



**VANESSA DA SILVA DUTRA DE CARVALHO**

**Influência de hormônios vegetais sobre a morfo-fisiologia e virulência de  
*Cryptococcus gattii***

**Belo Horizonte**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

**Influência de hormônios vegetais sobre a morfo-fisiologia e virulência de  
*Cryptococcus gattii***

**VANESSA DA SILVA DUTRA DE CARVALHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais

**Co-orientadora:** Profa. Dr<sup>a</sup> Julliana Ribeiro Alves dos Santos

Universidade CEUMA (UNICEUMA), São Luís, Maranhão

**Belo Horizonte**

**2016**



“Un peu de science éloigne de Dieu, beaucoup de science y ramène.”

Louis Pasteur

## AGRADECIMENTOS

Pense em um banquinho de três pés. Cada um dos pés contribui igualmente para sustentar o peso que vier por cima. Deste mesmo modo, eu tenho três pés, três alicerces que me sustentam. Sem qualquer um deles, este trabalho não teria sido possível, são eles: o espiritual, pessoal e profissional. A eles, meus agradecimentos.

Em meu alicerce espiritual está o meu amigo Deus, a quem eu agradeço por estar ao meu lado todo o tempo, me dando apoio e me ensinando coisas novas todos os dias. Nem sempre sem dor, mas sempre ali, protegendo, guiando e abençoando.

Em meu alicerce pessoal estão minha família e meus amigos.

Agradeço ao meu marido, Iago, pelo apoio incondicional na realização deste sonho, por acreditar em mim mais do que eu mesma, pela compreensão por minhas ausências e prioridades, por respeitar minhas escolhas, por estar ao meu lado neste período de mestrado que foi magnífico, mas que não foi nada fácil, por me amar apesar de minhas imperfeições, por ser o melhor de todos os amigos.

À minha mãe por se orgulhar de mim e apoiar minhas escolhas, por estar ao meu lado, por entender que as coisas comigo não vão ser do jeito dela e continuar me amando mesmo assim, por ter me criado para o mundo, por se orgulhar de ter uma filha mestranda.

Aos meus irmãos, Andressa e Gabriel, pelo apoio, carinho, mesmo longe, por se orgulharem de mim e entenderem minha ausência neste período do mestrado.

À minha sogra-mãe e meu sogro-pai que me adotaram já velha, cheia de defeitos e manias, mas me amam como filha, mesmo assim. Vocês tornaram este período mais fácil com sua companhia, nossas viagens e mudanças.

Aos meus pais, Francisco e Waldércie, pelo apoio, atenção e carinho, por compreenderem minha ausência.

Às minhas famílias Ananias da Silva, Abreu, Leite, Beaumont, Oliveira e Dutra de Carvalho, por amenizarem meus períodos de sofrimento com seu amor e tornarem meus momentos felizes ainda mais felizes.

Aos meus amigos-irmãos que vou levar pra sempre: Renata, Igor, Júlia, Silvinha, Mariane e Gláucia, pela amizade que ampara, sustenta, acalma, socorre e alegra.

Em meu alicerce profissional, uma enorme gratidão ao meu orientador Daniel, que é o melhor orientador que a Microbiologia tem. Ele orienta, entende as dúvidas e as incertezas, respeita as escolhas e as TPMs. Ele merece o carinhoso apelido que foi designado a ele: Príncipe da Paz, por zelar sempre pelo bom relacionamento da turma. Ele é um pai científico, mesmo. Ele me inspira a superar meus limites e mostrar meu melhor.

À minha cocozinha (co-orientadora) Ju, pela solicitude, atenção, paciência, pelos ensinamentos feitos sempre de maneira tão carinhosa, pela amizade.

Aos meus colegas de jornada do Laboratório de Micologia, por compartilharem todo seu conhecimento e experiência, por pacientemente ensinarem técnicas e teorias, pelas aulas no prisma e no Image J, por apoiarem nos momentos difíceis e festejarem nos felizes, a todos, minha gratidão.

À Erika, por me mostrar a Microbiologia das cavernas e mostrar que é possível ser “biólogo de bota y de bata” (expressão espanhola para biólogo de campo e de laboratório).

À Sônia, que tornou meus dias mais fáceis, graças ao seu trabalho e companhia. Que me mostrou que eu nunca vou ter direito de reclamar de cansaço, ao contar de sua rotina com um sorriso no rosto e sem reclamar nem um pouquinho. Sempre que penso em reclamar de cansaço, lembro dela e retomo minhas forças.

Aos professores da Microbiologia da UFMG, por doarem todo seu conhecimento e experiência a cada aula, contribuindo com meu crescimento profissional.

Aos amigos e colaboradores dos demais laboratórios, que também foram solícitos sempre que eu precisei, seja com material, reagente, com uma técnica, com seu conhecimento, com grandes ajudas na realização de experimentos, com sua palavra amiga nos momentos difíceis ou com aquele tempinho pra rir de qualquer coisa pelos corredores do labirinto do ICB.

À coordenação, equipe técnica e de limpeza, por cuidarem de um trabalho além da bancada que eu não seria capaz de fazer.

A todos, minha enorme gratidão, por participarem na realização deste sonho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
LISTA DE TABELAS .....	iv
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUÇÃO .....	8
REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
<i>Cryptococcus gattii</i> .....	9
O gênero <i>Cryptococcus</i> .....	10
<i>C. gattii</i> – características específicas e fatores de virulência .....	12
Criptococose .....	15
Ecologia de <i>C. gattii</i> e sua associação com outros organismos.....	16
OBJETIVOS .....	20
Objetivo geral .....	20
Objetivos específicos .....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
AG3	Ácido giberélico
AIA	Ácido indol-3-acético
ANB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASC	Área Sob a Curva
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
BEN	Benomyl
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FCZ	Fluconazol
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MML	Meio mínimo líquido
MMs	Meio mínimo sólido
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>
nm	Nanômetros
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PER	Peroxidase
qRT-PCR	<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	meio de cultura, acrônimo de <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
UFC	Unidade formadora de colônia



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Distribuição mundial de *C. gattii* isolados ambientais e clínicos (humanos e veterinários).

**Figura 2** – Esquema dos diferentes sorotipos e genótipos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

**Figura 3** – Foto ilustrativa da célula de *Cryptococcus gattii*.

**Figura 4** – Foto ilustrativa do teste de concentração inibitória mínima em meio sólido. Cada *spot* corresponde a 10 µL de uma cepa de *C. gattii*.

**Figura 5** – Placa com cultivo das cepas em uma das condições. Foto e representação esquemática de mensuração do tamanho da cápsula e diâmetro celular.

**Figura 6** – Absorbância de ácido 3-indolacético nos meios RPMI e meio mínimo, a 28 °C e 37 °C no escuro e à temperatura ambiente na presença de luz, ao longo de 72 horas em soluções com diferentes concentrações do hormônio.

**Figura 7** – Absorbância de giberelina (no comprimento de onda 250 nm) nos meios RPMI e meio mínimo, a 28 °C e 37 °C ao longo de 72 horas em soluções com diferentes concentrações do hormônio.

**Figura 8** – Meio mínimo sólido inoculado com 13 cepas de *Cryptococcus gattii* e incubado a 37 °C por 48 horas. Os círculos correspondem ao inóculo de cada cepa.

**Figura 9** – Meio mínimo sólido suplementado com 90 µg/mL de AIA e inoculado com 13 cepas de *Cryptococcus gattii*, incubado a 37 °C por 48 horas. Os círculos correspondem ao crescimento de cada cepa.

**Figura 10** – Parâmetros morfométricos avaliados para 13 cepas de *Cryptococcus gattii* previamente exposto ao hormônio vegetal ácido indol-3-acético.

**Figura 11** – Parâmetros morfométricos avaliados para 13 cepas de *Cryptococcus gatti* previamente exposto ao hormônio vegetal ácido giberélico.

**Figura 12** – Curvas de sobrevivência de *C. elegans* infectados com diferentes estirpes de *C. gattii* previamente tratados com diferentes concentrações de ácido 3-indolacético (AIA) e de ácido giberélico (AG3).

**Figura 13** – Curvas de sobrevivência de *C. elegans* infectados com diferentes estirpes de *C. gattii* previamente tratados com AIA ou AG3.

**Figura 14** – Índice fagocítico de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L e 90,0 mg/L de AIA.

**Figura 15** – Índice fagocítico de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L e 1000,0 mg/L de AG3.

**Figura 16** – Imagens do ensaio de fagocitose.

**Figura 17** – Recuperação intracelular de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L e 90,0 mg/L de AIA.

**Figura 18** – Recuperação intracelular de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L e 1.000,0 mg/L de AG3.

**Figura 19** – Atividade de SOD de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L e 90,0 mg/L de AIA.

**Figura 20** – Atividade de SOD de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L e 1000,0 mg/L de AG3.

**Figura 21** – Atividade de PER de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L e 90,0 mg/L de AIA.

**Figura 22** – Atividade de PER de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L e 1000,0 mg/L de AG3.

**Figura 23** – Peroxidação lipídica de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L e 90,0 mg/L de AIA.

**Figura 24** – Peroxidação lipídica de células de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L e 1000,0 mg/L de AG3.

**Figura 25** – Curva de crescimento de células de sete cepas diferentes de *C. gattii*.

**Figura 26** – Valores de ASC da atividade metabólica para os grupos controle e previamente expostos ao ácido 3-indolacético em diferentes concentrações.

**Figura 27** – Valores de ASC da atividade metabólica para os grupos controle e previamente expostos ao ácido giberélico em diferentes concentrações.

**Figura 28** – Potencial zeta de cada uma das cepas previamente tratadas com AIA e AG3.

**Figura 29** – Taxa de expressão do gene *Grr1*

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Relação das estirpes de *Cryptococcus gattii* utilizadas no presente estudo.

**Tabela 2** – Solubilidade indicada para cada hormônio vegetal.

**Tabela 3** – Estirpes selecionadas para os demais experimentos, hormônios aos quais estas serão expostas previamente a cada experimento e suas respectivas concentrações.

**Tabela 4** – Oligonucleotídeos utilizados nas qRT-PCR

**Tabela 5** – Valores de pH após incubar meio mínimo, sozinho ou inoculado com leveduras, a 28 °C e 37 °C.

**Tabela 6** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de auxina e giberelina frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* a 28 °C e 37 °C.

**Tabela 7** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de AIA e AG3 frente a 13 estirpes de *Cryptococcus gattii* a 28 °C e 37 °C em meio mínimo sólido.

**Tabela 8** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de fluconazol frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* expostas ou não (grupo controle) a diferentes concentrações de hormônios vegetais: ácido indol-3-acético (máxima: 24, 48 e 90 µg/mL e mínima: 0,5 µg/mL) e ácido giberélico (1000 e 0,5 µg/mL).

**Tabela 9** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de anfotericina B frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* expostas ou não (grupo controle) a diferentes concentrações de hormônios vegetais: ácido indol-3-acético (máxima: 24, 48 e 90 µg/mL e mínima: 0,5 µg/mL) e ácido giberélico (1000 e 0,5 µg/mL).

**Tabela 10** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de benomyl frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* expostas ou não (grupo controle) a diferentes concentrações de hormônios vegetais: ácido indol-3-acético (máxima: 24, 48 e 90 µg/mL e mínima: 0,5 µg/mL) e ácido giberélico (1000 e 0,5 µg/mL).

**Tabela 11** – Alteração no diâmetro das células, espessura da cápsula e relação superfície/volume após crescimento em contato com os hormônios vegetais auxina e giberelina, em duas concentrações diferentes cada um, máxima e mínima.

**Tabela 12** – Resumo dos resultados de BLASTN dos genes contra genomas completos de *Cryptococcus gattii*.

**Tabela 13** – Valores de Cts (*Threshold Cycle*) obtidos em triplicata biológica (1, 2 e 3) em qRT-PCR com o uso de iniciadores para amplificação de Grr1 e β-actina (gene normalizador) e como molde o cDNA de *C. gattii* estirpe 1913ER. Duplicata técnica (a e b).

**Tabela 14** – Valores de Cts (*Threshold Cycle*) obtidos em triplicata biológica (1, 2 e 3) em qRT-PCR com o uso de iniciadores para amplificação de Grr1 e  $\beta$ -actina (gene normalizador) e como molde o cDNA de *C. gattii* ICB181. Duplicata técnica (a e b).

**Tabela 15** – Resposta de cada cepa de *C. gattii* frente aos parâmetros avaliados, na presença de AIA (0,5 mg/L; 24,0 mg/L e 90,0 mg/L).

**Tabela 16** – Resposta de cada cepa de *C. gattii* frente aos parâmetros avaliados, na presença de AG3 (0,5 mg/L e 1000,0 mg/L).

## RESUMO

*Cryptococcus gattii* é uma levedura ambiental, globalmente distribuída. Esta levedura é um dos principais agentes causadores da criptococose, uma grave infecção fúngica sistêmica cuja procedência é exclusivamente ambiental. Este fungo é frequentemente isolado de plantas, indicando haver entre estes organismos uma possível associação, que pode ser influenciada por metabólitos de plantas, como os hormônios vegetais (HV) auxina e giberelina. Este trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a influência de hormônios vegetais sobre a morfo-fisiologia e fatores de resistência e virulência de *C. gattii*. Inicialmente, células de *C. gattii* previamente tratadas com diferentes concentrações de ácido giberélico (giberelina) e ácido 3-indolacético (auxina) foram submetidas à análise morfométrica. Tanto auxina quanto giberelina induzem alterações morfológicas cepa-dependente na cápsula e na relação superfície/volume de *C. gattii*. Algumas cepas foram selecionadas de acordo com seu perfil de alteração morfométrica e foram utilizadas para infecção do nemátodo *Caenorhabditis elegans* para avaliar a virulência da levedura previamente tratada com HV, por meio da sobrevivência do verme. A giberelina diminuiu a sobrevivência do verme em três das quatro cepas testadas. Já a auxina aumentou a sobrevivência em duas das três cepas testadas. Além disso, as células tratadas com HV também foram submetidas a ensaio de fagocitose por amebas. A sobrevivência no interior de amebas foi menor em três de quatro cepas tratadas com giberelina e em duas de três cepas tratadas com auxina. O fungo provavelmente adota diferentes estratégias de resposta frente à interação com nemátodos e amebas. Para entender estas alterações na resposta do fungo após contato com HV, foram realizados ensaios para mensurar a produção de enzimas relacionadas a fatores de virulência, como superóxido dismutase e peroxidase, além de verificar a taxa metabólica, potencial zeta e peroxidação lipídica. Auxina induziu o aumento da atividade de SOD e PER, duas enzimas relacionadas à virulência de *C. gattii*. Estes resultados fornecem uma luz no sentido de começar a compreender a complexidade da interação entre *C. gattii* e plantas e a influência desta interação sobre a morfo-fisiologia e virulência da levedura.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus gattii*, virulência, auxina, giberelina

## ABSTRACT

*Cryptococcus gattii* is an environmental yeast, globally distributed. This yeast is one of the main causative agents of cryptococcosis, a severe systemic fungal infection whose origin is exclusively environmental. This fungus is often isolated from plants, indicating that there is between these organisms a possible association, which can be influenced by plant metabolites, such as plant hormones (HV) auxin and gibberellin. This work aimed to evaluate the *in vitro* influence of plant hormones on the morpho-physiology, resistance and virulence factors of *C. gattii*. Initially, *C. gattii* cells pretreated with different concentrations of gibberellic acid (gibberellin) and 3-indoleacetic acid (auxin) underwent morphometric analysis. Both auxin as gibberellin induce strain-dependent morphological changes in the capsule and the surface/volume ratio of *C. gattii*. After that, some strains were selected according to their profile of morphometric changes. They were used for infection of the nematode *Caenorhabditis elegans* to evaluate the virulence of yeast previously treated with HV, through the worm survival. Gibberellin decreased survival of the worm in three of the four strains tested. On the other hand, auxin increased survival in two of three strains tested. Furthermore, HV-treated cells were also submitted to phagocytosis assay amoebae. The yeast survival within the amoebae was lower in three of four strains treated with gibberellin and in two of three strains treated with auxin. This yeast probably adopts different strategies forward to interacting with worms and amoebas. To understand these changes in fungal response after contact with HV, tests were performed to measure the production of enzymes related to virulence factors, such as superoxide dismutase and peroxidase, and to identify the metabolic rate, zeta potential and lipid peroxidation. Auxin increased SOD and PER activity, both enzymes are related to virulence in *C. gattii*. These results give an insight in order to begin to understand the complexity of the interaction between *C. gattii* and plants and the influence of this interaction on the morpho-physiology and yeast virulence.

**Keywords:** *Cryptococcus gattii*, virulence factors, auxin gibberellin

## INTRODUÇÃO

*Cryptococcus gattii* é uma levedura ambiental, frequentemente isolada de plantas, globalmente distribuída e com reconhecida capacidade patogênica para humanos. Esta levedura é um dos principais agentes causadores da criptococose, uma infecção fúngica sistêmica causada pela inalação de propágulos infecciosos de leveduras do grupo *Cryptococcus*. A cada ano, a doença acomete um milhão de pessoas e leva ao óbito 620.000 (Lazéra *et al.*, 2000; Springer e Chaturvedi, 2010).

A procedência da infecção é exclusivamente ambiental, uma vez que não há referência de transmissão entre humanos ou entre outros animais e humanos (Byrnes *et al.*, 2011).

Uma vez que este fungo é frequentemente isolado de plantas ou material vegetal em decomposição, acredita-se que haja uma relação bem estabelecida entre estes organismos (Leite *et al.*, 2012), mas informações sobre o tipo de associação/interação entre eles ainda são escassas. Poucos estudos relacionam fatores ambientais do habitat de *C. gattii* à sua patogenicidade e eventos de resistência. Atualmente, admite-se que a patogenicidade desta levedura pode ter sido selecionada evolutivamente graças à sua interação com o ambiente e com seus predadores naturais (May *et al.*, 2016).

Por isso, entender como o fungo interage com as plantas e quais fatores interferem nesta interação pode ter profunda implicação no entendimento da patogenicidade do micro-organismo. Entre estes fatores, os hormônios vegetais podem ter um papel de destaque.

Até o momento não haviam estudos relacionando os hormônios vegetais aos fatores de virulência e resistência de *C. gattii*, nem à sua interação com hospedeiros ambientais, como amebas e nemátodos. Este é o primeiro trabalho que avalia a influência de hormônios vegetais, como auxina e giberelina, sobre a morfo-fisiologia e fatores de virulência de *C. gattii*, como sua resposta à fagocitose por amebas, sobrevivência intracelular neste protozoário, produção de enzimas antioxidantes, entre outros.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### ***Cryptococcus gattii***

*Cryptococcus gattii* é uma levedura ambiental, ecologicamente estabelecida em árvores, com reconhecida capacidade patogênica e com distribuição geográfica global (Lazéra *et al.*, 1998; Springer e Chaturvedi, 2010).

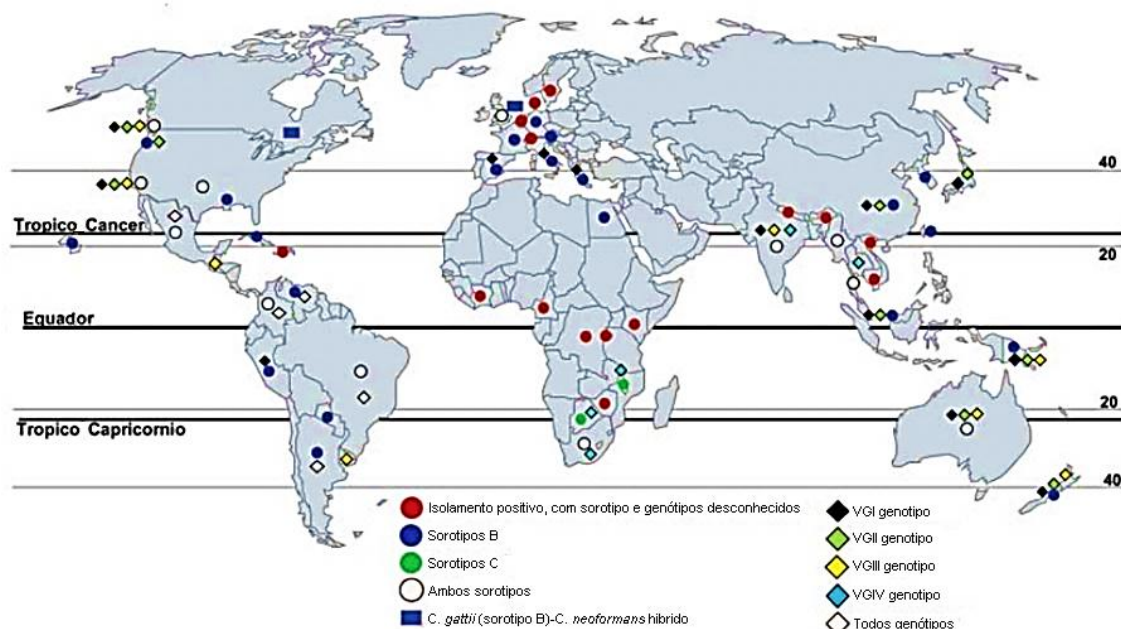
Este micro-organismo já foi identificado ser o causador autóctone de doença em animais domésticos e nativos na Europa, África, Austrália e Nova Zelândia, ou seja, o nicho ecológico da levedura coincide com o habitat destes animais, comprovando a presença de *C. gattii* em regiões de clima tropical, subtropical e temperado no mundo inteiro (Duncan *et al.*, 2006).

Até 2010, esta levedura já havia sido isolada de 54 diferentes espécies de árvores, gimnospermas e angiospermas, incluindo espécies nativas no Brasil, Colômbia, Argentina, Índia e Canadá (Figura 1), como cedro (*Thuja* spp.), amieiro (*Alnus* spp.), abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), carvalho (*Quercus garryana*), amendoeira (*Terminalia cattapa*), mangueira (*Mangifera indica*), dedo-do-pé-fedorento (*Cassia grandis*), falsa fedegoso (*Senna multijuga*), Banyan Chinês (*Ficus microcarpa*), Cabori (*Miroxylum peruiferum*), sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*), Oiti (*Moquilea tomentosa*) entre outras (Hagen e Boekhout, 2010; McMullan *et al.*, 2013). Além disso, o fungo já foi isolado de amostras do ar, solo e corpos d'água em áreas infestadas (Kidd *et al.*, 2007). Apesar disso, supõe-se que *C. gattii* seja mais amplamente distribuído do que o já identificado até agora. De fato, explora-se pouco o ambiente com o objetivo de encontrar esta levedura e amostras ambientais são mais escassas que as clínicas, uma vez que isolados clínicos são prioridade de saúde (Springer e Chaturvedi, 2010).

O fato de *C. gattii* já ter sido isolado de ocos em decomposição de angiospermas e gimnospermas, fornece uma evidência adicional para associações de longo prazo desta levedura com árvores. Os ocos em decomposição destes dois grupos distintos de fanerógamas diferem quanto à composição bioquímica, disponibilidade de nutrientes, presença de água e comunidade microbiana. Normalmente são nichos ecológicos habitados por comunidade microbiana com adaptações especializadas, como basidiomicetos, que participam ativamente da decomposição de material vegetal e ciclagem de nutrientes (Boddy *et al.*, 2008).



Dentro deste filo, algumas espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* chamam a atenção por sua capacidade de causar doenças em humanos e outros animais.



**Figura 1** - Distribuição mundial de *C. gattii* isolados ambientais e clínicos (humanos e veterinários). Círculos informam o sorotipo, losangos informam genótipo e retângulos indicam híbridos entre *C. gattii* e *C. neoformans*. É provável que *C. gattii* seja mais amplamente distribuído do que o relatado (Adaptado de: Springer e Chaturvedi, 2010).

### O gênero *Cryptococcus*

*Cryptococcus* é um gênero de fungos que compreende aproximadamente 80 espécies. Considerando a taxonomia, o gênero pertence ao filo *Basidiomycota*, ao subfilo *Agaricomycotina*, à classe *Tremellomycetes* e à família *Tremellaceae* da ordem *Tremellales* (Taxonomy, NCBI). No entanto, *Cryptococcus* é um grupo polifilético, uma vez que seus representantes ocorrem em diferentes clados de basidiomicetos – Tremellales, Trichosporonales, Filobasidiales e Cystofilobasidiales – segundo estudos filogenéticos baseados na análise da sequência da região D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomoal (Fell *et al.*, 2000). Este mesmo estudo aponta como monofilético o gênero *Filobasidiella*, que abriga duas espécies de crescente importância médica *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, as quais correspondem às fases teleomorfas de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, respectivamente. As espécies que se encaixam no gênero *Filobasidiella*, que comporta também *F. depauperata*, *F. lutea* e *F. amyolenta*, são distintas das mais

de 80 espécies do grupo polifilético *Cryptococcus* (Chen *et al.*, 2014). Desta maneira, é importante destacar que considerar a fase teleomorfa destes organismos classifica-os melhor filogeneticamente, embora didática e popularmente este e outros trabalhos sejam discutidos considerando a fase anamorfa de *C. neoformans* e *C. gattii*.

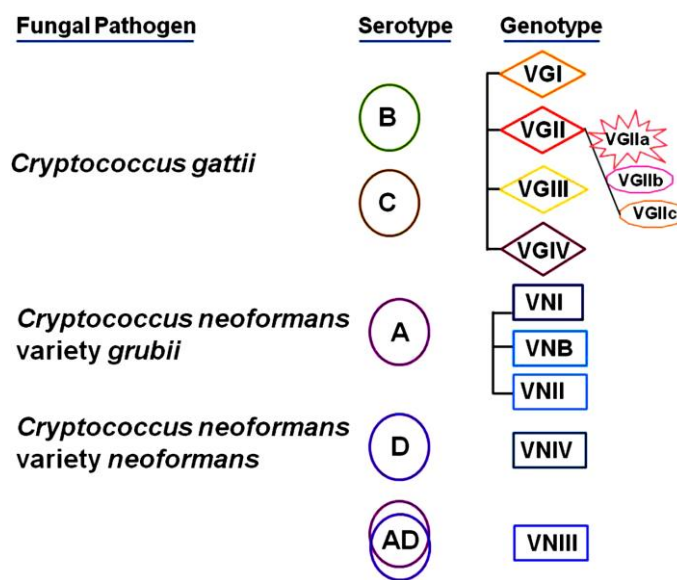
Durante algum tempo, estes agentes foram consideradas uma única espécie. *Cryptococcus neoformans* era considerada uma espécie homogênea, com quatro sorotipos já descritos (A, B, C e D) baseados em estudos sorológicos utilizando anticorpos contra a cápsula do fungo (Chen *et al.*, 2014).

Em 1970, pesquisadores observaram células arredondadas e baciliformes isoladas de paciente com leucemia na África, uma morfologia atípica de uma linhagem de *C. neoformans*, que passou a ser considerada uma nova entidade taxonômica: *C. neoformans* var. *gattii* (Mitchell e Perfect, 1995; Bovers *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014). O marco para a separação em duas diferentes espécies foi a descoberta da forma sexual desta linhagem. Em laboratório, pesquisadores observaram que o acasalamento entre cepas compatíveis (MAT $\alpha$  e MAT $\alpha$ ) resultou na formação de basidiósporos, ou esporos sexuais, baciliformes (Chen *et al.*, 2014). As diferenças fenotípicas ficaram evidentes, uma vez que os basidiósporos de *C. neoformans* são esféricos, elípticos ou cilíndricos com paredes rugosas e os basidiósporos de *C. bacillispora* são baciliformes e com parede lisa (Kwon-Chung, 1976). Na medida em que os estudos foram progredindo, foram descritas diferenças bioquímicas, fisiológicas, filogenéticas, genéticas e epidemiológicas, entre *C. neoformans* e *C. gattii*, reforçando a separação destas espécies (Kwon-Chung, 1976; Fan *et al.*, 1995; Boekhout e Van Belkum, 1997).

Atualmente, sabe-se que *C. gattii* e *C. neoformans* provavelmente divergiram de um ancestral saprofítico ambiental comum por volta de 30 a 40 milhões de anos atrás (Findley *et al.*, 2009). Estas duas espécies são distintas inclusive em relação à virulência, às manifestações clínicas e à resposta à terapia antifúngica (Ma e May, 2009; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Chen *et al.*, 2014).

Os sorotipos B e C que pertenciam à espécie *C. neoformans* var. *gattii* atualmente pertencem à nova espécie *C. gattii*, que possui quatro tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII e VGIV. As estirpes de cada tipo molecular diferem quanto à virulência, às manifestações da infecção, à susceptibilidade ao tratamento

antifúngico, ao tipo de reprodução, à epidemiologia e aos nichos ecológicos (Chen *et al.*, 2014). O genótipo VGII abriga, ainda, três subtipos: VGIIa, VGIIb e VGIIc, que empregam diferentes circuitos transcricionais e apresentam diferentes fenótipos de virulência. A figura 2 esquematiza os diferentes sorotipos e genótipos de *C. neoformans* e *C. gattii* (Chen *et al.*, 2014).



**Figura 2** – Esquema dos diferentes sorotipos e genótipos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. O status taxonômico do sorotipo AD não é claro (Chaturvedi e Chaturvedi, 2011).

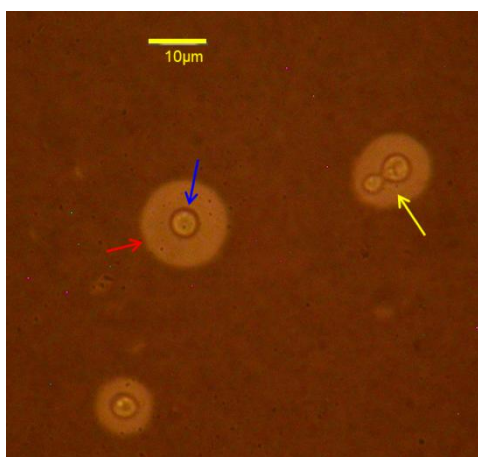
A genotipagem é crucial para a classificação desta levedura. No entanto, conhecer o arsenal bioquímico, fisiológico e a capacidade metabólica de *C. gattii*, além de auxiliar na identificação da espécie, ajuda a compreender a relação entre seus fatores de sobrevivência no ambiente e seus fatores de virulência.

### ***C. gattii* – características específicas e fatores de virulência**

Dentre as características bioquímicas e fisiológicas de *C. gattii*, cita-se: a assimilação de creatinina, não fermentação de açúcares, hidrólise de amido, sensibilidade a ciclo-heximida e resistência a difenil ( $C_6H_5C_6H_5$  – na concentração de 100ppm). Estas são características que, juntas aos seus putativos fatores de virulência – habilidade de crescer a 37°C e de produzir de fosfolipase, urease, melanina, superóxido dismutase (SOD), peroxidase e trealose (Shields e Ajello, 1966; Byrnes *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014) – podem ser usadas

para identificar a espécie. Entretanto, uma característica morfológica marcante deste organismo, como seu principal fator de virulência, é a cápsula.

A cápsula é um tipo de material gelatinoso que reveste a célula, composta principalmente por glucuronoxilomananas, glucuronoxilomanogalactanas e, em menor quantidade, por manoproteínas (Kumar *et al.*, 2011). A cápsula é uma estrutura típica do grupo *Cryptococcus* e é vista como um halo ao redor das células quando estas são imersas em tinta nankin (Figura 3). Uma peculiaridade da cápsula é sua habilidade de alterar de tamanho de acordo com as condições ambientais (Zaragoza e Casadevall, 2004). Este processo é fundamental para a sobrevivência da levedura no hospedeiro humano, pois o aumento da cápsula protege a levedura dos mecanismos de defesa do hospedeiro durante a criptococose (Zaragoza *et al.*, 2008).



**Figura 3** – Foto ilustrativa da célula de *Cryptococcus gattii* (Foto: Carvalho, 2015). Seta azul – célula fúngica; seta vermelha – cápsula polissacarídica; seta amarela – reprodução assexuada, brotamento.

A maioria dos fungos tem crescimento ótimo na faixa de temperatura entre 25 °C e 30 °C. Os fungos que têm a capacidade de crescer a 37 °C podem invadir e sobreviver no hospedeiro mamífero. A termotolerância é um dos requisitos para o desenvolvimento de micoses sistêmicas em humanos e é um atributo de alguns fungos patogênicos como *C. neoformans*, *C. gattii*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii* (Perfect *et al.*, 2010).

As fosfolipases são enzimas que hidrolisam as ligações éster dos fosfolipídios, presentes na membrana e por isso são importantes durante a invasão do tecido do hospedeiro. Dentre os quatro tipos de fosfolipases (A, B, C e D) (Calderone e Fonzi,

2001; Yang, 2003), a fosfolipase B é um importante fator de virulência que *C. gattii* compartilha com alguns fungos porque tem atividade de hidrolase e de lisofosfolipase-transacilase, permitindo ao fungo liberar os ácidos graxos do fosfolípido e os remanescentes de um lisofosfolípido, em seguida transferir um ácido graxo livre para um lisofosfolípido e produzir fosfolípidos (Ghannoum, 2000).

A urease também está envolvida na invasão do tecido hospedeiro. Esta metaloenzima catalisa a conversão de ureia em amônia e carbamato. Durante a infecção por *C. gattii*, a urease atua como coadjuvante na disseminação hematogênica e na invasão ao sistema nervoso central, ao auxiliar no cruzamento da barreira hematoencefálica através de um mecanismo paracelular. (Olszewski *et al.*, 2004; Torres-Rodríguez *et al.*, 2008; Ma e May, 2009).

A lacase, ancorada à parede de *C. gattii*, catalisa reações que culminam na síntese de melanina. Na natureza, a melanina protege o fungo de condições ambientais adversas como extremos de temperatura e radiações ultravioletas (Pukkila-Worley *et al.*, 2005). No hospedeiro mamífero, a melanina protege o fungo de radicais livres e outros agentes oxidantes produzidos por antifúngicos e pelo sistema imune do hospedeiro. Além disso, a dopamina, presente no sistema nervoso central, serve como substrato para a síntese de melanina, por isso a capacidade de disseminação para o sistema nervoso central de *C. gattii* está relacionado também à sua capacidade de sintetizar melanina (Mednick *et al.*, 2005; Perfect, 2005; Bovers *et al.*, 2008; Ma e May, 2009).

*Cryptococcus gattii* conta com diferentes meios para proteção contra agentes oxidantes. Além da melanina e da cápsula, a levedura conta com um complexo enzimático que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PER), catalase e trealose (Narasipura *et al.*, 2003). Estas enzimas protegem o fungo de estresses oxidativo e nitrosativo causado pelo sistema imune do hospedeiro e por agentes antifúngicos (Ferreira *et al.*, 2013).

A levedura *C. gattii* chama atenção por sua capacidade de causar doença em indivíduos imunocompetentes, já que a criptococose causada por *C. neoformans* é uma micose sistêmica que apresenta, predominantemente, caráter oportunista (Chen *et al.*, 2014).

Para o estabelecimento da criptococose invasiva, o fungo, após ser inalado, deve ser capaz de penetrar no tecido pulmonar, reproduzir-se, atingir a corrente

sanguínea e disseminar-se para outros órgãos, principalmente para o sistema nervoso central. Muitas características bioquímicas de *C. gattii* estão intimamente relacionadas a esta capacidade e por isso são chamadas de fatores de virulência (Buchanan e Murphy, 1998). A expressão dos fatores de virulência no momento do contato entre mamífero e *C. gattii* está entre os principais fatores que determinarão o curso da criptococose.

### **Criptococose**

A criptococose é uma infecção sistêmica causada principalmente por *C. neoformans* e *C. gattii*, embora *C. laurentii* e *C. albidus* também já tenham sido identificados como agentes causadores da infecção (Khawcharoenporn *et al.*, 2007). A doença é causada pela inalação de propágulos fúngicos a partir de fonte ambiental, mas ainda não se sabe ao certo qual a forma infecciosa: se são blastosporos produzidos sexualmente, células de levedura dessecadas ou basidiósporos produzidos sexualmente (Chen *et al.*, 2014). Alternativamente, a levedura pode ser inoculada diretamente no tecido de maneira traumática (Chayakulkeeree e Perfect, 2006). Admite-se que a infecção seja de procedência exclusivamente ambiental, uma vez que não há referência de transmissão entre humanos ou entre outros animais e humanos (Byrnes *et al.*, 2011).

O quadro clínico da criptococose varia muito, desde assintomático a fatal, se não tratado adequadamente, e depende, dentre outros fatores, da condição imune do hospedeiro e da virulência do fungo (Chen *et al.*, 2014).

O tratamento para a criptococose preconizado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas indica principalmente o uso de azólicos e poliênicos e depende do quadro clínico da doença e do estado imunológico do hospedeiro (Perfect, 2005; Perfect *et al.*, 2010). Fluconazol (FCZ) e anfotericina B (ANB) são as principais drogas de escolha. No entanto, estes fármacos podem interagir de modo antagônico dependendo da concentração, indicando que maior atenção deve ser dada na combinação destas duas drogas para o tratamento da criptococose (Santos *et al.*, 2012).

Além da dificuldade na escolha do tratamento adequado, recentemente foi notificado um aumento de isolados de *Cryptococcus* spp., principalmente *C. gattii*, resistentes ao fluconazol (Pfaller *et al.*, 2011). E ainda, uma linhagem de *C. gattii*

resistente ao FCZ também se mostrou resistente à ANB (Santos *et al.*, 2012), confirmando o fenômeno de resistência cruzada entre estes antifúngicos. O mesmo fenômeno foi observado *in vitro* por Carneiro (2015) entre fluconazol e benomyl (BEN), um fungicida de uso ambiental, o que pode comprometer a eficácia de antifúngicos clínicos. (Faria-Ramos *et al.*, 2014).

A resistência clínica aos antifúngicos tem resultado no aumento da morbidade e mortalidade (Ghannoum e Rice, 1999).

Um micro-organismo resistente a uma droga é aquele que não é sensível a tal substância e cresce mesmo em altas concentrações da mesma (Ghannoum e Rice, 1999; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014).

A resistência pode ser resultado da seleção de cepas naturalmente menos sensíveis a determinada substância ou de resistência adquirida, na qual as cepas tornam-se resistentes durante a terapia em resposta à presença de determinada substância (Valiante *et al.*, 2015).

Mecanismos de resistência adquirida frequentemente estão relacionados à redução da captação da droga, a modificação do alvo da droga, e/ou uma redução no nível celular da droga devido à regulação positiva de transportadores de efluxo de drogas (bombas) e biofilmes, que restringem a entrada do fármaco. Diversos fatores de regulação gênica que induzem mecanismos de resistência específicos têm sido observados em fungos (Valiante *et al.*, 2015). A evolução dos fungos os capacitou a responder ao estresse de maneira altamente dinâmica e sabe-se que as respostas ao estresse promovem a adaptação às drogas (Perlin *et al.*, 2015).

Embora fenômenos de resistência entre antifúngicos sejam extensivamente estudados, os estudos relacionando fatores ambientais do habitat de *C. gattii* a eventos de resistência são escassos (Lazera *et al.*, 2000). Até o momento, não há estudos relacionando fatores ambientais do habitat de *C. gattii* a eventos de resistência.

### **Ecologia de *C. gattii* e sua associação com outros organismos**

Um intrigante dilema a respeito de *Cryptococcus gattii* é a relação entre sua capacidade patogênica, com fatores de virulência altamente específicos, e sua habilidade bem estabelecida de sobrevivência no ambiente. Sugere-se que a infecção por *Cryptococcus* spp. ocorra de forma acidental, uma vez que o fungo não

depende de animais para completar seu ciclo de vida. Deste modo, uma explicação para o dilema é que os ditos fatores de virulência das espécies patogênicas, como alteração morfológica, produção de determinadas enzimas, melanização e outros, foram selecionados evolutivamente graças à interação levedura-ambiente (May *et al.*, 2016). Portanto, é extremamente relevante entender como o ambiente influencia o comportamento do fungo.

É possível que o nicho ecológico de *C. gattii* esteja relacionado à sua ampla distribuição. Nicho ecológico é definido como o conjunto de requisitos que permite ao organismo persistir e reproduzir no ambiente. É a associação entre as características individuais bioquímicas do espécime e a manifestação delas na comunidade, resultando no tipo de interação entre o organismo e os fatores bióticos e abióticos que o cercam (Begon *et al.*, 2007). Este parâmetro ainda é pobremente estabelecido para *C. gattii* (Lazera *et al.*, 2000).

Ao encontrar *C. gattii* em ocos de árvores Lazera e colaboradores (2000) indicaram uma possível ligação entre estes organismos e seus ciclos de vida na natureza, sugerindo o nicho natural primário para esta espécie.

Desde que foi isolado pela primeira vez a partir de eucaliptos, *C. gattii* já foi detectado em mais de 50 espécies de plantas. Portanto, é bem estabelecido que há uma relação entre *C. gattii* e plantas ou material vegetal em decomposição (Leite *et al.*, 2012), mas informações sobre o tipo de associação/interação entre estes organismos ainda são escassas.

De acordo com Xue e colaboradores (2007), *C. gattii* pode completar seu ciclo sexual ao interagir com plantas. Para Leite e colaboradores (2012), há uma associação biotrófica entre o micro-organismo e a planta, e esta serve como “árvore hospedeira”, a partir de onde os esporos do fungo irão se dispersar.

Springer e colaboradores (2010) observaram que *C. gattii* produz fibrilas extracelulares na superfície de plantas e sugeriram que estas estruturas poderiam ser uma adaptação ecológica do fungo, ao observar que quando há formação destas fibrilas o fungo mostra-se mais virulento em modelo murino e é capaz de escapar de células humanas. Estes experimentos sugerem que há uma ligação entre o *fitness* ecológico de *C. gattii* e sua virulência. Por isso, entender como o fungo interage com as plantas e quais fatores interferem nesta interação pode ter profunda implicação



no entendimento da patogenicidade do micro-organismo. Entre estes fatores, os hormônios vegetais podem ter um papel de destaque.

Hormônios vegetais, ou fito-hormônios, são compostos químicos produzidos numa célula vegetal que atuam como mensageiros, pois agem em outra célula modulando processos celulares como regulação e coordenação do metabolismo, crescimento e morfogênese. O desenvolvimento vegetal é regulado principalmente por seis principais tipos de hormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e brassinosteróides, mas outras moléculas sinalizadoras como ácido jasmônico, ácido salicílico e pequenos polipeptídeos também são importantes, pois participam nos processos de resistência a patógenos e defesa contra herbívoros (Kerbaui, 2008; Taiz e Zeiger, 2013). Compostos orgânicos produzidos pelas plantas, como hormônios vegetais, podem ter importantes implicações no ciclo de vida dos organismos que estão associados a elas.

Embora chamados de hormônios “vegetais”, já é bem conhecido que alguns destes compostos também podem ser sintetizados por fungos. A produção de auxina por fungos foi descrita na metade do século passado (Gruen, 1959). Além da auxina, os fungos também são capazes de sintetizar giberelina (Tudzynski, 2005), jasmonatos (Linares *et al.*, 2010), ácido abscísico e citocinina (Morrison *et al.*, 2015). Também foi visto que o ácido indol-3-acético (AIA) é uma molécula sinalizadora em micro-organismos, porque afeta a expressão gênica (Spaepen e Vanderleyden, 2011).

Fungos patógenos de plantas podem responder à presença de hormônios vegetais. Prusty e colaboradores (2004) descobriram que o AIA induz a filamentação e o crescimento invasivo na levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Este composto também induz o crescimento de hifas no patógeno *Candida albicans*, regulando um de seus fatores de virulência (Rao *et al.*, 2010). Com isso, levantaram a questão de que os hormônios vegetais poderiam agir como um sinal do ambiente que desencadeia alterações morfológicas durante o ciclo de vida *Cryptococcus* spp. na natureza.

Xue e colaboradores (2007) estabeleceram um sistema para estudar a interação *Cryptococcus*-planta e descobriram que o fungo pode desenvolver uma relação parasitária com a planta. Além disso, a presença de mio-inositol induziu *mating* e filamentação de *C. gattii* e o hormônio vegetal AIA estimulou seu

crescimento. Estes resultados indicam que o patógeno humano pode completar seu ciclo sexual na natureza, o que representa uma etapa fundamental na replicação e propagação deste micro-organismo.

Foi demonstrado, então, que compostos orgânicos produzidos por plantas interferem no ciclo de vida de *C. gattii* (Xue *et al.*, 2007), mas não se sabe ainda se os hormônios vegetais influenciam diretamente os fatores de resistência e virulência deste patógeno e sua resposta na interação com outros organismos como amebas e nemátodos.

*Acanthamoeba castellanii* é uma ameba de vida livre no solo que se alimenta e age como hospedeiro de vários patógenos intracelulares. Presume-se que a interação entre *C. gattii* e este hospedeiro forneça uma explicação para a virulência da levedura e sua estratégia patogênica intracelular em macrófagos, uma vez que a associação do fungo com a ameba ocorre de modo semelhante à associação deste com macrófagos (Steenbergen *et al.*, 2001). Assim, a associação com amebas pode ter atuado como pressão evolutiva de modo a manter a virulência que a levedura manifesta na infecção em mamíferos. Devido a isso, a associação *Cryptococcus*-ameba funciona como um sistema modelo para explorar as interações micro-organismo-hospedeiro, porque a associação *Cryptococcus*-macrófagos é semelhante a este modelo. (Feldmesser *et al.*, 2001; Levitz, 2001; Malliaris *et al.*, 2004; Derengowski *et al.*, 2013).

Outro organismo frequentemente usado como modelo para o estudo de fatores de virulência de *Cryptococcus* spp. é o nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Mylonakis e colaboradores (2002) constataram que leveduras mutantes mais virulentas em mamíferos também foram mais virulentas para *C. elegans*. Estes autores sugerem que a patogênese de *Cryptococcus* spp. em mamíferos pode ser consequência de adaptações evolutivas da levedura durante sua interação com predadores ambientais, como amebas e nemátodos e propõem a utilização de *C. elegans* como modelo simples para o estudo da virulência de *Cryptococcus* spp.

É importante destacar que existem questões a serem esclarecidas na compreensão da ecologia de *C. gattii*. Uma delas é entender a relação hormônios vegetais-patogenicidade. Até o presente momento não há estudos relacionando os hormônios vegetais aos fatores de virulência e resistência de *C. gattii*, nem à sua interação com hospedeiros ambientais.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, a influência de hormônios vegetais sobre a morfo-fisiologia e fatores de resistência e virulência de *Cryptococcus gattii*.

### Objetivos específicos

- ⇒ Determinar as concentrações inibitórias mínimas dos hormônios vegetais auxina (ácido indol-3-acético) e giberelina (ácido giberélico) frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* de acordo com CLSI e em meio mínimo sólido,
- ⇒ Determinar as concentrações inibitórias mínimas de antifúngicos de uso clínico (fluconazol e anfotericina B) e ambiental (benomyl) frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* tratados com hormônios vegetais e comparar com não tratados,
- ⇒ Avaliar o efeito de hormônios vegetais sobre a morfometria de células de *C. gattii*,
- ⇒ Selecionar estirpes de *C. gattii* que reajam mais acentuadamente à presença de hormônios vegetais, em relação à variação morfométrica,
- ⇒ Avaliar, nas estirpes selecionadas, a influência dos hormônios vegetais na sobrevivência de *C. elegans* infectados com *C. gattii*,
- ⇒ Avaliar a influência dos hormônios vegetais na resposta de *C. gattii* à fagocitose pela ameba *Acanthamoeba castellanii*,
- ⇒ Analisar, nas estirpes selecionadas, a influência dos hormônios vegetais em diferentes parâmetros fisiológicos relacionados à virulência de *C. gattii*, como
  - Resposta antioxidante (produção de peroxidase e superóxido dismutase),
  - Peroxidação lipídica,
  - Curva de crescimento em meio MMs,
  - Potencial zeta.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ESTIRPES FÚNGICAS

Neste trabalho, foram utilizadas 13 estirpes de *Cryptococcus gattii*, sendo nove isolados de origem clínica, dois isolados de origem ambiental pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia de Universidade Federal de Minas Gerais e duas linhagens de referência (ATCC® 24065™ e ATCC® 32608™) (TABELA 1).

As culturas foram preservadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) em geladeira. Antes de cada ensaio, foram repicadas em meio mínimo sólido (MMs) (glicose 15 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 29,4 mM, glicina 13 mM e tiamina 3,0 µM, pH 5,5 acrescido de ágar 20 g/L) e incubadas a 28 °C por 48 horas.

**Tabela 1** – Relação das estirpes de *Cryptococcus gattii* utilizadas no presente estudo

<b>Linhagens</b>	<b>Origem</b>
ATCC 24065	Amostra referência
ATCC 32608	Amostra referência
L24/01	Clínico
L27/01	Clínico
L28/02	Clínico
23/10993	Clínico
29/10893	Clínico
L135/03	Clínico
547/OTTI	Ambiental
196L/03	Clínico
1913ER	Clínico
ICB181	Ambiental
LMM818	Clínico

### HORMÔNIOS VEGETAIS

Os hormônios vegetais utilizados neste estudo foram ácido 3-indolacético (AIA) (175,18 g/mol) e ácido giberélico (AG3) (346,37 g/mol), pertencentes às classes das auxinas e giberelinas, respectivamente. As substâncias foram armazenadas a -20 °C e temperatura ambiente, respectivamente, segundo recomendações do fabricante/fornecedor, Sigma Aldrich.

### PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE HORMÔNIO

As substâncias em pó foram pesadas em uma balança analítica calibrada com pesos-padrão de referência pela Organização Nacional de Metrologia ou outros aprovados (CLSI, 2008). As soluções-padrão foram formuladas de acordo com a solubilidade de cada composto, sendo que a concentração da solução estoque de AIA foi equivalente a 5.000 µg/mL e a concentração da solução estoque de AG3 foi equivalente a 50.000 µg/mL. As concentrações dos hormônios nos testes inicialmente variaram entre 0,5 e 1.562 µg/mL.

## 1. TESTE DE TOXICIDADE DE ETANOL, UTILIZADO COMO SOLVENTE PARA OS HORMÔNIOS VEGETAIS, FRENTE A *Cryptococcus gattii*.

Os hormônios vegetais utilizados neste estudo são insolúveis, ou pouco solúveis, em água e, por isso, foram solubilizados em álcool etílico. A tabela 2 exibe o solvente e a solubilidade indicada pelo fornecedor dos hormônios vegetais utilizados neste trabalho. Antes de colocar a levedura em contato com os hormônios, foi realizado teste de toxicidade a fim de verificar qual a maior concentração de etanol poderia ser usada nos testes subsequentes com *C. gattii* sem que este solvente interferisse na viabilidade da levedura. Este teste foi realizado com 13 cepas de *C. gattii*, em triplicata.

**Tabela 2** – Solubilidade indicada para cada hormônio vegetal

<b>Classe do hormônio</b>	<b>Nome</b>	<b>Solubilidade<sup>1</sup></b>
Auxina	3-Indoleacetic acid	50 g/L Etanol
Giberelina	Gibberellic acid	Muito solúvel em etanol e metanol

1. Solubilidade indicada pelo fornecedor

## 2. ESTABILIDADE DE AIA E AG3 EM DIFERENTES CONDIÇÕES

A estabilidade de AIA e AG3 foi testada nos meios RPMI1640 (Sigma Aldrich) e meio mínimo, utilizados neste trabalho para cultivo de *Cryptococcus* spp. Quatro diferentes concentrações destes hormônios (3 µg/mL, 48 µg/mL, 1.560 µg/mL e 5.000 µg/mL), separadamente, foram preparadas nos meios citados e as soluções foram incubadas a 28 °C e 37 °C. Para auxina, houve uma condição adicional: temperatura ambiente na presença de luz. As demais soluções com auxina foram incubadas na ausência de luz. As soluções foram incubadas por até 72 horas. Nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, alíquotas de 200 µL foram submetidas a leitura em

espectrofotômetro. A leitura foi feita em comprimentos de onda que variaram de 200 a 900 nm. A absorvância foi medida a cada 10 nm neste intervalo.

### 3. ESTABILIDADE DO MEIO MÍNIMO APÓS CULTIVO DE *Cryptococcus gattii*

O meio mínimo não conta com um agente tamponador em sua composição. Por isso, seu pH poderia alterar-se após crescimento microbiano e interferir na atividade dos hormônios vegetais. Foi feito um cultivo de duas cepas separadamente de *C. gattii* (ATCC 24065 e L27/01) em meio mínimo líquido (MML) para verificar se metabólitos resultantes do crescimento das leveduras neste meio alterariam seu pH.  $10^5$  células de cada estirpe foram inoculadas em 20 mL de meio mínimo e incubadas a 28 °C e 37 °C. O mesmo volume de meio mínimo isento de células também foi incubado nas mesmas condições. Após 48 horas, os meios foram centrifugados, o sobrenadante foi filtrado em membrana de poro 0,22 µm e o pH destas soluções foi mensurado.

Para os testes e/ou análises 4- CIM de AIA e AG3; 5- CIMp de AIA e AG3; 6- CIM de ANB, FCZ e BEN e 7- Morfometria descritos abaixo foram utilizadas 13 estirpes de *Cryptococcus gattii* (Tabela 1). A partir da análise dos resultados de morfometria, as cepas L24/01, L27/01, 547/OTTI, 1913ER, ICB181 e 29/10893 foram selecionadas e submetidas a análise nos testes 8- Sobrevida de *Caenorhabditis elegans*; 9- Fagocitose; 10- Ensaio de *killing*; 11- Atividade de SOD e PER; 12- Peroxidação lipídica; 13- Curva de crescimento; 14- Potencial zeta. Para análise de qRT-PCR, apenas as cepas ICB181 e 1913ER foram utilizadas.

### 4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM - µg/mL) DE AIA E AG3 FRENTE A 13 LINHAGENS DE *Cryptococcus gattii*, DE ACORDO COM CLSI

A susceptibilidade das cepas de *C. gattii* frente aos hormônios vegetais AIA e AG3 foi determinada segundo a metodologia de microdiluição em caldo presente no documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, anteriormente denominado NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, adaptada (CLSI, 2008).

#### 4.1 PREPARO DAS PLACAS PARA O TESTE CIM

Os testes de susceptibilidade foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços de fundo chato. Foram distribuídos 100 µL da solução de cada hormônio diluído em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) em cada poço, variando a concentração do hormônio. A concentração inicial a partir da qual foi realizada a diluição foi duas vezes a maior concentração do teste (CLSI, 2008). A faixa de concentração avaliada foi entre 3 e 1.562 µg/mL, sendo que nos poços com a maior concentração de hormônio, a concentração do solvente, etanol, correspondeu à metade de sua concentração inibitória mínima. As soluções de hormônios foram diluídas, a partir da solução estoque, no momento do experimento em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) constituído por glutamina, indicador vermelho de fenol e sem a presença de bicarbonato para minimizar o efeito das substâncias utilizadas como solventes frente aos micro-organismos (CLSI, 2008 – com adaptações). Em cada placa, uma coluna foi mantida para controle de crescimento (apenas RPMI e inóculo) e outra coluna foi mantida para controle de toxicidade de etanol (RPMI, inóculo e a maior concentração de etanol presente no teste – 3,25%).

#### 4.2 PREPARO DOS INÓCULOS PARA O TESTE CIM

Os isolados fúngicos foram cultivados em ASD e incubados por 48 horas a 35 °C. *A posteriori*, colônias fúngicas foram suspensas em solução salina (0,85%) esterilizada. A concentração do inóculo foi mensurada pela transmitância no espectrofotômetro, com o comprimento de onda de 530 nm, buscando obter um valor de 75-77%, o que corresponde a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL. Este inóculo inicial foi diluído em RPMI numa proporção de 1:50 e, em seguida, novamente diluído, numa proporção de 1:20, de maneira a atingir uma suspensão com  $1 \times 10^3$  células/mL. Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em cada poço da placa de microdiluição, sendo todo o teste realizado em duplicata (CLSI, 2008). Por fim, as placas foram incubadas a 28 °C e 35 °C por 72 horas para posterior leitura e análise.

#### 4.3 LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A leitura foi realizada visualmente, por meio da determinação da menor concentração capaz de inibir 100% de crescimento nos poços contendo a solução com os hormônios comparada ao controle de crescimento (CLSI, 2008).

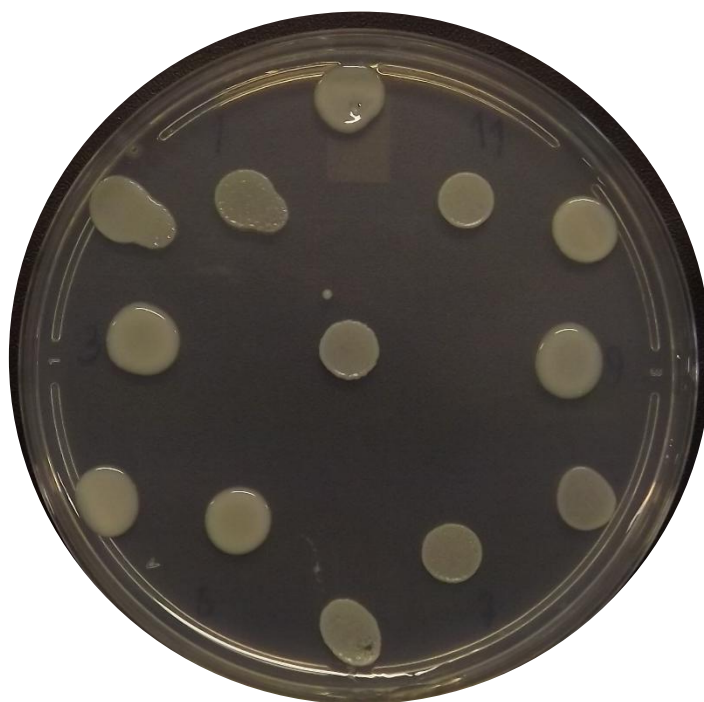
## 5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE HORMÔNIOS VEGETAIS EM MEIO SÓLIDO – CIMp

As concentrações inibitórias mínimas em meio sólido (CIMp) para os hormônios foram determinadas por meio da suplementação dos hormônios em meio mínimo sólido (MMs) em concentrações que variaram de 3 a 1.000 µg/mL.

### 5.1 PREPARO DOS INÓCULOS PARA O TESTE CIMp

Os isolados fúngicos foram cultivados em MMs e incubados por 48 horas a 28 °C. *A posteriori*, colônias fúngicas foram suspensas em solução salina (0,85%) esterilizada. A concentração do inóculo foi mensurada pela transmitância no espectrofotômetro, com o comprimento de onda de 530 nm, buscando obter um valor de 75-77%, o que corresponde a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL.

Um volume de 10 µL desta suspensão de cada cepa foi transferido para o MMs suplementado com os hormônios (MMs + hormônio vegetal) ou MMs isento de hormônios (controle de crescimento) (Figura 4).



**Figura 4** – Foto ilustrativa do teste de concentração inibitória mínima em meio sólido. Cada *spot* corresponde a 10 µL de uma cepa de *C. gattii*.

Este teste foi feito em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C e 37 °C, por 72 horas.



## 5.2 LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A leitura foi realizada visualmente, por meio da determinação da menor concentração capaz de inibir 100% de crescimento nas placas contendo a solução com os hormônios comparada ao controle de crescimento.

Após determinar a CIM em meios líquido e sólido, foram utilizadas para os testes seguintes a concentração sub-inibitória (ou a máxima concentração possível, quando o hormônio não inibe a levedura) e a concentração de 0,5 µg/mL de cada hormônio.

## 6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE FLUCONAZOL, ANFOTERICINA B E BENOMYL PARA *Cryptococcus gattii* APÓS TRATAMENTO COM HORMÔNIOS VEGETAIS

A susceptibilidade das cepas de *C. gattii* frente aos antifúngicos fluconazol (FCZ), anfotericina B (ANB) e benomyl (BEN), após tratamento com hormônios vegetais, foi determinada segundo a metodologia de microdiluição em caldo presente no documento M27-A3 (CLSI, 2008).

Células de *C. gattii* foram previamente cultivadas em MMs com o hormônio vegetal ou isento do hormônio (controle) por 48 horas a 28 °C.

### 6.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ANTIFÚNGICO

Uma solução estoque de FCZ, ANB e BEN foi preparada de acordo com o protocolo CLSI. FCZ foi solubilizado em água destilada estéril, ANB em dimetil sulfóxido 100% (DMSO - Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) e BEN em acetona. Todas as soluções estoque (de FCZ, ANB, BEN, AIA e AG3) foram diluídas no momento do experimento em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) (CLSI, 2008 – com adaptações). As concentrações testadas variaram entre 0,125 e 64,0 µg/mL para FCZ, entre 0,03 e 16,0 µg/mL para ANB e entre 2,0 e 64,0 µg/mL para BEN.

### 6.2 PREPARO DAS PLACAS PARA O TESTE

Os testes de susceptibilidade foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços de fundo chato. Foram distribuídos 100 µL da solução de antifúngico em

cada poço, variando a concentração. A concentração inicial a partir da qual foi realizada a diluição foi duas vezes a maior concentração do teste (CLSI, 2008).

### 6.3 PREPARO DOS INÓCULOS PARA O TESTE CIM

O preparo dos inóculos foi de maneira similar ao descrito no item 4.2.

### 6.4 LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

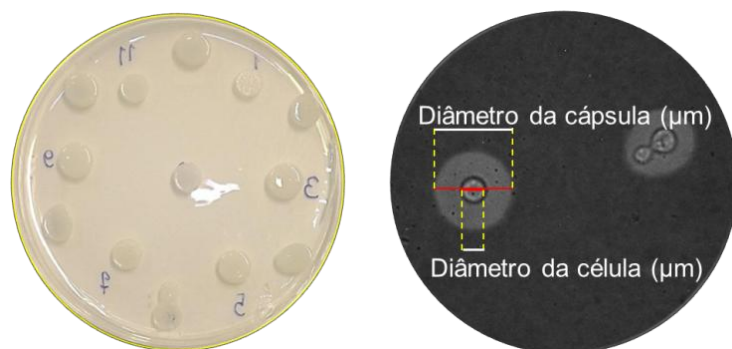
A leitura foi realizada visualmente, por meio da determinação da menor concentração capaz de inibir 100% de crescimento para ANB e BEN, 80% para FCZ comparada ao controle de crescimento (CLSI, 2008).

## 7. ANÁLISE MORFOMÉTRICA - VISUALIZAÇÃO E MENSURAÇÃO DO TAMANHO DE CÉLULA E CÁPSULA PELA COLORAÇÃO NEGATIVA COM TINTA NANQUIM

Para a morfometria de célula e cápsula, células de *C. gattii* previamente cultivadas em MMs por 48 horas a 28 °C foram suspensas em solução salina (0,85%) esterilizada. A concentração do inóculo foi mensurada pela transmitância no espectrofotômetro, com o comprimento de onda de 530 nm, buscando obter um valor de 75-77%, o que corresponde a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL.

Um volume de 10 µL desta suspensão de cada uma das 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* foi incubada a 28 °C por 48 horas em cinco diferentes condições: a) em meio mínimo sólido (controle); b) em MMs na presença de AIA na concentração de 0,5 µg/mL; c) em MMs na presença de AIA em concentração subinibitória (24, 48 ou 90 µg/mL dependendo da estirpe); d) em MMs na presença de AG3 na concentração de 0,5 µg/mL e e) em MMs na presença de AG3 na concentração de 1000,0 µg/mL.

Uma alçada de cada cultivo foi suspensa numa lâmina com tinta nankin, para visualização em microscópio óptico e captura de imagem. Os tamanhos das células e cápsulas de pelo menos 30 espécimes de cada cultivo foram mensurados com o auxílio do programa Image J (Institutos Nacionais de Saúde - NIH, Bethesda, MD). Com os dados obtidos foi feito cálculo da relação superfície/volume. A figura 5 mostra em uma placa como foi feito o cultivo e uma representação de como os dados morfológicos das leveduras foram adquiridos.



**Figura 5** - Placa com cultivo das cepas em uma das condições (esq.). Foto e representação esquemática de mensuração do tamanho da cápsula e diâmetro celular (dir.).

Após o ensaio morfométrico, algumas cepas foram selecionadas baseadas em seus diferentes perfis de resposta para verticalizar o estudo sobre a influência dos hormônios vegetais nos fatores de virulência de *C. gattii*. As cepas 29/10893, ICB181 e 1913ER foram selecionadas para continuar os estudos com AIA e as cepas L24/01, L27/01, 1913ER e 547/OTTI foram selecionadas para continuar os estudos com AG3. As cepas selecionadas foram submetidas a nova análise morfométrica, com cinco réplicas biológicas cada uma, a fim de confirmar os resultados observados.

A concentração para cada hormônio vegetal trabalhada nos estudos seguintes continua sendo a utilizada no ensaio de morfometria. A tabela 3 reúne informações sobre quais cepas foram trabalhadas com cada hormônio e em quais concentrações. As cepas selecionadas foram preservadas em ASD em geladeira. Previamente a cada experimento, as cepas foram repicadas em MMs isento de hormônio vegetal e incubadas por 48 horas, a 28 °C. Após este tempo de crescimento, as cepas foram novamente repicadas em MMs com hormônio vegetal nas duas concentrações ou sem hormônio (controle) e incubadas por 48 horas, a 28 °C.

**Tabela 3** – Cepas selecionadas para os demais experimentos, hormônios aos quais estas foram expostas previamente a cada experimento e suas respectivas concentrações.

Cepa	Hormônio	Conc. mínima	Conc. máxima
ICB181	AIA	0,5mg/L	90,0mg/L
29/10893	AIA	0,5mg/L	24,0mg/L
1913ER	AIA	0,5mg/L	24,0mg/L
1913ER	AG3	0,5mg/L	1000,0mg/L
L24/01	AG3	0,5mg/L	1000,0mg/L
L27/01	AG3	0,5mg/L	1000,0mg/L
547/OTTI	AG3	0,5mg/L	1000,0mg/L

AIA: ácido 3-indolacético; AG3: ácido giberélico.

#### 8. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE *C. elegans* INFECTADOS COM *C. gattii* PREVIAMENTE CRESCIDOS NA PRESENÇA DE AIA OU AG3

O ensaio de sobrevivência utilizando *Caenorhabditis elegans* foi realizado no Laboratório de Biologia Celular de Micro-organismos (Microbiologia - ICB/UFMG) utilizando protocolo previamente padronizado em placas de 96 poços. Para tanto, foram utilizadas larvas L4 (jovem adulto) de *C. elegans* (linhagem N2 Bristol – CGC – *Caenorhabditis* Genetic Center), obtidas por sincronização (Porta-De-La-Riva *et al.*, 2012). Previamente à adição dos nematódeos, a placa foi preparada com 200 µL de meio mínimo líquido suplementado com diferentes concentrações de hormônios vegetais (0,5 µg/mL, 24,0 µg/mL e 90,0 µg/mL de AIA, 0,5 µg/mL e 1000,0 µg/mL de AG3, e MML isento de hormônio). Em seguida, 10<sup>4</sup> células de cada uma das cepas de *C. gattii* (1913ER, 29/10893, ICB181, L24/01, L27/01 e 547/OTTI) foram adicionadas aos poços. Um poço de cada condição foi reservado sem levedura, onde foram adicionadas células de *Escherichia coli* linhagem OP50 como controle negativo de infecção. A placa foi incubada no escuro, a 28 °C por 16 horas. Os nematódeos (n=10) foram adicionados ao meio que foi suplementado com estreptomicina (100 µg/mL), 5'-fluoro-2-desoxiuridina (FUdR - Sigma) 50 µg/mL. A placa foi, então, incubada a 23 °C (Porta-De-La-Riva *et al.*, 2012). Ainda, a flurodeoxiuridina, um inibidor de timidilato sintase, foi adicionada ao ensaio para impedir a produção de descendência de *C. elegans* (Mitchell *et al.*, 1979). A sobrevivência dos nematódeos foi determinada pela contabilização de indivíduos

vivos a cada 48 horas até a morte de todos os indivíduos para determinação da  $LT_{50}$  (tempo necessário para morte de 50% da população). As curvas de sobrevivência, cálculo de  $LT_{50}$  e estimativa de diferenças na sobrevivência foram avaliadas (teste de Log-Rank). O experimento foi realizado em triplicata.

## 9. ENSAIO DE FAGOCITOSE COM AMEBA

Células de *C. gattii* foram submetidas a ensaio de fagocitose com *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 para comparar a capacidade fagocítica entre leveduras do grupo controle e aquelas colocadas previamente em contato com hormônio vegetal. Os trofozoítos das amebas cultivadas no Laboratório de Parasitologia Clínica (Faculdade de Farmácia/UFMG) foram crescidas previamente a 20 °C em garrafas de cultura estéreis por aproximadamente uma semana em meio PYG (20 g/L de proteose-peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 0,1 M de glicose, 4 mM de  $MgSO_4$ , 0,4 mM de  $CaCl_2$ , 3,4 mM citrato de sódio, 0,05 mM  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ , 2,5 mM de  $Na_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$ , pH 6,5) (Alfieri *et al.*, 2000) enriquecido com soro fetal bovino 10% (Cultilab, Campinas, SP) e suplementado com antibiótico enrofloxaxino (Baytril®, Bayer). Após atingir quantidade de células necessárias, deu-se início o experimento. Na base de placas de 24 poços foram colocadas lamínulas circulares 13-16 mm.  $2 \times 10^5$  células de *A. castellanii* em meio PYG foram adicionadas em cada poço e incubadas por 18 horas a 28 °C. Após, o sobrenadante da cultura foi removido e as células lavadas com PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril.  $1 \times 10^6$  células de *C. gattii* previamente tratadas com hormônios vegetais foram adicionadas em cada poço e estas co-culturas foram incubadas por 1 e 4 horas a 28 °C. Ao final de cada tempo, o sobrenadante da cultura foi desprezado, os poços foram lavados com PBS, fixados com metanol frio e corados com Giemsa. A capacidade fagocítica foi dada pelo percentual de células de amebas total em relação aos fungos internalizados. Este ensaio foi realizado em duplicata biológica, e em cada uma houve triplicata.

## 10. ENSAIO DE KILLING

Simultaneamente ao ensaio de fagocitose descrito anteriormente e utilizando o mesmo inóculo de amebas e de leveduras, foi realizado o ensaio de *killing* para comparar estratégia de sobrevivência intracelular entre as leveduras do grupo

controle e aquelas previamente tratadas com hormônio vegetal. Em uma placa de 96 poços,  $2 \times 10^4$  células de *A. castellanii* em meio PYG foram adicionadas em cada poço e incubadas por 18 horas a 28 °C. Após,  $1 \times 10^5$  células de *C. gattii* foram adicionadas em cada poço e estas co-culturas foram incubadas por 1 e 4 horas a 28 °C. Para o grupo de 4 horas, após uma hora de co-cultivo, o sobrenadante da cultura foi removido, os poços foram lavados para eliminar leveduras não fagocitadas e novo meio isento de leveduras foi adicionado, com o objetivo de avaliar a sobrevivência intracelular das leveduras já fagocitadas. Ao final de cada tempo, o sobrenadante da cultura foi removido, os poços foram lavados para eliminar leveduras não fagocitadas e as células das amebas foram rompidas por lise mecânica com água e agulha. Esta solução foi diluída 10 vezes em PBS estéril e 50 µl foram plaqueados de maneira homogênea em uma placa de Petri com MMs. As placas foram incubadas a 28 °C por até 96 horas para contagem de UFC.

Este ensaio foi realizado em duplicata biológica, e em cada uma houve triplicata.

## 11. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE: PEROXIDASE (PER) E SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD)

A avaliação da atividade das enzimas neutralizadoras PER e SOD foi realizada segundo Ferreira e colaboradores (2013), com alterações. Inicialmente, 20 mg de células de *C. gattii* do grupo controle ou previamente crescidas em meio suplementado com AIA ou AG3 foram ressuspensos em 2 mL de meio de trituração (250 mM de sacarose, 10 mM de TrisHCl, pH 7,5, 1,0 mM de PMSF) e 50 mg de pérolas de vidro (0,45 mm). A suspensão foi agitada mecanicamente em vórtex, por cinco ciclos de 270 s cada de 10.000 vibrações/minuto. O homogenato foi coletado e centrifugado a 1000 g, por 5 minutos, a 4 °C para remover as células não rompidas e as pérolas de vidro. Em seguida, centrifugado a 15.000 g, a 4 °C, por 40 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato livre de célula. Proteínas solúveis foram determinadas utilizando o teste de Bradford, por meio de uma curva padrão de soro albumina bovina

### 11.1. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade SOD foi mensurada pela inibição da auto-oxidação do pirogalol (Khan *et al.*, 2011). O controle foi realizado com 100 µL de meio de trituração e 100 µL de pirogalol (20 mM; Sigma-Aldrich) diluído em PBS (pH 8,5). Nas amostras, 100 µL de extrato livre de células foram adicionados ao pirogalol e a inibição da auto-oxidação foi monitorada a cada 30 segundos, durante 30 minutos a 420 nm. As unidades de SOD foram consideradas como auto-oxidação do pirogalol por 200 µL, calculado a seguir:

Unidade de SOD mL<sup>-1</sup> amostra = [(A-B) / A x 50 x 100] x 0,6 (fator de diluição)

Onde, A é a diferença da absorbância por 1 minuto no controle e B, a diferença na absorbância por 1 minuto, nas amostras. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

#### 11.2. ATIVIDADE PEROXIDASE (PER)

A atividade PER foi realizada de acordo com a metodologia proposta previamente (Jensen e Riley, 2002) e quantificada em um sistema contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e guaiacol como substrato. As mudanças na absorbância foram monitoradas a 470 nm, utilizando o valor de coeficiente de extensão molar de 26,61 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para o produto tetraguaiacol formado pela reação enzimática. 100 µL de cada extrato livre de células foram incubados por 13 minutos em solução de HEPES (25 mM, pH 6,8), contendo 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 4,0 mM de guaiacol (Sigma Aldrich). As mudanças na absorbância causada pela formação do tetraguaiacol a 470 nm foram monitoradas a cada 30 segundos, durante três minutos de reação. A última contagem da quantificação de absorbância foi 0,001 e uma unidade de enzima é a quantidade de enzima que produz 1,0 nmol/min do produto. Os resultados foram expressos em nmols/min/mg de proteína.

#### 12.MENSURAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS CÉLULAS FÚNGICAS TRATADAS COM OS HORMÔNIOS

Inicialmente, 20 mg de células de *C. gattii* do grupo controle ou previamente crescidas em meio suplementado com AIA ou AG3 foram ressuspendidas em 1 mL de ácido fosfórico 1,1% congelado. O homogenato (0,4 mL) foi homogeneizado com 0,4 mL de uma solução contendo 1% de ácido tiobarbitúrico (Sigma–Aldrich), 50 mM de NaOH e 0,1 mM de butilhidroxitolueno e com 0,2 mL de uma solução com 7% de

ácido fosfórico (todas as soluções foram mantidas geladas durante a manipulação). Em seguida, as amostras foram aquecidas por 15 minutos a 98 °C. Após resfriamento em gelo adicionou-se 1,5 mL de butanol. O homogenato foi agitado vigorosamente e centrifugado por cinco minutos a 2.000 g. A fase orgânica foi adicionada em cubetas de vidro e mensuradas as absorbâncias a 532 nm. (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific). A solução de ácido tiobarbitúrico foi trocada por uma solução de HCl a 3 mM para o branco. Os valores de TBARS foram expressos usando o coeficiente de extinção molar de 156 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Ferreira *et al.*, 2013).

### 13. CURVA CRESCIMENTO DE *C. gattii* NA PRESENÇA OU NÃO (CONTROLE) DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO OU ÁCIDO GIBERÉLICO

O preparo do inóculo para este teste é similar ao utilizado para o teste de CIMp (5), isto é, as células de *C. gattii* foram suspensas em salina (0,85%) numa concentração equivalente a 10<sup>6</sup> cel/mL. Uma quantidade de 100 µL deste inóculo foi distribuída em microplacas contendo 100 µL de meio mínimo ou meio mínimo suplementado com AIA ou AG3. As placas foram incubadas por até 72 horas a 28 °C. A atividade metabólica celular foi avaliada nos tempos 0, 3, 6, 12, 16, 20, 24, 36, 48, e 72 horas. Ao atingir cada um dos tempos de crescimento, foi adicionado 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) (5,0 mg/mL) para determinar a atividade metabólica celular. Após a adição de MTT, as placas foram incubadas no escuro a 28 °C, por 3 horas. Antes da leitura espectrofotométrica a 490 nm, foi adicionado isopropanol na proporção 1:1. A atividade metabólica é proporcional à absorbância detectada (Santos *et al.*, 2012). Este teste foi realizado com quatro réplicas de cada situação. O parâmetro Área Sob a Curva (ASC) foi utilizado para comparar os grupos.

### 14. MENSURAÇÃO DO POTENCIAL ZETA

O potencial Zeta foi mensurado em um analisador de potencial Zeta (ZetaPlus, Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY), como descrito por Frases e colaboradores (2008) após tratamento com hormônios vegetais ou não (controle).



## 15. ANÁLISE *IN SILICO* DA PRESENÇA DE RECEPTOR DE AUXINAS E GIBERELINAS NO GENOMA DE *C. gattii*

Foram realizados alinhamentos locais par a par no BLAST (BLASTN 2.2.26 [Sep-21-2011]) via terminal. Foram utilizadas como *query* as sequências dos genes ABP, TIR1 (ambos receptores de auxina em plantas), YML079W (presente em *Saccharomyces cerevisiae*, estruturalmente semelhante ao ABP), Grr1 (TIR1-related em leveduras), GID1 (receptor de giberelina em plantas) e VID30 (GID1-related em leveduras, componente central do complexo GID). As sequências completas destes genes foram obtidas dos bancos de dados do NCBI (NCBI - site), Broad Institute (Broad Institute - site) e Saccharomyces Genome Database (SGD - site). As sequências *query* foram desafiadas contra sequências genômicas completas de três linhagens de *C. gattii*: R265, WM276 e CBS-7750. Estas três sequências genômicas utilizadas como banco foram previamente reanotadas e depositadas na biblioteca do grupo Informática de Biosistemas do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz/Minas Gerais.

## 16. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA PARA COMPARAR EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA RECEPTOR DE AUXINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES

As linhagens 1913ER e ICB181 de *C. gattii* foram cultivadas a 28 °C, sob agitação, por 24 horas em MML e em MML acrescido da concentração sub-inibitória de AIA para cada linhagem, 24,0 e 90,0 mg/L respectivamente. Para cada linhagem, em cada condição, foram cultivadas triplicatas biológicas. 50 mL de cada cultura foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos, para remoção do meio de cultura. Aproximadamente 1 mL de cada *pellet* foi submetido à criomaceração com nitrogênio líquido três vezes, resultando num material pulverizado. À este, foi adicionado TRIzol® e a extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do reagente, disponível em:

[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf).

Todo o material utilizado na execução desta técnica foi previamente tratado com DEPC. O RNA foi quantificado em nanodrop e armazenado à temperatura de -80 °C.

A integridade do RNA extraído de cada cultivo foi analisada em gel de agarose 1,0% (p/v), em TAE 1 X (Tris Base 0,04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM, em pH 8,0) adicionado de hipoclorito 1% (v/v), de acordo com metodologia de Aranda e colaboradores (2012).

A transcrição reversa foi realizada utilizando a enzima MMLV (Promega, Madison, WI, USA). O cDNA foi utilizado para determinar os níveis de expressão de *Grr1* através da qRT-PCR, utilizando 200 nM de oligonucleotídeos iniciadores específicos. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas nas reações de PCR quantitativa encontram-se descritas na Tabela 4.

As reações foram realizadas no Laboratório de Virologia (Microbiologia – ICB/UFMG) utilizando-se um termociclador StepOne (Applied Biosystem, EUA) e SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, USA, 10 µL) para detecção. Os valores para  $\beta$ -actina foram utilizados como referência endógena (Kozera e Rapacz, 2013). Os oligonucleotídeos foram padronizados, a partir de amplificação por qRT-PCR, usando as diluições de 0,001, 0,01, 0,1 e 1 µL de cDNA para estabelecimento da curva padrão de uso dos *primers*. As reações foram feitas em duplicata. Ao final da reação obteve-se a representação gráfica (“Amp Plot”) e numérica (Ct; “Threshold Cycle”) que representam o aumento de fluorescência durante os ciclos de amplificação. O nível de expressão foi calculado em relação ao gene normalizador, e a análise foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001).

**Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados nas qRT-PCR**

Oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	Fornecedor
Grr1-CodSeq Fw	TGGTCTCCCGTTTTTGGTGT	Síntese Biotecnologia
Grr1-CodSeq Rv	ATGGCGTTGGCGTAAGGTAG	
$\beta$ -ACT Fw	CTCCCCTTAACCCCAAGCAG	IDT*
$\beta$ -ACT Rv	GAACGGCCTGGATAGAGACG	

\* Integrated DNA Technologies;  $\beta$ -ACT: beta actina; Fw: forward; Rv: reverse

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando o Software Prism 5 (GrapPad Inc., San Diego, CA, USA). Para comparação de dois grupos que não assumiram distribuição Gaussiana, o teste t foi utilizado. Para comparação de três ou mais grupos que assumiram distribuição normal, foi utilizado

o ANOVA (“One-way”) seguido de Teste de Tukey. Os resultados obtidos foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (intervalo de confiança de 95%).

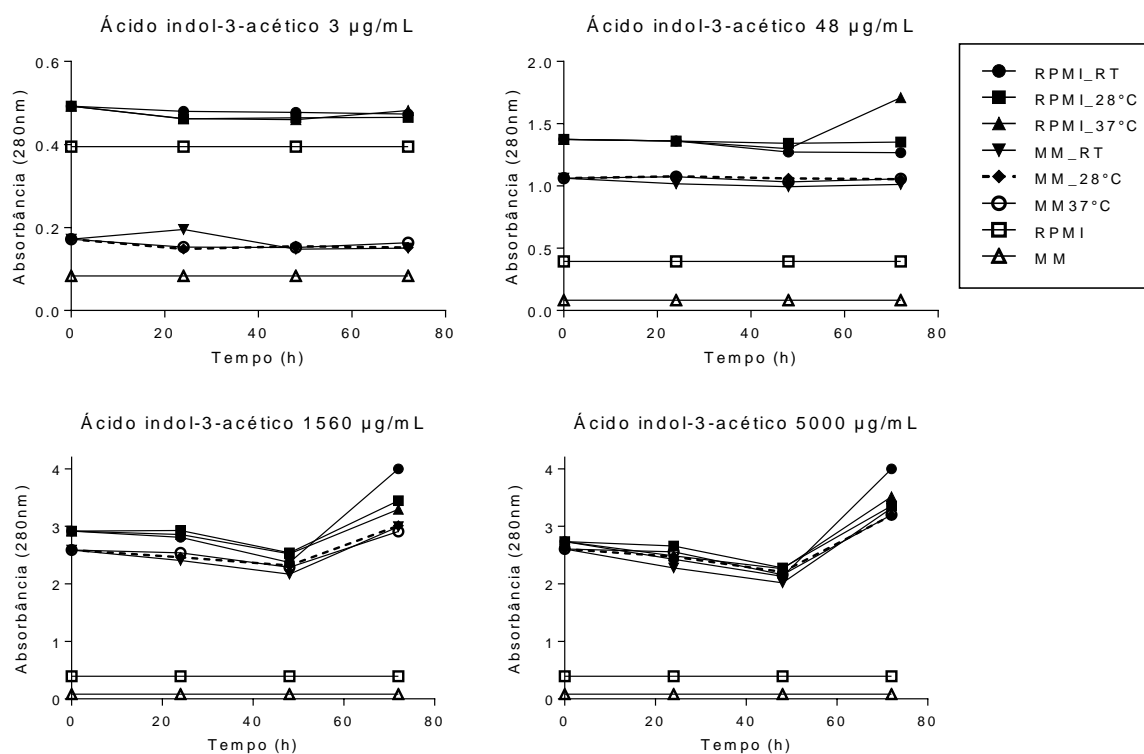
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. TESTE DE TOXICIDADE DE ETANOL, UTILIZADO COMO SOLVENTE PARA OS HORMÔNIOS VEGETAIS, FRENTE A *Cryptococcus gattii*.

A menor concentração de etanol que inibiu o crescimento de pelo menos uma das cepas de *C. gattii* foi 6,25% (porcentagem do solvente em relação ao volume final numa solução). Deste modo, qualquer concentração abaixo desta permite a viabilidade de todas as cepas.

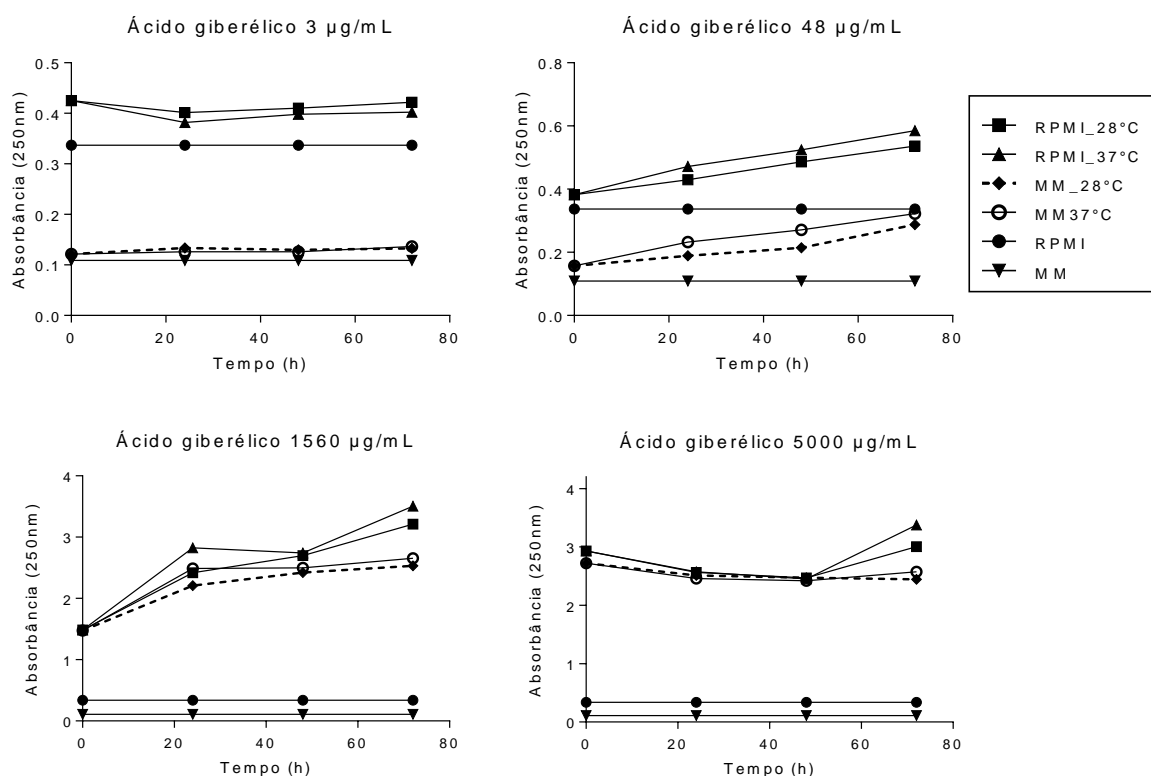
### 2. ESTABILIDADE DE AIA E AG3 EM DIFERENTES CONDIÇÕES

A figura 6 mostra a absorvância de auxina (no comprimento de onda 280 nm) nos meios RPMI ou meio mínimo, a 28 °C, 37 °C e à temperatura ambiente na presença de luz, ao longo de 72 horas. Valores mais altos de absorvância refletem maior quantidade do composto no meio. Em concentrações mais baixas, 3 µg/mL e 48 µg/mL, o composto se manteve estável durante as 72 horas. Nas soluções mais concentradas, nota-se que a partir de 48 horas há uma alteração considerável na absorvância. Após este estudo, percebemos que este hormônio pode ser usado, sem uma perda expressiva em sua estabilidade, por até 48 horas. Além disso, o meio mínimo e a temperatura de 28 °C foram as condições de cultivo escolhidas para dar continuidade aos estudos (destaque em linhas pontilhadas).



**Figura 6** – Absorbância de ácido 3-indolacético (no comprimento de onda 280 nm) nos meios RPMI ou meio mínimo (MM), a 28 °C ou 37 °C no escuro ou à temperatura ambiente (RT) na presença de luz, ao longo de 72 horas em soluções com diferentes concentrações do hormônio.

A figura 7 mostra a absorbância de giberelina (no comprimento de onda 250 nm) nos meios RPMI e em meio mínimo, a 28 °C ou 37 °C ao longo de 72 horas. Valores mais altos de absorbância refletem maior quantidade do composto no meio. Nas soluções com concentrações de 3 µg/mL e 5.000 µg/mL, o AG3 se mantém estável durante as 72 horas. Nas demais soluções, nota-se um sutil aumento na absorbância ao longo do tempo. Provavelmente uma pequena quantidade do hormônio é transformada em outro(s) composto(s), indicando uma possível degradação de parte do hormônio. A situação onde a degradação é menor é em meio mínimo e a 28 °C, tanto para a concentração de 48 µg/mL quanto para 1.560 µg/mL. Estas foram as condições de cultivo escolhidas para dar continuidade aos estudos (destaque em linhas pontilhadas).



**Figura 7** – Absorbância de giberelina (no comprimento de onda 250 nm) nos meios RPMI ou meio mínimo (MM), a 28 °C e 37 °C ao longo de 72 horas em soluções com diferentes concentrações do hormônio.

### 3. ESTABILIDADE DO MEIO APÓS CULTIVO DE *Cryptococcus gattii*

O pH do meio mínimo estéril e após cultivo de *C. gattii* é apresentado na tabela 5. O pH do meio após crescimento da levedura não sofre alteração relevante comparado ao meio isento de micro-organismo. Portanto, os hormônios vegetais não sofreram influência do pH do meio ao longo dos testes realizados neste estudo.

**Tabela 5** – Valores de pH após incubar meio mínimo, sozinho ou inoculado com leveduras, a 28 °C e 37 °C

Condições	28 °C	37 °C
Meio mínimo	4,40	4,38
<i>C. gattii</i> ATCC24065	4,36	4,35
<i>C. gattii</i> L27/01	4,32	4,25

### 4. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM - µg/mL) DE AUXINA E GIBERELINA FRENTE A 13 LINHAGENS DE *Cryptococcus gattii*, DE ACORDO COM CLSI

Seguindo a metodologia de micro diluição em caldo, a giberelina AG3 não inibiu o crescimento da levedura independente da temperatura e a auxina AIA inibiu o crescimento apenas a 37 °C, em concentrações que variaram de 390 µg/mL a 1.560 µg/mL dependendo da cepa, sendo 640 µg/mL a média geométrica. O controle de toxicidade mostrou crescimento fúngicos idêntico ao controle de crescimento, indicando que o etanol não interferiu na viabilidade das células durante o teste.

**Tabela 6** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de auxina e giberelina frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* a 28°C e 37°C.

Estirpes	CIM (µg/mL)			
	Ácido 3-indolacético (auxina)		Ácido Giberélico (giberelina)	
	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C
ATCC 24065	-	390	-	-
ATCC 32608	-	390	-	-
L24/01	-	1560	-	-
L27/01	-	1560	-	-
L28/02	-	-	-	-
23/10993	-	390	-	-
29/10893	-	390	-	-
135/03	-	390	-	-
547/OTTI	-	1560	-	-
196L/03	-	-	-	-
1913ER	-	390	-	-
ICB181	-	780	-	-
LMM818	-	780	-	-
Variação da CIM	-	390 – 1560	-	-
CIM <sub>50</sub>	-	780	-	-
CIM <sub>90</sub>	-	1560	-	-
Média geométrica	-	640	-	-

Experimento feito em triplicata. Os resultados observados foram idênticos em todas as réplicas.

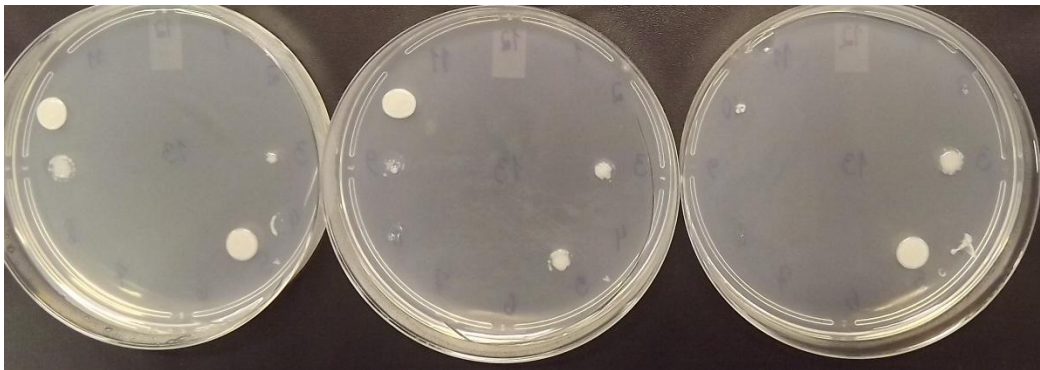
##### 5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE HORMÔNIOS VEGETAIS EM MEIO SÓLIDO – CIM<sub>p</sub>

A concentração inibitória mínima também foi testada em meio mínimo sólido suplementado com AIA ou AG3, em duas diferentes temperaturas (figuras 8 e 9). Nestas condições, o hormônio AG3 não inibiu o crescimento da levedura independente da temperatura e o AIA inibiu o crescimento em ambas as temperaturas testadas, em concentrações que variaram de 48 µg/mL a 190 µg/mL a 28 °C e de 12 µg/mL a 190 µg/mL a 37 °C.

Em meio sólido a levedura é mais susceptível, provavelmente porque a disponibilidade de nutrientes ao redor da célula é menor neste meio. Além disso, em meio sólido as leveduras estão mais expostas à ação oxidativa do ar. A susceptibilidade também é maior a 37 °C comparada àquela a 28°C, comprovando que embora o fungo seja capaz de crescer a 37 °C, esta temperatura é mais estressante. A tabela 5 resume estes resultados.



**Figura 8** – Meio mínimo sólido inoculado com 13 cepas de *Cryptococcus gattii* e incubado a 37 °C por 48 horas. Os círculos correspondem ao inóculo de cada cepa.



**Figura 9** – Meio mínimo sólido suplementado com 90 µg/mL de AIA e inoculado com 13 cepas de *Cryptococcus gattii*, incubado a 37 °C por 48 horas. Os círculos correspondem ao crescimento de cada cepa.

**Tabela 7** - Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de AIA e AG3 frente a 13 estirpes de *Cryptococcus gattii* a 28 °C e 37 °C em meio mínimo sólido.

Estirpes	CIM (µg/mL)			
	Ácido 3-indolacético (auxina)		AG <sub>3</sub> (giberelina)	
	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C
ATCC 24065	48	12	-	-
ATCC 32608	90	24	-	-
L24/01	190	190	-	-
L27/01	190	90	-	-
L28/02	190	190	-	-
23/10993	90	a	-	a
29/10893	48	a	-	a
135/03	48	24	-	-
547/OTTI	190	190	-	-
196L/03	190	190	-	-
1913ER	48	48	-	-
ICB181	190	48	-	-
LMM818	48	90	-	-
Variação da CIM	48 – 190	12 – 190	-	-
CIM <sub>50</sub>	90	90	-	-
CIM <sub>90</sub>	190	190	-	-
Média geométrica	100	69	-	-

<sup>a</sup> não foi observado crescimento a 37 °C, inclusive no grupo controle (sem hormônio).

O experimento foi feito em triplicata. Os resultados observados foram idênticos em todas as réplicas.

Com este experimento foi definida a concentração máxima de cada hormônio vegetal à qual as leveduras foram desafiadas para os testes seguintes. Esta concentração não simula o que ocorre *in natura*, no entanto poderia mostrar de maneira mais exacerbada a resposta da levedura à presença do hormônio. Para auxina foi escolhida a concentração subinibitória de cada linhagem e para giberelina foi escolhida a concentração igual a 1.000 µg/mL, por ser a maior possível para se trabalhar com as leveduras, considerando a solubilidade deste hormônio e a susceptibilidade das leveduras frente a seu solvente. Também foi escolhida a concentração de 0,5 µg/mL para ambos os hormônios, pois esta se aproxima da encontrada *in natura* durante o contato levedura-hormônio. Por este mesmo motivo, a temperatura escolhida para continuar os estudos foi a de 28 °C.



6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE FLUCONAZOL, ANFOTERICINA B E BENOMYL PARA *Cryptococcus gattii* APÓS TRATAMENTO COM HORMÔNIOS VEGETAIS

A CIM de FCZ variou de 2 a 32 µg/mL, com média geométrica de 11,62 µg/mL para as diferentes estirpes de *C. gattii* crescidas em meio mínimo sólido isento de hormônio vegetal (condição controle). Quando as mesmas estirpes foram cultivadas previamente na presença de diferentes concentrações de hormônios vegetais (0,5 µg/mL e concentração subinibitória de AIA, 0,5 e 1.000 µg/mL de AG3) a CIM de FCZ variou de 4 a 32 µg/mL, com médias geométricas respectivamente iguais a 12,93 µg/mL 13,63 µg/mL 12,93 µg/mL e 13,63 µg/mL, não representando uma diferença significativa em relação ao grupo controle (tabela 8).

**Tabela 8** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de fluconazol frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* expostas ou não (grupo controle) a diferentes concentrações de hormônios vegetais: ácido indol-3-acético (máxima: 24, 48 e 90 µg/mL e mínima: 0,5 µg/mL) e ácido giberélico (1.000 e 0,5 µg/mL).

Linhagens	CIM Fluconazol (µg/mL)				
	Controle	AIA		AG3	
Concentração:	MMs	Máx.	0,5	1000	0,5
ATCC 24065	4	8 <sup>a</sup>	4	4	4
ATCC 32608	16	16 <sup>b</sup>	16	16	32
L24/01	16	16 <sup>c</sup>	16	16	16
L27/01	8	8 <sup>c</sup>	8	8	8
L28/02	32	32 <sup>c</sup>	32	32	32
23/10993	4	8 <sup>b</sup>	4	8	8
29/10893	16	16 <sup>a</sup>	16	16	16
135/03	2	4 <sup>a</sup>	16	4	4
547/OTTI	16	16 <sup>c</sup>	16	16	16
196L/03	32	32 <sup>c</sup>	32	32	32
1913ER	16	8 <sup>a</sup>	16	16	8
ICB181	16	16 <sup>c</sup>	16	16	16
LMM818	16	16 <sup>a</sup>	16	16	32
Varição da CIM	2 – 32	4 – 32	4 – 32	4 – 32	4 – 32
CIM50	16	16	16	16	16
CIM90	32	32	32	32	32
Méd. geométrica	11,62	12,93	13,63	12,93	13,63

Concentrações máximas de auxina (AIA): a) 24 µg/mL; b) 48 µg/mL, c) 90 µg/mL.

A CIM de ANB variou de 0,5 a 4 µg/mL, com média geométrica de 1,0 µg/mL para as diferentes estirpes de *C. gattii* crescidas em MMs isento de hormônio vegetal

(condição controle). Quando as mesmas estirpes foram cultivadas previamente na presença de a) 0,5 µg/mL de AIA, a CIM variou de 1,0 a 8,0 µg/mL com média geométrica de 1,7 µg/mL; b) concentração subinibitória de AIA, a CIM variou de 1,0 a 4,0 µg/mL com média geométrica de 1,62 µg/mL; c) 0,5 µg/mL de AG3, a CIM variou de 0,5 a 4,0 µg/mL com média geométrica de 1,38 µg/mL e d) 1.000 µg/mL de AG3, a CIM variou de 1,0 a 4,0 µg/mL com média geométrica de 1,53 µg/mL, não representando uma diferença significativa comparadas às CIM do grupo controle (tabela 9).

**Tabela 9** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de anfotericina B frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* expostas ou não (grupo controle) a diferentes concentrações de hormônios vegetais: ácido indol-3-acético (máxima: 24, 48 e 90 µg/mL e mínima: 0,5 µg/mL) e ácido giberélico (1000 e 0,5 µg/mL).

Linhagens	CIM Anfotericina B (µg/mL)				
	Controle	AIA		Gib	
Concentração:	MMs	Máx.	0,5	1000	0,5
ATCC 24065	0,5	2,0 <sup>a</sup>	2,0	2,0	0,5
ATCC 32608	0,5	1,0 <sup>b</sup>	2,0	1,0	1,0
L24/01	1,0	1,0 <sup>c</sup>	1,0	1,0	0,5
L27/01	1,0	1,0 <sup>c</sup>	1,0	1,0	1,0
L28/02	1,0	1,0 <sup>c</sup>	1,0	1,0	1,0
23/10993	1,0	1,0 <sup>b</sup>	2,0	2,0	2,0
29/10893	4,0	4,0 <sup>a</sup>	4,0	1,0	4,0
135/03	0,5	4,0 <sup>a</sup>	1,0	4,0	4,0
547/OTTI	0,5	1,0 <sup>c</sup>	1,0	1,0	1,0
196L/03	1,0	2,0 <sup>c</sup>	1,0	1,0	0,5
1913ER	2,0	2,0 <sup>a</sup>	4,0	4,0	4,0
ICB181	1,0	1,0 <sup>c</sup>	1,0	1,0	1,0
LMM818	2,0	4,0 <sup>a</sup>	8,0	4,0	4,0
Variação da CIM	0,5 – 4,0	1,0 – 4,0	1,0 – 8,0	1,0 – 4,0	0,5 – 4,0
CIM <sub>50</sub>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CIM <sub>90</sub>	2,0	4,0	8,0	4,0	4,0
Méd. geométrica	1	1,62	1,70	1,53	1,38

Concentrações máximas de auxina (AIA): a) 24 µg/mL; b) 48 µg/mL, c) 90 µg/mL.

A CIM de BEN variou de 4,0 a 8,0 µg/mL, com média geométrica de 4,95 µg/mL para as diferentes estirpes de *C. gattii* crescidas em meio mínimo sólido isento de hormônio vegetal (condição controle). Quando as mesmas estirpes foram cultivadas previamente na presença de a) 0,5 µg/mL de AIA, a CIM foi 8,0 µg/mL para todas estirpes; b) concentração subinibitória de AIA, a CIM variou de 2,0 a 16,0 µg/mL com média geométrica de 6,82 µg/mL; c) 0,5 µg/mL ou d) 1.000,0 µg/mL de

AG3, a CIM foi 8,0 µg/mL para todas estirpes, não representando uma diferença significativa comparadas às CIM do grupo controle (tabela 10).

**Tabela 10** – Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de benomyl frente a 13 linhagens de *Cryptococcus gattii* expostas ou não (grupo controle) a diferentes concentrações de hormônios vegetais: ácido indol-3-acético (máxima: 24, 48 e 90 µg/mL e mínima: 0,5 µg/mL) e ácido giberélico (1.000 e 0,5 µg/mL).

Linhagens	CIM Benomyl (µg/mL)				
	Controle	AIA			Gib
Concentração:	MMs	Máx.	0,5	1000	0,5
ATCC 24065	8	8 <sup>a</sup>	8	8	8
ATCC 32608	4	4 <sup>b</sup>	8	8	8
L24/01	4	2 <sup>b</sup>	8	8	8
L27/01	4	16 <sup>a</sup>	8	8	8
L28/02	4	8 <sup>b</sup>	8	8	8
23/10993	4	4 <sup>b</sup>	8	8	8
29/10893	4	8 <sup>a</sup>	8	8	8
135/03	8	8 <sup>a</sup>	8	8	8
547/OTTI	4	8 <sup>b</sup>	8	8	8
196L/03	8	8 <sup>b</sup>	8	8	8
1913ER	4	8 <sup>a</sup>	8	8	8
ICB181	4	8 <sup>b</sup>	8	8	8
LMM818	8	8 <sup>a</sup>	8	8	8
Varição da CIM	4 – 8	2 – 16	8	8	8
CIM <sub>50</sub>	4	8	8	8	8
CIM <sub>90</sub>	8	8	8	8	8
Méd. geométrica	4,95	6,82	8	8	8

Concentrações máximas de auxina (AIA): a) 24 µg/mL; b) 48 µg/mL, c) 90 µg/mL.

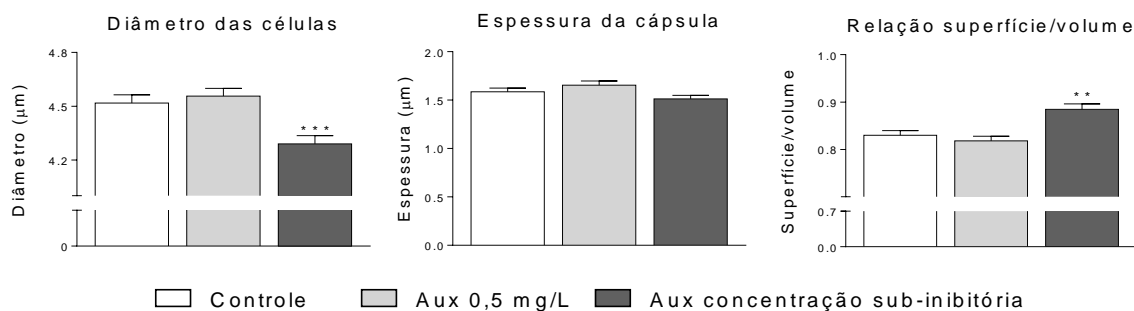
Com este estudo pode-se concluir que quando considerados isoladamente nem AIA nem AG3 interferem na resposta de *C. gattii* aos antifúngicos ANB, FCZ e BEN, *in vitro*. Nestas condições, não houve relação destes hormônios com eventos de resistência da levedura.

## 7. ANÁLISE MORFOMÉTRICA - VISUALIZAÇÃO E MENSURAÇÃO DO TAMANHO DE CÉLULA E CÁPSULA PELA COLORAÇÃO NEGATIVA COM TINTA NANQUIM

Quando cultivadas apenas em meio mínimo sólido, o diâmetro das células variou de 2,0 a 7,0 µm, com médias aritmética e geométrica iguais a 4,17 e 4,07 µm, respectivamente. A espessura da cápsula variou de 0,5 a 5,0 µm, com médias aritmética e geométrica iguais a 1,35 e 1,18 µm, respectivamente. E a relação

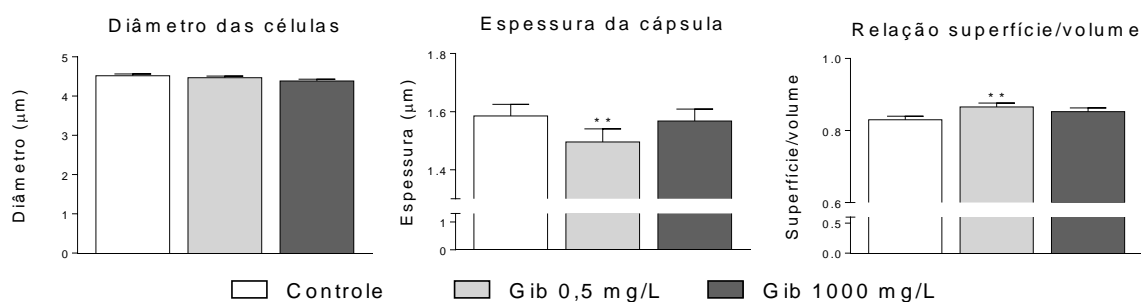
superfície/volume abrangeu de 0,43 a 1,5. Estes parâmetros variaram quando as leveduras foram colocadas em meios suplementados com auxina (0,5 mg/L e concentração subinibitória) e giberelina (0,5 mg/L ou 1.000 mg/L).

Analisadas em conjunto, na presença de concentração sub-inibitória de AIA, as células de *C. gattii* diminuíram o diâmetro da célula e aumentaram a relação superfície/volume.



**Figura 10** – Parâmetros morfométricos avaliados – (da esquerda para a direita) Diâmetro das células, espessura da cápsula e relação superfície/volume – para 13 cepas de *Cryptococcus gattii* previamente exposto ao hormônio vegetal ácido indol-3-acético. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Quando na presença de AG3, em baixa concentração, as células de *C. gattii* diminuíram a espessura da cápsula e aumentaram a relação superfície/volume.



**Figura 11** – Parâmetros morfométricos avaliados – (da esquerda para a direita) Diâmetro das células, espessura da cápsula e relação superfície/volume – para 13 cepas de *Cryptococcus gattii* previamente exposto ao hormônio vegetal ácido giberélico. \*\*p=0,01.

Embora tenha sido observado um padrão geral para as 13 cepas tomadas em conjunto (descrito acima), quando analisadas separadamente cepas da mesma espécie comportaram-se de maneiras diferentes entre si. A tabela a seguir resume como cada uma das cepas se comportou em relação ao grupo controle quando

submetidas a uma exposição prévia aos hormônios vegetais auxina ou giberelina, em duas diferentes concentrações: 0,5 µg/mL de AIA e AG3, 1.000,0 µg/mL de AG3 e concentração sub-inibitória de AIA para cada cepa (ver em tabela 11).

**Tabela 11** – Alteração no diâmetro das células, espessura da cápsula e relação superfície/volume após crescimento em contato com os hormônios vegetais auxina e giberelina, em duas concentrações diferentes cada um, máxima e mínima.

<b>Cepas</b>	<b>Morfologia</b>	<b>AIA Máx</b>	<b>AIA 0,5</b>	<b>Gib 1000</b>	<b>Gib 0,5</b>
ATCC24065	Diâmetro célula	-	Diminuiu	Diminuiu	Diminuiu
	Espessura cápsula	-	Diminuiu	-	-
	Superfície/volume	-	Aumentou	-	-
ATCC32608	Diâmetro célula	-	-	-	-
	Espessura cápsula	Diminuiu	-	-	-
	Superfície/volume	Aumentou	-	-	-
L24/01	Diâmetro célula	Diminuiu	-	-	-
	Espessura cápsula	Diminuiu	-	-	-
	Superfície/volume	Aumentou	-	Aumentou	Diminuiu
L27/01	Diâmetro célula	-	-	-	-
	Espessura cápsula	Diminuiu	-	Diminuiu	Diminuiu
	Superfície/volume	Aumentou	-	Aumentou	Aumentou
L28/02	Diâmetro célula	Diminuiu	-	-	-
	Espessura cápsula	Aumentou	Aumentou	Aumentou	-
	Superfície/volume	-	Diminuiu	-	-
23/10993	Diâmetro célula	Diminuiu	-	-	-
	Espessura cápsula	Diminuiu	-	-	-
	Superfície/volume	Aumentou	-	-	-
29/10893	Diâmetro célula	Aumentou	Aumentou	Diminuiu	Diminuiu
	Espessura cápsula	-	-	Aumentou	Diminuiu
	Superfície/volume	Diminuiu	Diminuiu	-	Aumentou
135/03	Diâmetro célula	Aumentou	-	-	-
	Espessura cápsula	Aumentou	-	-	-
	Superfície/volume	Diminuiu	Diminuiu	-	-
547/OTTI	Diâmetro célula	Diminuiu	-	-	-
	Espessura cápsula	Diminuiu	-	Aumentou	Aumentou
	Superfície/volume	Aumentou	-	Diminuiu	Diminuiu
196L/03	Diâmetro célula	Diminuiu	Aumentou	-	Aumentou
	Espessura cápsula	Diminuiu	Diminuiu	-	Diminuiu
	Superfície/volume	Aumentou	-	-	-
1913ER	Diâmetro célula	-	-	-	-
	Espessura cápsula	Diminuiu	Diminuiu	Diminuiu	Diminuiu
	Superfície/volume	Aumentou	Aumentou	Aumentou	Aumentou
ICB181	Diâmetro célula	-	Aumentou	-	-
	Espessura cápsula	Aumentou	Aumentou	-	-
	Superfície/volume	Diminuiu	Diminuiu	-	-
LMM818	Diâmetro célula	Diminuiu	-	-	Diminuiu
	Espessura cápsula	Aumentou	Aumentou	-	Aumentou
	Superfície/volume	-	-	-	-

AIA: ácido 3-indolacético; Gib: ácido giberélico; Máx: Concentrações máximas de auxina (AIA): a) 24 µg/mL; b) 48 µg/mL, c) 90 µg/mL.

Na presença de 0,5 µg/mL de AIA no meio, 23% das cepas tiveram aumento no diâmetro celular (29/10893, 196L e ICB181) e apenas uma cepa, ATCC24065, diminuiu o diâmetro. Em concentração sub-inibitória do mesmo hormônio, 46,1% das cepas diminuíram o diâmetro celular (LMM818, 196L, 547/OTTI, 23/10993, L28/02 e L24/01) enquanto 15,3% aumentaram o diâmetro (L135/03 e 29/10893).

Considerando a espessura da cápsula, a presença de 0,5 µg/mL de AIA no meio resultou na diminuição da espessura da cápsula de 23% das cepas (ATCC24, 196L/03 e 1913ER) e no aumento da espessura da cápsula de outras três cepas (L28/02, ICB181 e LMM818). Já na presença de concentração sub-inibitória deste hormônio, 53,8% das cepas diminuíram a espessura da cápsula (1913ER, 196L/03, 547/OTTI, 23/10993, L27/01, L24/01 e ATCC32608). Na mesma condição, 30,7% das cepas aumentaram a espessura da cápsula (LMM818, ICB181, L135/03 e L28/02).

A relação superfície/volume, sob a condição de baixa concentração de AIA no meio, diminuiu significativamente quando comparada ao controle em 30,7% das estirpes (L28/02, 29/10893, L135/03 e ICB181) e aumentou para as cepas ATCC24065 e 1913ER, correspondendo a 15,3% das cepas. Na presença de concentração sub-inibitória de AIA, 53,8% das cepas (1913ER, 196L/03, 547/OTTI, 23/20993, L27/01, L24/01 e ATCC32608) aumentaram o valor desta relação, ao passo que 23% diminuíram (ICB181, L135/03 e 29/10893).

Quando as leveduras foram colocadas em 0,5 µg/mL de giberelina, 23% das cepas apresentaram diminuição no diâmetro das células (ATCC24065, 29/10893 e LMM818) e a cepa 196L/03 apresentou aumento no diâmetro de suas células. Em alta concentração de giberelina, duas cepas apresentaram diminuição no diâmetro, ATCC24065 e 29/10893 e nenhuma aumentou o diâmetro nesta condição.

30,7% das cepas (L27/01, 29/10893, 196L/03 e 1913ER) diminuíram a espessura da cápsula quando em contato com 0,5 µg/mL de giberelina e 15,3% (547/OTTI e LMM818) aumentaram a espessura. Em alta concentração do mesmo hormônio, os isolados clínicos L27/01 e 1913ER diminuíram a espessura da cápsula e 23% das cepas (L28/02, 29/10893 e 547/OTTI) aumentaram a espessura.

Quando em contato com baixa concentração de giberelina, 23% das cepas (L27/01, 29/10893 e 1913ER) aumentaram a relação superfície/volume comparada ao controle, enquanto as cepas L24/01 e 547/OTTI diminuíram esta relação. Na

presença de alta concentração do mesmo hormônio no meio, apenas o isolado 547/OTTI diminuiu a relação superfície/volume, enquanto 23% das cepas (L24/01, L27/01 e 1913ER) aumentaram esta relação comparada ao grupo controle.

Uma vez que a resposta a diferentes concentrações de AIA ou AG3 é cepa-dependente, selecionamos algumas cepas que mostraram alterações morfológicas na presença de um ou outro hormônio para verticalizar o estudo e tentar entender melhor a influência desses compostos. Os parâmetros para a escolha das cepas foram: alteração na relação superfície/volume e alteração na espessura da cápsula, tendo em vista que o aumento da relação superfície/volume está relacionado à virulência de *C. gattii* (Ferreira *et al*, 2015) e que a cápsula é considerada um dos principais fatores de virulência desta levedura (Zaragoza *et al*, 2008). Neste sentido, para o estudo da influência de AIA, foram selecionadas as cepas: a) **ICB181**, que apresentou maior cápsula e menor relação s/v nas duas concentrações de AIA; b) **29/10893** que diminuiu a relação s/v nas duas concentrações de AIA e c) **1913ER** que diminuiu a espessura da cápsula e aumentou a relação s/v nas duas concentrações de AIA. Para o estudo da influência de AG3, foram selecionadas as cepas: a) **L24/01** que diminuiu a relação s/v na menor concentração de AG3 e mostrou comportamento contrário quando na maior concentração; b) **L27/01** e **1913ER** que diminuíram a espessura da cápsula e aumentaram a relação s/v nas duas concentrações de AG3 e c) **547/OTTI** que aumentou a espessura da cápsula e diminuiu a relação s/v nas duas concentrações de AG3.

A morfologia das células de *C. gattii* afeta sua patogenicidade e a interação com células do hospedeiro. As células desta levedura podem sofrer diferentes mudanças morfológicas, como formação de filamentos, variação na espessura da cápsula e no diâmetro celular, dependendo das condições ambientais (Okagaki *et al.*, 2010). Para as estirpes selecionadas, foram vistas alterações morfológicas em todas as estirpes de *C. gattii* tratadas com auxina ou giberelina, em relação ao grupo controle. Houve aumento no diâmetro da célula em duas das três cepas tratadas com auxina. Foi observado aumento da espessura da cápsula e redução da relação superfície/volume em uma das três cepas tratadas com auxina e em uma das quatro cepas tratadas com giberelina. Para uma das três cepas tratadas com auxina e duas das quatro cepas tratadas com giberelina, houve diminuição na espessura da cápsula e aumento na relação superfície/volume. A cápsula polissacarídica é um

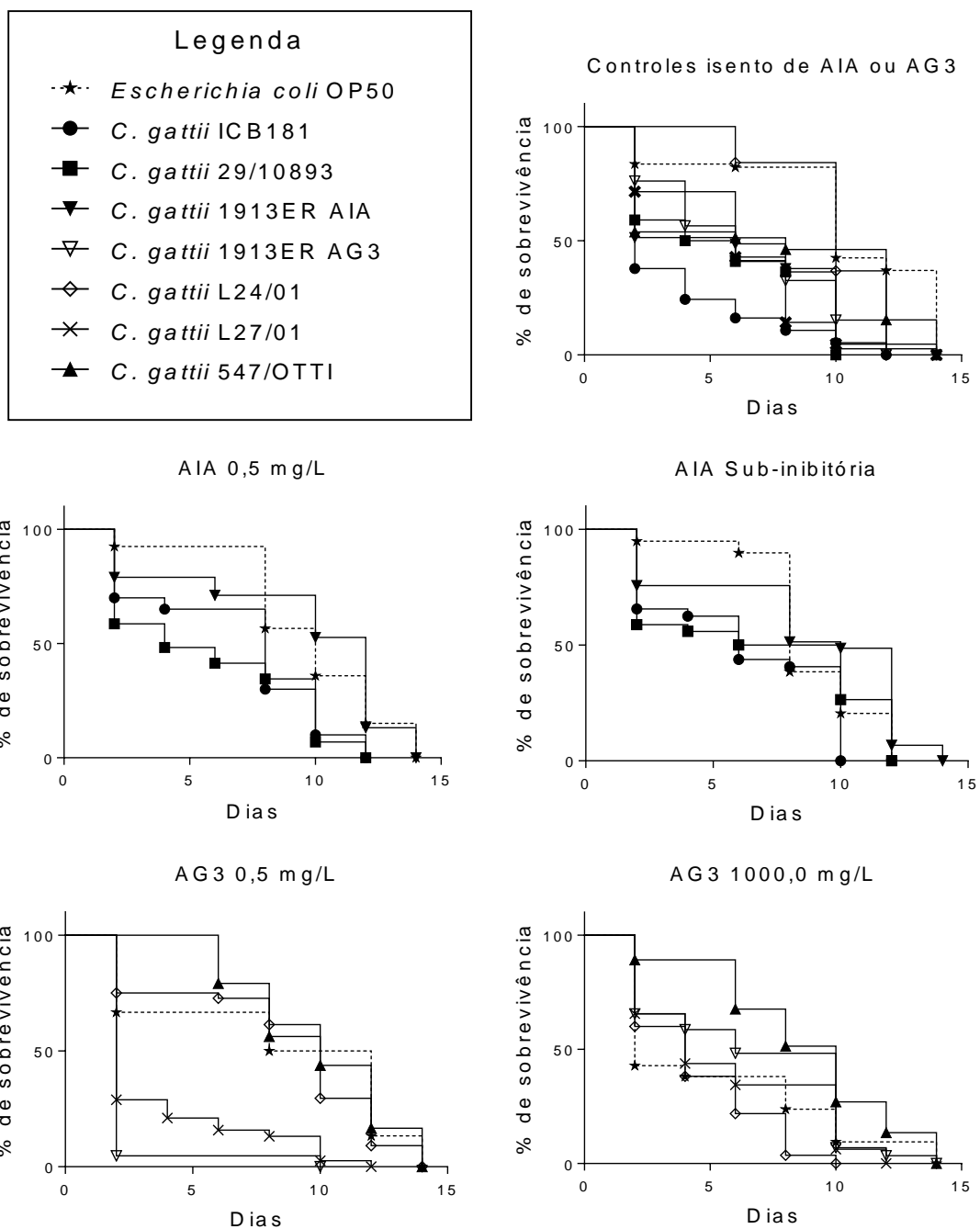
importante fator de virulência de leveduras do grupo *Cryptococcus* e uma peculiaridade é sua habilidade de alterar de tamanho de acordo com as condições ambientais (Zaragoza e Casadevall, 2004). Frequentemente o aumento da cápsula está relacionado ao aumento da virulência da levedura, como previamente demonstrado por Zaragoza e colaboradores (2008). A virulência da levedura foi avaliada inicialmente por meio da sobrevivência de nemátodos infectados com o fungo tratados com auxina ou giberelina.

#### 8. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE *C. elegans* INFECTADOS COM CÉLULAS DE *C. gattii* PREVIAMENTE CRESCIDOS NA PRESENÇA DE AIA OU AG3

Foi realizado ensaio de sobrevivência de *C. elegans* infectados com células de *C. gattii* previamente tratadas com AIA ou AG3. A sobrevivência média dos vermes variou entre 10 e 14 dias em todas as condições. Foi feito um controle com a linhagem OP50 de *Escherichia coli* em contato com os mesmos hormônios, a fim de verificar a toxicidade dos hormônios para os vermes. Não foi observada toxicidade, como pode ser observado na figura 12, na qual colocamos o controle *C. elegans* infectado com a bactéria *Escherichia coli* OP50 em cada uma das condições. Uma menor sobrevivência dos nemátodos na presença da bactéria indicaria uma provável toxicidade do composto. No entanto, em todas as condições testadas, a presença do hormônio não foi o suficiente para diminuir o tempo de sobrevivência dos vermes infectados. Deste modo, toda a diminuição na sobrevivência dos vermes infectados com alguma linhagem de *C. gattii* tratado com algum dos hormônios indica uma maior virulência da estirpe na presença do composto.

Foi constatada diminuição na sobrevivência dos vermes infectados com as seguintes cepas e condições: a) 1913ER na presença de 0,5 mg/L de AG3; b) L24/01 na presença de 1.000,0 mg/L de AG3 e c) L27/01 na presença de 0,5 mg/L de AG3, ou seja, três das quatro cepas de *C. gattii* tratadas com giberelina, que foram utilizadas para infecção dos nematódeos, mostraram-se mais virulentas neste modelo. Nestas mesmas condições, estas cepas mostraram aumento da relação superfície/volume, o que corrobora com resultados anteriores que indicam que o aumento da relação superfície/volume pode estar relacionado à virulência desta levedura (Ferreira *et al*, 2015).

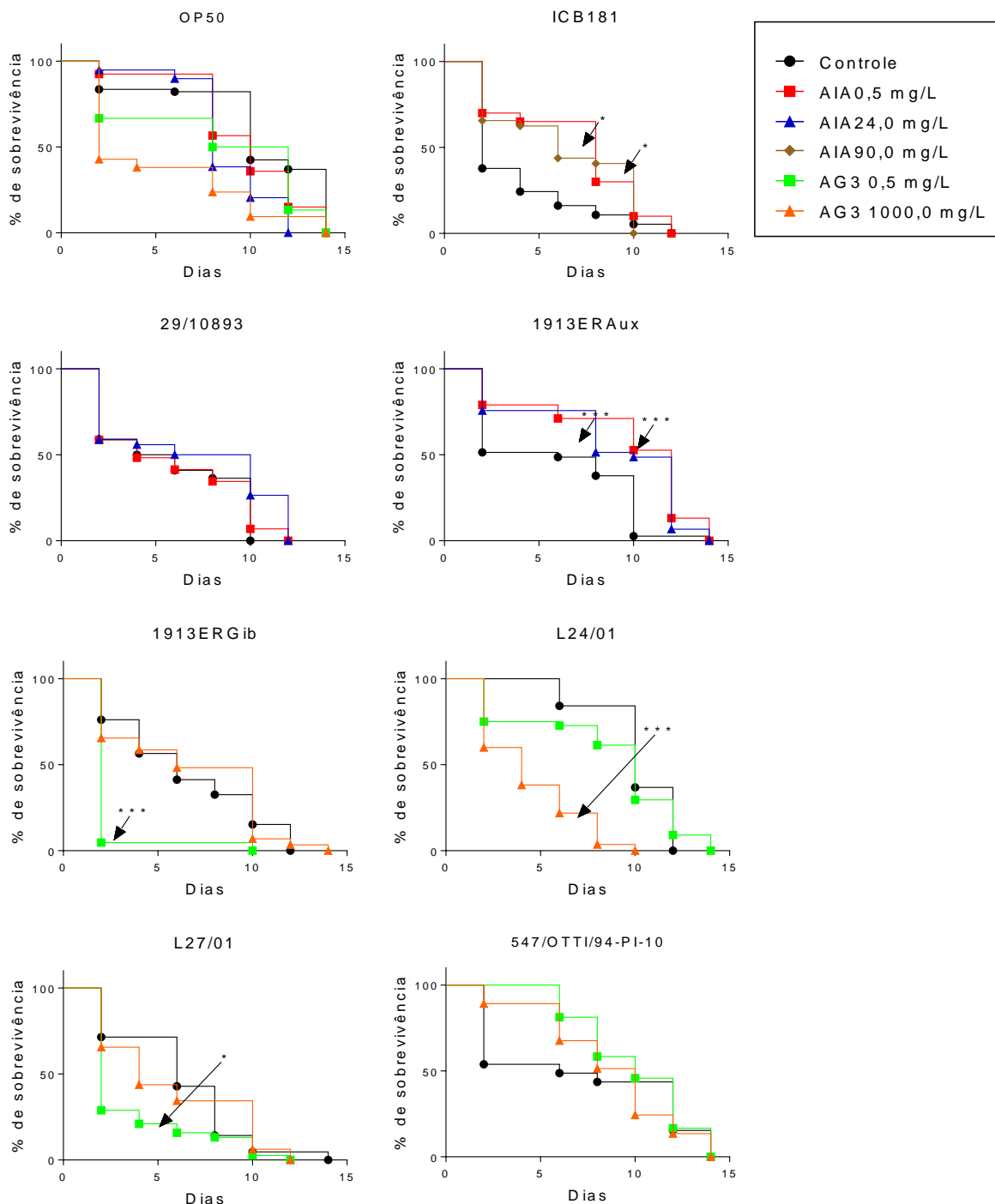




**Figura 12** – Curvas de sobrevivência de *C. elegans* infectados com diferentes estirpes de *C. gattii* previamente tratados com diferentes concentrações de ácido 3-indolacético (AIA) ou de ácido giberélico (AG3).

Por outro lado, foi observado aumento na sobrevivência dos vermes que foram infectados com as seguintes cepas e condições: a) ICB181 na presença de 0,5 mg/L e 90,0 mg/L de AIA; b) 1913ER na presença de 0,5 mg/L e 24,0 mg/L de AIA, isto é, duas das três cepas de *C. gattii* tratadas com auxina, que foram utilizadas para

infecção dos nematódeos, mostraram-se menos virulentas neste modelo. A cápsula é um importante fator de virulência de *C. gattii* (Zaragoza *et al.*, 2009).



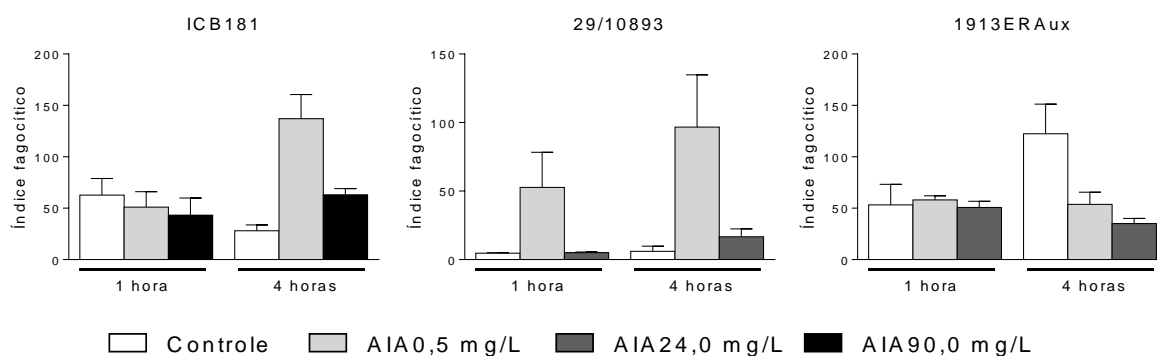
**Figura 13** – Curvas de sobrevivência de *C. elegans* infectados com diferentes estirpes de *C. gattii* previamente tratados com diferentes concentrações de ácido 3-indolacético (AIA) ou de ácido giberélico (AG3). \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,0001.

Ao contrário do esperado, o aumento da cápsula em ICB181 na presença de AIA em ambas concentrações não culminou no aumento da virulência da levedura durante a infecção dos nematódeos. Apesar desta aparente contradição, um resultado similar foi visto por Mylonakis e colaboradores (2002) que concluíram que a cápsula é importante, mas não essencial na morte de *C. elegans* por *Cryptococcus neoformans*.

O modelo com *Acanthamoeba castellanii* também foi utilizado para verificar a virulência de *C. gattii* após tratamento com hormônios vegetais.

## 9. ENSAIO DE FAGOCITOSE COM AMEBA

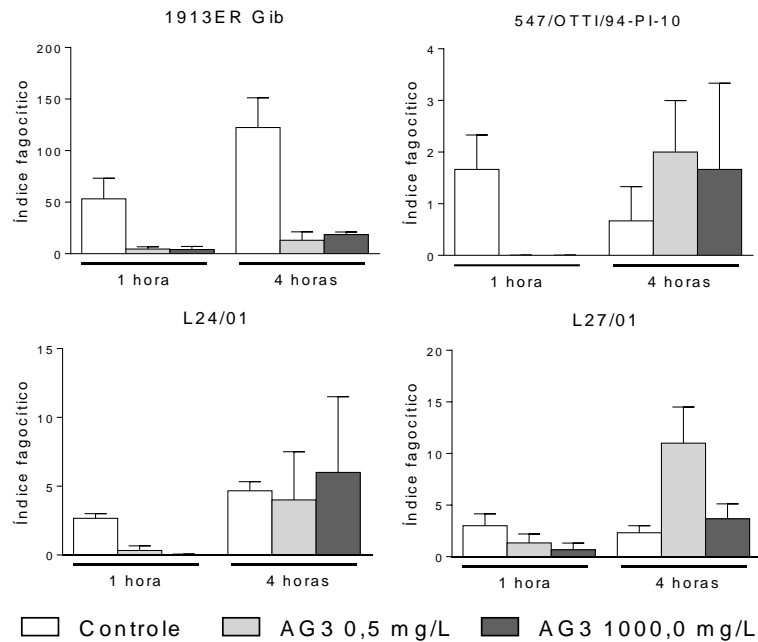
A figura 16 exibe imagens do ensaio de fagocitose. Foram observados perfis similares no índice fagocítico das leveduras do grupo controle e das leveduras previamente tratadas com AIA, após uma e quatro horas de cocultivo levedura x protozoário, independente da concentração do hormônio e da linhagem de *C. gattii*. Além disso, não houve diferença na progressão da fagocitose entre uma e quatro horas, entre os grupos controle e tratados com AIA, isto é, a razão entre o índice fagocítico de quatro horas pelo índice de uma hora exibe um perfil similar entre os grupos controle e tratados.



**Figura 14** – Índice fagocítico de células de três diferentes cepas de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L ou 90,0 mg/L de ácido 3-indolacético (AIA).

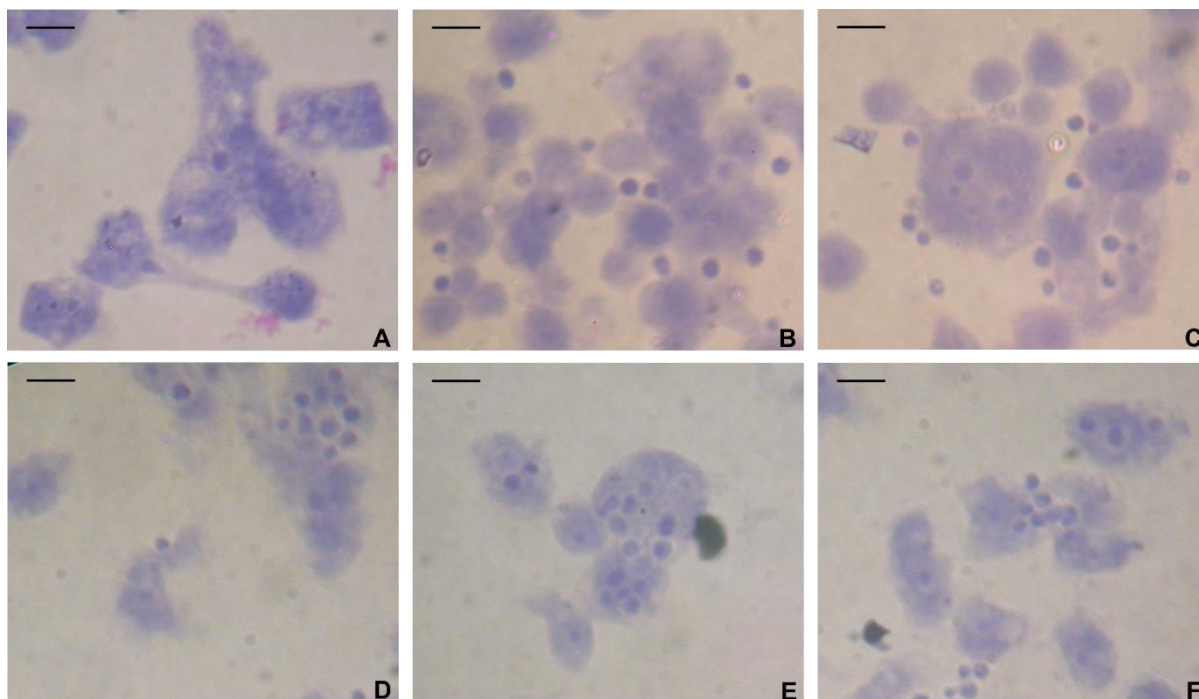
Foram observados perfis similares no índice fagocítico das leveduras do grupo controle e das leveduras previamente tratadas com AG3, após uma ou quatro horas de cocultivo levedura x protozoário, independente da concentração do hormônio ou da linhagem de *C. gattii*. Além disso, assim como as leveduras tratadas com AIA, não houve diferença na progressão da fagocitose entre uma e quatro horas, entre os

grupos controle e tratados com AG3, isto é, a razão entre o índice fagocítico de quatro horas pelo índice de uma hora exibe um perfil similar entre os grupos controle e tratados.



**Figura 15** – Índice fagocítico de células de quatro diferentes cepas de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L ou 1000,0 mg/L de ácido giberélico (AG3).

Okagaki e colaboradores (2010) concluíram que o aumento da cápsula está relacionado a diminuição nos níveis de fagocitose. Apesar disso, neste trabalho, a alteração no tamanho da cápsula de células de leveduras previamente expostas aos hormônios vegetais não interferiu no índice de fagocitose por amebas.



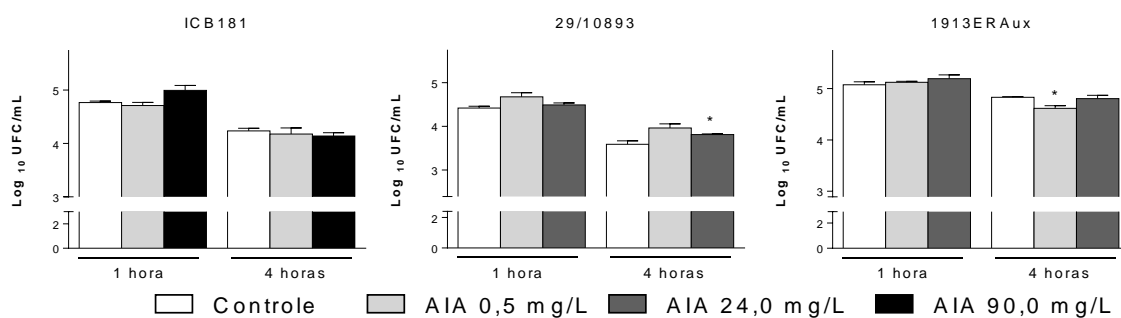
**Figura 16** – Imagens do ensaio de fagocitose. A) Monocultivo de *Acanthamoeba castellanii*, B) e C) Após 4 horas de co-cultivo de *A. castellanii* e *C. gattii* 29/10893, tratado com 24,0 mg/L de ácido 3-indolacético (AIA); D), E) e F) Após 4 horas de co-cultivo de *A. castellanii* e *C. gattii* 1913ER, tratado com 0,5 mg/L de AIA. Barra de escala = 10  $\mu$ m. Coloração Giemsa.

## 10. ENSAIO DE *KILLING*

A cepa ICB181 apresentou perfis similares de recuperação intracelular para os grupos controle e aqueles tratados com AIA, independente da concentração do hormônio.

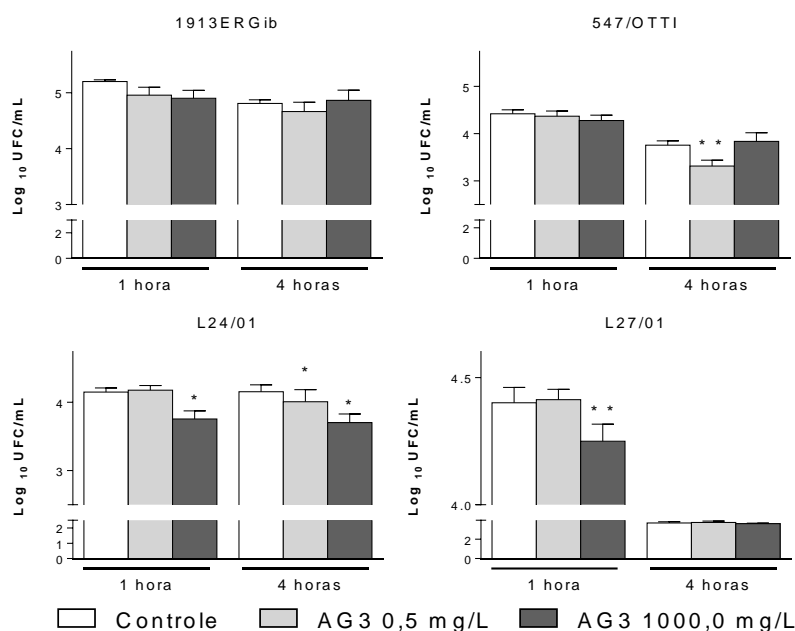
A cepa 29/10893 de *C. gattii* mostrou maior habilidade para sobreviver dentro da ameba quando previamente tratada com 24,0 mg/L de AIA, comparada ao grupo não tratado, após quatro horas de co-cultivo com o protozoário ( $p < 0,05$ ).

Já a cepa 1913ER de *C. gattii* mostrou menor habilidade para sobreviver dentro da ameba quando previamente tratada com 0,5 mg/L de AIA, comparada ao grupo não tratado, após quatro horas de co-cultivo com o protozoário ( $p < 0,05$ ). Nesta condição, células desta estirpe diminuíram a espessura da cápsula. Estudos prévios (Zaragoza *et al.*, 2008) apontam que o aumento da cápsula confere resistência ao estresse oxidativo sugerindo um mecanismo para sobrevivência intracelular. A diminuição da cápsula na presença de AIA provavelmente favoreceu a suscetibilidade desta cepa ao estresse oxidativo gerado no evento de fagocitose.



**Figura 17** – Recuperação intracelular de células de três cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L ou 90,0 mg/L de ácido 3-indolacético (AIA). UFC: unidade formadora de colônia. \* $p < 0,05$ .

Foi constatada menor habilidade para sobreviver dentro da ameba nas seguintes cepas e condições: a) L24/01 previamente tratada com 1.000,0 mg/L de AG3, após uma hora de co-cultivo com o protozoário, 0,5 mg/L e 1.000,0 mg/L de AG3 após quatro horas de co-cultivo com o protozoário ( $p < 0,05$ ); b) L27/01 tratada com 1.000,0 mg/L de AG3, após uma hora de co-cultivo com o protozoário ( $p < 0,05$ ); c) 547/OTTI tratada com 0,5 mg/L de AG3, após quatro horas de co-cultivo com o protozoário ( $p < 0,05$ ) (Figura 18).



**Figura 18** – Recuperação intracelular de células de quatro cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L ou 1.000,0 mg/L de ácido geberélico (AG3). UFC: unidade formadora de colônia. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

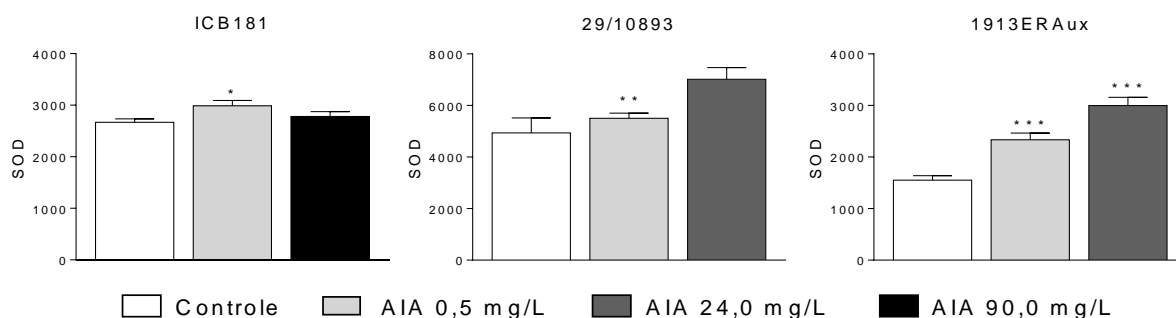
Este resultado indica que o hormônio giberelina leva a uma diminuição da virulência em diferentes cepas de *C. gattii* quando considerada a estratégia de sobrevivência intracelular das leveduras em amebas. Em contrapartida, em modelo nematódeo, este hormônio levou a um aumento da virulência destas cepas. Esta dicotomia também foi verificada no estudo de Mylonakis e colaboradores (2002) que concluíram que o sistema de patogênese de *Cryptococcus neoformans* é diferente para *A. castellanii* e *C. elegans*.

Para tentar entender o comportamento de *C. gattii* frente aos modelos de infecção utilizados neste trabalho, foram investigados fatores de virulência relacionados a estes modelos. Por exemplo: O aumento da atividade antioxidante é uma vantagem em situações de fagocitose. Um dos mecanismos usados por células fagocíticas é a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no fagossomo (Ferreira *et al.*, 2013). Se a levedura consegue neutralizar este estresse provavelmente terá mais chance de sobreviver. Deste modo, algumas enzimas como superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (PER) contribuem com o fenótipo de virulência de *Cryptococcus* spp. porque protegem o fungo do estresse oxidativo gerado no interior de fagócitos (Almeida *et al.*, 2015). Neste trabalho, foi verificado o perfil de SOD e PER de células de *C. gattii* tratadas com auxina e giberelina.

## 11. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE: PEROXIDASE E SUPEROXIDO DISMUTASE

### a. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

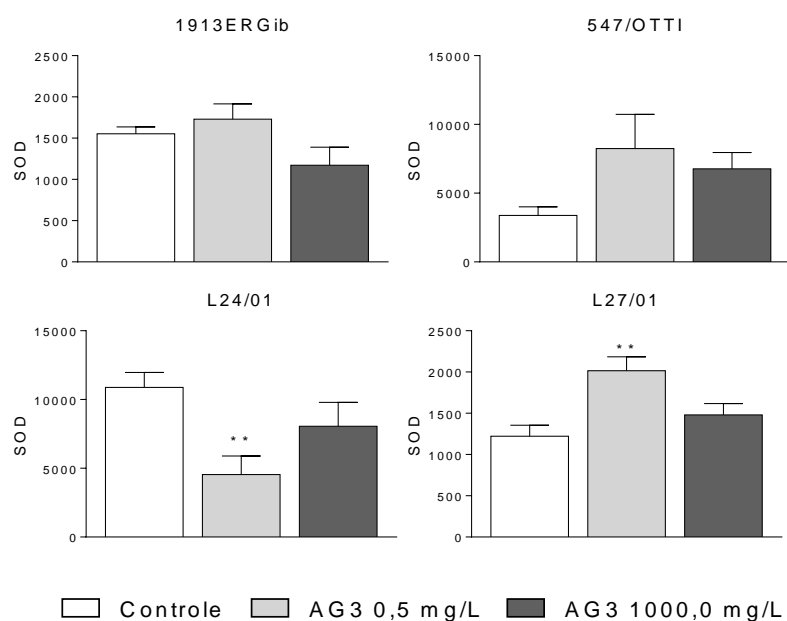
Foi observado aumento da atividade de SOD nas leveduras previamente tratadas com 0,5 mg/L de AIA, para as três estirpes de *C. gattii* testadas (Figura 19). A cepa 1913ER ainda mostrou aumento da atividade de SOD na presença de concentração sub-inibitória (24,0 mg/L) de AIA ( $p < 0,05$ ). O aumento da atividade de SOD da cepa 29/10893 na presença de AIA pode ter influenciado a melhor estratégia de sobrevivência intracelular desta cepa observada no ensaio de *killing*. Já para a cepa 1913ER, o aumento na atividade de SOD pode não ter sido suficiente para responder ao estresse oxidativo causado pela fagocitose, resultando em menor habilidade para sobreviver dentro da ameba.



**Figura 19** – Atividade de superóxido dismutase (SOD) de células de três cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L e 90,0mg/L de ácido 3-indolacético (AIA). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,0001.

A atividade de SOD foi significativamente maior nas células da cepa L27/01 previamente tratadas com 0,5 mg/L de AG3, comparadas àquelas não tratadas. Já para as células da cepa L24/01 sob as mesmas condições, a atividade de SOD foi significativamente menor, comparadas às não tratadas. Para as cepas 1913ER e 547/OTTI, o perfil da atividade de SOD não apresentou diferença entre leveduras previamente tratadas com 0,5 ou 1000,0mg/L de AG3 em relação aos grupos não tratados (Figura 20). A diminuição da atividade de SOD da cepa L24/01 na presença de AG3 pode ter influenciado a menor habilidade desta cepa para sobreviver dentro de amebas. Já para a cepa L27/01 na presença de AG3, assim como visto para a cepa 1913ER na presença de AIA, o aumento na atividade de SOD pode não ter sido suficiente para responder ao estresse oxidativo causado pela fagocitose, resultando em menor habilidade para sobreviver dentro da ameba.



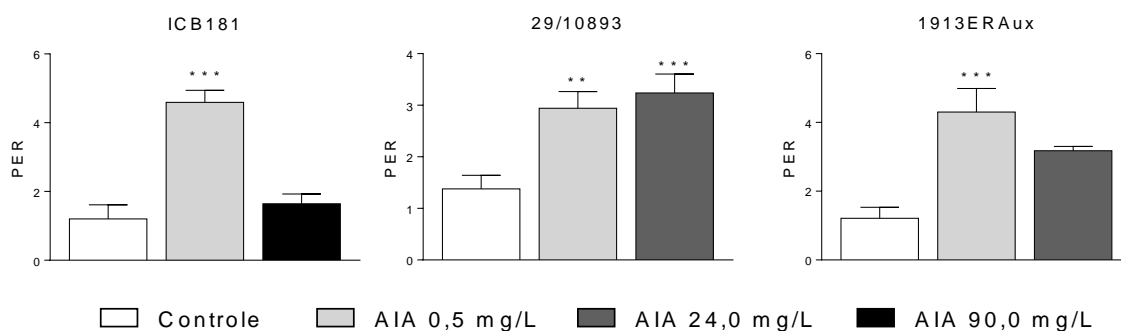


**Figura 20** – Atividade de superóxido dismutase (SOD) de células de quatro cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L e 1000,0 mg/L de ácido giberélico (AG3). \*\* $p < 0,01$ .

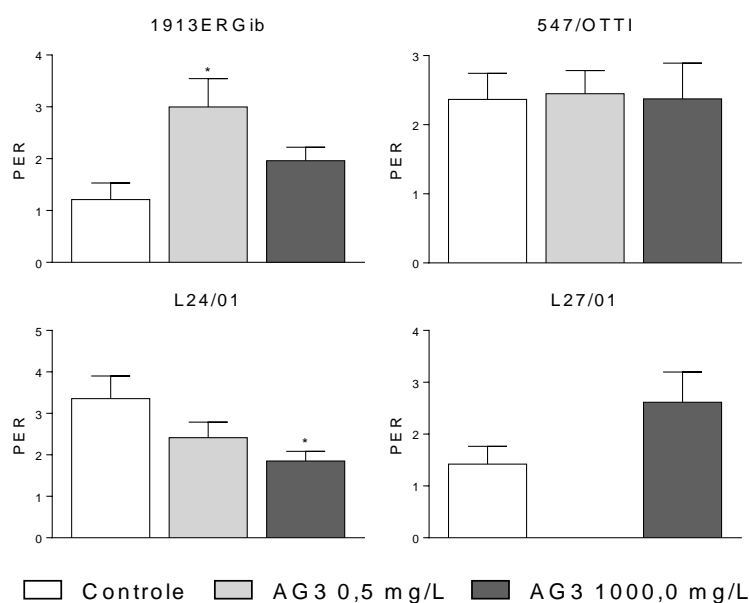
#### b. ATIVIDADE PEROXIDASE

Foi observado aumento da atividade de PER nas leveduras previamente tratadas com 0,5 mg/L de AIA, para as três estirpes de *C. gattii* testadas. A cepa 29/10893 ainda mostrou aumento da atividade de PER na presença de concentração sub-inibitória (24,0 mg/L) de AIA ( $p < 0,05$ ). Este resultado corrobora com a melhor estratégia de sobrevivência intracelular em amebas observada quando a cepa 29/10893 foi tratada com AIA. Já para a cepa 1913ER, o aumento na atividade de PER pode não ter sido suficiente para responder ao estresse oxidativo causado pela fagocitose, resultando em menor habilidade para sobreviver dentro da ameba.

A atividade de PER foi significativamente maior nas células da cepa 1913ER previamente tratadas com 0,5 mg/L de AG3, comparadas àquelas não tratadas. Já para as células da cepa L24/01 previamente tratadas com 1.000,0 mg/L do mesmo hormônio, a atividade de PER foi significativamente menor, comparadas às não tratadas. Para as cepas 547/OTTI e L27/01, o perfil da atividade de PER não apresentou diferença entre leveduras previamente tratadas com 0,5 ou 1.000,0 mg/L de AG3 em relação aos grupos não tratados.



**Figura 21** – Atividade de peroxidase (PER) de células de três cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L ou 90,0 mg/L de ácido 3-indolacético (AIA). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,0001.



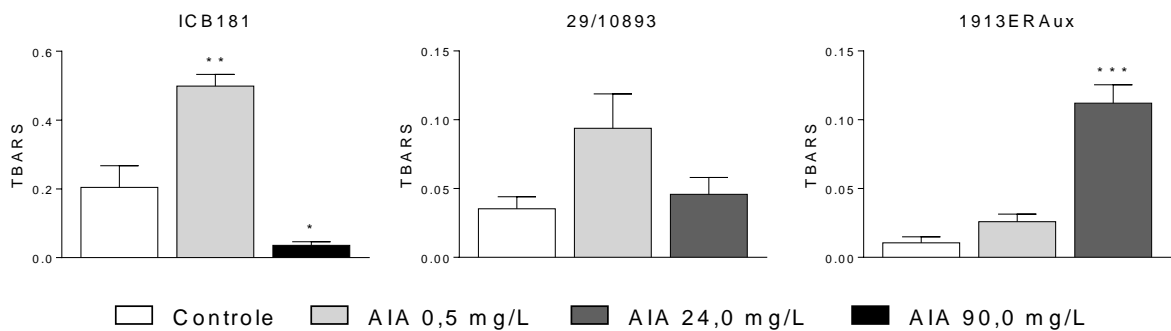
**Figura 22** – Atividade de peroxidase (PER) de células de quatro cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L ou 1000,0 mg/L de ácido giberélico (AG3). \*p<0,05.

## 12.MENSURAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS CÉLULAS FÚNGICAS TRATADAS COM OS HORMÔNIOS

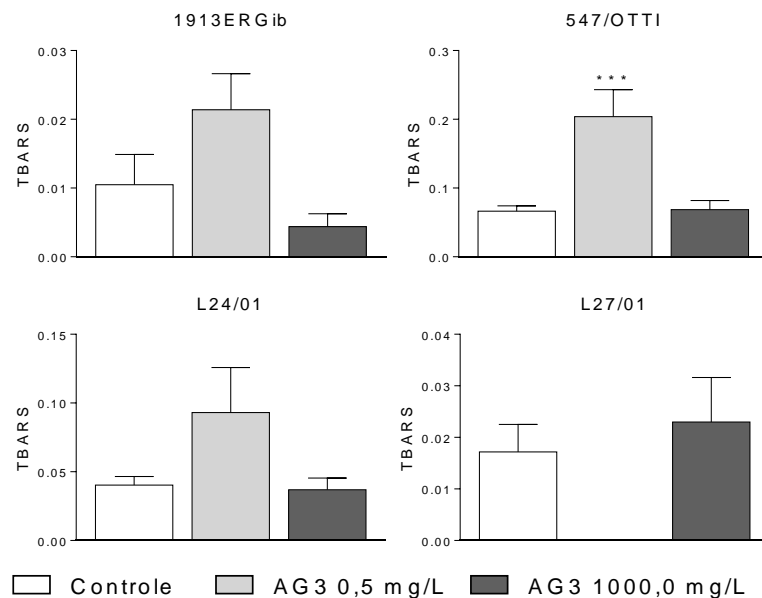
Células de *C. gattii* da estirpe ICB181 sofreram maior peroxidação lipídica quando tratadas com 0,5 mg/L de AIA e menor peroxidação lipídica quando tratadas com 90,0 mg/L do mesmo hormônio (p<0,05) quando comparadas àquelas não tratadas. Células da cepa 1913ER sofreram maior peroxidação lipídica quando previamente tratadas com 24,0 mg/L de AIA. Para células da cepa 29/10893,

tratadas com 0,5 e 24,0 mg/L de AIA, não houve diferença na peroxidação lipídica, comparadas às células das mesmas cepas do grupo controle.

Células de *C. gattii* da estirpe 547/OTTI mostraram maior peroxidação lipídica quando tratadas com 0,5 mg/L de AG3 quando comparadas àquelas não tratadas ( $p < 0,05$ ). Para células das cepas 1913ER, L24/01 e L27/01, tratadas com 0,5 e 1000,0 mg/L de AG3, não houve diferença na peroxidação lipídica, comparadas às células das mesmas cepas do grupo controle.



**Figura 23** – Peroxidação lipídica de células de três cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L, 24,0 mg/L e 90,0 mg/L de ácido 3-indolacético (AIA). y=absorbância por detecção de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$



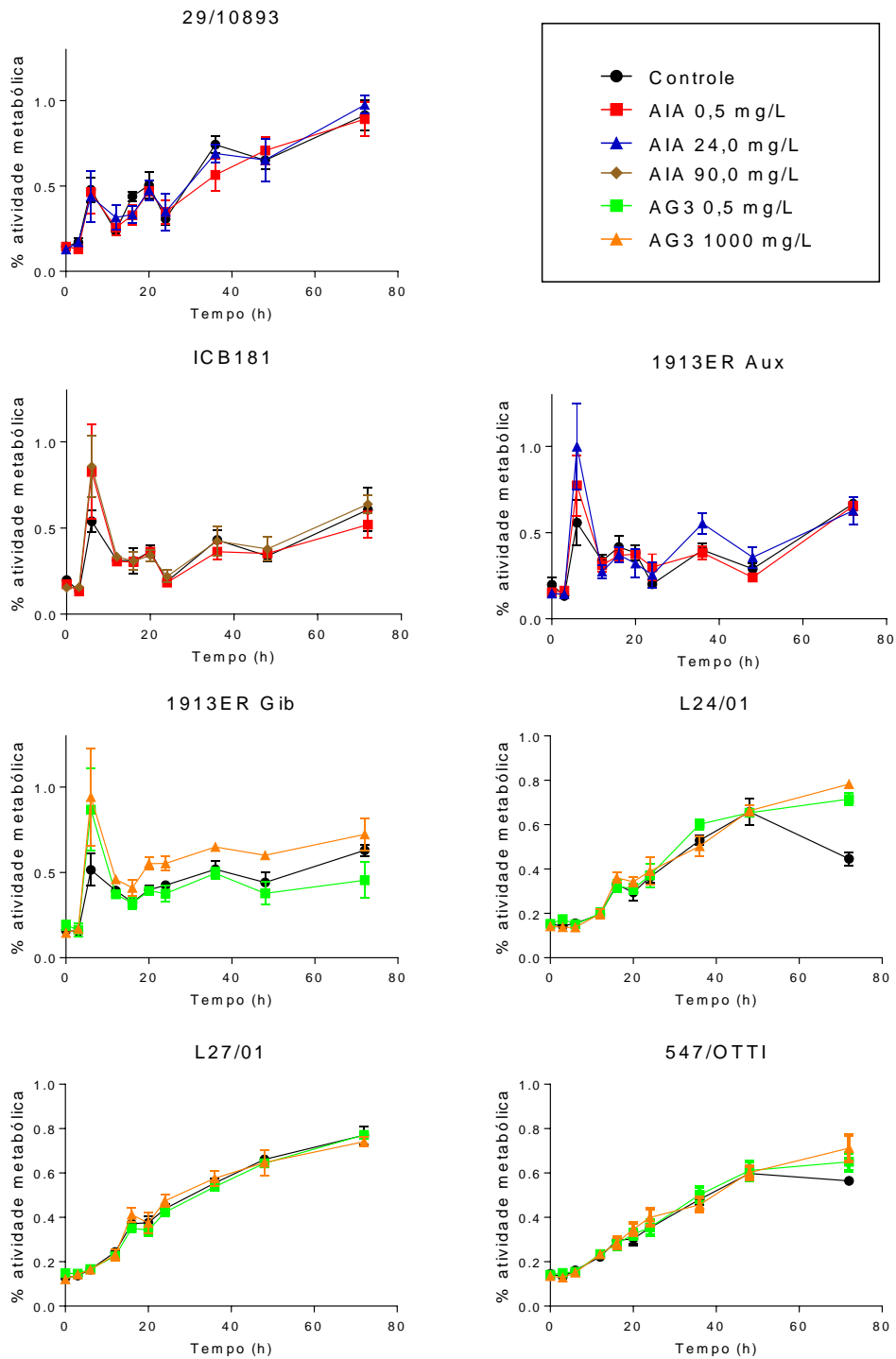
**Figura 24** – Peroxidação lipídica de células de quatro cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com 0,5 mg/L ou 1000,0 mg/L de ácido giberélico (AG3). y=absorbância por detecção de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). \*\*\* $p < 0,0001$

### 13. CURVA CRESCIMENTO DE *C. gattii* NA PRESENÇA OU NÃO (CONTROLE) DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO OU ÁCIDO GIBERÉLICO

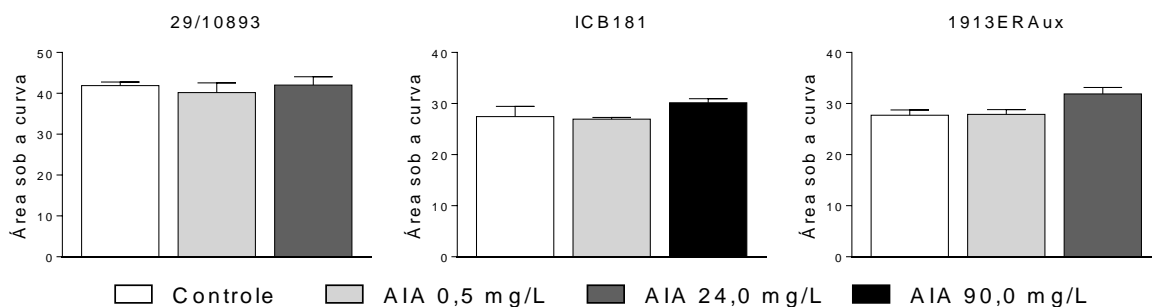
Os gráficos a seguir (figura 25) mostram uma medida indireta de crescimento através da mensuração da atividade metabólica em função do tempo durante 72 horas de crescimento de cada uma das cepas separadamente. A atividade metabólica, neste caso, é proporcional à absorvância detectada em espectrofotômetro.

Para cada curva mostrada acima foi feito cálculo de Área Sob a Curva (ASC) com o objetivo de comparar quantitativamente se houve diferença na atividade metabólica entre os grupos controle e tratamentos. A figura 26 mostra os gráficos que comparam os valores de ASC para o grupo controle e os grupos tratados com 0,5 mg/L de AIA e concentração sub-inibitória deste hormônio para cada cepa.

Não foi observada diferença entre a atividade metabólica do grupo controle e dos grupos previamente tratados com AIA para todas as estirpes testadas, independente da concentração do hormônio.



**Figura 25** – Curva de crescimento de células de sete cepas diferentes de *C. gattii* do grupo controle e células previamente tratadas com ácido 3-indolacético (AIA) - 0,5 mg/L, 24,0 mg/L e 90,0 mg/L - ou ácido giberélico (AG3) - 0,5 mg/L e 1000,0 mg/L. y=absorbância por detecção de MTT.



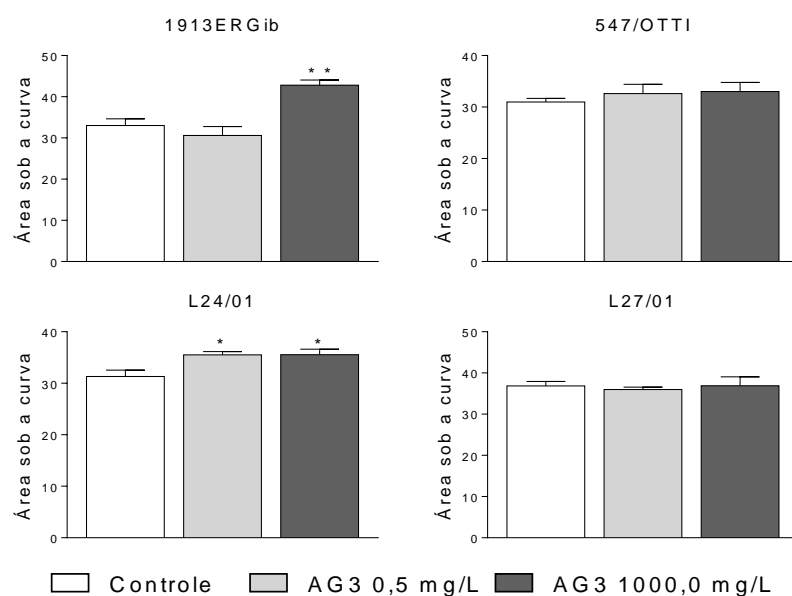
**Figura 26** – Valores de ASC da atividade metabólica para os grupos controle e previamente expostos ao ácido 3-indolacético em diferentes concentrações, de três diferentes cepas de *C. gattii*.

A figura 27 mostra os gráficos que comparam os valores de ASC para o grupo controle e os grupos tratados com 0,5 mg/L e 1000,0 mg/L de AG3 para cada cepa.

Não houve diferença entre os valores mensurados de atividade metabólica para os grupos controle e os grupos previamente tratados com AG3 para as estirpes 547/OTTI e L27/01 ( $p < 0,05$ ).

As cepas 1913ER e L24/01 apresentaram maior atividade metabólica quando colocadas em contato com 1000,0 mg/L de AG3. A cepa L24/01 ainda apresentou maior atividade metabólica quando colocada em contato com 0,5 mg/L de AG3.

A síntese da cápsula tem um alto custo energético para a célula. Deste modo, células com maiores cápsulas podem apresentar um crescimento mais lento (Maxson *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2015). Por outro lado, células com cápsulas menores podem apresentar maior taxa de crescimento, como observado neste trabalho, para duas das quatro cepas tratadas com giberelina.



**Figura 27** – Valores de ASC da atividade metabólica para os grupos controle e previamente expostos ao ácido giberélico em diferentes concentrações, quatro diferentes cepas de *C. gattii*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Outro fator relacionado à virulência em fagócitos é o potencial zeta, que indica a diferença de potencial na superfície da célula.

#### 14. MENSURAÇÃO DO POTENCIAL ZETA

O potencial zeta das estirpes analisadas no grupo controle variou de -14,4 mv a -5,8 mv, com média de -9,98 mv. Quando as cepas 29/10893, ICB181 e 1913ER foram previamente colocadas em contato com 0,5 mg/L de AIA, seu potencial zeta variou de -14,6 mv a -5,82 mv, com média de -10,72 mv. Quando as cepas 29/10893, 1913ER e ICB181 foram previamente colocadas em contato com concentração sub-inibitória de AIA, o potencial zeta variou de -13,4 mv a -5,17 mv, com média de -8,83 mv.

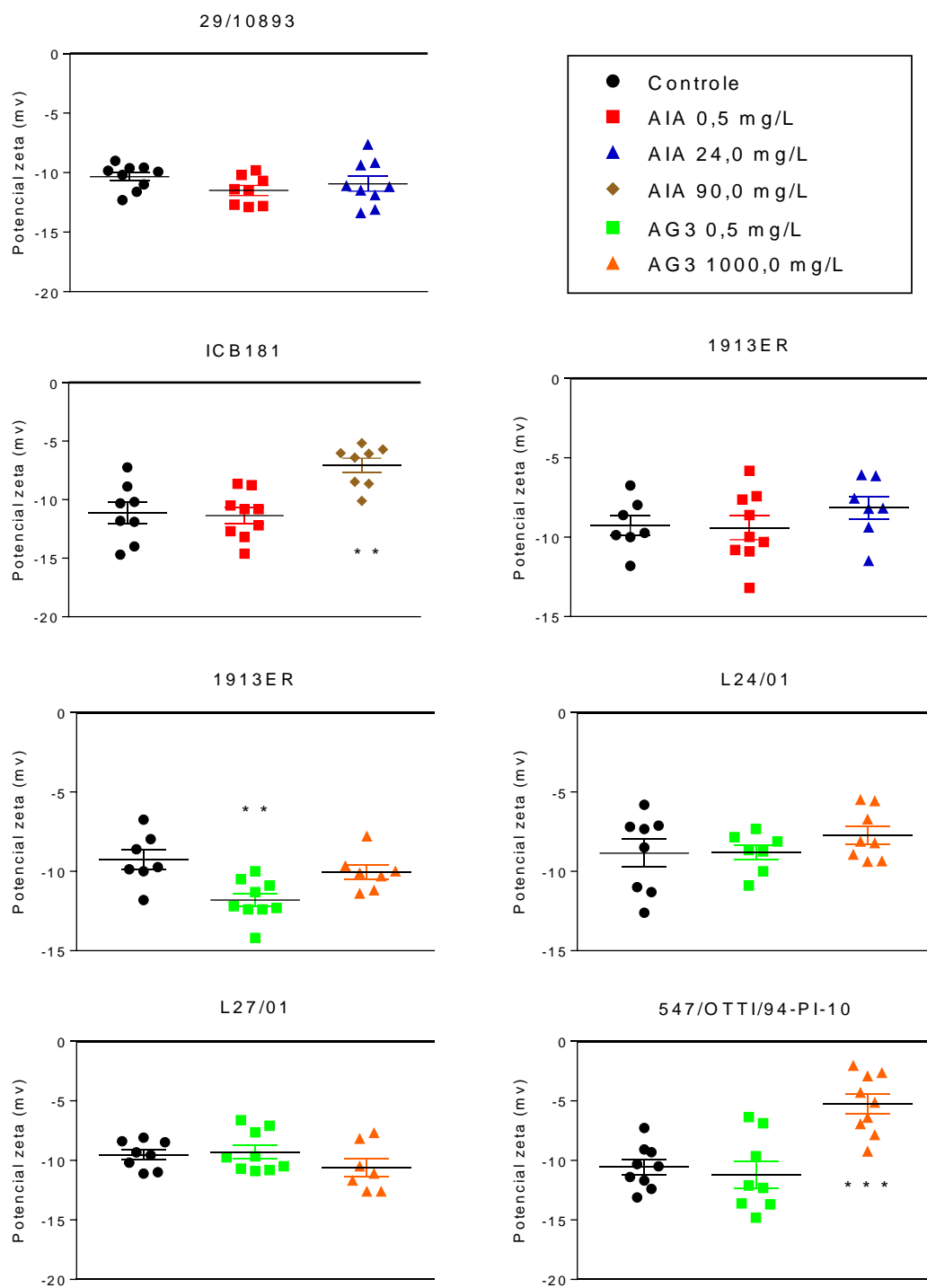
Quando em contato com 0,5 mg/L de AG3, o potencial zeta das cepas 1913ER, L24/01, L27/01 e 547/OTTI variou de -14,8 mv a -6,35 mv, com média de -10,33 mv. As mesmas cepas, quando previamente expostas à concentração de 1.000,0 mg/L do mesmo hormônio, mostraram potencial zeta de -12,6 mv a -2,05 mv, com média -8,2 mv.

Quando analisadas separadamente, as cepas: ICB181, previamente tratada com 90,0 mg/L de AIA e b) 547/OTTI, previamente tratada com 1.000,0 mg/L de

AG3, apresentaram diminuição significativa do potencial zeta, tornando-se menos eletronegativas que seus respectivos controles. A cepa 1913ER tratada com 0,5 mg/L de AG3 aumentou seu potencial zeta. A figura 28 exhibe graficamente o potencial zeta de cada estirpe em cada condição às quais foram expostas.

Os fagócitos tem a superfície carregada eletronegativamente. Quanto mais negativa for a carga de *Cryptococcus gattii*, menor a chance de ser fagocitado. Dois fatores que contribuem para a eletronegatividade da superfície de *Cryptococcus* spp. são a melanina e a cápsula. Nosanchuk e Casadevall (1997) demonstraram que quanto maior a cápsula, mais eletronegativa a superfície desta levedura. Assim, frequentemente o aumento da cápsula está relacionado ao aumento do potencial zeta (Zaragoza *et al.*, 2009). No entanto, aqui foi observada uma relação contrária. As cepas que apresentaram diminuição no potencial zeta (547/OTTI em AG3 e ICB181 em AIA) aumentaram sua cápsula quando tratadas nas mesmas condições e a cepa que aumentou seu potencial zeta (1913ER em AG3) diminuiu sua cápsula nesta condição. Estes resultados indicam que embora a cápsula tenha caráter predominantemente negativo devido a resíduos de ácido glicurônico (Zaragoza *et al.*, 2009), é necessário analisar sua composição para concluir sobre seu potencial zeta, não podendo ser feita uma associação direta entre aumento da cápsula e diminuição do potencial zeta.





**Figura 28** – Potencial zeta de cada uma das sete cepas previamente tratadas com ácido 3-indolacético (AIA) ou ácido giberélico (AG3). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

## 15. ANÁLISE *IN SILICO* DA PRESENÇA DE RECEPTOR DE AUXINAS E GIBERELINAS NO GENOMA DE *C. gattii*

Resultados de alinhamentos locais par a par no BLAST mostraram que os genes que codificam receptores de AIA (ABP e TIR1) e de AG3 (GID1) em plantas, o gene descrito como YML079W (presente em *S. cerevisiae*, estruturalmente semelhante ao ABP) e o VID30 (GID1-*related* em leveduras, componente central do complexo GID) não são encontrados no genoma de *C. gattii*.

O gene Grr1, TIR1-*related* em leveduras, foi encontrado como componente do genoma de diferentes estirpes de *C. gattii*.

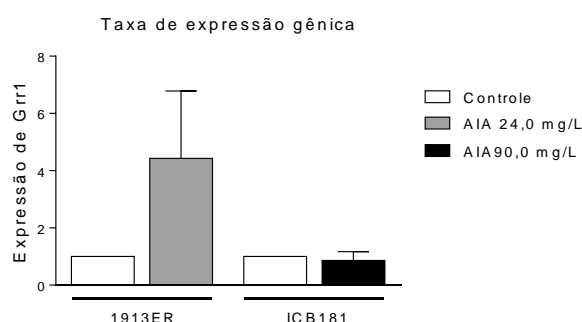
**Tabela 12** – Resumo dos resultados de BLASTN dos genes contra genomas completos de *Cryptococcus gattii*.

Gene/tamanho	Base de Dados								
	<i>Cryptococcus gattii</i> R265			<i>Cryptococcus gattii</i> WM276			<i>Cryptococcus gattii</i> CBS 7750		
	Score	E-value	ID	Score	E-value	ID	Score	E-value	ID
<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 4 (ABP)/ 1822	36	0,4	100% (18/18)	36	0,43	100% (18/18)	36	0,39	100% (18/18)
<i>C. gattii</i> R265 (V2 Pilon) supercont2.17 (Grr1)/ 2307	4573	0,0	100% (2307/2307)	3836	0,0	96% (2215/2307)	4573	0,0	100% (2307/2307)
gi 330443688:110247-110852 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c chromosome XIII (YML079W)/ 606	34	0,51	100% (17/17)	34	0,55	100% (17/17)	34	0,51	100% (17/17)
330443578:69671-72547 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c chromosome VII (VID30)/ 2877	40	0,04	95% (23/24)	36	0,68	95% (21/22)	40	0,04	95% (23/24)
722018281:c66059537 66058022 <i>Solanum lycopersicum cultivar</i> Heinz 1706 chromosome 9 (GID1)/	36	0,33	100% (18/18)	36	0,35	95% (21/22)	36	0,33	100% (18/18)
TIR1/ 3260	36	0,72	100% (18/18)	36	0,77	100% (17/17)	36	0,7	100% (18/18)

\* Resultados referentes ao primeiro hit. ID: identidade.

## 16. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA PARA COMPARAR EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA RECEPTOR DE AUXINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES

A expressão do gene *Grr1* foi avaliada nas estirpes 1913ER e ICB181 crescidas em meio mínimo contendo 24,0 mg/L ou 90,0 mg/L de AIA, respectivamente, e em meio isento de hormônio. Utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi possível verificar que não há alteração na taxa de expressão do gene *Grr1* quando a levedura é previamente tratada com condição sub-inibitória de AIA.



**Figura 29** – Taxa de expressão do gene *Grr1*, pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . AIA: ácido 3-indolacético.

**Tabela 13** – Valores de Cts (*Threshold Cycle*) obtidos em triplicata biológica (1, 2 e 3) em qRT-PCR com o uso de iniciadores para amplificação de *Grr1* e  $\beta$ -actina (gene normalizador) e como molde o cDNA de *C. gattii* 1913ER. Duplicata técnica (a e b).

Cepa e condição	Ct <i>Grr1</i>	Ct $\beta$ -actina
<b>1913ER</b>		
Controle1a	30,34158516	16,24903
Controle1b	30,72717667	16,27311
Controle2a	29,15402412	16,80637
Controle2b	29,11150932	16,55923
Controle3a	25,22899818	12,98314
Controle3b	25,60157776	13,2198
AIA 24,0 mg/L 1a	26,47732735	16,87175
AIA 24,0 mg/L 1b	26,90941429	16,84683
AIA 24,0 mg/L 2a	27,69100761	15,17574
AIA 24,0 mg/L 2b	27,88006401	15,18659
AIA 24,0 mg/L 3a	24,04511642	12,8229
AIA 24,0 mg/L 3b	24,46112442	12,73905

Ct: *Threshold Cycle*

**Tabela 14** – Valores de Cts (*Threshold Cycle*) obtidos em triplicata biológica (1, 2 e 3) em qRT-PCR com o uso de iniciadores para amplificação de Grr1 e  $\beta$ -actina (gene normalizador) e como molde o cDNA de *C. gattii* ICB181. Duplicata técnica (a e b).

<b>Cepa e condição</b>	<b>Ct Grr1</b>	<b>Ct <math>\beta</math>-actina</b>
<b>ICB181</b>		
Controle1a	27,22430801	17,48409
Controle1b	28,12714767	17,41992
Controle2a	28,62824059	16,66457
Controle2b	28,63627052	16,91706
Controle3a	27,6103878	16,98057
Controle3b	27,59575272	16,86182
AIA 90,0 mg/L 1a	26,90104294	14,99157
AIA 90,0 mg/L 1b	26,99533844	15,46022
AIA 90,0 mg/L 2a	27,63665581	17,21344
AIA 90,0 mg/L 2b	27,43489838	17,1495
AIA 90,0 mg/L 3a	26,95442772	15,38755
AIA 90,0 mg/L 3b	26,96434784	14,91773

Ct: *Threshold Cycle*

Com estes estudos foi possível concluir que células de *C. gattii* são capazes de alterar-se fenotipicamente na presença de giberelina e auxina, mesmo que estas células não apresentem um receptor para o hormônio, como é o caso da giberelina, ou que não alterem a expressão gênica do possível receptor, como é o caso da auxina. Provavelmente estas substâncias penetram nas células destas leveduras por um mecanismo independente de receptor ou ativam vias de transdução de sinal através de receptores de outros compostos.

A tabela a seguir resume o comportamento de cada cepa frente a todos os parâmetros avaliados na presença de 0,5 mg/L de AIA e concentração sub-inibitória (24,0 mg/L ou 90,0 mg/L) do mesmo hormônio.

**Tabela 15** – Resposta de cada cepa de *C. gattii* frente aos parâmetros avaliados, na presença de AIA (0,5 mg/L; 24,0 mg/L ou 90,0 mg/L).

Cepa	Parâmetro avaliado	Concentração de AIA (mg/L)	
		0,5	24,0 ou 90,0
29/10893	Diâmetro celular	↑	↑
	Espessura da cápsula	=	=
	S/V	↓	↓
	Curva de cresc.	=	=
	Zeta	=	=
	Fagocitose	=	=
	<i>killling</i>	=	↑
	SOD	↑	=
	PER	↑	↑
	TBARS	=	=
	Sobrevida	=	=
ICB181	Diâmetro celular	↑	=
	Espessura da cápsula	↑	↑
	S/V	↓	↓
	Curva de cresc.	=	=
	Zeta	=	↓
	Fagocitose	=	=
	<i>killling</i>	=	=
	SOD	↑	=
	PER	↑	=
	TBARS	↑	↓
	Sobrevida	↑	↑
1913ER	Diâmetro celular	=	=
	Espessura da cápsula	↓	↓
	S/V	↑	↑
	Curva de cresc.	=	=
	Zeta	=	=
	Fagocitose	=	=
	<i>killling</i>	↓	=
	SOD	↑	↑
	PER	↑	=
	TBARS	=	↑
	Sobrevida	↑	↑

AIA: ácido 3-indolacético; S/v: relação superfície/volume; IPR: proliferação intracelular; SOD: superóxido dismutase; PER: peroxidase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (peroxidação lipídica); ↑: aumento em relação ao controle; ↓: diminui em relação ao controle; = estatisticamente similar ao controle.

A tabela a seguir resume o comportamento de cada cepa frente a todos os parâmetros avaliados na presença de 0,5 mg/L e 1000,0 mg/L de AG3.

**Tabela 16** – Resposta de cada cepa de *C. gattii* frente aos parâmetros avaliados, na presença de AG3 (0,5 mg/L e 1.000,0 mg/L).

Cepa	Parâmetro avaliado	Concentração de AG3 (mg/L)	
		0,5	1.000,0
1913ER	Diâmetro celular	=	=
	Espessura da cápsula	↓	↓
	S/V	↑	↑
	Curva de cresc.	=	↑
	Zeta	↑	=
	Fagocitose	=	=
	<i>killling</i>	=	=
	SOD	=	=
	PER	↑	=
	TBARS	=	=
	Sobrevida	↓	=
L24/01	Diâmetro celular	=	=
	Espessura da cápsula	=	=
	S/V	↓	↑
	Curva de cresc.	↑	↑
	Zeta	=	=
	Fagocitose	=	=
	<i>killling</i>	↓	↓
	SOD	↓	=
	PER	=	↓
	TBARS	=	=
	Sobrevida	=	↓
L27/01	Diâmetro celular	=	=
	Espessura da cápsula	↓	↓
	S/V	↑	↑
	Curva de cresc.	=	=
	Zeta	=	=
	Fagocitose	=	=
	<i>killling</i>	=	↓
	SOD	↑	=
	PER	=	=
	TBARS	=	=
	Sobrevida	↓	=
547/OTTI	Diâmetro celular	=	=
	Espessura cáps.	↑	↑
	S/V	↓	↓
	Curva de cresc.	=	=
	Zeta	=	↓
	Fagocitose	=	=
	<i>killling</i>	↓	=
	SOD	=	=
	PER	=	=
	TBARS	↑	=
	Sobrevida	=	=

AG3: ácido giberélico; S/v: relação superfície/volume; IPR: proliferação intracelular; SOD: superóxido dismutase; PER: peroxidase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (peroxidação lipídica); ↑: aumento em relação ao controle; ↓: diminui em relação ao controle; = estatisticamente similar ao controle.

A hipótese da patogênese acidental atualmente é a mais aceita para explicar por que *C. gattii*, uma levedura majoritariamente ambiental, tem fatores de virulência tão específicos na patogênese humana. Esta hipótese propõe que a pressão seletiva exercida pelo ambiente e predadores naturais da levedura, atuaram no sentido de favorecer a evolução de certas características da levedura, que casualmente também funcionam como vantagem na infecção em mamíferos (May *et al.*, 2016).

Mylonakis e colaboradores (2002) sugerem que a patogênese de *Cryptococcus* spp. em mamíferos pode ser consequência de adaptações evolutivas da levedura durante sua interação com predadores ambientais, como amebas e nemátodos. Sabe-se, por exemplo, que a interação entre *C. gattii* e *Acanthamoeba castellanii* fornece uma explicação para a virulência da levedura e sua estratégia patogênica intracelular em macrófagos, uma vez que a associação do fungo com a ameba ocorre de modo semelhante à associação deste com macrófagos (Steenbergen *et al.*, 2001).

Além da associação com amebas e nemátodos, acredita-se que haja uma relação bem estabelecida entre *C. gattii* e plantas, pois a levedura já foi isolada a partir de mais de 50 espécies de plantas e de material vegetal em decomposição (Leite *et al.*, 2012) e associada às flores em eucalipto na Índia (Gugnani *et al.*, 2005). Além disso, quando sementes de *Arabisopsis thaliana* foram co-incubadas com *C. gattii*, foi observado menos germinação e aumento da virulência da levedura sobre o tronco da planta (Warpeha *et al.*, 2013).

Apesar disso, pouco se sabe sobre a influência que compostos produzidos por plantas, como hormônios vegetais, podem exercer sobre a biologia da levedura.

Na planta, hormônios da classe auxina regulam aspectos relacionados ao crescimento e desenvolvimento do vegetal, divisão, alongamento, senescência e diferenciação celular. Os da classe giberelina participam de outros processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento, como germinação da semente, alongamento do caule, divisão celular e floração (Woodward e Bartel, 2005; Pan e Wang, 2009; Zhao, 2010).

Neste trabalho, foi avaliada uma possível influência de auxina e giberelina sobre alguns fatores de resistência e virulência de *C. gattii* e sua associação com amebas e nemátodos.

Tanto auxina quanto giberelina exerceram influência sobre a biologia das cepas de *C. gattii*. Diferentes perfis de resposta à presença dos hormônios foram visualizados quando diferentes cepas de *C. gattii* foram submetidas às mesmas condições. Esta variação fenotípica pode estar relacionada a uma possível variação genotípica entre estas estirpes. Uma conclusão similar a esta foi descrita por Beale e colaboradores (2015) para *C. neoformans*. Os autores demonstraram que esta levedura é fenotipicamente heterogênea e que a linhagem desempenha um papel importante na virulência durante a criptococose. Rodrigues e colaboradores (2015) também demonstraram uma alta diversidade fenotípica, resultando numa alta diversidade patogênica, entre isolados de *C. gattii* que pertenciam ao mesmo sorotipo. A grande diversidade genética entre os isolados de *C. gattii* sustenta a ideia de que existem cinco espécies dentro de *C. gattii* (Hagen *et al.*, 2015). Provavelmente há uma variação genotípica entre as cepas analisadas neste trabalho, o que explicaria a variação fenotípica quando diferentes cepas de *C. gattii* foram expostas às mesmas condições.

Este estudo avaliou a influência de auxina e giberelina isoladamente sobre diferentes cepas de *C. gattii*. É possível que a resposta da levedura seja diferente num ambiente com associação entre estes e outros hormônios e com pressões bióticas e abióticas. Mais estudos precisam ser realizados para entender o mecanismo de resposta do fungo à presença destes hormônios. No entanto, os resultados descritos neste trabalho fornecem uma luz no sentido de começar a compreender a complexidade da interação entre *C. gattii* e plantas e a influência desta interação sobre a morfo-fisiologia e virulência da levedura.



## CONCLUSÕES

Tanto auxina quanto giberelina induzem alterações morfológicas cepa-dependente na cápsula e na relação superfície/volume de *C. gattii*. Estas alterações morfológicas estão relacionadas com alteração na virulência da levedura.

Auxina induziu o aumento da atividade de SOD e PER, duas enzimas relacionadas à virulência de *C. gattii*, apesar disso, o ácido 3-indolacético pode estar relacionado à diminuição da virulência da levedura, em modelo *C. elegans*. O ácido giberélico, por outro lado, pode estar relacionado ao aumento da virulência de *C. gattii* neste mesmo modelo.

Estudos com foco na expressão de fatores de virulência de *C. gattii* devem ser feitos utilizando diferentes cepas, uma vez que a resposta a um mesmo fator pode ser cepa-dependente e conclusões baseadas na resposta de uma só cepa podem ser enviesadas.

## REFERÊNCIAS

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br J Haematol*, v. 166, n. 4, p. 471-84, Aug 2014. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24749533> >.

ALFIERI, S. C. *et al.* Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *J Parasitol*, v. 86, n. 2, p. 220-7, Apr 2000. ISSN 0022-3395. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10780536> >.

ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, v. 14, n. 12, p. 1173-85, Dec 2015. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453651> >.

ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, v. 33, n. 2, p. 366-9, Jan 2012. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22222980> >.

BEALE, M. A. *et al.* Genotypic Diversity Is Associated with Clinical Outcome and Phenotype in Cryptococcal Meningitis across Southern Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 6, p. e0003847, 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26110902> >.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. *Ecologia: De Indivíduos a Ecosistemas*. 4ª ed. Porto Alegre, RS. Editora Artmed, 2007

BODDY, L.; FRANKLAND, J. C.; WEST, P. V. eds. *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. British Mycological Society Symposium Series. 1st ed. London: Elsevier/Academic Press; 2008.

BOEKHOUT, T.; VAN BELKUM, A. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. *Curr Genet*, v. 32, n. 3, p. 203-8, Sep 1997. ISSN 0172-8083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9339345> >.

BOVERS, M. *et al.* Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol*, v. 45, n. 4, p. 400-21, Apr 2008. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18261945> >.

BROAD INSTITUTE. Banco de dados do Broad Institute. Disponível em: <<http://www.broadinstitute.org/>>

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis*, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998 Jan-Mar 1998. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9452400> >.

BYRNES, E. J. *et al.* *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect*, v. 13, n. 11, p. 895-907, Oct 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684347> >.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, v. 9, n. 7, p. 327-35, Jul 2001. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435107> >.

CARNEIRO, H. C. S. Influência de agroquímicos na susceptibilidade de *Cryptococcus gattii* aos antifúngicos de uso clínico. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Microbiologia, Instituto de Ciências Naturais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2015.

CARVALHO, V. S. D. Influência de hormônios vegetais em fatores de virulência e resistência de *Cryptococcus gattii*. Projeto (Mestrado em Microbiologia) – Microbiologia, Instituto de Ciências Naturais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2015.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends Microbiol*, v. 19, n. 11, p. 564-71, Nov 2011. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880492> >.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, v. 20, n. 3, p. 507-44, v-vi, Sep 2006. ISSN 0891-5520. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984867> >.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin Microbiol Rev*, v. 27, n. 4, p. 980-1024, Oct 2014. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278580> >.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27–A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

DERENGOWSKI, L. A. S. *et al.* The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. *Eukaryot Cell*, v. 12,

n. 5, p. 761-74, May 2013. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23524994> >.

DUNCAN, C. *et al.* *Cryptococcus gattii* in wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada. *J Wildl Dis*, v. 42, n. 1, p. 175-8, Jan 2006. ISSN 0090-3558. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699162> >.

FAN, M. *et al.* The 5S rRNA and the rRNA intergenic spacer of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol*, v. 33, n. 4, p. 215-21, 1995 Jul-Aug 1995. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8531018> >.

FARIA-RAMOS, I. *et al.* Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. *BMC Microbiol*, v. 14, p. 155, 2014. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920078> >.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol*, v. 9, n. 6, p. 273-8, Jun 2001. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390242> >.

FELL, J. W. *et al.* Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 50 Pt 3, p. 1351-71, May 2000. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843082> >.

FERREIRA, G. F. *et al.* The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother*, v. 68, n. 8, p. 1801-11, Aug 2013. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612570> >.

FERREIRA, G. F. *et al.* Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother*, May 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26014951> >.

FINDLEY, K. *et al.* Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. *Eukaryot Cell*, v. 8, n. 3, p. 353-61, Mar 2009. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151324> >.

FRASES, S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. *Eukaryot Cell*, v. 7, n. 2, p. 319-27, Feb 2008. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156290> >.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, v. 13, n. 1, p. 122-43, table of contents, Jan 2000. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627494> >.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*, v. 12, n. 4, p. 501-17, Oct 1999. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515900> >.

GUGNANI, H. C. *et al.* Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of Eucalyptus trees in India. *Med Mycol*, v. 43, n. 6, p. 565-9, Sep 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16323312> >.

GRUEN, H. E. Auxins and Fungi. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 10:405-440, 1959.

HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia*, v. 170, n. 4, p. 209-11, Oct 2010. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414730> >.

HAGEN, F. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*, v. 78, p. 16-48, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721988> >.

JENSEN, M. P.; RILEY, D. P. Peroxynitrite decomposition activity of iron porphyrin complexes. *Inorg Chem*, v. 41, n. 18, p. 4788-97, Sep 2002. ISSN 0020-1669. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206706> >.

KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. 2ª Ed. Rio de Janeiro. Editora: Guanabara Koogan, 452p. 2008.

KHAN, A. *et al.* Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Res*, v. 11, n. 1, p. 114-22, Feb 2011. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114624> >.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*, v. 35, n. 2, p. 51-8, Apr 2007. ISSN 0300-8126. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401707> >.

KIDD, S. E. *et al.* Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol*, v. 73, n. 5, p. 1433-43, Mar 2007. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194837> >.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*, v. 54, n. 4, p. 391-406, Nov 2013. ISSN 2190-3883. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078518> >.

KUMAR, P. *et al.* Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. *Curr Opin Struct Biol*, v. 21, n. 5, p. 597-602, Oct 2011. ISSN 1879-033X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889889> >.

KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, v. 68, n. 4, p. 821-33, 1976 Jul-Aug 1976. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/790172> >.

LAZERA, M. S. *et al.* Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*, v. 38, n. 5, p. 379-83, Oct 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092385> >.

LAZÉRA, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med Mycol*, v. 36, n. 2, p. 119-22, Apr 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9776823> >.

LEITE, D. P. *et al.* *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. *J Occup Med Toxicol*, v. 7, n. 1, p. 11, 2012. ISSN 1745-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682392> >.

LEVITZ, S. M. Does amoeboid reasoning explain the evolution and maintenance of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*? *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 26, p. 14760-2, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752420> >.

LINARES, A. M. P.; HERNANDES, C.; FRANÇA, S. C.; LOURENÇO, M. V. Atividade fitorreguladora de jasmonatos produzidos por *Botryosphaeria rhodina*. Horticultura Brasileira 28: 430-434, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. Adv Appl Microbiol, v. 67, p. 131-90, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245939> >.

MALLIARIS, S. D.; STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. Med Mycol, v. 42, n. 2, p. 149-58, Apr 2004. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15124868> >.

MAXSON, M. E. *et al.* The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. Fungal Genet Biol, v. 44, n. 3, p. 180-6, Mar 2007. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963294> >.

MAY, R. C. *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. Nat Rev Microbiol, v. 14, n. 2, p. 106-17, Feb 2016. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685750> >.

MCMULLAN, B. J.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. Future Microbiol, v. 8, n. 12, p. 1613-31, Dec 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24266360> >.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. Infect Immun, v. 73, n. 4, p. 2012-9, Apr 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784542> >.

MITCHELL, D. H. *et al.* Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. J Gerontol, v. 34, n. 1, p. 28-36, Jan 1979. ISSN 0022-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/153363> >.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev, v. 8, n. 4, p.

515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468> >.

MORRISON, E. N. *et al.* Detection of phytohormones in temperate forest fungi predicts consistent abscisic acid production and a common pathway for cytokinin biosynthesis. *Mycologia*, v. 107, n. 2, p. 245-57, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572099> >.

MYLONAKIS, E. *et al.* Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 24, p. 15675-80, Nov 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438649> >.

NARASIPURA, S. D. *et al.* Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Mol Microbiol*, v. 47, n. 6, p. 1681-94, Mar 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622821> >.

NCBI. Banco de dados do NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>>

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infect Immun*, v. 65, n. 5, p. 1836-41, May 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125569> >.

OKAGAKI, L. H. *et al.* Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 6, p. e1000953, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585559> >.

OLSZEWSKI, M. A. *et al.* Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol*, v. 164, n. 5, p. 1761-71, May 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111322> >.

PAN, X.; WANG, X. Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 877, n. 26, p. 2806-13, Sep 2009. ISSN 1873-376X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427277> >.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 45, n. 3, p. 395-404, Sep 2005. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16055314> >.



PERFECT, J. R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

PERLIN, D. S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on Antifungal Drug Resistance. *Curr Clin Microbiol Rep*, v. 2, n. 2, p. 84-95, Jun 2015. ISSN 2196-5471. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26120512> >.

PFALLER, M. A. *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 71, n. 3, p. 252-9, Nov 2011. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917395> >.

PORTA-DE-LA-RIVA, M. *et al.* Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *J Vis Exp*, n. 64, p. e4019, 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710399> >.

PRUSTY, R.; GRISAFI, P.; FINK, G. R. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 12, p. 4153-7, Mar 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15010530> >.

PUKKILA-WORLEY, R. *et al.* Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell*, v. 4, n. 1, p. 190-201, Jan 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643074> >.

RAO, R. P. *et al.* Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics*, v. 185, n. 1, p. 211-20, May 2010. ISSN 1943-2631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233857> >.

RODRIGUES, J. *et al.* Pathogenic diversity amongst serotype C VGIII and VGIV *Cryptococcus gattii* isolates. *Sci Rep*, v. 5, p. 11717, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26153364> >.

SACCHAROMYCES GENOME DATABASE. Banco de dados do Saccharomyces Genome Database. Disponível em: <<http://www.yeastgenome.org/>>.

SANTOS, J. R. *et al.* Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 5, p. 2553-8,

May 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290956> >.

SHIELDS, A. B.; AJELLO, L. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Science, v. 151, n. 3707, p. 208-9, Jan 1966. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5907910> >.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 3, n. 4, Apr 2011. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084388> >.

SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. Emerg Infect Dis, v. 16, n. 1, p. 14-20, Jan 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20031037> >.

SPRINGER, D. J. *et al.* Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. PLoS One, v. 5, n. 6, p. e10978, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539754> >.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742090> >.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal - 3ª ed. Editora Artmed. Tradução em português, 954p. 2013.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. *et al.* MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. J Antimicrob Chemother, v. 62, n. 1, p. 205-6, Jul 2008. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18375969> >.

TUDZYNSKI, B. Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol, v. 66, n. 6, p. 597-611, Mar 2005. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15578178> >.

VALIANTE, V. *et al.* The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. Front Microbiol, v. 6, p. 325, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25932027> >.

WARPEHA, K. M.; PARK, Y. D.; WILLIAMSON, P. R. Susceptibility of intact germinating *Arabidopsis thaliana* to human fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Appl Environ Microbiol*, v. 79, n. 9, p. 2979-88, May 2013. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435895> >.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*, v. 95, n. 5, p. 707-35, Apr 2005. ISSN 0305-7364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749753> >.

XUE, C. *et al.* The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe*, v. 1, n. 4, p. 263-73, Jun 2007. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005707> >.

YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*, v. 36, n. 4, p. 223-8, Dec 2003. ISSN 1684-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14723249> >.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online*, v. 6, p. 10-15, 2004. ISSN 1480-9222. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15103395> >.

ZARAGOZA, O. *et al.* Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol*, v. 10, n. 10, p. 2043-57, Oct 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554313> >.

ZARAGOZA, O. *et al.* The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*, v. 68, p. 133-216, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426855> >.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*, v. 61, p. 49-64, 2010. ISSN 1545-2123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192736> >.