica	Técnica com alta complexidade e alto custo

Fonte: Adaptado de Gazzoni *et al.*, 2008.

### 1.5.2 Diagnóstico radiológico: comprometimento pulmonar

O diagnóstico radiológico dos pulmões (Figura 8), para o diagnóstico de criptococose, consiste em observar a presença de nódulos ou massas unilaterais ou bilaterais bem definidos e não calcificados, tipicamente localizados subpleural variando de 0,5 a 4,0 cm de diâmetro, acometendo principalmente pacientes imunocompetentes. Em pacientes imunocomprometidos, observa-se a presença de infiltrados intersticiais, sendo necessário o diagnóstico diferencial com pneumocistose (Severo *et al.*; 2009).

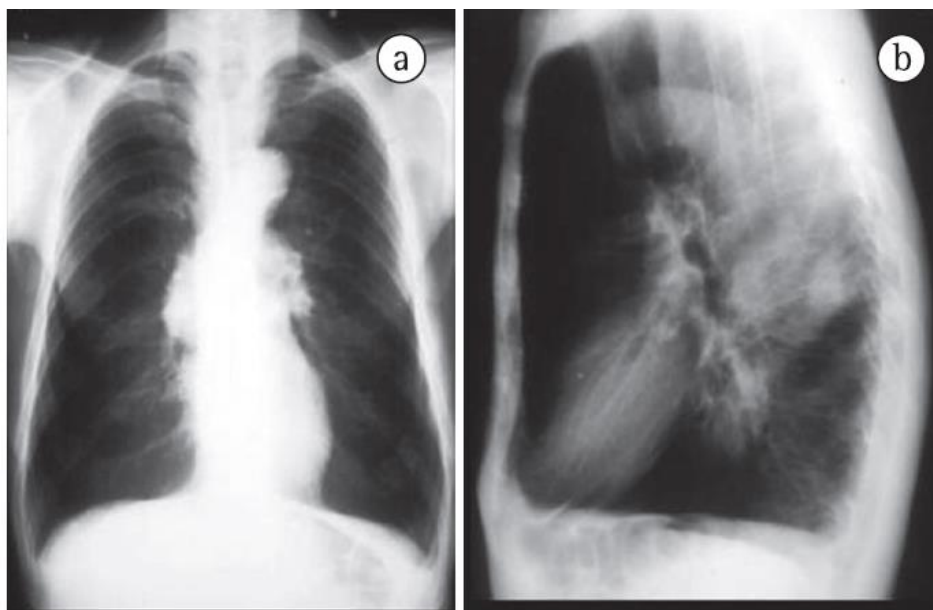


Figura 8. Radiografia de tórax de paciente com suspeita de criptococose, evidenciando a presença de uma massa esférica de 5 cm de diâmetro. (A) Incidência frontal (B) incidência lateral. Fonte Adaptado de Severo *et al.*, 2009.

O acometimento pulmonar associado à criptococose pode estar presente concomitante a outras patologias como candidíase oroesofageana, micobacteriose disseminada, toxoplasmose, pneumocistose, histoplasmose e citomegalovirose, fazendo necessária realização de exames diferenciais para diagnosticá-las (Severo *et al.*; 2009).

### 1.5.3 Diagnóstico molecular

As técnicas de biologia molecular são ferramentas muito promissoras para obtenção de um diagnóstico confiável, com alta sensibilidade e especificidade. Contribuem para a caracterização e distinção de linhagens; para estudos de epidemiologia molecular e são essenciais para o estudo da patogênese e virulência do fungo (Pasa, 2011).

O método diagnóstico mais utilizado é o PCR ou reação em cadeia da polimerase, uma vez que possui alta sensibilidade e especificidade (Tello *et al.*, 2013). O teste é responsável por detectar ácidos nucleicos necessários para diferenciação do complexo *C. neoformans* / *C. gattii* a partir de amostras biológicas como líquido; sangue; secreções; aspirado broncoalveolar e urina. Contudo, essa técnica apresenta grande desvantagem devido ao alto custo de equipamentos e reagentes, necessidade de instalações apropriadas e padronização dos

procedimentos, além de profissionais altamente qualificados para realização da técnica (Backes *et al.*, 2016).

## 1.6 Nanotecnologia - conceito

Conforme os estudos de Stagers *et al.* (2008), a nanotecnologia é definida como a manipulação de materiais em escala atômica e/ou molecular para a construção de novos produtos e dispositivos. Um nanômetro (nm) corresponde a um metro dividido em um bilhão de partes, ou seja, um nm é o equivalente a  $10^{-9}$  metros (Figura 9).

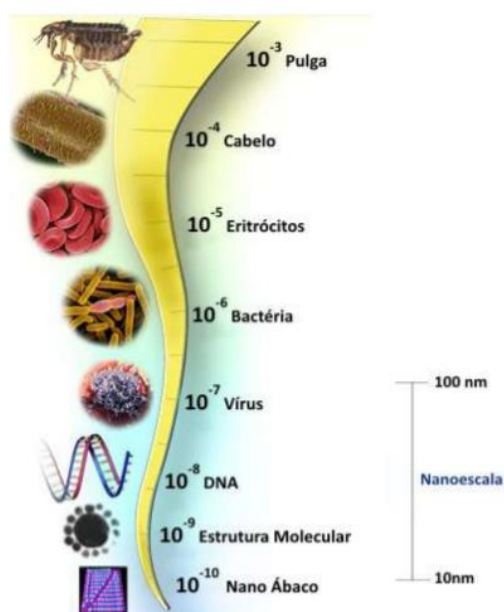


Figura 9. Escala nanométrica. Representação de uma escala nanométrica com exemplos comparativos de tamanho. Fonte: Adaptado de CERN. Disponível em: <<http://microcosm.web.cern.ch/microcosm>>.

Conforme Cai *et al* (2008), a nanotecnologia corresponde a um campo interdisciplinar que abrange áreas da física, biologia e química. O campo possui grande aplicação no diagnóstico clínico, na detecção e tratamento de doenças, além de uma infinidade de aplicações no meio industrial (Toma, 2016).

### 1.6.1 Histórico

A primeira utilização de ouro na forma coloidal datado ano de 1400 – 1300 a. C. no Egito e na Mesopotâmia, onde se utilizava nanopartículas de ouro e de prata para conferir diferentes cores aos vidros de acordo com a incidência da luz, como motivações decorativas ou medicinais. O cálice de Licurgo, datado do período romano no século IV, d. C., (Figura 10) é um exemplo da aplicação de ouro nanocrystalino. Esse cálice foi fabricado a partir de uma matriz vítrea, onde a cor depende do ângulo que a luz visível incide sobre a superfície do objeto (Louis e Pluchery, 2017).



Figura 10. Cálice de Licurgo. Em verde, observa-se a reflexão da luz pela superfície do cálice. Em vermelho, observa-se a alteração de cor após a luz ser transmitida através do vidro. Fonte: Louis e Pluchery, 2017.

De acordo com Kreuter (2007), o “ouro solúvel” era utilizado com fins curativos e estéticos durante os séculos V e VI a.C. no Egito e na China. Até a idade Média, o “ouro solúvel” ainda era utilizado para tratar e diagnosticar diversas doenças como a sífilis, problemas venéreos e do coração, entre outros.

Mesmo com diversos conhecimentos históricos, os cientistas começaram a compreender as propriedades das nanopartículas após muitos anos. Em 1959, durante um encontro anual da Sociedade Norte-Americana de Física, o pesquisador Richard Feynman ficou conhecido pela frase “Há muito mais espaço lá embaixo”, uma vez que supôs que seria possível a escrita de toda a enciclopédia britânica na cabeça de um alfinete. Feynman é considerado o primeiro pesquisador a observar o grande potencial de se trabalhar em escala nanométrica, entretanto, não possuía as ferramentas necessárias para tal finalidade (Maynard, 2006).

Alguns anos mais tarde, em 1981, a partir da invenção do microscópio eletrônico de tunelamento (STM – sigla em inglês) pelos pesquisadores Gerd Binnig e Heinrich Rohrer nos laboratórios de pesquisa da International Business Machines (IBM), foi possível observar e manipular superfícies em escala atômica, e desse modo criou-se a primeira imagem a partir da manipulação de átomo por átomo, através da disposição de 35 átomos de xenônio em uma superfície de níquel formando a sigla IBM (International Business Machines) (Eigler e Schweizer, 1990). A partir de então, diversas pesquisas se desenvolveram nessa área, principalmente utilizando nanopartículas metálicas.

### 1.7 Nanopartículas metálicas

Conforme os estudos de Huang *et al* (2009), as nanopartículas metálicas apresentam propriedades físico-químicas que são determinadas pelo tipo de movimento que os elétrons podem apresentar no material. As nanopartículas (NPs) são tipicamente sintetizadas em tamanhos na faixa de 1 a 100 nm, o que favorece sua interação com moléculas biológicas, uma vez que são cerca de 100 a 1000 vezes menores que as células humanas.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) tem sido extensamente utilizadas em pesquisas devido às suas propriedades únicas, como uma boa química de superfície, o que facilita a ligação de biomoléculas à sua superfície; o fato de poderem ser sintetizadas em diferentes formatos e tamanhos (Figura 11), além de possuírem alguns formatos que podem absorver luz na região infravermelha, sendo importante para fins biológicos; e por apresentarem testes negativos para toxicidade, e portanto, serem biocompatíveis (Pissuwan *et al.*, 2008).

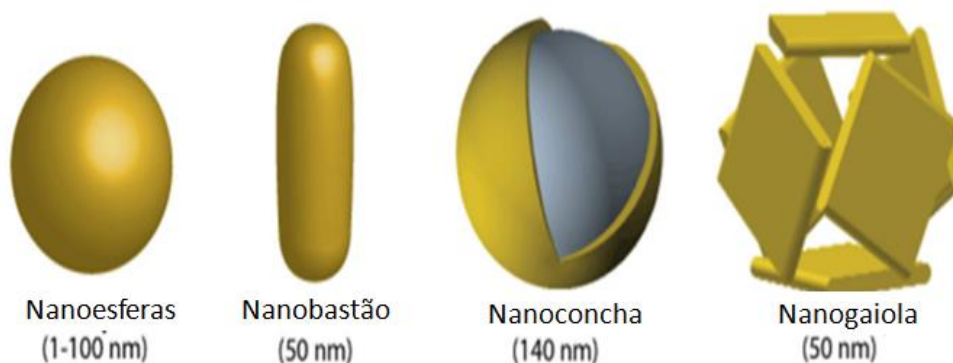


Figura 11. Diferentes formatos de nanopartículas metálicas. Fonte: Adaptado de Ajnai *et al.*, 2014.

### *1.7.1 Nanopartículas de ouro*

As NPs de ouro são as nanopartículas metálicas mais estáveis, resultado da distribuição espacial dos elétrons presentes nos átomos de ouro (Wang *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2017). Podem apresentar-se de diversos formatos, tais como nanobastões, nanoesferas, nanoestrelas, nanoconchas, nanogaiolas, dentre outras. Dentre elas, os nanobastões (NBs) são os mais estudados em razão de possuir maior aplicabilidade biológica e crescimento altamente controlado (Xu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Zijlstra *et al.*, 2006).

Os NBs de ouro são partículas anisotrópicas, de forma que a oscilação dos elétrons no material pode ocorrer em dois sentidos principais: ao longo do eixo curto, referido como eixo transversal, e ao longo do eixo longo, referido como eixo longitudinal (Wang *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2011).

Devido à alta razão entre a área de superfície e volume que os NBs de ouro apresentam, observa-se uma alta sensibilidade dos mesmos à natureza dielétrica do ambiente circundante. Ou seja, caso ocorra alguma alteração nesse ambiente, como alterações na superfície dos bastões, a adição de solventes ou agregação de partículas, isso acarretará modificações das propriedades eletrônicas dos mesmos e, conseqüentemente, em alterações colorimétricas e mudanças nos espectros de absorção e emissão (Stone *et al.*, 2011).

### *1.7.2 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) e outras propriedades ópticas*

Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (sigla em inglês LSPR) é um fenômeno eletromagnético que ocorre em nanopartículas metálicas. Esse processo consiste na oscilação coletiva dos elétrons livres presentes nas superfícies das NPs quando essas são submetidas à radiação com frequências específicas, e está relacionado com as propriedades ópticas que essas apresentam, demonstradas na figura 12 (Versiani *et al.*, 2016).

Conforme os estudos de Cao e colaboradores (2014), como as nanopartículas metálicas possuem diversos formatos e tamanhos, conseqüentemente apresentam diferentes propriedades de absorção e espalhamento da luz, o que pode resultar em múltiplas colorações. Os NBs apresentam dois picos nos espectros de extinção, sendo eles devido ao efeito de ressonância plasmônica ao longo dos eixos longitudinal e transversal dos NBs. Por outro lado,

as nanoesferas apresentam apenas um pico nos espectros de extinção, já que possuem geometria isotrópica.

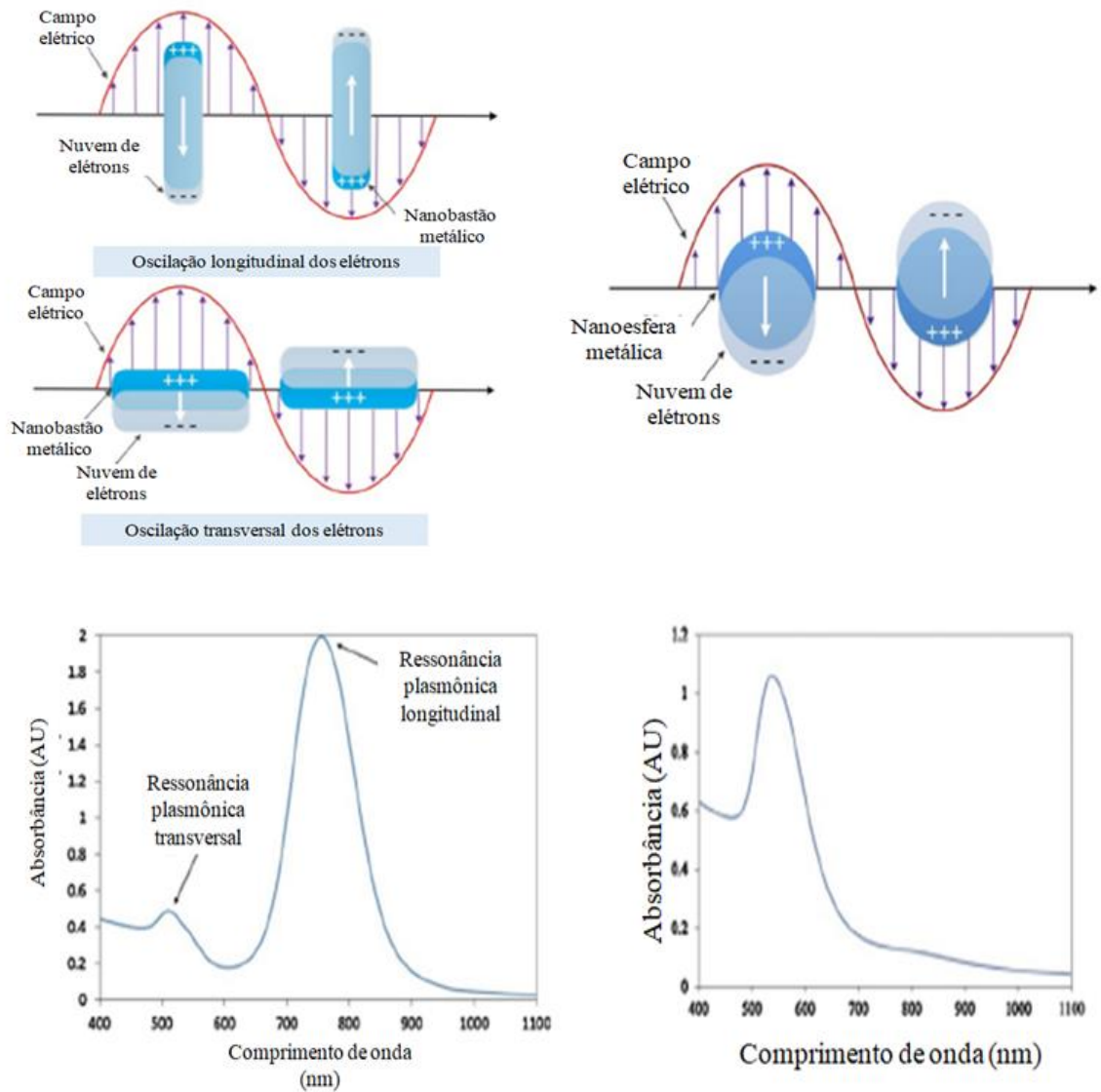


Figura 12. Esquematização dos tipos de LSPR em nanobastões e nanoesferas metálicas. Os nanobastões de ouro, por serem anisotrópicos, apresentam dois picos, o transversal em torno de 500 nm e o longitudinal, em 750 nm. E as nanoesferas apresentam apenas um pico em torno de 500 nm, uma vez que são nanopartículas isotrópicas. Fonte: Adaptado de Cao *et al.*, 2014.

## 1.8 Aplicações em nanobiotecnologia

Conforme os estudos de Lio *et al.* (2018), NBs de ouro podem auxiliar no monitoramento, em tempo real, na expressão do biomarcador para angiogênese (Lgr1). Além disso, de acordo

com Rouxinol (2009), as nanopartículas de PLA – poli (ácido- lático) contribuem para a liberação controlada de substâncias utilizadas para o tratamento de doenças oftalmológicas.

De acordo com os estudos de Ghosh e colaboradores (2008), os nanobastões de ouro podem auxiliar no processo de terapia fototermal e terapia gênica para destruição de tumores e no processo de terapia fotodinâmica como é demonstrado no estudo de Idris e colaboradores (2012). Segundo Allaker e Ren (2008), as nanopartículas de cálcio podem ser utilizadas como um adjuvante para a fabricação de vacinas contra esquistossomose, além da utilização de nanoemulsões contendo partículas ou proteínas virais como potenciais vacinas contra doenças infecciosas.

### *1.8.1 Biosensoriamento*

O desenvolvimento de biosensores a partir de nanopartículas se baseia em princípios de transdução ótica, especialmente em técnicas de fluorescência, ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) e quimiluminescência. Os nanosensores são amplamente utilizados em diversos setores científicos incluindo diagnóstico clínico; desenvolvimento de medicamentos; detecção de drogas ilícitas; qualidade e segurança alimentícia e monitoramento ambiental (Cao *et al*, 2014).

Nesse trabalho utilizamos nanosensores e a técnica de espalhamento dinâmico de luz para propor um novo método de diagnóstico para *Cryptococcus*, por uma Plataforma Portátil de Biodiagnóstico. Nessa metodologia os nanobastões são funcionalizados com anticorpo monoclonal 18B7 e o diagnóstico ocorre pela alteração de tamanho dos nanosensores quando estes se ligam a moléculas específicas. As medidas óticas são realizadas por um equipamento portátil, que utiliza o fenômeno de ressonância plasmônica para amplificar o espalhamento de luz pelos nanosensores em solução. A metodologia utilizada indica se houve ligação aos nanosensores e fornece informação sobre a massa molecular do ligante e da afinidade química entre os ligantes, em poucos minutos. Sendo assim, o diagnóstico é do tipo *point of care* de alta acurácia.



## 1. JUSTIFICATIVA

As micoses sistêmicas podem ser consideradas como doenças negligenciadas devido às altas taxas de morbidade e mortalidade no Brasil. Em relação à criptococose, o Brasil apresenta o maior número de casos por ano em comparação com outros países da América Latina, gerando alto número de atendimentos hospitalares. Infelizmente, há que se considerar que, quando populações negligenciadas são acometidas por doenças infecciosas, há pouco ou nenhum interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de medidas diagnósticas e/ou terapêuticas, pois a margem de lucro seria irrisória. Somam-se a isso os baixos índices de financiamento de pesquisas em criptococose (Rodrigues, 2016) e também o fato de a doença não ser reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada (Molloy *et al.*, 2017). Esta situação aumenta a responsabilidade de Organizações Não Governamentais (ONGs) e sistemas públicos de saúde (como o SUS) para que sejam instaladas medidas de diagnóstico, controle e tratamento da doença. Há, portanto, a necessidade de aumento da eficiência do SUS para a disponibilização de métodos diagnósticos acurados, rápidos e de baixo custo.

O uso da plataforma portátil de biodiagnóstico para o diagnóstico de *Cryptococcus* possui grandes vantagens: utiliza pequeno volume de amostra clínica (uma gota de sangue ou líquido é suficiente para o diagnóstico); a leitura dos resultados é efetuada em um espectrofotômetro portátil, de baixo custo, que pode ser levado a áreas remotas para estudos clínicos e epidemiológicos; e por fim, a liberação do resultado em poucos minutos. Um método rápido e sensível será de enorme utilidade para o diagnóstico rápido, instalação da terapêutica adequada e conhecimento da real epidemiologia da criptococose.

## 2. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver, validar e aplicar uma plataforma portátil para o diagnóstico de doenças causadas por *Cryptococcus* baseada em nanopartículas de ouro e medidas fotônicas.

### 3.2 Objetivos específicos

- Repicar linhagem H99 de *C. neoformans* para infecção de camundongos BALB/c;
- Obter soros a partir de sangue de camundongos infectados com *C. neoformans* e de camundongos saudáveis;
- Desenvolver nanosensores para a detecção de *Cryptococcus* spp.:
  - Síntese NBs;
  - Bioconjugação dos NBs ao anticorpo monoclonal 18B7 (estudo de concentrações);
  - Bloqueio de ligações inespecíficas por BSA (estudo de concentrações para bloqueio nos soros e/ou nos sensores).
- Testar com medidas de espalhamento ótico os nanosensores desenvolvidos:
  - Titulação de soros positivos e negativos para avaliar acurácia e especificidade dos nanosensores.

### 3. METODOLOGIA

#### 4.1 Repique de linhagens de *Cryptococcus*

Para esse procedimento foram utilizadas culturas de leveduras fornecidas pelo Laboratório de Micologia da UFMG. As linhagens escolhidas de *C. neoformans* H99. Essas leveduras foram repicadas em Agar Sabouraud Dextrose – ASD, através do método de espalhamento por estrias e incubadas à 37 °C por 48 horas.

#### 4.2 Obtenção de amostras clínicas

##### 4.2.1 Preparo do inóculo e infecção intratraqueal de *C. neoformans*

Os processos de infecção de camundongos *C. neoformans* e a obtenção dos soros foram fornecidos pelo Laboratório de Micologia – UFMG, onde se seguiu os procedimentos descritos abaixo.

Para a execução dos experimentos *in vivo*, utilizou-se camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com seis a oito semanas de idade, adquiridos no biotério do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Para *C. neoformans* utilizou-se o inóculo e o modelo de infecção intratraqueal desenvolvido no Laboratório de Micologia – UFMG.

A concentração do inóculo foi ajustada de modo que cada 30 µL continha  $1 \times 10^4$  leveduras viáveis. Após anestesia via intraperitoneal com solução de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) diluídas em PBS (137 mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,46mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), realizou-se uma pequena incisão medial longitudinal posterior ao mento do animal. Para a exposição da traqueia. A inoculação foi feita usando micro seringa de 100 µL carregada com 30 µL da suspensão fúngica. Após inoculação, a pele foi suturada e os animais foram acompanhados até completa recuperação.

Depois de realizados os procedimentos, todos os grupos experimentais (tabela 5) foram mantidos em gaiolas separadas, onde se forneceu água e ração *ad libitum*. Todos os

procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG).

Tabela 5. Grupos experimentais. Os camundongos utilizados foram separados em 2 grupos, cada um infectado com uma linhagem distinta, o grupo 2 foi denominado controle, uma vez que se utilizou camundongos saudáveis, não infectados por linhagens de *C. neoformans*.

Grupo	Linhagem	Número de camundongos
1	H99	5
2	Controle- não infectados	7

Fonte: Elaborada pelos autores.

#### 4.2.2 Obtenção de soros

Posteriormente aos 18 dias de infecção dos camundongos, iniciou-se o processo de obtenção de soros. Primeiramente, os camundongos foram anestesiados com 50  $\mu\text{L}$  da solução de ketamina e xilazina, administrados via intraperitoneal.

Em seguida, realizou-se um pequeno corte na veia porta – hepática de cada camundongo. Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur coletou-se o sangue, deixando-o em repouso durante 30 min, em seguida colocados sob refrigeração over – night, para evitar o processo de hemólise. No dia seguinte, esse material foi centrifugado a 1200 rpm durante 15 min a 4 °C para a obtenção dos soros.

### 3.3 Nanobastões de ouro

#### 4.3.1 Síntese

As sínteses químicas de nanobastões são divididas em dois tipos: mediada por semente e sem semente. O método mediado por sementes consiste na adição de partículas esféricas de aproximadamente quatro nm (sementes), em uma solução de crescimento contendo sais de ouro, nitrato de prata, ácido ascórbico e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um surfactante que atua como um agente de crescimento, que se liga preferencialmente nas

laterais dos NBs (Figura 13) (Ferreira *et al.*, 2017; Rostro-Kohanloo *et al.*, 2009; Stone *et al.*, 2011). O CTAB forma uma bicamada na superfície das partículas e possui carga resultante positiva em solução, conferindo estabilidade coloidal ao NBs. (Stone *et al.*, 2011) (Wang *et al.*, 2016).

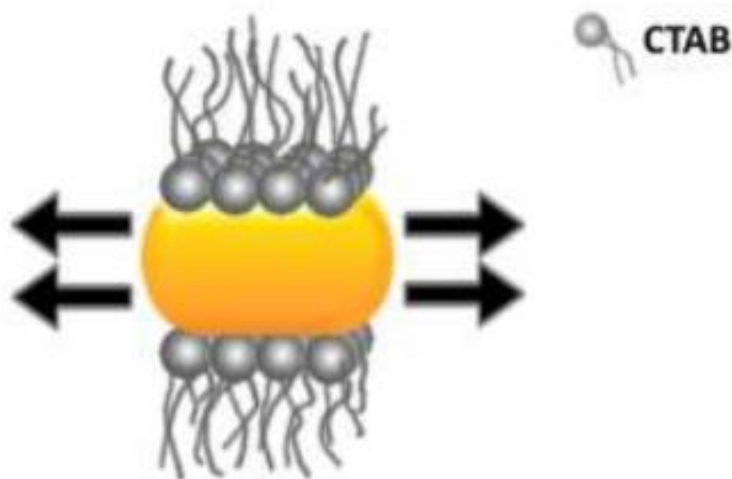


Figura 13. Síntese de nanobastão de ouro mediada por semente. A solução de crescimento é reduzida na presença das “sementes” nanométricas, assim o CTAB, agente direcionador de crescimento, facilita a formação do nanobastão através de uma ligação preferencial nas laterais das nanopartículas. Assim, o ouro disponível para a reação é adicionado aos polos da nanopartícula proporcionando um crescimento longitudinal da mesma. Fonte: Adaptado de Pearce *et al.*, 2007.

O método denominado sem semente é uma modificação do método mediado por sementes, onde são incluídos alguns aditivos orgânicos para controlar a relação de tamanho das nanopartículas de ouro produzidas (Lohse e Murphy, 2013). Um exemplo do processo sem semente é uma síntese mediada por resveratrol, um antioxidante natural obtido a partir de cascas de uva, utilizado como um agente redutor no processo de crescimento de NBs (Wang *et al.*, 2016).

Nesse trabalho os nanobastões de ouro foram sintetizados através do método sem semente, baseando-se no artigo “Seedless synthesis of GNR using resveratrol as a reductant” (Wang *et al.*, 2016). Nessa síntese, adiciona-se a uma solução aquosa de CTAB (50 mM) juntamente com ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$  0,5 mM), uma solução aquosa de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$  0,05 mM) e uma solução de resveratrol (5 mM) contendo álcool. Nesse processo ocorre a redução de Au (IV) para Au (I), observado através da alteração de cor da solução. Em seguida, adiciona-se uma solução aquosa de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$  0,015 mM), a 4 °C, que dispara a formação de sementes de ouro e o crescimento dos NBs. A solução é então

gradualmente aquecida até os 70 °C e permanece nessa temperatura por várias horas. Para essas concentrações são produzidos NBs com dimensões típicas de 50 nm de comprimento (L) e 25 nm de diâmetro (d), e, portanto, razão de aspecto (L/d) 2 (Figura 14). Variando as concentrações de nitrato de prata e resveratrol variam-se as dimensões do NBs produzidos.

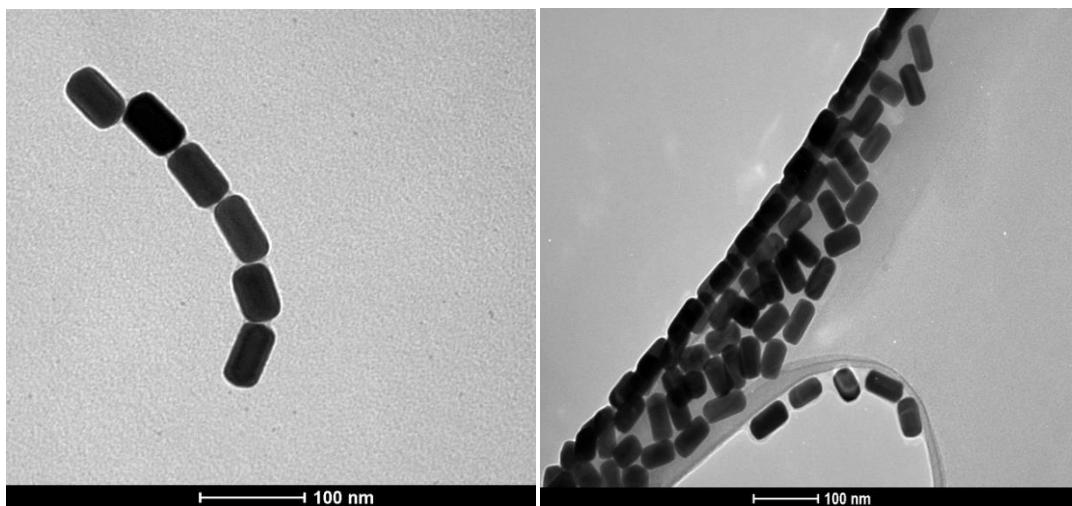


Figura 14. Microscopia eletrônica dos nanobastões de ouro produzidos pelo método sem semente, inspirado no artigo de (Wang *et al.*, 2016). Os nanobastões possuem dimensões típicas de 50 nm de largura e 25 nm de diâmetro. Medidas realizadas no Centro de Microscopia da UFMG, 2016.

#### 4.3.2 Funcionalização

O processo de funcionalização permite a ligação química de moléculas biológicas aos nanobastões de ouro. Os nanobastões produzidos possuem a lateral passivada por CTAB e as extremidades livres de moléculas. Para possibilitar ligações às extremidades dos bastões é necessário que se utilize um *linker*, ou seja, uma molécula que possua uma extremidade com afinidade para ligação no ouro e outra para ligação de biológicos, como antígenos e anticorpos. É possível realizar uma troca de superfície dos nanobastões, retirando o CTAB e substituindo-o por um linker (Su *et al.*, 2017), o que possibilita total cobertura dos Nbs por moléculas biológicas. No entanto, o processo é muito trabalhoso e delicado, envolvendo muitas etapas para evitar a perda de estabilidade coloidal dos NBs.

Como o método de detecção do espectrômetro de luz utilizado privilegia o espalhamento proveniente de partículas anisotrópicas, nesse trabalho efetuamos ligações somente nas extremidades dos NBs, via um *linker* denominado MUA (ácido - 11- mercaptoundecanóico). O MUA, representado estruturalmente pela figura 15, possui duas extremidades: uma

possibilita a ligação com moléculas contendo grupos amina, via um grupamento carboxila (-COOH); e outra que possibilita ligação ao nanobastão de ouro, por um grupamento tiol (-SH) (Bolat *et al.*, 2013).

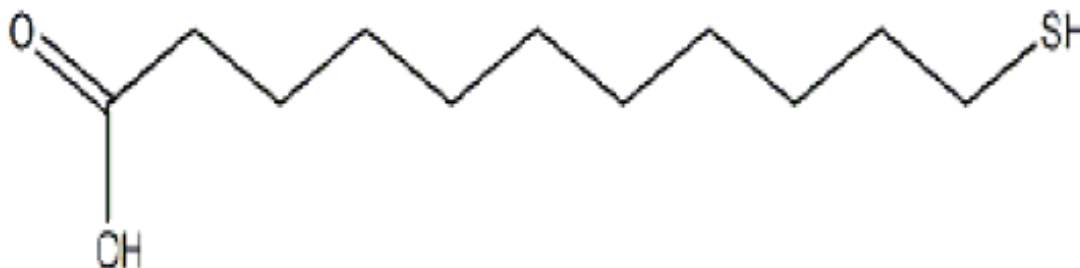


Figura 15. Representação esquemática da cadeia química do ácido – 11 – mercaptoundecanóico (MUA). Fonte: Adaptado de Bolat *et al.*, 2013.

O procedimento para funcionalização dos nanobastões de ouro sintetizados nesse trabalho foi inspirado no artigo “Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods” (Yu *et al.*, 2007) e segue as seguintes etapas:

- 1- Para a ligação do MUA aos nanobastões utiliza-se uma solução de MUA a 20 mM, preparada a partir da adição de 4.4 mg de MUA (11- Mercaptoundecanoicacid 95% Sigma- Aldrich 450561-5G) a 1 mL de álcool etílico absoluto P.A. (Química Moderna QMA00001123401000). Para uma solução de 50 ml de Nbs a uma concentração de 200 pM utiliza-se 7,6 microlitros de MUA a 20 mM, deixando sob agitação lenta por 12 horas. Em seguida, centrifuga-se a solução a 10000 G por 10 minutos e resuspende-se em uma solução de CTAB na concentração de 10 mM.
- 2- Para comprovar se ocorreu a ligação entre Nbs e as moléculas de MUA é realizado o teste da lectina, que consiste na utilização de concavalina A (Concavalin A from *Canavalia ensiformis* – Jack Bean, Tipo IV lyophilized power – Sigma Aldrich L7647), um tipo de lectina que possui afinidade de se ligar à carboidratos. A Con A possui quatro sítios de ligações possíveis, que estão disponíveis para a ligação às moléculas de MUA quando são adicionados íons ativadores (cloreto de magnésio anidro e cloreto de cálcio). Para o teste adiciona-se 320 µL de Nbs+ MUA e uma quantidade em excesso de concavalina A juntamente com os íons ativadores. Para

comprovar que há moléculas de MUA ligadas aos Nbs deve-se observar um aumento no tamanho dos NBs em solução.

- 3- Para a ativação do grupo carboxila do MUA e sua ligação à moléculas contendo amina (antígenos e anticorpos) utiliza-se um processo de EDAC/NHS (Figura 16), amplamente difundido na literatura.

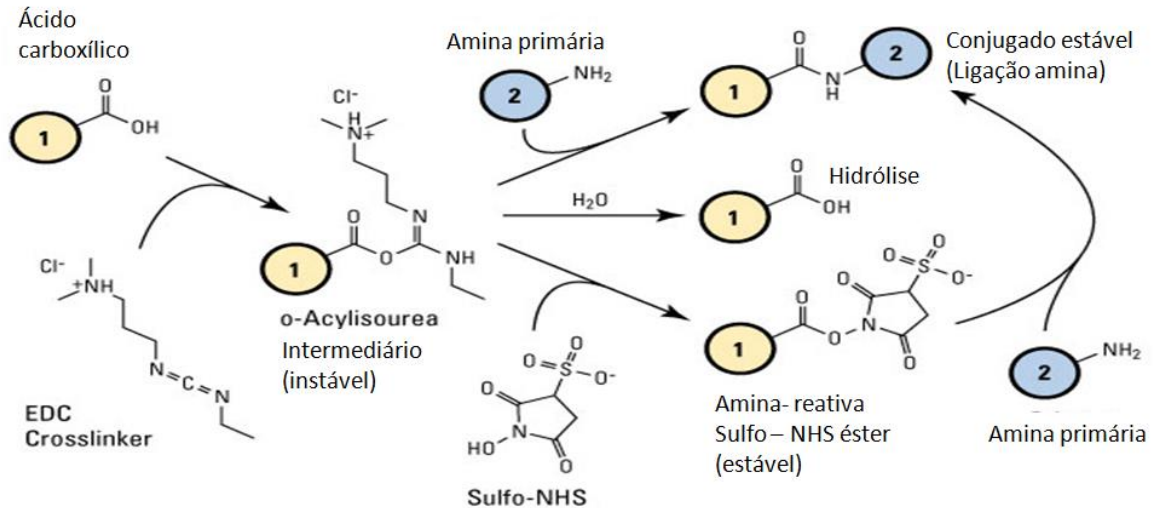


Figura 16. Esquema da modificação química mediada por EDAC/NHS que ocorre no grupo carboxila do MUA para ligação de aminas. Fonte: Thermo Scientific, 2012.

- 1- Após a ativação das carboxilas, ocorre a adição do anticorpo monoclonal 18B7 e a incubação durante 60 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo é previamente diluído em PBS e adicionado em diferentes concentrações. O anticorpo monoclonal 18B7, também chamado de anticorpo anti – glicoronoxilomanana (GXM) é capaz de reconhecer fragmentos da cápsula polissacarídea de *C. neoformans*.
- 2- Após o período de incubação, centrifuga-se a amostra a 5000 G por 5 minutos e resuspende-se em uma solução de PBS (pH 7,4) contendo CTAB a 10mM.
- 3- O último passo do processo é ligação de moléculas de BSA (albumina bovina), via interação eletrostática, à superfície lateral dos nanosensores. Essa ligação funciona como um bloqueio para evitar ligações não específicas ao CTAB presente nas laterais dos NBs.

Ao longo do processo de funcionalização é feita uma amostra controle que passa por todas as etapas citadas acima, porém sem a adição de anticorpo monoclonal 18B7. A amostra controle é testada juntamente com os nanosensores.



### 3.4 MEDIDAS ÓTICAS

#### 4.4.1 Espalhamento Dinâmico de Luz

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS), ou Espectroscopia de Correlação de Fotóns (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), representada através da figura 17, é uma metodologia muito utilizada para avaliar as dimensões de partículas em suspensão. A técnica consiste na análise das flutuações de luz espalhada pelas partículas (Figura 18), a partir da qual se podem obter informações sobre o movimento delas. Em soluções monodispersas no qual as partículas executem movimento Browniano pode-se utilizar DLS para extrair o coeficiente de difusão das partículas, e então, seu tamanho (Glidden e Muschol, 2016).

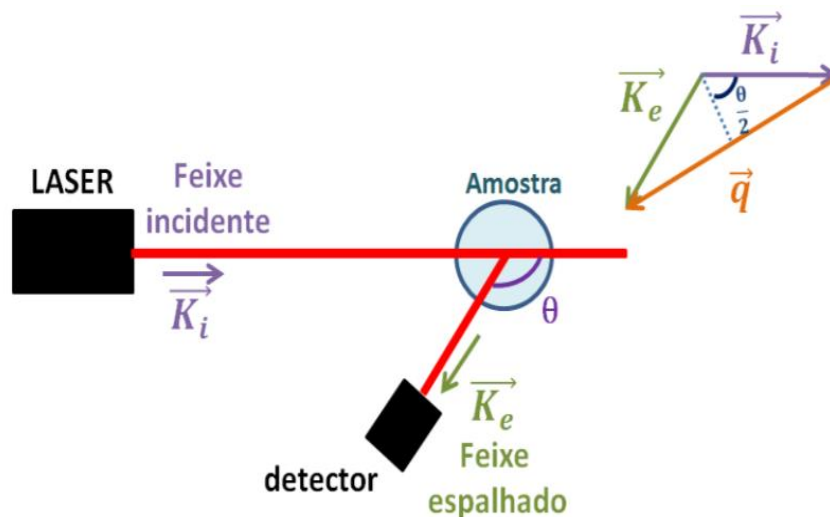


Figura 17. Esquema do aparato experimental utilizado em medidas de espalhamento de luz. Fonte: Nomura, 2018.

Essa técnica utiliza luz visível como fonte de energia e um detector para coletar a intensidade de luz espalhada nos ângulos  $\theta$ , assim pode-se obter características da radiação espalhada e informações sobre os processos difusos (Figura 18). O aparelho possui um correlator, que é responsável por medir o grau de semelhança entre os sinais de intensidade em diferentes tempos, obtendo o coeficiente de difusão e o tamanho médio das partículas, através da função de autocorrelação (Nomura, 2018).

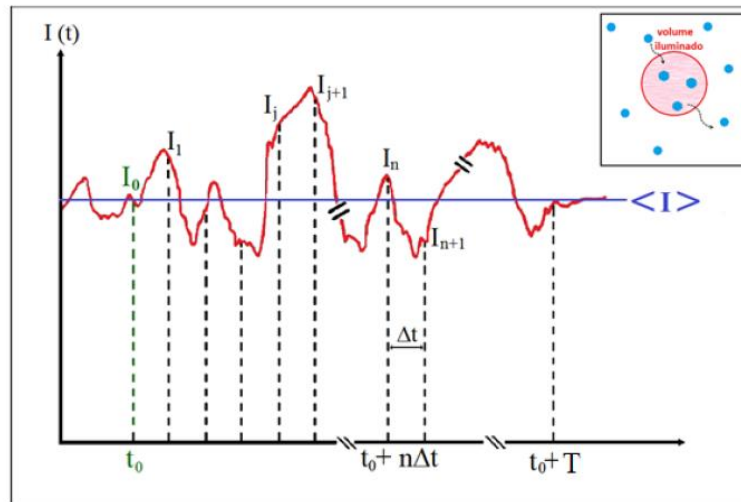


Figura 18. Análise de flutuações de intensidade de luz espalhada pelas nanopartículas. Fonte: Glidden e Muschol, 2016.

Para o caso de partículas cilíndricas com tamanho  $L$  e diâmetro  $d$ , obtém-se informação sobre os coeficientes translacional ( $D_T$ ) e rotacional ( $D_R$ ), os quais podem ser modelados pelas equações (1) e (2):

$$(1) \quad D_T = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} [\ln\sigma + 0.312 + 0.565\sigma - 0.1\sigma^2]$$

$$(2) \quad D_R = \frac{3k_B T}{\pi\eta L^3} \left[ \ln\sigma - 0.662 + \frac{0.917}{\sigma} - \frac{0.05}{\sigma^2} \right]$$

Sendo  $K_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura,  $\eta$  a viscosidade do solvente,  $\sigma$  a razão de aspecto do cilindro, dada por  $L/d$  (Glidden e Muschol, 2016).

#### 4.4.2 Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz

O dispositivo Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz (EPEL) (Figura 19), patente número BR 10 2016 009765 7 foi desenvolvido no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos da UFMG, pelos professores Oscar Mesquita, Lívia Siman e Luiz Orlando Ladeira. O instrumento se baseia na correlação de fótons para medir e caracterizar o espalhamento dinâmico de luz a partir de soluções coloidais, e determinar o tamanho das

partículas em suspensão. Uma das aplicações do EPEL é em biodiagnóstico, através da análise do tamanho de nanosensores em solução.



Figura 19. Espectrômetro Portátil de Espalhamento de Luz (EPEL).

O dispositivo EPEL possui as mesmas aplicações de um leitor de ELISA convencional, porém é mais simples e prático, sendo mais rápido (resultado em minutos), com menor custo, podendo ser operado por não especialistas e transportado para os diferentes ambientes, tanto para postos de saúde; hospitais; clínicas e para áreas de difícil acesso. Esse dispositivo EPEL juntamente com os nanosensores constitui a Plataforma Portátil de Biodiagnóstico (PPB).

Quando os nanosensores estão dispersos em solução e executando movimento Browniano, apresentam uma dinâmica característica. Com a Plataforma Portátil de Biodiagnóstico pode-se medir os coeficientes de difusão translacional e rotacional dos nanosensores em solução, e a partir destes, determinar o tamanho das partículas em suspensão. Esses coeficientes são alterados quando moléculas como antígenos e anticorpos se ligam aos nanosensores. Mais especificamente, a ocorrência de ligações promove uma diminuição nos coeficientes de difusão rotacional dos nanobastões, devido ao aumento da massa total da partícula e da força de atrito viscosa. Quantificando essa diminuição dos coeficientes de difusão, define-se a alteração de tamanho e massa no NB e pode-se determinar se houve ou não a ligação antígenos e anticorpos e ainda, estimar a massa molecular das moléculas ligadas. Além disso,

realizando-se medidas sistemáticas em concentrações controladas de antígenos e anticorpos, é possível quantificar as moléculas ligantes e definir a afinidade entre as mesmas.

A função de autocorrelação temporal de intensidades (FACTI) de luz espalhada por nanosensores em solução é dada pela equação 3 e possui decaimento exponencial (gráfico 1). Na equação,  $I(t)$  é intensidade de luz espalhada em um instante  $t$ ,  $I(t + \Delta t)$  é a intensidade de luz espalhada no instante  $t + \Delta t$  e tau ( $\tau$ ) é o tempo característico ou tempo de decaimento da função de autocorrelação temporal de intensidades. Para o caso de nanobastões dispersos em solução o tempo de decaimento é dado pela equação 4, onde  $D_T$  e  $D_R$  são dados pelas equações 1 e 2 e  $q$  é o vetor de onda do espalhamento.

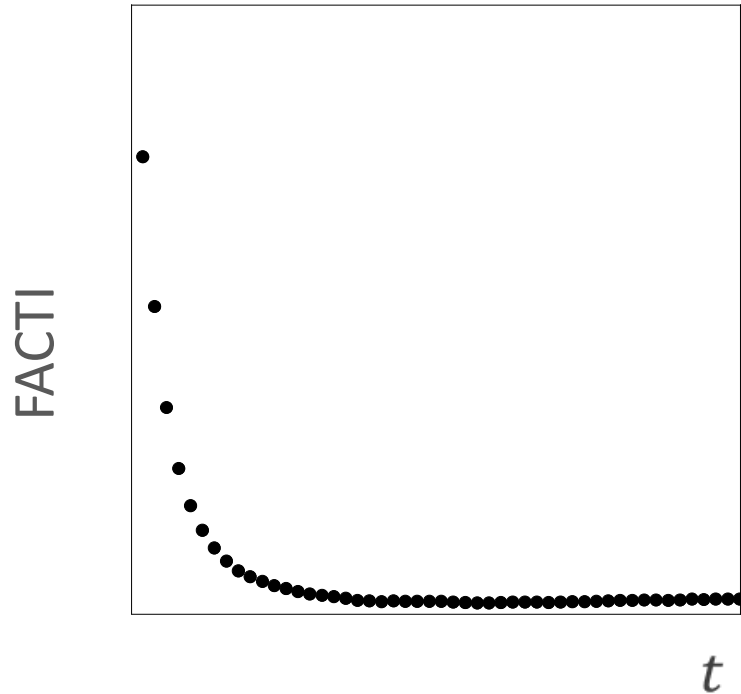


Gráfico 1. Função de autocorrelação temporal de intensidades ao longo do tempo.

$$(3) \quad \text{FACTI} \propto \frac{\langle I(t)I(t+\Delta t) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle} \propto e^{-t/\tau}$$

$$(4) \quad \tau = \frac{1}{2q^2 D_T + 12D_R}$$

Manipulando-se as equações (1), (2) e (4), obtém-se que o tamanho L dos bastões em solução é dado por:

$$(5) \quad L = \left( \frac{\tau - \tau_e}{C} \right)^{1/3}$$

Onde  $\tau_e$  é o tempo da eletrônica do detector da luz espalhada e C é uma constante. Pelas equações (1), (2), (3) e (4) observa-se que as medidas de correlação temporal da luz espalhada por nanobastões são muito sensíveis à alterações do tamanho L dos bastões, o que torna a técnica de DLS interessante para aferir a ocorrência de ligações aos nanosensores.

Para as medidas no EPEL utiliza-se 320  $\mu$ l de solução de nanobastões a uma concentração típica de 200 pM, que é adicionada a um poço de acrílico com fundo chato de poliestireno (Corning Life Sciences, USA). Com as medidas é possível acompanhar todos os passos da funcionalização dos nanobastões e caracterizar as ligações em cada etapa. A título de exemplo, no gráfico abaixo temos as funções correlações para nanobastões livres (círculos), nanobastões + MUA+ ligante 1 (quadrados) e nanobastões + MUA + ligante1 + ligante 2 (triângulos). Comparando o tempo de decaimento de cada função é possível confirmar a ocorrência da ligação de moléculas aos NBs e utilizando a equação (5) é possível calcular o tamanho L dos bastões em cada etapa. A relação (6) de Erickson (2009), nos permite relacionar a massa molecular (MW em Daltons) de proteínas globulares com o seu tamanho ( $L_p$ ) em solução, tal que:

$$(6) \quad L_p = \sqrt[3]{(3 \times MW)}$$

Utilizando as equações (5) e (6) pode-se estimar o peso molecular das moléculas ligantes e o tamanho, em nanômetros, da molécula que se ligou às extremidades do nanosensores e, assim obter a alteração de tamanho dos mesmos.

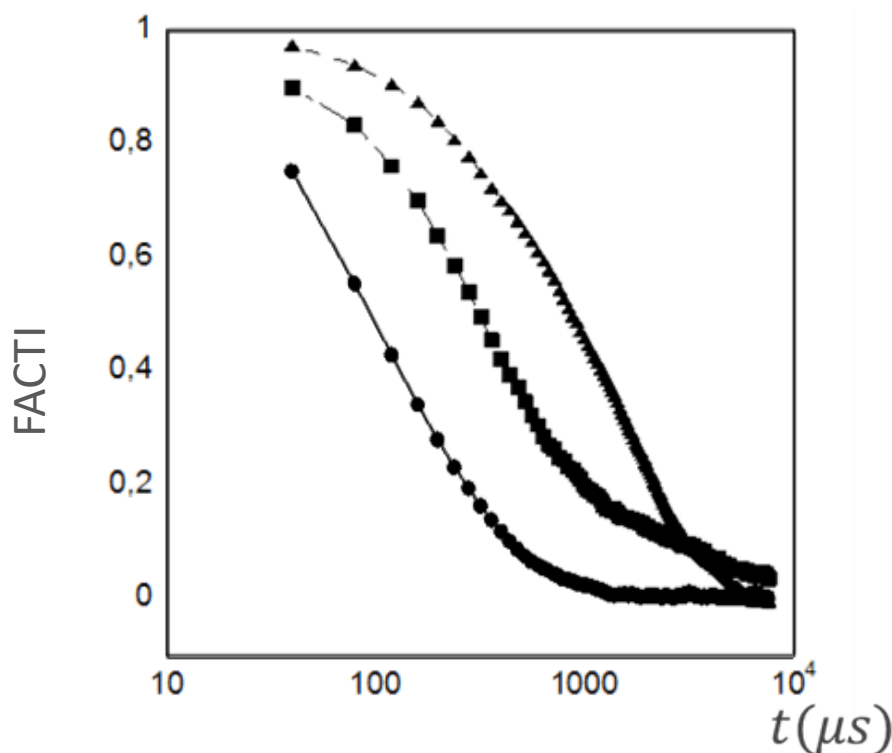


Gráfico 2. Funções de autocorrelação temporal do nanobastão (círculo), nanobastão + ligante 1 (quadrado) e nanobastão + ligante 1 + ligante 2 (triângulo).

#### 4.4.3 Espectroscopia UV-Visível

Em decorrência das propriedades ópticas dos nanobastões de ouro, a interação de moléculas em sua superfície é refletida em alterações da ressonância plasmônica, observada através de deslocamentos do pico de ressonância longitudinal. Os deslocamentos podem ser medidos por meio de medidas de espectroscopia óptica UV-Visível (UV- VIS).

A técnica UV - VIS (Figura 20) se baseia em medidas de absorção e espalhamento (extinção) da radiação eletromagnética nas regiões do espectro visível e ultravioleta por partículas em solução. O equipamento possui um monocromador, responsável por separar a luz no comprimento de onda desejado. Em seguida, essa luz passa pela amostra, onde é absorvida, refletida e espalhada. O detector coleta a luz transmitida e a transforma em um sinal elétrico, que gera o espectro de extinção em relação ao comprimento de onda. O padrão branco em espectrofotometria é utilizado para eliminar interferências e deve conter todos os constituintes do sistema, exceto a amostra a ser analisada (Rosa; Gauto e Gonçaves, 2013).

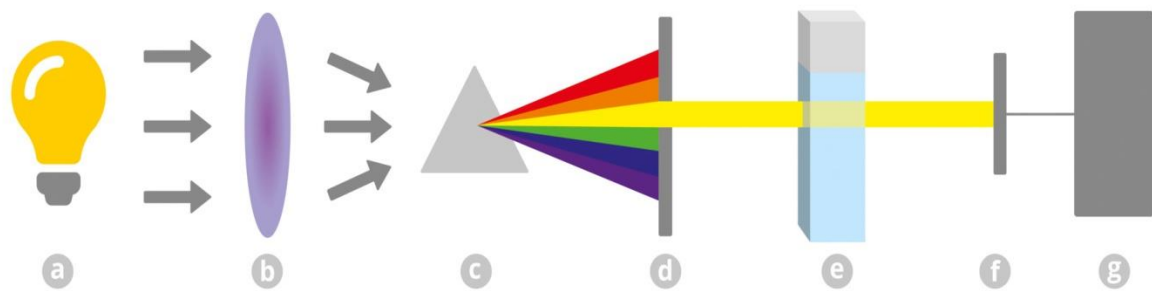


Figura 20. Esquema da técnica de UV- VIS. . (A) Fonte de luz. (B) Colimador (C) Prisma ou rede de difração (D) Fenda seletora (E) Cubeta (F) Detector (G) Leitor. Fonte: Kasvi, 2018.

Para as medidas de UV-VIS, 200  $\mu\text{L}$  de solução contendo nanobastões é colocada em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm e lida no aparelho Ray- Leigh VIS- 723G (Termo Scientific). A faixa de radiação utilizada é de 400 a 900 nm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese dos nanobastões de ouro

Ao longo do desenvolvimento do trabalho realizou-se cerca de vinte processos de síntese de NBs baseados no artigo “Seedless synthesis of GNR using resveratrol as a reductant” (Wang *et al.*, 2016) e os principais resultados estão apresentados a seguir.

#### 5.1.1 Caracterização dos nanobastões de ouro

Os dados gerados a partir da análise por UV – VIS das sínteses produzidas foram visualizados pelo programa KaleidaGraph e um exemplo está representado no gráfico 3. Observa-se um pico na extinção relativo à LSPR longitudinal em 619 nm e outro pico em 524 nm relativo à LSPR transversal e uma eficiência de 1,4, dada pela equação 8 abaixo. Segundo Omi (2012), NBs com LSPR em 619 nm possuem razão de aspecto 2,01, dada pela equação 7 abaixo. A partir da leitura ótica pelo dispositivo EPEL, obtém-se que o tau médio ( $\tau$ ) = 11  $\mu$ s, o que retorna um tamanho de L= 44 nm para os Nbs (equação 5) e, portanto, um diâmetro d= 22 nm. Sabendo-se o valor da densidade ótica em 400 nm define-se a massa total de ouro na solução (Scarabelli *et al.*, 2015) e, a partir do tamanho dos Nbs e da densidade do ouro (19,3 g/cm<sup>3</sup>), calcula-se a massa de cada bastão. Dividindo-se a massa total de ouro na solução pela massa de cada bastão obtém-se a concentração de NBs em solução.

$$(7) \text{ A.R.} = \left[ \frac{(\lambda \text{ máximo} - 467,31)}{2,36} + 41,24 \right] \times \frac{1}{52,58}$$

$$(8) \text{ Eficiência} = \frac{\text{O.D. } \lambda \text{ Longitudinal}}{\text{O.D. } \lambda \text{ Transversal}}, \text{ sendo O. D. a densidade ótica.}$$

A partir de uma análise da amplitude das funções de autorrelação temporal de intensidades para diferentes concentrações das soluções dos NBs, define-se a concentração ótima que retorna o máximo espalhamento de luz. Essa concentração foi definida para diferentes



sínteses, sendo de aproximadamente 150 pM. Assim, essa concentração foi mantida para todos os experimentos.

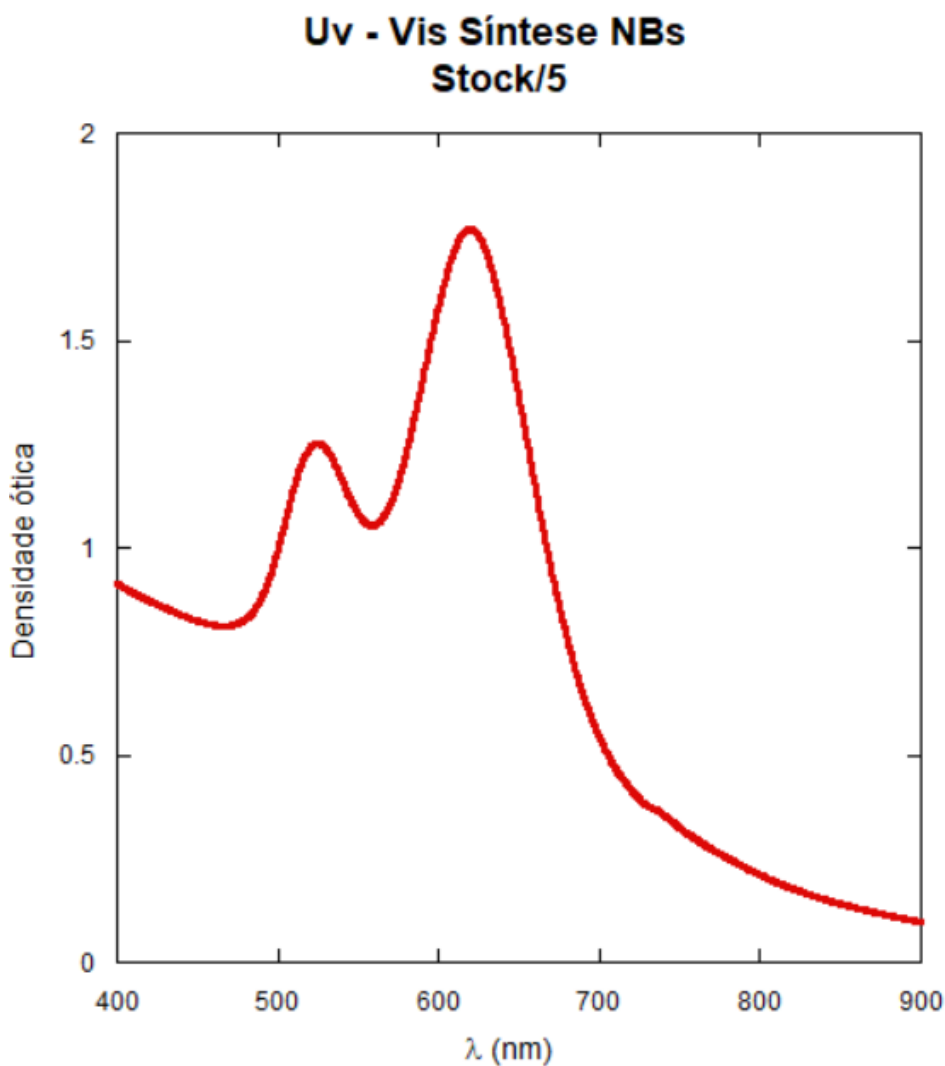


Gráfico 3. Espectroscopia de UV - VIS dos nanobastões de ouro sintetizados. O pico relativo à LSPR transversal está em 524 nm e o pico LSPR longitudinal em 619 nm.

As características físico – químicas dos NBs do gráfico 3 estão representadas na tabela 6, onde o volume (V) e a área total são obtidos considerando os nanobastões como cilindros com calotas semiesféricas nas extremidades. A tabela 6 fornece todos os parâmetros para a funcionalização dos NBs.

Tabela 6. Características físico - químicas dos Nbs sintetizados.

Características Físico - Químicas NBs	
Concentração NBs	2,29 nM
Concentração CTAB	25 mM
Razão de Aspecto	2,01
Largura	44 nm
Diâmetro	22 nm
Volume	14104 nm <sup>3</sup>
Área da Calota	1529 nm <sup>2</sup>
Área total	4598 nm <sup>2</sup>
Tau médio ( $\tau$ )	11 $\mu$ s
Eficiência	1,4
$\lambda$	619 nm

Fonte: Elaborado pelos autores.

### 5.1.2 Problemas com resveratrol

O resveratrol é um polifenol natural obtido a partir de sementes de uvas, caracterizado como um importante antioxidante. No processo de síntese de nanobastões de ouro, esse composto age como um redutor fraco, que pode ter sua ação alterada na presença de impurezas, umidade e exposição à luz (Wang *et al.*, 2016).

A síntese de NBs é um processo muito criterioso, onde qualquer alteração pode ocasionar diversos problemas. É necessário um rígido controle de temperatura e de agitação durante todo o processo de síntese. Além disso, observa-se uma grande variação de resultados dependendo do resveratrol utilizado no processo. Por exemplo, ao longo do desenvolvimento do trabalho houve mudanças no fornecedor do resveratrol utilizado e isso acarretou em sínteses de baixa eficiência com excessiva formação de nanoesferas, como observado no gráfico 4. Após alguns ajustes finos na prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e na temperatura da síntese, se obteve uma melhor eficiência e a quantidade de esferas em relação aos Nbs foi menor, representado pelo gráfico 5.

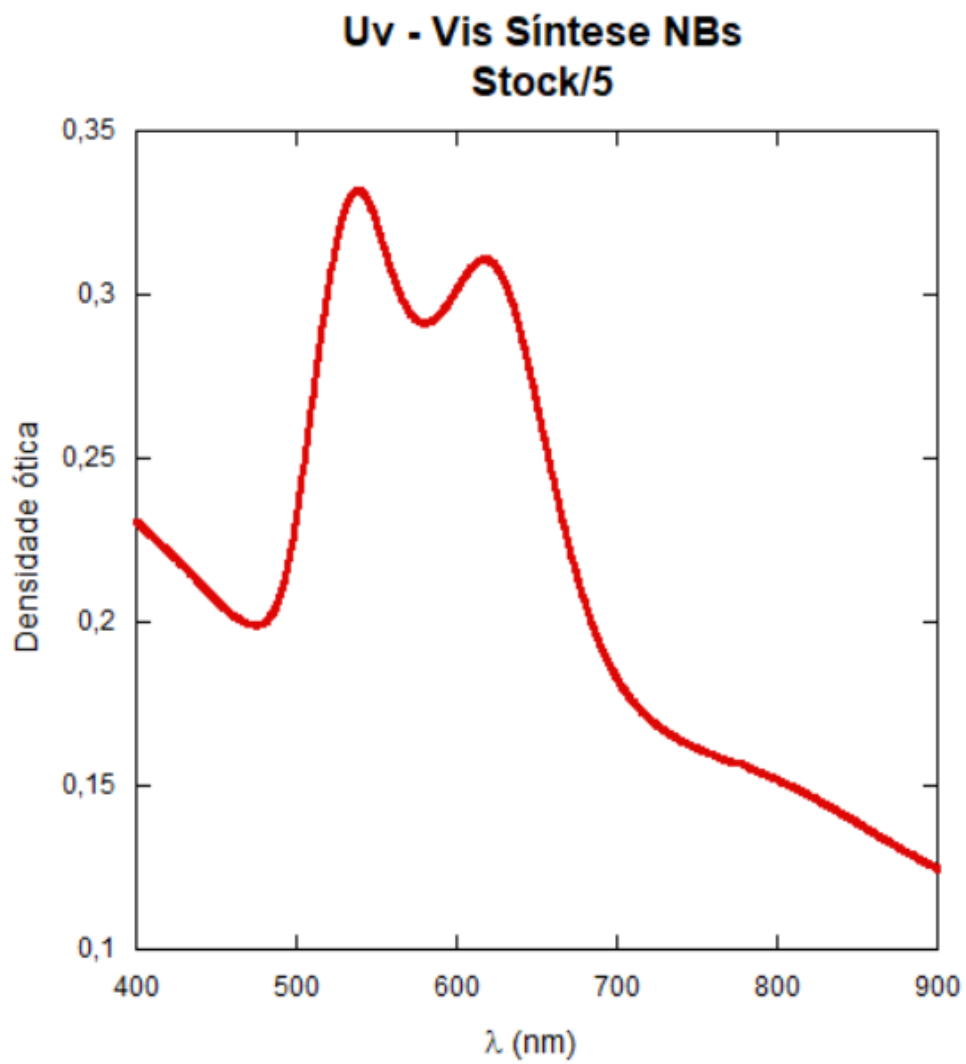


Gráfico 4. Sínteses de NBs com baixa eficiência. No gráfico observa-se menor eficiência e maior quantidade de nanoesferas em relação aos Nbs, resultando em uma eficiência de 0,91.

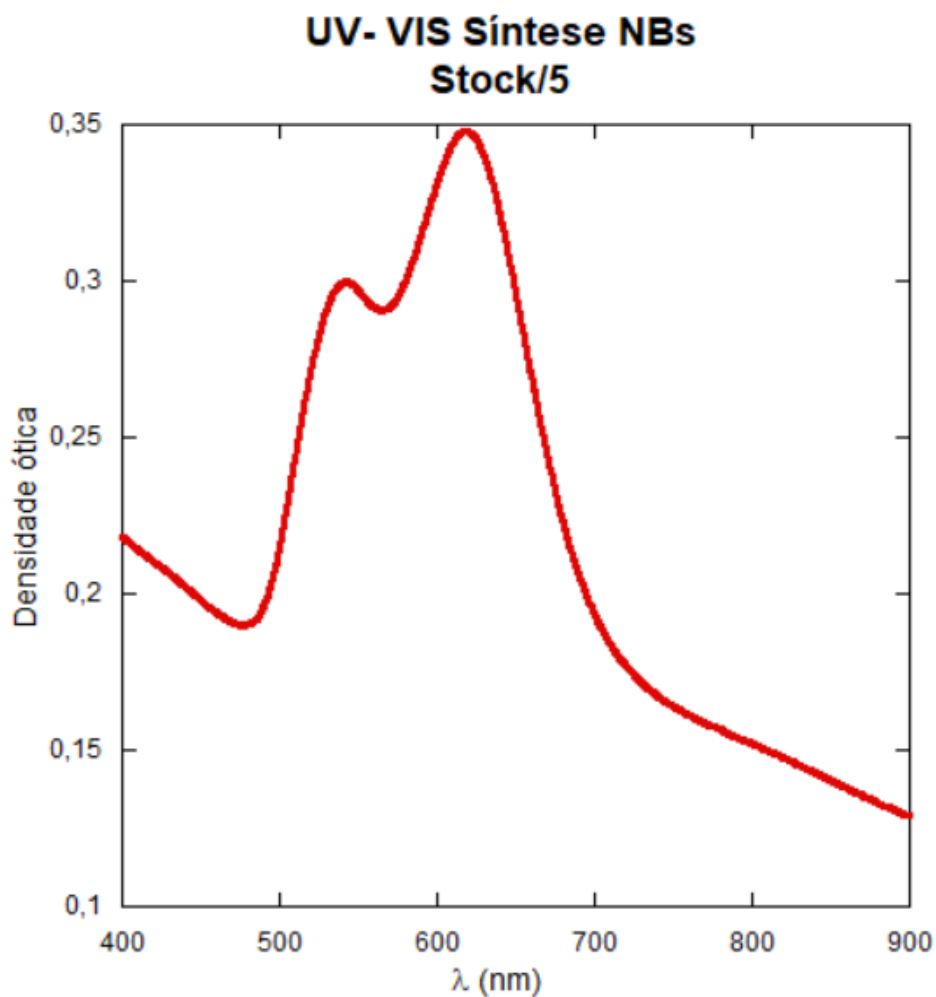


Gráfico 5. Sínteses de NBs com baixa eficiência, após alguns ajustes. Observa-se uma maior concentração de NBs, resultando em uma eficiência de 1,2.

## 5.2 Conjugação de Ácido – 11 – mercaptoundecanóico

### 5.2.1 Caracterização de Ácido – 11 – mercaptoundecanóico

A partir da análise por UV – VIS dos NBs + MUA, obtém-se resultados como representado no gráfico 6. Nesse, observa – se um máximo em 617,5 nm, deslocado de - 1,5 nm em relação ao máximo de Nbs não conjugados, o sugere a ligação de MUA aos nanobastões.

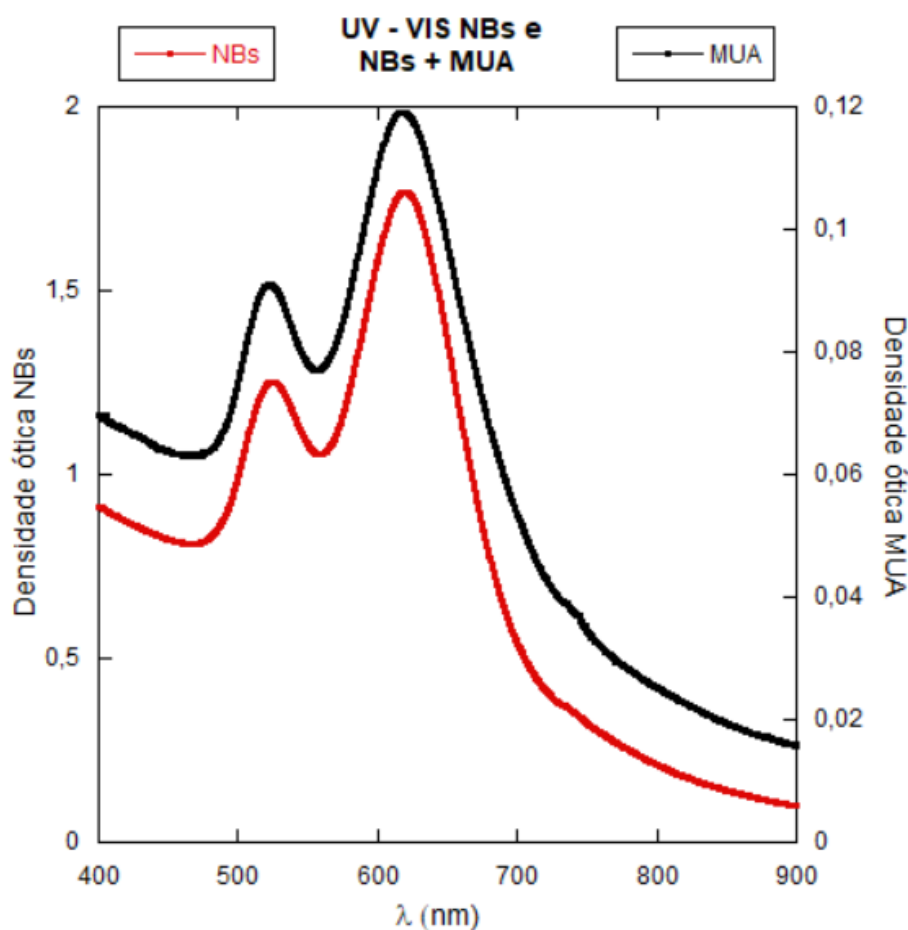


Gráfico 6. Análise por espectroscopia de UV- VIS comparando NBs antes (vermelho) e após (preto) a conjugação com MUA. Observa-se o deslocamento do espectro, sugestivo de ligação do MUA aos NBs.

Estudos anteriores relacionados ao diagnóstico de FiV (Vírus da Imunodeficiência Felina) indicaram que a variação mínima em tamanho detectável pelo EPEL é de 3 nm. Como o MUA possui peso molecular baixo ( $MW = 0,218$  KDa), o que resulta no aumento de aproximadamente 1 nm, realiza-se o teste da lectina, de modo que o aumento do tau possa ser observado caso tenha ocorrido essa ligação. Após a realização desse teste, observou o aumento do tau de  $16,5 \mu s$  para  $240,6 \mu s$ , confirmando a presença das moléculas.

### 5.3 Funcionalização dos nanobastões de ouro

Durante o desenvolvimento do trabalho, foram realizadas diversas funcionalizações na tentativa de encontrar a concentração ideal para o funcionamento dos nanosensores. Os resultados de maior relevância estão descritos abaixo. Para determinação da concentração de

anticorpo a ser utilizada na funcionalização supõe – se que toda a área das extremidades dos NBs (calotas semiesféricas) está coberta por MUA. Além disso, considera - se a área ocupada pela ligação de um anticorpo. Dividindo - se a área das duas calotas semiesféricas (equivalente a uma esfera) de raio  $d/2$  pela área ocupada por um anticorpo, de raio de aproximadamente 4 nm, obtêm – se o número máximo de anticorpos que podem se ligar por nanobastão. Essa concentração é denominada 1:1.

### *5.3.1 Caracterização nanobastões de ouro funcionalizados na concentração 1:1*

Os dados gerados a partir da análise por UV – VIS dos nanosensores funcionalizados na concentração 1:1 foram visualizados pelo programa KaleidaGraph e os resultados estão representados pelo gráfico 7. Observa – se pico relativo à LSPR longitudinal em 619 nm. A partir da leitura pelo dispositivo EPEL, obtêm-se que o tau médio ( $\tau$ ) dos NBs de 20,4  $\mu$ s, o que corresponde um aumento de aproximadamente 7 nm para cada lado do nanobastão. Esse valor coincide com o tamanho de IgG completo. Pelo gráfico, nota – se a densidade ótica máxima de 0,06 para os nanosensores compara com 0,12 dos NBs + MUA. Essa diminuição ocorre por perda de material devida à agregação durante o processo de funcionalização. Esse efeito indica que a concentração 1:1 é muito alta, possibilitando ligações via interação eletrostática de anticorpos as laterais dos NBs. Essas ligações ocasionam a perda de estabilidade coloidal dos nanosensores em solução.

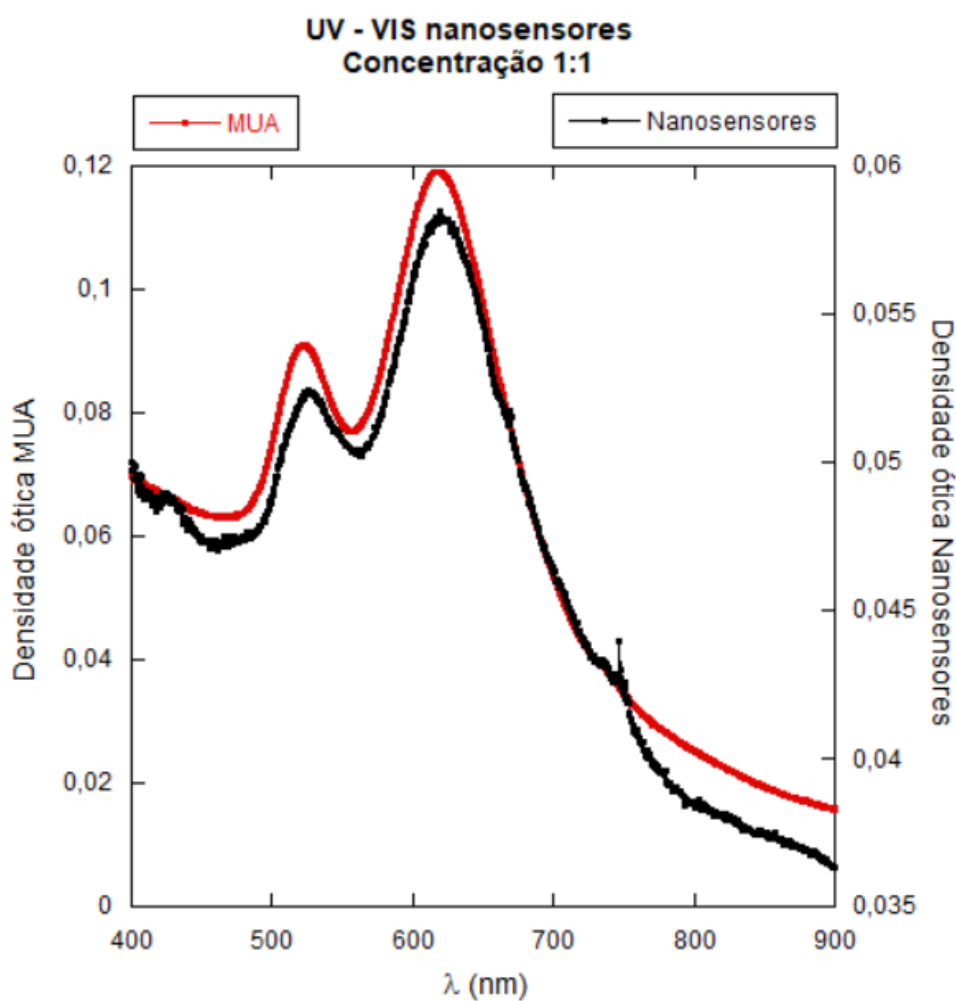


Gráfico 7. Análise por espectroscopia de UV- VIS dos NBs funcionalizados na concentração 1:1.

### 5.3.2 Caracterização nanobastões de ouro funcionalizados na concentração 0,2:1

Os dados gerados a partir da análise por UV – VIS dos nanosensores funcionalizados na concentração 0,2:1 foram visualizados pelo programa KaleidaGraph e os resultados estão representados pelo gráfico 8. Observa – se pico relativo à LSPR longitudinal em 620,5 nm. A partir da leitura pelo dispositivo EPEL, obtém-se que o tau médio ( $\tau$ ) dos NBs de 20,0  $\mu$ s, o que corresponde a um aumento de aproximadamente 7 nm para cada lado do nanobastão de ouro, coincidindo com o tamanho de um IgG completo.

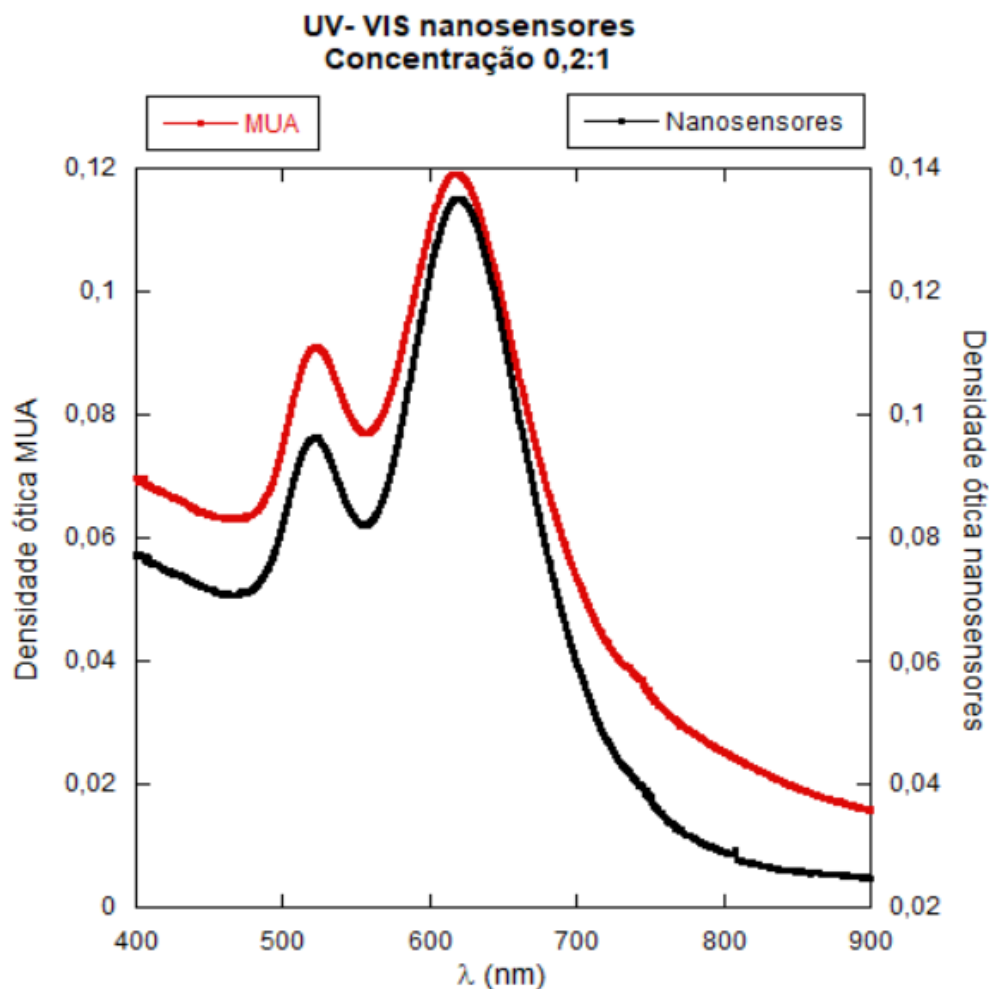


Gráfico 8. Análise por UV – VIS dos nanosensores na concentração 0,2:1. Os nanosensores (preto) apresentam um pico máximo de absorbância em 620.5 nm com  $\Delta\lambda$  de -3nm e concentração aproximada de 848 pM.

#### 5.4 Blocker (BSA)

A albumina sérica bovina (BSA) é utilizada para saturar o excesso de sítios de ligações na superfície dos NBs de ouro, impedindo ligações do tipo não específicas. Em estudos anteriores relacionados ao FeLV (Vírus da Leucemia Felina) utilizando medidas no EPEL, pesquisou-se a concentração mais eficaz de BSA para impedir ligações não específicas aos Nbs. Os resultados estão representados nos gráficos 5.7 e 5.8.

Os testes foram realizados a partir de soros negativos e positivos para FeLV, onde testou-se os soros sem a adição do blocker (círculos), nas concentrações de 1000 BSA (quadrados), 2000 BSA (losangos) e 3000 BSA (triângulos) por nanobastão.



Para a titulação dos soros negativos (gráfico 9) observa – se que sem adição do blocker o tau inicial foi de aproximadamente 20  $\mu\text{s}$  chegando até 160  $\mu\text{s}$  com cerca de 15  $\mu\text{L}$  de soro titulado, indicando agregação dos nanosensores. Para a concentração de 1000 BSA por nanosensor, observa – se o tau inicial foi de aproximadamente 20  $\mu\text{s}$  e o tau final de aproximadamente 130  $\mu\text{s}$  com cerca de 20  $\mu\text{L}$  de soro titulado, indicando também a rápida agregação dos nanosensores. Na concentração de 2000 BSA por nanosensor, observa - se menor crescimento do tau, quando comparado com as outras concentrações, sendo o tau inicial de aproximadamente 20  $\mu\text{s}$  e final próximo a 100  $\mu\text{s}$ . Quando se observa a titulação com o blocker na concentração de 3000 BSA por nanobastão, houve maior titulação do soro chegando até aproximadamente 220  $\mu\text{L}$ , com tau inicial de aproximadamente 20  $\mu\text{s}$  e o tau final de aproximadamente 130  $\mu\text{s}$ , o que indica maior estabilidade para os nanosensores.

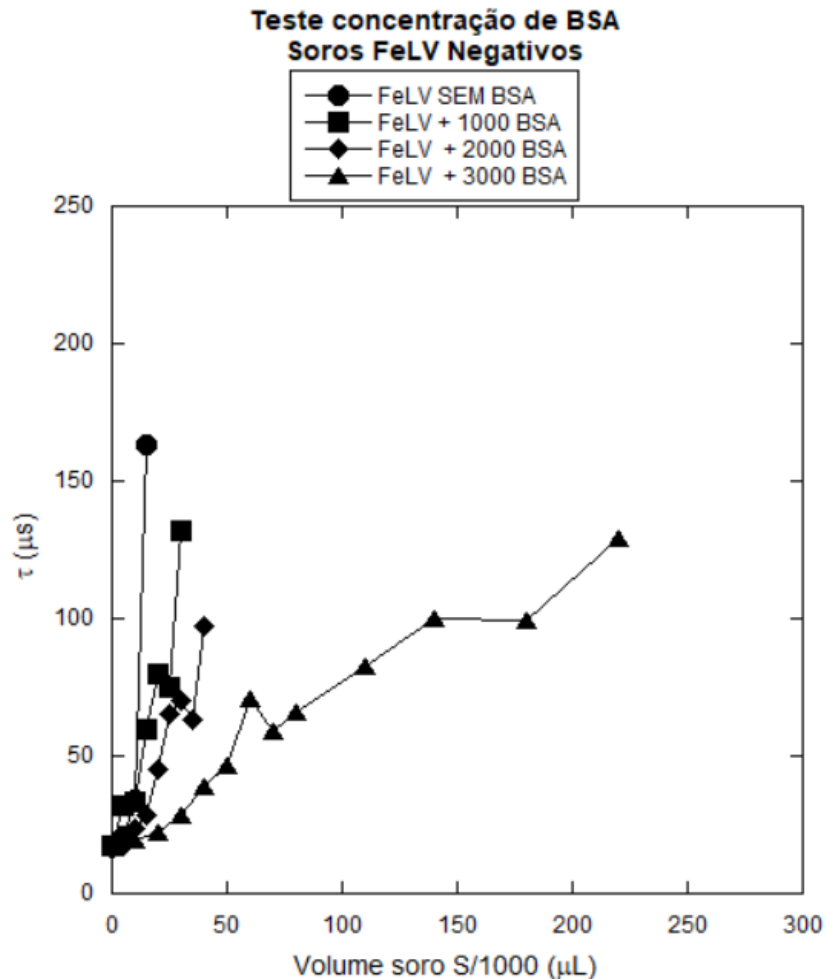


Gráfico 9. Estudo de concentrações de BSA para impedir ligações não específicas em soros negativos para FeLV.

Para a titulação dos soros positivos (gráfico 10) observa – se que sem adição do blocker o tau inicial foi de aproximadamente 20  $\mu\text{s}$  chegando até próximo de 240  $\mu\text{s}$  com cerca de 15  $\mu\text{L}$  de soro titulado, indicando agregação dos nanosensores. Para a concentração de 1000 BSA por nanosensor, observa – se o tau inicial de aproximadamente 20  $\mu\text{s}$  e o final de 130  $\mu\text{s}$  com cerca de 20  $\mu\text{L}$  de soro titulado, indicando também a agregação dos nanosensores. Para a concentração de 2000 BSA por nanosensor, observa – se tau inicial de aproximadamente 20  $\mu\text{s}$  e tau final de aproximadamente 100  $\mu\text{s}$  com cerca de 120  $\mu\text{L}$  de soro titulado, também indicando rápida agregação. E para a concentração de 3000 BSA por nanosensor, nota– se tau inicial de aproximadamente 20  $\mu\text{s}$  e tau final próximo a 100  $\mu\text{s}$ , porém com 270  $\mu\text{L}$  de soro titulado, indicando maior estabilidade aos nanosensores.

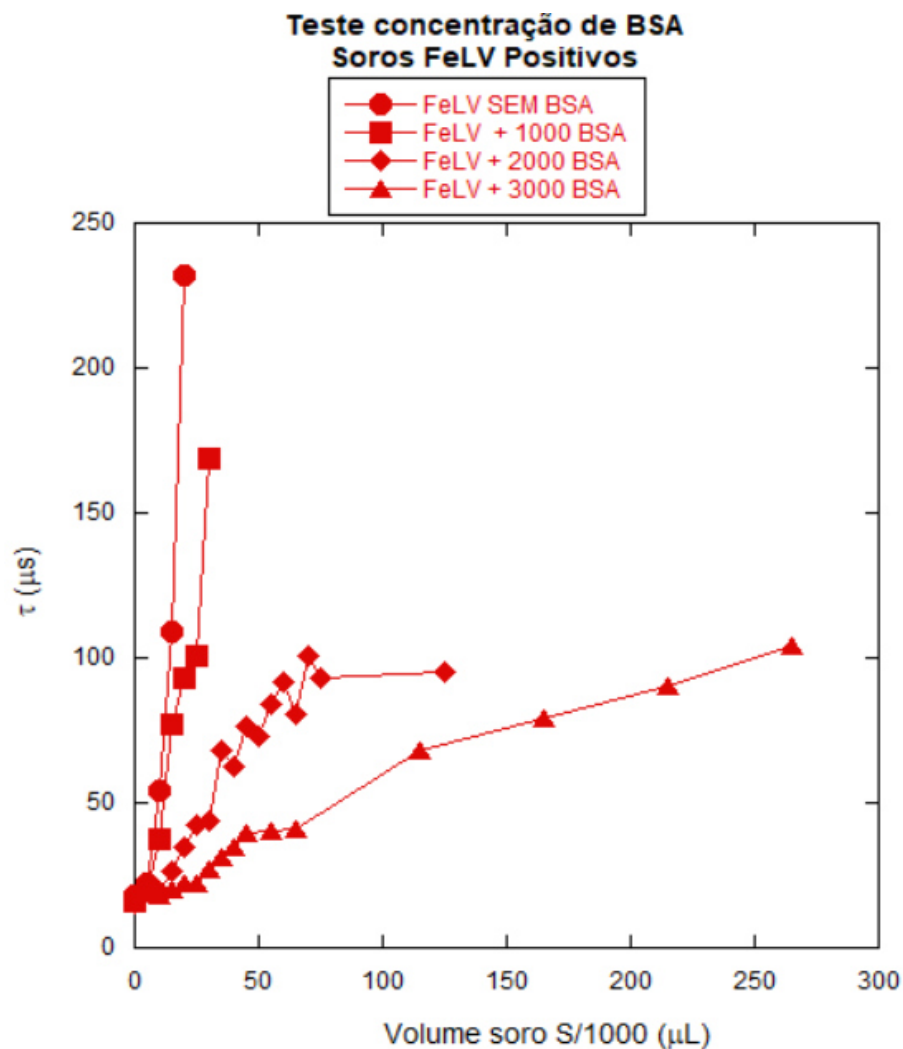


Gráfico 10. Estudo de concentrações de BSA para impedir ligações não específicas em soros positivos para FeLV.

No caso do diagnóstico para *Cryptococcus* testou-se também a eficácia de bloqueio dos soros ao invés do bloqueio nos sensores. Assim, os soros H2 positivo e N1 negativo para *Cryptococcus* foram titulados e analisados por EPEL, utilizando a concentração de 3000 BSA, determinada pelo teste anterior. A concentração de proteínas presente nesses soros foi determinada a partir de medidas em UV – VIS, sendo os resultados semelhantes. Os testes foram realizados sem adição do blocker aos nanosensores e aos soros (círculos), adicionado BSA ao nanosensor no momento da titulação dos soros (triângulos) e adicionado BSA quando se diluiu os soros positivos e negativos (quadrados). Os resultados estão representados através do gráfico 11 e 12.

Para o soro N1 negativo (gráfico 11), medido no dia seguinte após a realização da funcionalização, observa-se que sem adição de BSA, o tau inicial foi próximo a 10  $\mu$ s e tau final de aproximadamente 30  $\mu$ s, com 20  $\mu$ L de soro titulado, indicando ligações inespecíficas (via interação eletrostática) de proteínas do soro ao CTAB causando instabilidade e agregação dos nanosensores. Quando adiciona-se BSA ao soro, é possível observar que o tau inicial foi próximo a 10  $\mu$ s e tau final de aproximadamente 100  $\mu$ s, com cerca de 20  $\mu$ L de soro titulado, indicando também agregação dos nanosensores. E por fim, quando se analisa o BSA adicionado ao nanosensor, é possível observar que o tau inicial foi também de aproximadamente 10  $\mu$ s e o tau final de 150  $\mu$ s, com cerca de 40  $\mu$ L de soro titulado, indicando maior estabilidade aos nanosensores.

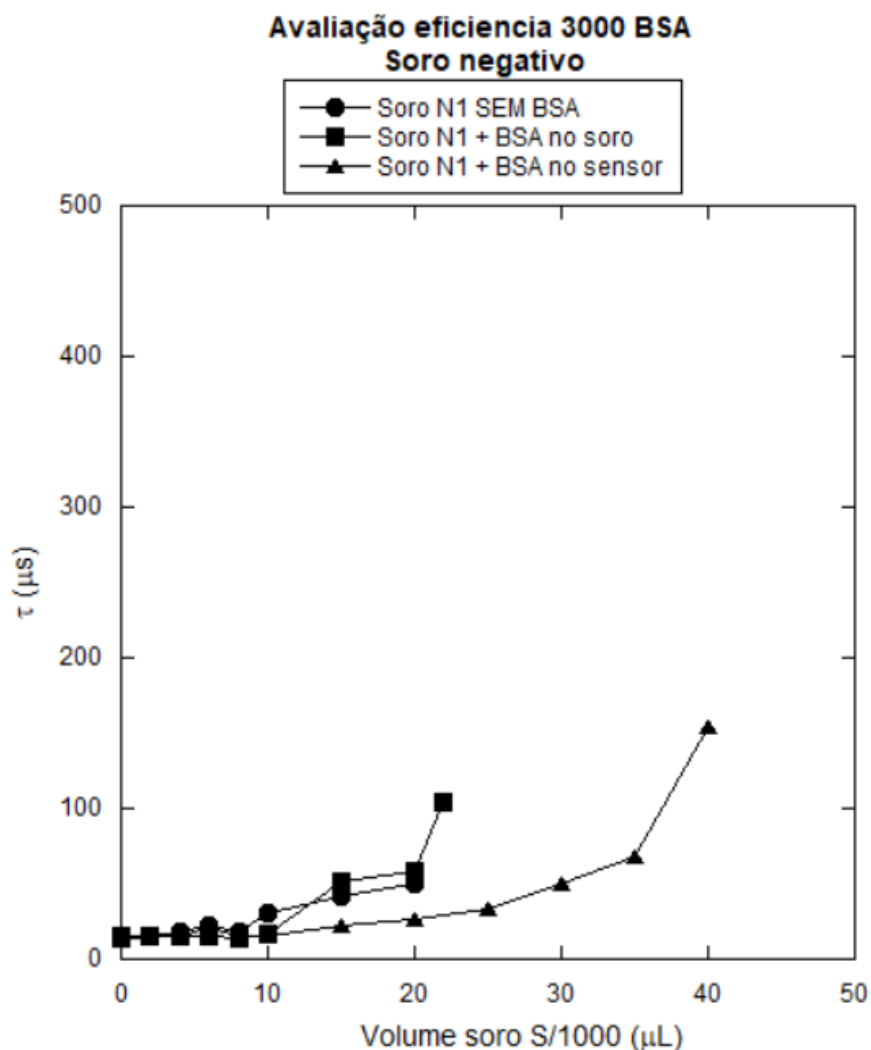


Gráfico 11. Avaliação eficiência 3000 BSA por nanosensor, titulado em soro negativo.

Para o soro H2 positivo (gráfico 12) observa – se que sem adição de BSA o tau inicial foi próximo a 10  $\mu\text{s}$  e o tau final foi de aproximadamente 450  $\mu\text{s}$ , com cerca de 25  $\mu\text{L}$  de soro titulado, indicando ligações inespecíficas (via interação eletrostática) de proteínas do soro ao CTAB causando instabilidade e agregação dos nanosensores. Ao adicionar o BSA ao soro, nota – se que o inicial foi próximo a 10  $\mu\text{s}$  e tau final de aproximadamente 300  $\mu\text{s}$ , com cerca de 40  $\mu\text{L}$  de soro titulado. Comparado com a titulação sem adição de BSA nota - se uma diminuição do valor do tau para o mesmo volume de soro titulado. Entretanto ainda ocorrem ligações inespecíficas de proteínas do soro ao CTAB causando instabilidade e agregação dos nanosensores. E quando BSA é adicionado ao nanosensor verifica – se que ocorreu aumento do tau de 10  $\mu\text{s}$  para 180  $\mu\text{s}$ , com cerca de 40  $\mu\text{L}$  de soro titulado. Ao comparar com as titulações anteriores, percebe – se redução do tau indicando que ocorreu o bloqueio de

ligações inespecíficas e que manutenção da estabilidade permitindo a observação da interação entre anticorpo e antígeno.

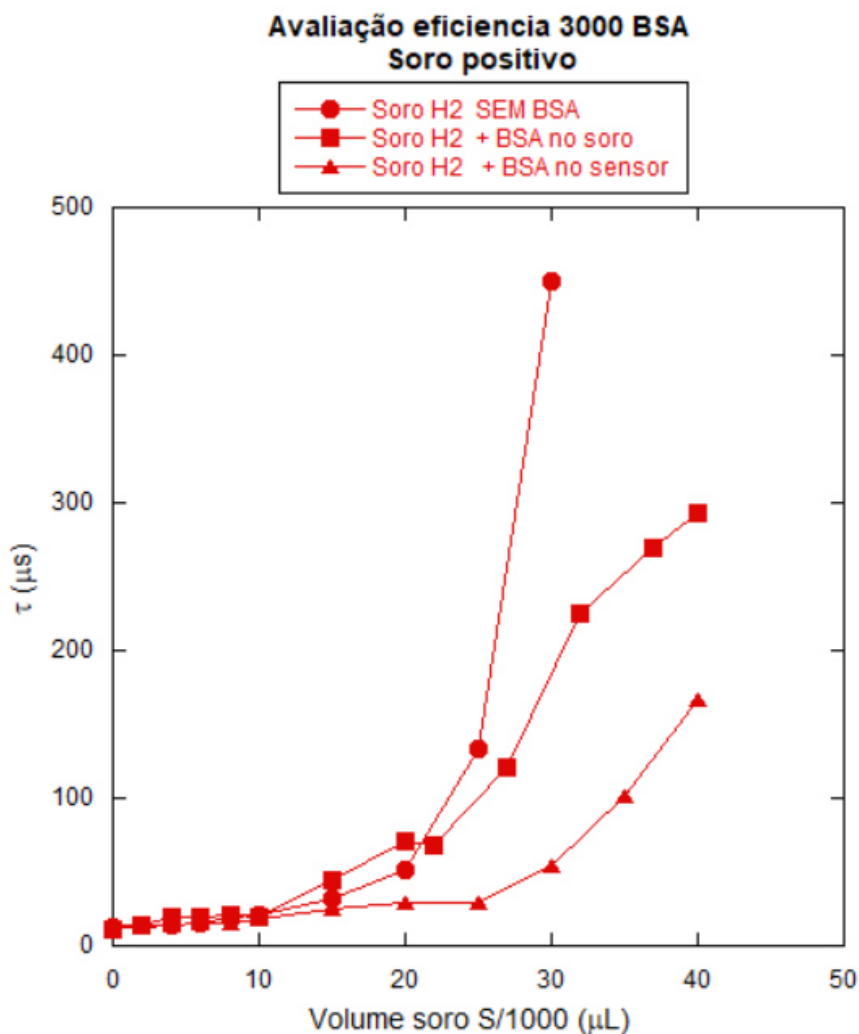


Gráfico 12. Avaliação eficiência 3000 BSA por nanosensor, titulado em soro positivo.

### 5.5 Titulação do soro H2 positivo aos nanosensores na concentração 1:1

Mesmo após a funcionalização apresentar sinais de agregação, o nanosensor foi testado a partir da titulação do soro H2 positivo e controle (o controle foi submetido a todas as etapas do processo de funcionalização, porém não foi adicionado o anticorpo monoclonal 18B7), com a adição de 3000 BSA por NBs ao nanosensor.

Para a titulação do soro H2 positivo (gráfico 13), observa-se o tau inicial de 20,4 μs e o tau final de aproximadamente 280 μs, com cerca de 8 μL de soro titulado, indicando agregação

dos nanosensores devido à presença de anticorpos em toda superfície dos nanobastões (ligado via eletrostática ao CTAB).

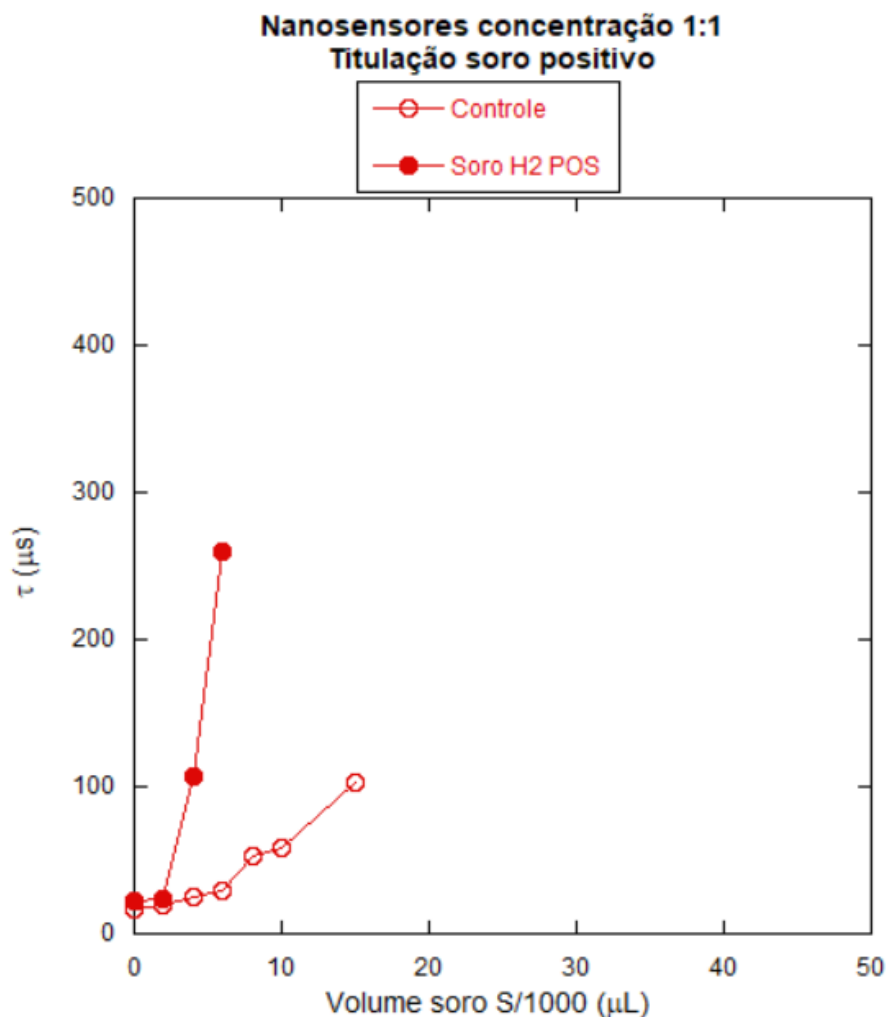


Gráfico 13. Titulação do soro positivo e controle a partir da funcionalização dos NBs na concentração 1:1.

### 5.6 Titulação dos soros H2 positivo e N1 negativo aos nanosensores na concentração 0,2:1

Os soros H2 positivo e N1 negativo e os controles foram titulados com adição 3000 BSA ao nanosensor, os resultados obtidos estão representados nos gráficos 14 e 15.

Para a titulação do soro N1 negativo (círculos cheios) nota – se o tau inicial de 20  $\mu$ s e o tau final de aproximadamente 150  $\mu$ s, com 35  $\mu$ L de soro titulado. Por outro lado, o controle titulado com o soro negativo (círculos vazios), apresentou tau inicial de 20  $\mu$ s e o tau final de

aproximadamente 50  $\mu\text{s}$ , com 40  $\mu\text{L}$  de soro titulado. Assim, observa – se que a presença do anticorpo favorece a ligação de proteínas (antígenos específicos ou inespecíficos).

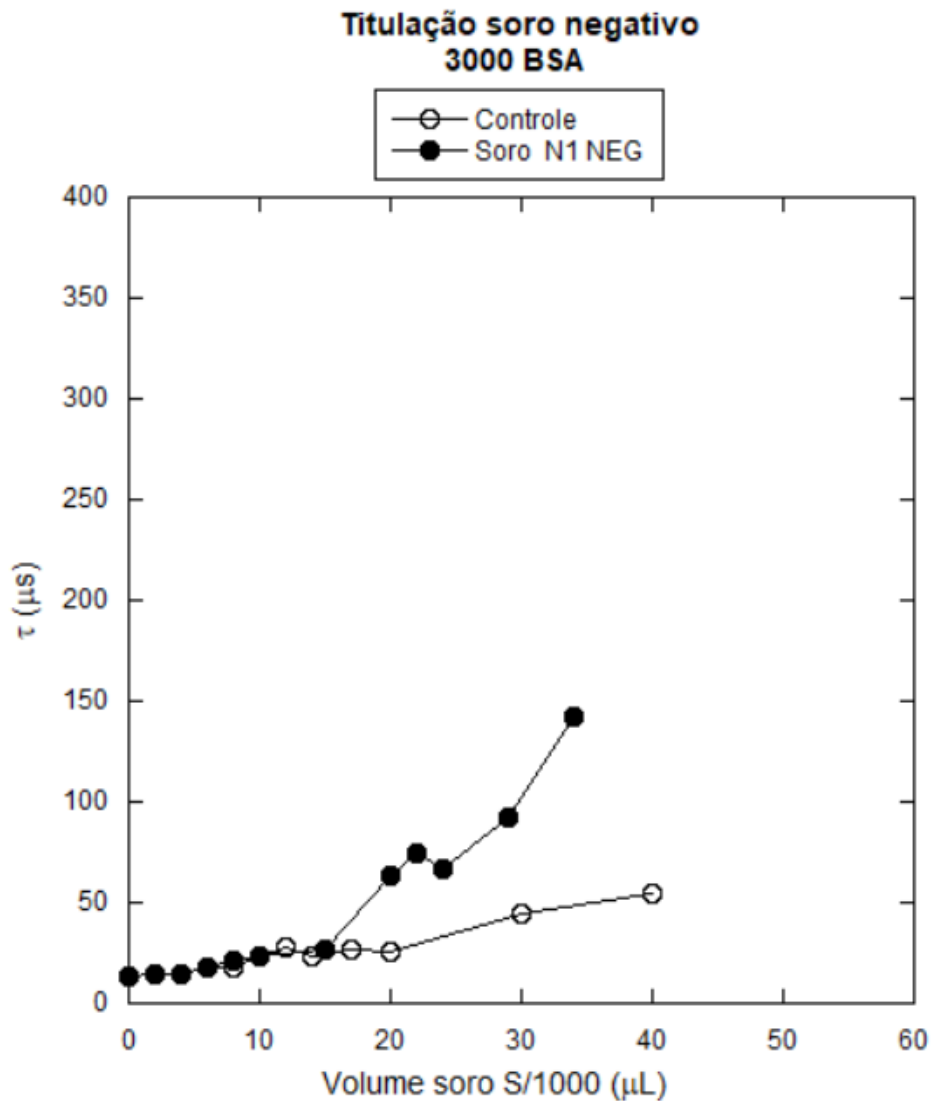


Gráfico 14. Titulação do soro negativo e controle a partir da funcionalização dos NBs na concentração 0,2:1.

Para a titulação do soro H2 positivo (círculos cheios) nota – se o tau inicial de 20  $\mu\text{s}$  e o tau final de aproximadamente 360  $\mu\text{s}$ , com cerca de 40  $\mu\text{L}$  de soro titulado. Esse aumento no tempo de decaimento corresponde a aumento de aproximadamente 50 nm para cada lado dos nanosensores. Esse valor é compatível com o tamanho dos fragmentos da cápsula polissacarídea criptocócica, especificamente fragmentos de glucoroxilomanana (GXM) que possui peso molecular entre 1700 a 7000 KDa (O’Meara e Alspaugh; 2012). Para o controle

(círculos vazios) titulado com o soro H2 positivo, o tau inicial foi de 20  $\mu\text{s}$  e o final de 150  $\mu\text{s}$ . Novamente os dados indicam que a presença do anticorpo favorece a ligação de proteínas.

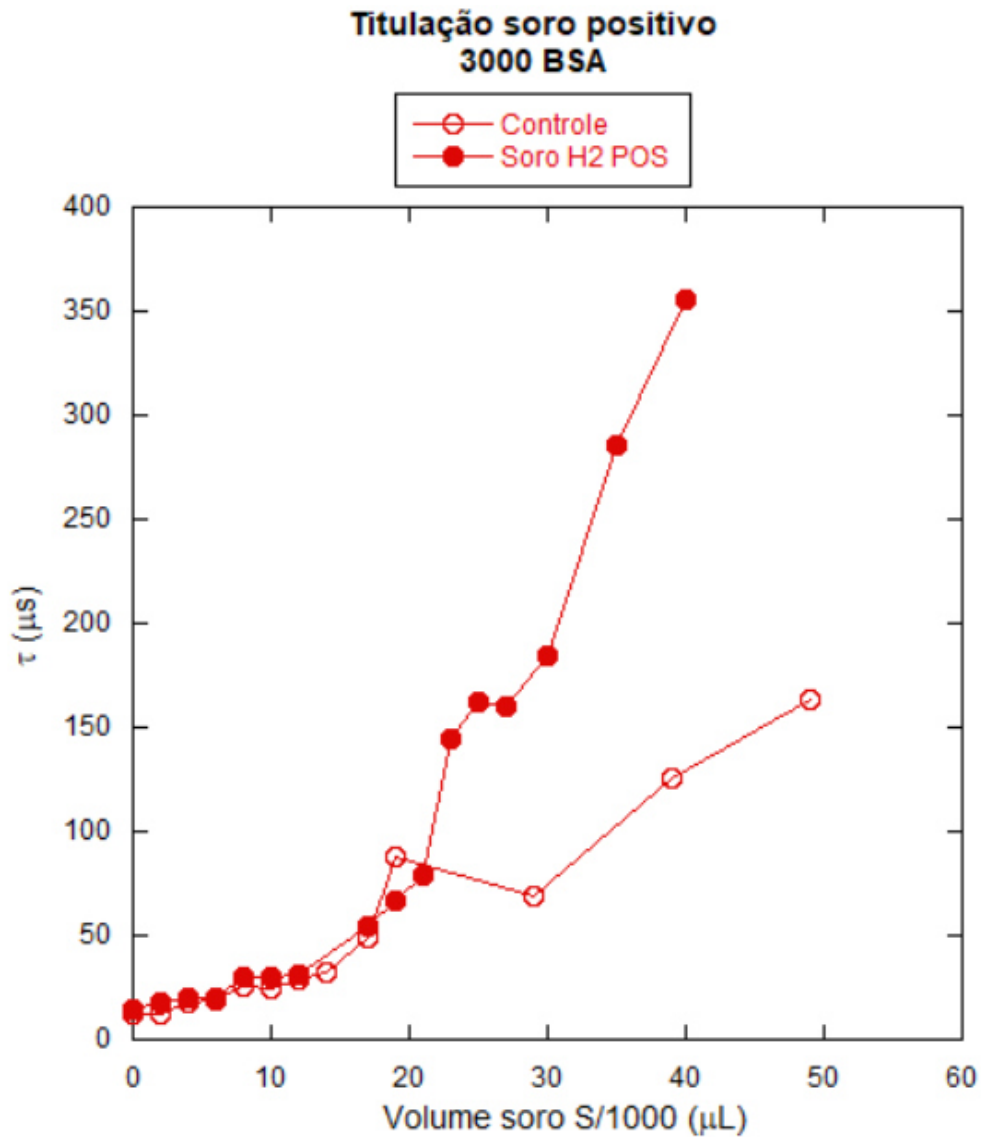


Gráfico 15. Titulação do soro positivo e controle a partir da funcionalização dos Nbs na concentração 0,2: 1.

Após a análise de ambos os gráficos é possível observar que no ponto 40  $\mu\text{L}$  houve um aumento no tau de 20  $\mu\text{s}$  para 150  $\mu\text{s}$  para o soro negativo e de 20  $\mu\text{s}$  para 350  $\mu\text{s}$  para o soro positivo. Ou seja, o aumento do tau para o caso do soro positivo foi duas vezes maior do que o aumento do tau para o soro negativo, no volume máximo titulado, comprovando a boa acurácia do nanosensor sintetizado.



### 5.7 Avaliação da especificidade do nanosensor

Para comprovar a especificidade dos nanosensores, o soro H2 positivo foi submetido ao aquecimento em banho térmico a 95 °C durante 5 minutos. Os resultados obtidos estão representados no gráfico 16.

Para o soro H2 positivo aquecido, observa – se o tau inicial de 20  $\mu\text{s}$  e o tau final de aproximadamente 100  $\mu\text{s}$ , com cerca de 110  $\mu\text{L}$  de soro titulado. Comparando o valor para o tau em 40  $\mu\text{L}$ , nota – se um valor de 350  $\mu\text{s}$  para o soro positivo e de aproximadamente 50  $\mu\text{s}$  para o soro positivo aquecido. Esse resultado demonstra que o aquecimento promoveu a desnaturação de proteínas, inclusive de antígenos, impedindo o evento de bioreconhecimento do nanosensor sintetizado.

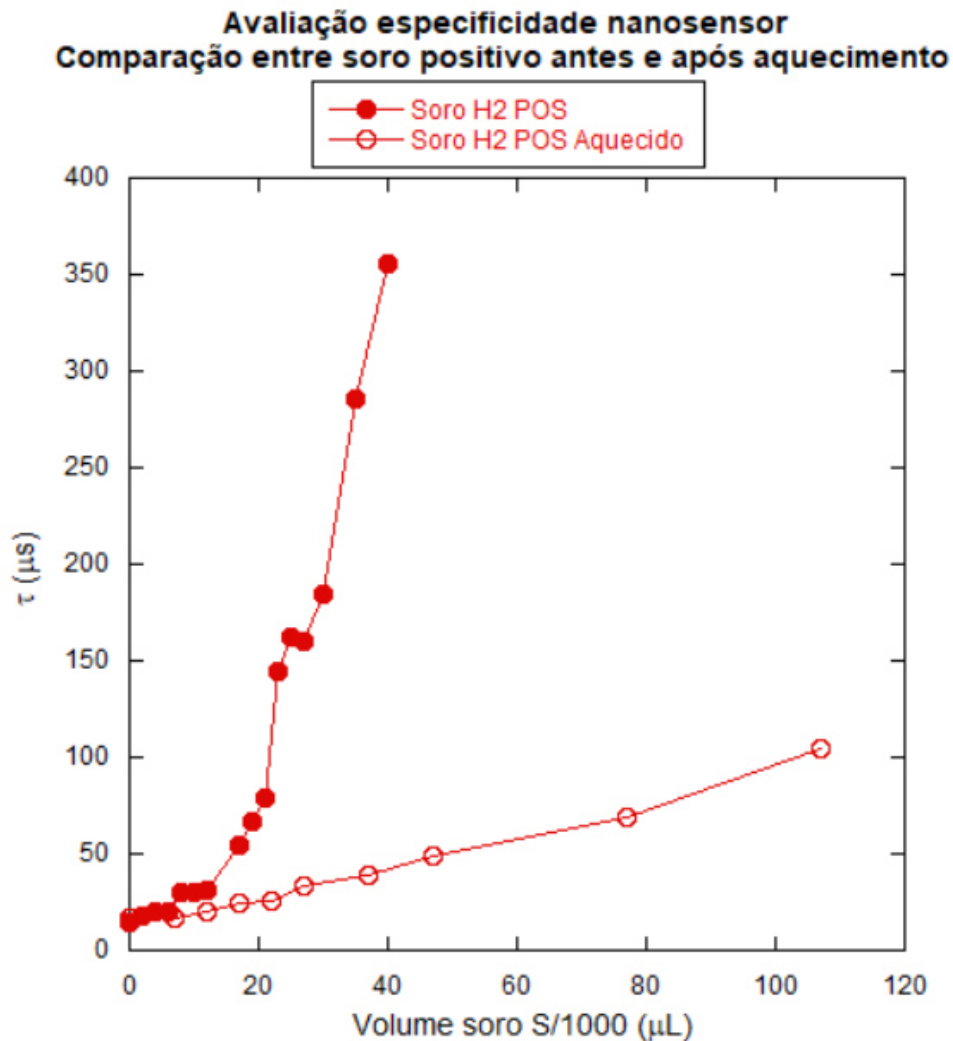


Gráfico 16. Comparação antes e após o aquecimento do soro H2 positivo.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento desse trabalho permitiu a demonstração de uma nova tecnologia diagnóstica para a detecção de criptococose em soros. A tecnologia utilizada foi uma plataforma portátil de biodiagnóstico baseada em nanosensores e medidas de espalhamento dinâmico de luz.

Para o desenvolvimento dos nanosensores foram realizados procedimentos de síntese e funcionalização dos nanobastões de ouro, que foram testados com soros de camundongos infectados e sadios. Para o teste de eficácia dos nanosensores foram feitas medidas óticas utilizando um espectrômetro portátil de espalhamento de luz (EPEL).

A partir dos experimentos realizados, concluiu – se a síntese baseada no componente natural resveratrol forneceu nanobastões com características físico – químicas adequadas para a fabricação de nanosensores para uso na plataforma. Além disso, com a realização dos processos de funcionalização chegou – se a uma concentração ótima de anticorpos a ser utilizada para a fabricação dos nanosensores.

A sensibilidade e especificidade dos nanosensores sintetizados foram avaliadas com a titulação de soros positivos e negativos, demonstrando a acurácia do diagnóstico. Sendo assim, esse trabalho demonstrou a prova de conceito do uso de uma plataforma portátil de biodiagnóstico para a detecção de criptococose em soro de animais infectados.

O próximo passo nesse desenvolvimento é a validação da metodologia, o que inclui as atividades: novos testes com um banco de soros e a comparação das respostas com a técnica padrão de diagnóstico, estudo da estabilidade dos nanosensores (em solução ou liofilizados) para armazenamento dos mesmos e uso da plataforma em campo.

## REFERÊNCIAS

ALLAKER, R. P; REN, G. Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 102, 2008. ISSN 1770 – 6258. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706258>>.

ALMEIDA, F; WOLF, J. M; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cells.** v. 14, n. 12, p. 1173- 1185. Dec. 2015. ISSN 2646 – 3651. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453651>>.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica** – Módulo 8. Brasília, 2013.

ANAISSE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical Mycology.** 2 ed. Churchill Livingstone. 2009.

BACKES, P. et al. Diagnóstico laboratorial de *Cryptococcus* spp. no líquido. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** v. 48, n. 03, p. 10 – 14. 2016. ISSN 2448-387.

BALTAZAR, L. M; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 41, n. 5, p. 449- 453. Set. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822008000500003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000500003)> .

BOLAT, G. et al. Fabrication of a Polyaniline Ultramicroelectrode via a Self Assembled Monolayer Modified Gold Electrode. **Journal Sensors.** v. 13, p. 8079 – 8094. Jun. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797740>>.

BOVERS, M. et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Res.** v. 6, p. 599 – 607. 2006.

CAI, W. et al. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnology, science and applications,** v. 2008, n. 1, p. 10.2147/NSA.S3788, ISSN 1177-8903. 2008.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical.** v. 39, n. 2, p. 83 – 89. Abr. 2010.

CAO, J.; SUN, T.; GRATAN, K. T. V. Gold nanorod- based localized surface Plasmon resonance biosensors: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical.** v. 195, p. 332 – 351. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925400514000732>>.

CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? **J Clin Invest.** v. 120, n. 5, p. 1389 – 1392. 2010.

CASADEVALL, A. et al. Characterization of a Murine Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Is a Candidate for Human Therapeutic

Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, n. 6 p. 1437–1446 Jun. 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624491> >.

CHAVES, C. D.. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. **J Bras Patol Med Lab**. v. 46, n. 5. 2010.

CHEN, H. et al. Gold nanorods and their plasmonic properties. **Chemical Society Reviews**.v.42, p. 2679 – 2724, 2013.ISSN 0306- 0012. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/cs/c2cs35367a>>.

CHEN, S; MEYER, W; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 27, n.4, p. 980 – 1024. Oct. 2014. ISSN 1098-6618. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278580>>.

CHEN, J. L et al. Calcineurin Governs Thermotolerance and Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Investigation**. v. 2, p. 527 – 539. Mar. 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450261> >.

CHOW, S. K; CASADEVALL, A. Evaluation of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan protein conjugate as vaccine candidate against murine cryptococcosis. **Vaccine**. v. 29, n. 10. Fev. 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238568><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238568>>.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 219-38, 2014. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050625> >.

**COSTA M. C et al. Social, environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in Brazil.** *New Microbes and New Infections*. **v. 29, 2019.**

COX, G et al. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. **Infection and Immunity**. v. 71, n.1, p. 173 – 180. Jan. 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496163> >.

CONTIN, J. T. et al. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG – Brasil. **Rev Med Minas Gerais** v. 21, n. 1, p. 19-24. 2011.

DOERING, T. L. How Sweet is it! Cell Wall Biogenesis and Polysaccharide Capsule Formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 63, p. 223 – 247. 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2880894/>>.

DROMER, F. et al. Epidemiology of cryptococcosis in France: A 9-year survey (1985 – 1993). **Clin. Infect. Dis.** v. 23, p. 82 – 90. 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816134> >.

DUIN, D. V.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUNK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 11, p. 3394 – 3400. Nov. 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384341> >.

EIGLER, D. M.; SCHWEIZER, E. K. Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope. *Nature*. v. 344, p. 524 – 526. Apr. 1990. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/344524a0>>.

ESHER, S. K. et al. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.113, n. 7. 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29668825>>.

**Espectrofotometria: Análise da concentração de soluções.** Kasvi. São José dos Pinhais, 16 de fev. 2018. Disponível em: < <https://kasvi.com.br/espectrofotometria-analise-concentracao-solucoes/>>.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J Immunol*.v. 64, n. 5. p. 423 –430.Mai. 1950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15415610>>.

FERNANDES, K. E et al. Species in the *Cryptococcus gattii* Complex Differ in Capsule and Cell Size following Growth under Capsule- Inducing Conditions. *mSphere*. v. 1, n. 6. Dec. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5196034/>>.

FERREIRA, C. S. et al. Uso de nanobastões de ouro para o desenvolvimento de aulas práticas de nanotecnologia. *Quim. Nova*. v. 40, n. 5, p. 594- 601. Feb. 2017. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422017000500594](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422017000500594)>.

GAZZONI, A et al. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of Cryptococcosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. v. 51, n. 5, p. 255 – 259. Set. 2009. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652009000500004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652009000500004)>.

GAZZONI, A et al. Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 cases. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v. 52, n. 3, p. 145 – 149. Jun. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602024>>.

GHOSH, P. et al. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. V. 60, p. 1307–1315. 2008. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X08000999>>.

GLIDDEN, M.; MUSCHOL, M. Characterizing Gold Nanorods in Solution Using Depolarized Dynamic Light Scattering. *The Journal of Physical Chemistry*. v. 116, p. 8128–8137. 2012. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp211533d>>.

GRAY, L. D.; ROBERTS, G. D. Experience with the use of pronase to eliminate interference factors in the Latex Agglutination Test for Cryptococcal antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 26, n. 11, p. 2450 – 2451. Nov. 1988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3235676>>.

HAMILTON, A. J; HOLDOM M. D. Biochemical Comparison of the Cu, Zn Superoxide Dismutases of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infection and Immunity*. v. 65, n. 2, p. 488 - 494. Fev. 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9009302>>.

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. Feb. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721988>>.

HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON- CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R. ; CASADEVALL, A. **Cryptococcus from human pathogen to model yeast**. 2 ed. Washington: ASM Press, 2011. 620p.

HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M. A. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. **Adv Mater**, v. 21, n. 48, p. 4880-910, ISSN 0935-9648. 2009

HULL, C. M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annu. Rev. Genet.** v. 36, p. 557 – 615. 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429703>>.

IDRIS, N. M. et al. *In vivo* photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. **Nature Medicine**. v. 18, n. 10, p. 1580 – 1586. Oct. 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.2933>>.

ILLNAIT, M.T. et al. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection and Quantification of *Cryptococcus neoformans* Antigen. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 96, n.2, p. 241-245. Feb. 2001. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762001000200018](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762001000200018)>.

JACOBSON, E. S.; JENKINS, N. D.; TODD, J. M. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. **Infect Immun**.V. 62, n. 9, p. 4085-4086, Sep 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8063430>>.

JACOBSON, E. S.; TINNELL, S. B. Antioxidant Function of Fungal Melanin.**Journal of Bacteriology**. v. 175, n. 21, p. 7102 – 7104. Nov. 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226653>>.

Jan. 2009. ISSN 1535- 9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952901>>.

KON, A. S. et al. Concenso em Criptococose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v. 41, n. 5, p. 524 – 544, 2008. ISSN 1678- 9849.

KREUTER, J. Nanoparticles--a historical perspective. **Int J Pharm**, v. 331, n. 1, p. 1-10, ISSN 0378-5173. 2007.

KRONSTAND, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews**. v. 5, p. 193- 203. Mar. 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4698337/>>.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 5 ed. New York: ACM Press, 2011. p. 1661-1662.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; THEODORE, I.S. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. **Int. J. system. Bact.** v. 28, p. 616-620. 1978.

KWON- CHUNG, K.J; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y. S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066639/>>.

KWON-CHUNG, K. J.; HILL, W. B.; BENNETT, J. E. New, special stain for histopathological diagnostics of Criptococcosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 13, p. 383 – 387. 1981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC273793/>>.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.

KWON- CHUNG, K.J; POLACHECK, I.; POPKIN, T. J. Melanin- Lacking Mutants of *Cryptococcus neoformans* and Their Virulence in Mice. **Journal of Bacteriology.** v. 150, n. 3, p. 1414 – 1421. Jun. 1982. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6804444>>.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica Lacaz.** 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. Cap. 17, p. 416 – 440.

LAZCANO, O. et al. Combined histochemical stains in the differential diagnosis of *Cryptococcus neoformans*. **Modern Pathol.** v. 6, p. 80 – 84. 1993. Disponível em: <

LEVITZ, S. M. The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. **Reviews of Infectious Diseases.** v. 13, n. 6 p. 1163-1169. Dec. 1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678937>>.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Health Research Innovation Centre**, Calgary, v. 7, p. 186 – 196, Oct. 2010.

LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature.** v. 434. p. 1017 – 1021. 2005. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature03448>>.

LIO, D. C. S. et al. Molecular beacon-gold nanosensors for Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 (Lrg1) detection in pathological angiogenesis. **ACS Sensors.** 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30095245>>.

LIN, J.; IDNURM, A.; LIN, X. Morphology and its underlying genetic regulation impact the interaction between *Cryptococcus neoformans* and its hosts. **Med Mycol.** v. 53, n. 5, p. 493 – 504. Jun. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841056>>.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution.** v. 9, p. 401–416. 2009. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134809000148>>.

LIN, X; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **The Annual Review of Microbiology.** v. 60, p. 69 -105. May. 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346>>.



LOHSE, S. E.; MURPHY, C. J. The Quest for Shape Control: A History of Gold Nanorod Synthesis. **Chemistry of Materials**. 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cm303708p>>.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol.** v. 67, p. 131-190, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245939>>.

MARTINEZ, L. R. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, p. 3365 – 3367. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526180>>.

MAYNARD, A. D. Nanotechnology: The Next Big Thing, or Much Ado about Nothing? **Ann. Occup. Hyg.** v. 51, n. 1, p. 1–12. Oct. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041243>>.

MEDNICK, A. J. et al. Melanization of *Cryptococcus neoformans* Affects Lung Inflammatory Responses during Cryptococcal Infection. **Infection and Immunity.** v. 73, n. 4 p. 2012–2019. Apr. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784542>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasília, 2012.

MITCHELL, T. G; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the Era of AIDS – 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 8, n. 4, p. 515 – 548. Oct. 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468>>.

MOLLOY S. F, et al. Cryptococcal meningitis: a neglected NTD? **PLoS Negl Trop Dis.** 29; v. 11 n. 6: e0005575, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005575>>.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 75, p. 767 – 769.

NICOLA, A. M. et al. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. **MBio,** v. 2, n. 4, 2011. ISSN 2150-7511. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828219>>.

NEILSON, J. B.; IVEY, M. H; BULMER, G. S. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. **Infect Immun.** v. 20, n. 1, p. 262-266. Abr. 1978. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/352931>>.

NESSER N.; FILHO N.N.; VIEIRA A.G. Criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente. **Anais Brasileiros Dermatologia.** v. 86, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962011000600018](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000600018)>.

NOMURA, D. A. Caracterização estrutural de dispersões aquosas de lipídios aniônicos. 2018. 258 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.



NOSANCHUK, J. D. et al. Evidence That *Cryptococcus neoformans* Is Melanized in Pigeon Excreta: Implications for Pathogenesis. **Infection and Immunity**. v. 67, n. 10, p. 5477- 5479. Mar. 1999 ISSN 0019- 9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10496933>>.

OLDOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO Journal**. v. 16, n. 10 p. 2576–2589, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169869/>>.

OLIVEIRA, L.; MALHEM, M., S., C. *Cryptococcus neoformans*: importância do diagnóstico clínico das formas polimórficas. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**. v. 24, n. 1, p. 49-50. 2014. Disponível em: < <https://www.researchgate.net/publication/305730146>>.

OLSZEWSKI, M. A.; ZHANG, Y.; HUFFNAGLE, G. B. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. **Future Microbiol**. v. 5, n. 8, p. 1269 – 1288. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20722603>>.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n. 3, p. 387 –408. Jun. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763631>>.

OMI, H. The Transmission Electron Microscope. *In: Determination of Aspect Ratio Distribution in Gold Nanowires Using Absorption Spectrum and Transmission Electron Microscopy Techniques*. 2012.

PASA, C. R. Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar. 2011. 124f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento). Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, 2011.

PEDROSO, R. S; CANDIDO, R. C. Diagnóstico Laboratorial da Criptococose. **NewsLab**. v. 77, p. 94- 102. Jan. 2006.

PEREIRA, C. B. et al. Evaluation of laccases and melanization in clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* samples by non- denaturing PAGE. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, p. 563 – 566. Jan. 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369516>>.

PEARCE, M.; MELANKO, J.; SALEM, A. Multifunctional Nanorods for Biomedical Applications. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, p. 2335-2352. 2007. ISSN 0724-8741. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684708>>.

PINTI, M. et al. Identification and characterization of an aspartyl protease from *Cryptococcus neoformans*. **FEBS Lett**. v. 581, n. 20, p. 3882-3886, Aug. 2007. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651737>>.

PISSUWAN, D.; VENEZUELA, S. M.; CORTIE, M. B. Prospects for Gold Nanorod Particles in Diagnostic and Therapeutic Applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. v. 25, n. 1, p. 93 – 112. 2008. ISSN 0264 – 8745. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412351>>.

RODRIGUES, ML. Funding and innovation in diseases of neglected populations: the paradox of cryptococcal meningitis. **PLoS Negl Trop Dis.** v.10, n.3 e0004429, 2016. Disponível em: <  
<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004429>>.

ROSA, G., GAUTO, M., GONÇALVES, F.. Química Analítica: Práticas de Laboratório – Série Tekne. Bookman, 2013.

REOLON, A.; PEREZ, L. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 40 n.5. Oct. 2004. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442004000500003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442004000500003)>.

ROSTRO-KOHANLOO, B. C. et al. The stabilization and targeting of surfactant-synthesized gold nanorods. **Nanotechnology.** v. 20. Oct. 2009. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801751>>.

ROUXINOL, F. S. *Preparação de nanopartículas para sistemas de libertação controlada de substâncias ativas usadas no tratamento de doenças oftalmológicas.* 2009. 135 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009.

SALAS, S. D. et al. Effect of Laccase Gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Experimental Medicine.** v. 184, p. 377 – 386. Ago. 1996. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192698/>>.

SÁNCHEZ, M; COLOM, F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Revista Iberoamericana de Micología.** v. 27, n.1, p. 10 -13. Feb. 2010. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167522>>.

SCAREBELLI, L. et al. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. **The Journal of Physical Chemistry.** v. 6, p. 4270 – 4279. 2015.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. **Capítulo 3- Criptococose pulmonar.** J. Bras. Pneumol. v. 35, n. 11, p. 1136 – 1144. 2009.

SOARES, E. A. et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** v.13, n. 7. Jul. 2019. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6687200/>>.

STAGGERS, N. et al. Nanotechnology: The coming revolution and its implications for consumers, clinicians, and informatics. **Nursing Outlook.** v. 56, n. 5, p. 268 – 274. 2008. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922283>>.

STONE, J.; JACKSON, S.; WRIGHT, D. Biological applications of gold nanorods. **John Wiley e Sons, Inc.** v. 3, p. 100 – 108. Jan –Fev. 2011. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20967876>>.

SU, L. et al. A Fast and Efficient Replacement of CTAB with MUA on the Surface of Gold Nanorods Assisted by a Water-Immiscible Ionic Liquid. **Small.** 2017. Disponível em: <  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sml.201602809>>.

TELLO, M. et al. Criptococosis. **Revista médica Risaralda**. v.19 n.2. Jul - Dez. 2013. Disponível em < [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-06672013000200008&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-06672013000200008&script=sci_arttext&tlng=en)>.

THERMO SCIENTIFIC. Easy Molecular Bonding Crosslinking Technology: Reactivity chemistries, applications and structure references. 45p. 2012.

TISSI, L. et al. Glucuronoxylomannan, the Major Capsular Polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, Inhibits the Progression of Group B Streptococcal Arthritis. **Infection And Immunity**. v. 72, n. 11, p. 6367 – 6372. Nov. 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501766>>.

TOMA, H. E. **Nanotecnologia Molecular- Materiais e Dispositivos**. v. 6, São Paulo: Blucher, 2016. Cap. 10, p. 279 – 304.

VAN GELDEREN, A.; KELSTEMAN, I. B. Morfología atípica de *Cryptococcus neoformans* en tejidos autopsiados. **Bol. Micol**. v. 27, n. 2, p. 46- 54. 2012. Disponível em: < <https://www.researchgate.net/publication/318712765> >.

VERSIANI, A. F. et al. Gold nanoparticles and their applications in biomedicine. **Future Virol**. Mar. 2016. ISSN 1746-0794. Disponível em: < <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fvl-2015-0010>>.

VIDAL, J. E.; BOULWARE, D. R. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**. v. 57. n. 19, p. 38-45, Sep. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26465368>>.

XU, X. et al. Seedless Synthesis of High Aspect Ratio Gold Nanorods with High Yield. **Journal of Materials Chemistry A**. 2013. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/231238828\\_Seed-Mediated\\_Synthesis\\_of\\_High\\_Aspect\\_Ratio\\_Gold\\_Nanorods\\_with\\_Nitric\\_Acid](https://www.researchgate.net/publication/231238828_Seed-Mediated_Synthesis_of_High_Aspect_Ratio_Gold_Nanorods_with_Nitric_Acid)>.

WANG, W. et al. Seedless synthesis of gold nanorods using resveratrol as a reductant. **Nanotechnology**. v. 27, Mar. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26954263>>.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, imunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews**. 2016.

WILSON, D.E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 127, p. 820 –823. 1968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5651140>>.

YU, C.; IRUDAYARAJ, J. Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods. **Analytical Chemistry**. v. 79, n. 2. Jan. 2007. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac061730d>>.

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. **Curr. Opin. Microbiol**. v. 16, n. 4, p. 409 – 413. Abr. 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588027>>.

ZIJLSTRA, P et al. High-temperature Seedless Synthesis of Gold Nanorods. **J. Phys. Chem.** v. 110, n.39, p. 19315 – 19318. Aug. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17004786>>.