

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

EFEITO DA HIPÓXIA SOBRE A EXPRESSÃO
PROTÉICA DE *Cryptococcus gattii*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cláudia Sperotto Bemfica Balaguez

Porto Alegre, maio de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

EFEITO DA HIPÓXIA SOBRE A EXPRESSÃO
PROTÉICA DE *Cryptococcus gattii*

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

Cláudia Sperotto Bemfica Balaguez

Orientadora: Prof. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, maio de 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O financiamento foi do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

À minha orientadora Prof. Marilene Henning Vainstein pela sabedoria, paciência, dedicação, ensinamentos, oportunidades, formação, respeito e compreensão.

Ao Prof. Augusto Schrank pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela receptividade, pelas idéias e pela crítica construtiva.

Ao Prof. Charley Christian Staats pela dedicação à pesquisa, questionamentos pertinentes e pelas idéias sensatas.

Aos professores do Centro de Biotecnologia pelos ensinamentos, pelos equipamentos e laboratórios disponibilizados.

À Prof. Lívia Kmetzsch pela colaboração na solução de dúvidas e problemas, pela presença e responsabilidade com o laboratório e com os alunos.

À colega Juliana Ferraz pelos ensinamentos de proteômica.

Ao estimado colega Éder Oliveira que me ajudou, sem hesitar, no momento mais valoroso desse trabalho.

Ao estimado colega Diogo Demartini que sempre respondeu às minhas dúvidas, pela paciência, dedicação com a proteômica e colaboração com muitos ensinamentos.

À todos os queridos colegas do laboratório 220 pela convivência, tolerância, paciência e colaboração com o meu aprendizado.

À Lucélia pelas dicas, protocolos e dúvidas.

Aos caros colegas do laboratório 217 pela convivência e ajuda.

Aos colegas do laboratório 206 e 210.

À Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Aos meus queridos pais e irmão que me serviram de exemplo e me apoiaram nessa jornada.

Ao meu marido pelo apoio, companheirismo e paciência.

À UFRGS, PPGBCM pelo ensino de qualidade e de alto padrão.

Aos funcionários do PPGBCM e do Centro de Biotecnologia pelo suporte e prestabilidade.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades	viii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Resumo	xiii
Abstract.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1 Aspectos Gerais	4
1.2 <i>Cryptococcus gattii</i>	5
1.2.1 A Criptococose e <i>Cryptococcus gattii</i>	6
1.2.2 A ecologia e a epidemiologia	9
1.2.3 Os fatores de virulência	11
1.2.3.1 A cápsula polissacarídica.....	11
1.2.3.2 A Melanina	14
1.2.3.3 O desenvolvimento a 37°C	15
1.2.3.4 As enzimas.....	16
1.3 O oxigênio	18
1.3.1 A hipóxia	20
1.3.2 A homeostase de Oxigênio	21
1.3.3 Os mecanismos de adaptação à hipóxia	22
1.4 A análise proteômica	25
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivos Específicos	26

3. Materiais e Métodos	27
3.1 Linhagem fúngica e condições de crescimento	27
3.1.1 Efeito da hipóxia sobre a Curva de desenvolvimento de <i>C. gattii</i>	28
3.2 Análises fenotípicas	28
3.2.1 Efeito da hipóxia sobre a produção de melanina por <i>C. gattii</i>	28
3.2.2 Efeito da hipóxia sobre a espessura da cápsula de <i>C. gattii</i>	29
3.3 Proteômica	30
3.3.1 Preparação dos extratos protéicos	30
3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	30
3.3.3 Digestão em gel	31
3.3.4 Análise das amostras por LC-MS/MS	32
3.3.5 Análise dos dados de LC- MS/MS	33
3.3.6 Classificação funcional das proteínas identificadas	33
4. Resultados.....	34
4.1 Análise do efeito da hipóxia sobre os fatores de virulência de <i>C. gattii</i>	34
4.2 Extração e quantificação das proteínas da linhagem R265 de <i>C. gattii</i>	38
4.2.1 Efeito da hipóxia sobre a concentração protéica de <i>C. gattii</i>	38
4.2.2 Separação das proteínas de <i>C. gattii</i> por eletroforese em SDS-PAGE.....	39
4.3 Identificação e análise da expressão diferencial das proteínas de <i>C. gattii</i> sob condição de hipóxia	40
4.3.1 Análises comparativas entre T0 e T24	41
4.3.2 Análises comparativas entre T24 e T48	43
4.3.3 Análises comparativas entre T0, T24 e T48	45
4.3.4 Análise das proteínas hipotéticas.....	47
4.4 Classificação funcional das proteínas de <i>C. gattii</i> envolvidas na adaptação do fungo à hipóxia.	48
4.5 Mapeamento das vias metabólicas de <i>C. gattii</i> envolvidas na adaptação do fungo à hipóxia	50

5. Discussão.....	53
6. Conclusões.....	64
7. Perspectivas	66
8. Referências Bibliográficas.....	75

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

ACN- Acetonitrila

AFLP- *Amplified fragment length polymorphism*

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

cm- Centímetros

CHAPS- (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonado)

°C- Graus Celsius

2DE- Gel de eletroforese bidimensional

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

DTT- Ditioneitol

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

ESI – Ionização por eletrospray

GO – *Gene ontology*

FADH₂- Dinucleotídeo de flavina adenina (reduzido)

“g”- Força gravitacional

GABA- Ácido gama-aminobutírico

GalXM- Galactoxilomana

GXM- Glicuronoxilomana

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HSP – Proteína de choque térmico

IL- Interleucina

IFN γ - Interferon gama

IMPDH- Inosina monofosfato desidrogenase

Kb- Quilobase, 1.000 pares de bases

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem

L-DOPA- L-3,4- Dihidroxifenilalanina

MP – Manoproteínas

m/v- Razão massa/volume

m/z- Razão massa/carga

Mr- Massa molecular relativa

MS- Espectrometria de massas

NAD⁺- Adenina Nicotinamida Dinucleotídeo (oxidada)

NADH- Adenina Nicotinamida Dinucleotídeo (reduzida)

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

OD - Densidade óptica

PCR- Reação em Cadeia da DNA Polimerase

PBS- Tampão fosfato-salino

PMSF- Fenilmetilsufonil fluorido

pO₂- Pressão parcial de oxigênio

PTMs- Modificações pós-traducionais

Q-ToF – Analisador do tipo Quadrupolo associado a um analisador do tipo Tempo de Vôo

RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA- Ácido Ribonucléico

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SNC- Sistema nervoso central

TCA- Ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs)

TFA –Ácido trifluoroacético

TPCK- N-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

UPLC - Cromatografia líquida de ultra eficiência

1DE- Gel de eletroforese unidimensional

V/V- Razão volume/volume

YPD - Extrato de levedura, peptona, dextrose

YNB- Base de levedura nitrogenada

Lista de Figuras

Figura 1 Ciclo de infecção de <i>C. neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> ..	7
Figura 2 Isolados de <i>Cryptococcus gattii</i> no mundo.	10
Figura 3 Cápsula polissacarídica de <i>C. neoformans</i> .	13
Figura 4 Síntese de melanina por <i>C. gattii</i> ..	15
Figura 5 A hipóxia afeta o desenvolvimento de <i>C. gattii</i> .	35
Figura 6 A agitação do cultivo é um fator importante para a formação da cápsula de <i>Cryptococcus gattii</i> .	36
Figura 7 Efeito da hipóxia sobre a melanização <i>in vitro</i> de <i>C. gattii</i> .	37
Figura 8 Análise por SDS-Page das proteínas de <i>C. gattii</i> sob condição de hipóxia.	39
Figura 9 Distribuição das proteínas de <i>C. gattii</i> obtidas após crescimento do fungo sob hipóxia.	41
Figura 10 Anotação do “Gene Ontology” das proteínas de <i>C. gattii</i> sob condição de hipóxia.	49
Figura 11 Diagrama das vias metabólicas.	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 Concentrações das proteínas da linhagem R265 de <i>C. gattii</i>	38
Tabela 2 Análise comparativa das proteínas de <i>C. gattii</i> R265 identificadas em T0 e T24 sob hipóxia.....	42
Tabela 3 Análise comparativa das proteínas de <i>C. gattii</i> R265 identificadas em T24 e T48 sob hipóxia.....	44
Tabela 4 Análise comparativa da expressão relativa das proteínas de <i>C. gattii</i> R265 identificadas em T0, T24 e T48 sob hipóxia.	46
Tabela 5 Proteínas de <i>C. gattii</i> R265 identificadas exclusivamente em T0, T24 e T48 sob hipóxia	68
Tabela 6 Classificação putativa das proteínas hipotéticas da linhagem R265 de <i>C. gattii</i> sob hipóxia.....	68
Tabela 7 Contagem espectral, cobertura, peptídeos únicos, score máximo e mínimo de íons e proteínas obtidos pelo programa scaffold a partir das 130 proteínas diferencialmente expressas de <i>C.gattii</i> identificadas por LC MS/MS sob condição de hipóxia em T0, T24 e T48.....	71
Tabela 8 Lista das 190 das proteínas de <i>C.gattii</i> identificadas por LC MS/MS em condição de hipóxia nos tempos T0, T24 e T48.....	75

Resumo

A levedura *Cryptococcus gattii* é um dos agentes etiológicos da criptococose, doença que pode levar à infecção fatal no sistema nervoso central em humanos e outros mamíferos. A forma de infecção ocorre através da inalação de esporos fúngicos pelas vias aéreas superiores e atinge os pulmões dando início à formação de sítios de deposição fúngica (criptococoma). Os níveis de oxigênio nos criptococomas são reduzidos devido à diminuição da perfusão sanguínea no local, ocasionando hipóxia (0,5-5% oxigênio) ou anóxia (0% oxigênio). Nesses sítios, o fungo não só modula seu metabolismo energético de acordo com a disponibilidade de oxigênio como também de nutrientes que o tecido dispõe. O oxigênio molecular (O₂) é essencial para a produção de trifosfato de adenosina (ATP) na respiração celular e nas vias bioquímicas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos insaturados, tirosina, esteróis e ácido nicotínico para a fosforilação oxidativa e processos biossintéticos. Desse modo, o oxigênio é um elemento essencial para a manutenção do patógeno aeróbico no hospedeiro. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi analisar o efeito da hipóxia sobre a expressão global das proteínas de *C. gattii*. Para isso, a levedura foi cultivada em YNB líquido a 37°C em concentração de O₂ ajustada para 1% (V/V). As células foram coletadas em três tempos diferentes de hipóxia (0h-T0, 24h-T24 e 48h-T48) e as proteínas extraídas foram separadas por SDS-PAGE. Cada canaleta do gel foi dividida em -9 frações, as quais foram submetidas à tripsinização. Os peptídeos eluídos foram separados por cromatografia líquida e analisados por espectrometria de massas. Foram consideradas identificações válidas as proteínas que apresentassem pelo menos 2 peptídeos únicos, nas quais aparecessem em no mínimo 2 replicatas biológicas. Nas condições analisadas, foi possível identificar 130 proteínas, tendo sido identificadas proteínas expressas somente em uma determinada condição (43 proteínas em T0, 14 em T24 e 13 em T48). Com os resultados proteômicos analisados, pôde-se observar que houve a regulação positiva ou negativa da expressão protéica de *C. gattii* na situação de hipóxia. Devido ao

fato da hipóxia ocorrer comumente no ambiente da infecção fúngica, o remodelamento metabólico ao qual o fungo se submete é crucial para a sua proteção e manutenção *in vitro* ou no hospedeiro. Em análises fenotípicas realizadas neste trabalho, verificou-se que a hipóxia pode exercer influência no crescimento fúngico e na sua melanização, porém não foi possível verificar aumento na espessura da cápsula. Adicionalmente, observou-se modificações na regulação da expressão protéica nas vias metabólicas glicolítica, pentose-fosfato, glioxalato, ácido tricarbóxico, fosforilação oxidativa entre outras. Essa alteração entre as via metabólicas pode ser o resultado de uma compensação pela redução do aporte de oxigênio para dentro da célula fúngica.

Abstract

The yeast *Cryptococcus gattii* is the etiologic agent of cryptococcosis, a disease that can lead to fatal infection of the central nervous system in humans and other mammals. The form of infection occurs through inhalation of fungal spores through the upper airways and reaches the lungs initiating the formation sites of fungal deposition (cryptococcoma). Cryptococcomas experience low oxygen levels in the lungs causing hypoxia (0.5-5 % oxygen) or anoxia (0 % oxygen). At these sites, the fungal cells not only modulates its energy metabolism according to the availability of oxygen but also to the nutrients that the tissue has. The molecular oxygen is essential for the production of adenosine triphosphate (ATP) in cell respiration and the biochemical pathways related to the biosynthesis of unsaturated fatty acids, tyrosine, sterols and nicotinic acid for oxidative phosphorylation and biosynthetic processes. Thus, oxygen is essential for the maintenance of aerobic pathogen in host environment. So, the aim of this study is to analyze the effect of hypoxia on the global expression of proteins of *C. gattii*. For that reason, yeast was grown in liquid YNB 37°C with reduced O₂ levels (1% - V/V). Cells were collected at three different periods of hypoxia (0h-T0, 24h-T24, 48h-T48) and the extracted proteins were separated by SDS-PAGE. Each gel lane was divided into 10 slices and digested with trypsin. The eluted peptides were separated by HPLC and analyzed by mass spectrometry. Only proteins identifications with at least 2 unique peptides and present in at least two biological replicates were considered true identifications. In the conditions analyzed, a total of 130 proteins could be identified, with several presenting the expression in specific conditions (forty-three proteins in T0, fourteen in T24 and thirteen in T48). With the proteomic results analyzed, it was observed that there was a positive or negative regulation of protein expression of *C. gattii* in the situation of hypoxia. Because of hypoxia occur commonly in the environment fungal infection, metabolic remodeling to which the fungus undergoes is crucial for their protection and maintenance *in vitro* or in the host. The phenotypic analyzes showed that hypoxia can exert influence on fungal growth and their melanization, but this work did not observed

increase in the thickness of the capsule. In addition, we observed changes in the regulation of protein expression, pentose-phosphate, glyoxylate, tricarboxylic acid, oxidative phosphorylation and other glycolytic pathways. This change between the metabolic pathway may be the result of a compensation for reduced oxygen supply into the fungal cell.

1. Introdução

No período que compreende as décadas de 1980 a 2000, ocorreu um aumento drástico de infecções invasivas por fungos patogênicos, que ao infectarem os pacientes imunocomprometidos, provocaram morbidade e mortalidade em diversas partes do globo. Todavia, o surgimento dessas infecções pode ser consequência de fatores como o aumento de pacientes imunocomprometidos (Síndrome da imunodeficiência adquirida-AIDS, câncer e transplantes) e resistência microbiana (Rees *et al.*, 1998). As infecções mencionadas são decorrentes de diversos agentes etiológicos. Destacando-se entre eles, as espécies *Cryptococcus neoformans*/*C.gattii*. Esses são os principais fungos patogênicos causadores de infecção fatal no sistema nervoso central em humanos e em outros mamíferos, denominada criptococose. A rota de infecção de *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* em humanos ocorre via inalação dos esporos ou células de levedura dessecadas que irão colonizar os pulmões. Nos alvéolos pulmonares, o sistema imune do hospedeiro pode remover o fungo a menos que este esteja em estado de latência, propiciando uma infecção assintomática. Nessa última hipótese, sendo o hospedeiro imunocomprometido, o patógeno pode ser reativado e desencadear uma doença pulmonar com nódulos e inflamação nesses órgãos (Kishi *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009), desse modo, o fungo pode burlar o sistema imune e subsequentemente, disseminar-se para todos os órgãos tendo como preferência o cérebro (Garcia-Hermoso *et al.*, 1999; Goldman *et al.*, 2001; Lin & Heitman, 2006; Lin *et al.*, 2009), causando meningite (Sabiiti & May, 2012). Num certo sentido, considera-se forte o tropismo que o patógeno tem pelo sistema nervoso central (McClelland *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013).

No entanto, *C. gattii* só apareceu com destaque, quando ocorreu o surto epidêmico de criptococose nas Ilhas de Vancouver (Columbia Britânica- Canadá), que se iniciou a partir de 1999 (kidd *et al.*, 2004; Galanis & Macdougall, 2010; Vorathavorn *et al.*, 2013), tendo como ponto de expansão esse local até o continente da Colúmbia Britânica (Canadá) e noroeste do pacífico (Byrnes *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2005; Kidd *et al.*, 2004). Em

2003, a infecção criptocócica tornou-se notória na Colúmbia Britânica. Isso foi relatado pelo centro de controle de doenças dessa localidade, além de uma incidência de 218 casos de criptococose causada por *C. gattii* entre 1999 a 2007, com uma média de 24,2 casos por ano (Datta *et al.*, 2009). Também houve outros casos de infecção por *C. gattii* evidenciados em indivíduos na Austrália Ocidental e no Brasil. Dentre as epidemias citadas, a mais proeminente é a de Vancouver (Datta *et al.*, 2009; Byrnes *et al.*, 2010; Carriconde *et al.*, 2011).

De algum modo, antes da ocorrência desse surto provocado por *C. gattii*, o patógeno era geralmente conhecido como causador de uma infecção criptocócica rara em humanos saudáveis e animais. Estes eram habitantes de regiões tropicais e subtropicais (América do Sul e Oceania) (Datta *et al.*, 2009; Kidd *et al.*, 2004; Springer & Chaturvedi, 2010). Contudo, ao longo da última década, centenas de pessoas aparentemente saudáveis e animais que vivem na área afetada pelo surto de Vancouver, foram infectadas pela linhagem genotípica AFLP6/VGII de *C. gattii* (Carriconde *et al.*, 2011). Simultaneamente, foi detectado *C. gattii* AFLP6/VGII relacionado à doença em pássaros *Captive psittacine* em São Paulo (Raso *et al.*, 2004), entre crianças imunocompetentes no norte do Brasil (Santos *et al.*, 2008; Trilles *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009) e entre ovelhas na Austrália Ocidental (McGill *et al.*, 2009; Carriconde *et al.*, 2011). Todas essas epidemias e casos foram causados pelo *C. gattii* genótipo AFLP6/VGII. Globalmente, a imunossupressão em decorrência do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o fator de risco mais evidente para o desenvolvimento de infecções sistêmicas fúngicas (Chong *et al.*, 2012). A meningite criptocócica é a quarta causa de morte relacionada à AIDS e a maioria dos casos dessa enfermidade estão associados ao HIV (Dehdashti *et al.*, 2013). Em termos globais, estima-se que ocorram um milhão de casos de meningite criptocócica por ano, com mais de 60% de mortalidade em três meses de infecção (Park *et al.*, 2009). Foi relatado que 80% desses casos ocorrem na região do continente africano ao sul do Deserto do Saara, denominada de subsaariana (Park *et al.*, 2009). Adicionalmente, a incidência de meningite criptocócica não associada ao HIV causada por linhagens hipervirulentas de *C. gattii* e *C. neoformans* está aumentando na América do norte ocidental e no extremo oriente da Ásia, respectivamente (Dehdashti *et al.*, 2013). Em consequência disso, ficou constatado que *C. neoformans* é a causa mais comum de meningoencefalite em indivíduos imunocomprometidos com uma estimativa de 1 milhão de casos da doença resultando em aproximadamente 625.000 mortes ao ano no mundo (Park *et al.*, 2009; Dehdashti *et al.*, 2013; Cadieux *et al.*, 2013).

Esses fatos relacionados contribuíram para que infecções (antes incomuns) começassem a representar ameaça à saúde pública (Byrnes *et al.*, 2011). Dessa forma, a espécie *Cryptococcus gattii* tornou-se um importante organismo modelo para estudos sobre fungos, virulência e resposta ao hospedeiro (Chong *et al.*, 2012). Embora, *C. neoformans* seja um dos principais patógenos infecciosos relacionados à AIDS, *C. gattii* também é capaz de infectar indivíduos saudáveis e indivíduos com HIV/AIDS (Byrnes *et al.*, 2011; Chong *et al.*, 2012).

A investigação de proteínas sintetizadas por *C. gattii*, genótipo VGIIa, tem como principal interesse ampliar a compreensão a respeito dos principais mecanismos utilizados por esse micro-organismo para sobreviver em uma situação de privação de nutriente (Kidd *et al.*, 2004; Ngamskulrungraj *et al.*, 2011). Tendo em vista que, o patógeno dispõe dos nutrientes do microambiente em que está inserido e os emprega em diversas rotas metabólicas a fim obter a energia necessária para seu desenvolvimento, no hospedeiro. Existem muitos nutrientes essenciais para a geração de energia, destacando-se o oxigênio molecular (Goldberg *et al.*, 1988; Ingavale *et al.*, 2008). Este foi um importante elemento de força motriz na evolução da célula simples e de organismos eucarióticos complexos, exercendo papel essencial como aceptor de elétrons e gerando energia química através da respiração mitocondrial. Esse elemento é primordial para a biossíntese de esteróis, ácidos graxos mono e poli-insaturados, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺- do inglês “Nicotinamide adenine dinucleotide”) e outras vias metabólicas e de biossíntese. Sendo assim, o volume de oxigênio disponível para as células eucarióticas é um fator que determina o metabolismo celular global.

No contexto da patogênese microbiana é aceito que a hipóxia ocorra, geralmente, nos sítios de infecção, ocasionando um ambiente de estresse para o hospedeiro e para as células do patógeno (Grahl *et al.*, 2012). Esse microambiente dinâmico encontrado pelo fungo, associado aos seus mecanismos moleculares de sobrevivência em hipóxia precisam ser investigados a fim de entender as modificações que ocorrem em nível transcricional, pós-transcricional e proteômico (Grahl *et al.*, 2012). O interesse em determinar o perfil proteômico de *C. gattii* é norteado pelo fato de que algumas proteínas servem de alvo para drogas antifúngicas, sem o devido entendimento de como a regulação gênica contribui para a virulência e para a resposta a essas drogas. Dessa forma, esse tema tornou-se um importante tópico de pesquisa em fungos patogênicos com potencial significado clínico (Chung *et al.*, 2012).

Com base no grau de importância que o patógeno primário *C. gattii* representa para a saúde pública global, o presente trabalho visa esclarecer o impacto da hipóxia sobre a fisiologia e virulência de *C. gattii* linhagem R265. Em virtude da inexistência de relatos na literatura quanto à influência da hipóxia sobre os aspectos anteriormente citados em *C. gattii*, esta pesquisa priorizou a análise proteômica como ferramenta para se atingir tal entendimento. Sendo assim, foi realizado um estudo qualitativo e quantitativo das proteínas globais que o micro-organismo sintetiza em diferentes tempos de hipóxia, *in vitro*. O propósito principal desse trabalho é entender os mecanismos regulatórios, em nível de expressão protéica, que o fungo patogênico *C. gattii* utiliza para adapta-se as condições limitantes de oxigênio *in vitro*.

1.1 Aspectos Gerais

O gênero *Cryptococcus* foi reconhecido há mais de 125 anos (Springer & Chaturvedi, 2010), tendo sido obtido pela primeira vez na análise do suco de fruta pelo cientista italiano Francesco Sanfelice em 1894. Mais tarde, *C. neoformans* foi encontrado no leite de humanos, em excretas de pombos e nos poleiros de galinheiros (Knoke & Schwesinger, 1994; Springer & Chaturvedi, 2010). O primeiro relato de criptococose em humanos foi trazido à tona por dois cientistas alemães a saber: Busse e Buschke em 1895. Estes observaram a ocorrência do problema em uma mulher de 31 anos, que teve uma lesão na tíbia (Heitman *et al.*, 2011). A partir de 1947-1968, foram detectados casos no Continente Africano. Ademais, presume-se que tantos casos ocorreram e aumentaram devido ao desencadeamento da “AIDS” na bacia do rio Congo, durante esse período (Molez, 1998; Huffnagle, 1999; Springer & Chaturvedi, 2010).

1.2 *Cryptococcus gattii*

A levedura *Cryptococcus gattii* é considerada um patógeno primário por infectar principalmente indivíduos imunocompetentes (Krockenberger *et al.*, 2010; Sabiiti & May, 2012). *C. gattii* pode ser encontrado na natureza na forma de esporo ou de levedura e envolto por uma cápsula polissacarídica. Foi inicialmente denominado de *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* em 1896. Em 1970, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* foi proposto formalmente como uma nova entidade taxonômica a partir de um caso clínico em que apareciam células de forma arredondadas regulares (forma R) e células em forma de haste (forma B) na cultura celular. Essa descoberta que ocorreu em paralelo com a caracterização de antígenos capsulares em *C. neoformans*, revelou quatro sorotipos distintos: A, B, C, D sendo os sorotipos B e C pertencentes a *C. gattii* (Vishnu & Chaturvedi, 2011). Estima-se que essa espécie divergiu de *C. neoformans* há aproximadamente 37,5 milhões de anos (Byrnes *et al.*, 2011). As mudanças taxonômicas se devem também a estudos de variabilidade genética que detectaram acentuadas diferenças entre *C. neoformans* var. *gattii* e *C. neoformans* var. *neoformans*. A análise genética molecular das progênies geradas pelo cruzamento entre ambas não evidenciou recombinação gênica entre as duas variedades (kwon-chung *et al.*, 2002). Esses resultados apontaram para duas variedades bem distintas. Com isso, a variedade *C. gattii* passou a ser espécie (kwon-chung *et al.*, 2002). *C. neoformans* está classificado em duas variedades *C. neoformans* var. *grubbi* (sorotipo A) (Franzot *et al.*, 1999) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Sorrell *et al.*, 1996) e três sorotipos (A, D, e o híbrido AD) de acordo com características antigênicas da cápsula polissacarídica, apresentando diferentes fatores de virulência.

Enquanto *C. neoformans* está presente em excretas de pombos, aves e no solo, atingindo principalmente indivíduos imunocomprometidos (Huffnagle, 1999), o *C. gattii* está presente em árvores, mais especificamente em *Eucalyptus camaldulensis* nas regiões tropicais, nas subtropicais e nas de clima temperado, atingindo principalmente indivíduos imunocompetentes (Byrnes *et al.*, 2011; Ellis & Pfeiffer, 1990; Chowdhary *et al.*, 2012). Contudo há relatos de pacientes portadores de HIV com meningite decorrente de infecção por *C. gattii* (Tamfum *et al.*, 1992; Bodasing *et al.*, 2004). Cabe destacar que *C.*

neoformans está mundialmente distribuído (Huffnagle, 1999). Além disso, as linhagens pertencentes ao sorotipo A são responsáveis por 95% das infecções (Hull & Heitman, 2002). Em suma, as espécies *Cryptococcus neoformans*/ *C. gattii* possuem diferenças fenotípicas, genotípicas, epidemiológicas, reprodutivas, bioquímicas e clínicas. Todavia, essas espécies possuem alguns fatores de virulência em comum como a cápsula polissacarídica, a produção de melanina e o crescimento a 37°C (ver seções 1.2.3.1 a 1.2.3.4) (Sorrell, 2001; Vishnu & Sudha Chaturvedi, 2011; Katsu *et al.*, 2004; Kwon-Chung & Varma, 2006). Historicamente, *C. gattii* era apontado como sendo endêmico em regiões de clima tropical e subtropical (Sorrell, 2001), contudo esse conceito modificou-se nos anos 90, devido à epidemia de criptococose na Ilha de Vancouver (Canadá). Estima-se que a incidência de infecção por *C. gattii* entre 1999 e 2003, tenha atingido entre 8,5 a 37 casos por milhão de residentes ao ano (Marr, 2012).

Foi realizado o sequenciamento do genoma das linhagens WM276 representante do genótipo molecular predominante (VGI) e da linhagem clínica R265 do principal genótipo (VGIIa) de *C. gattii*, causador da doença na América do Norte. Para esse advento compararam o genoma de *C. gattii* entre as diferentes linhagens com o genoma das linhagens representativas de *Cryptococcus neoformans*, revelando que os genomas de *C. gattii* VGI e VGIIa são colineares para a maioria dos cromossomos (D'Souza *et al.*, 2011).

1.2.1 A Criptococose e *Cryptococcus gattii*

A criptococose resultante da infecção causada pelo patógeno primário *C. gattii* (sorotipo VGI) é endêmica na Austrália, mas a espécie só começou a ser expressiva no meio científico e médico em 1999 quando foi noticiado um surto de criptococose na Ilha Vancouver, no Canadá. Desde então, *C. gattii* (sorotipo VGII) tem atraído atenção por ser considerado um problema de saúde pública (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012). Em decorrência disso, foram feitas investigações acerca do agente causal dessa epidemia, então foi detectada a prevalência de dois sub-genótipos de *C. gattii* R265 VGII: VGIIa e VGIIb (Kidd *et al.*, 2004). O genótipo VGIIa foi caracterizado como hipervirulento e VGIIb como hipovirulento.

O contágio por *C. gattii* ocorre por inalação de esporos ou partículas infecciosas (células leveduriformes) presentes no ambiente (Lin & Heitman, 2006). Uma vez que o micro-organismo esteja dentro das vias aéreas superiores, podem acontecer os seguintes fatores: podem ser depositados nos pulmões e serem ou não removidos do local pela ação dos macrófagos, podem permanecer em estado de latência sem causar doença ou podem desencadear uma infecção pulmonar e disseminar-se ou não para outras partes do corpo (Sabiiti & May, 2012). A disseminação do fungo através do organismo hospedeiro depende da modulação do sistema imune, da porta de entrada pela qual o micro-organismo infectou o hospedeiro e da linhagem que o está acometendo. Após essa etapa a infecção sistêmica pode ou não ocorrer. Os órgãos e sistemas afetados são: sistema nervoso central, pele, olhos, coração, ossos, e trato urinário (Lin & Heitman, 2006; Chayakulkeeree & Perfect, 2006). O ciclo de infecção de *C. neoformans* e *C. gattii* está ilustrado na Figura 1.

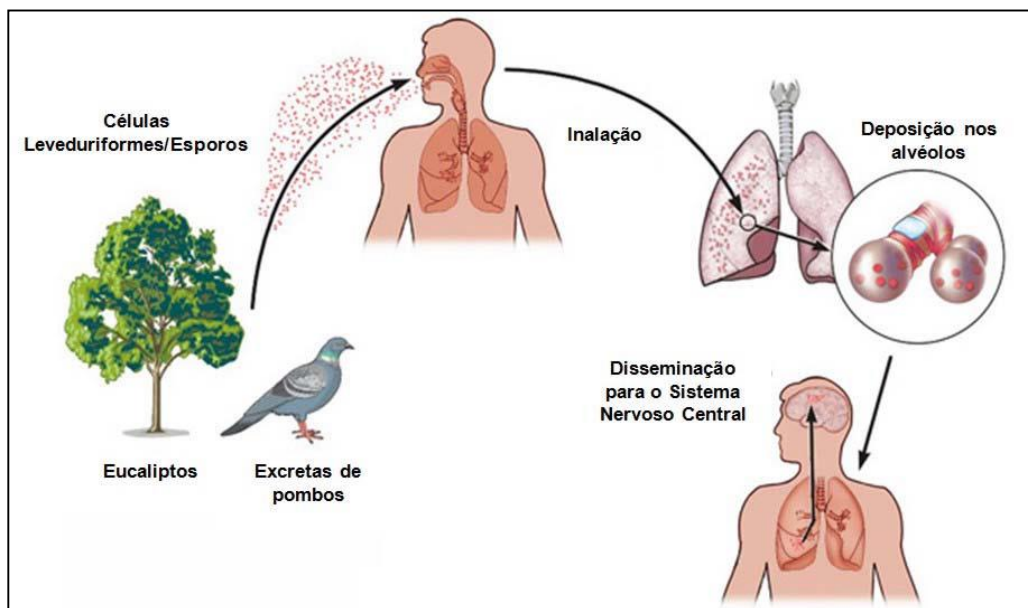


Figura 1 | Ciclo de infecção de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* e *C. gattii* estão principalmente associados à excreta de pombos e a eucaliptos, respectivamente. A infecção em humanos ocorre quando propágulos infecciosos (células leveduriformes ou esporos) do fungo são inalados para os pulmões e depositam-se nos alvéolos pulmonares disseminando-se ou não para o Sistema Nervoso Central. Figura adaptada de Hull & Heitman, 2002

Os estudos epidemiológicos em humanos sugerem que pacientes infectados por *C. gattii* apresentam principalmente doença pulmonar, apesar de algumas vezes causar meningite, enquanto os infectados por *C. neoformans* manifestam doença neurológica (Heitman *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2000; Galanis *et al.*, 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2000). Com base nisso, outros estudos compararam a patogênese causada pelas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* em modelo de infecção por via inalatória em camundongo e concluíram que *C. neoformans* cresce mais rápido no cérebro levando à morte por meningoencefalite enquanto o *C. gattii* cresce mais rápido nos pulmões levando à morte sem produção de meningoencefalite fulminante embora tenha sido encontrado em órgãos extrapulmonares e no cérebro (Ngamskulrunroj *et al.*, 2012). Entretanto, quando a infecção for via intravenosa, *C. gattii* produz meningoencefalite severa demonstrando que essa espécie é capaz de atravessar a barreira-hematoencefálica com eficiência (Ngamskulrunroj *et al.*, 2012).

Com base em outro estudo comparativo da resposta do hospedeiro para infecção com *C. neoformans* VNI (H99) e com *C. gattii* VGII (R265), ainda em modelo murino (Cheng *et al.*, 2009) evidenciou-se que a linhagem R265 suprime a resposta imune do hospedeiro mais eficientemente do que a linhagem H99. Isto ocorre porque esta última induz a uma resposta inflamatória menos protetora do que a outra. De forma que *C. gattii* não atrai a migração dos neutrófilos para os sítios de infecção e não induz resposta de citocinas protetoras, como exemplo tem-se o fator de necrose tumoral (TNF). Esse resultado sugere que a capacidade de burlar o sistema imune seja um forte motivo pelo qual *C. gattii* tenha muito mais êxito em infectar pacientes imunocompetentes em relação à *C. neoformans* (Ngamskulrunroj *et al.*, 2012). Outrossim, foi observado que o desenvolvimento de *C. gattii* no sangue ou soro de camundongo é mais lento do que o de *C. neoformans* (Ngamskulrunroj *et al.*, 2012). Esse fato deu credibilidade à assertiva de que existem fatores no sangue do camundongo que suprimem a linhagem R265 mas não suprimem a linhagem H99. Por sua vez, esses fatores podem ser posteriormente induzidos durante a infecção (Ngamskulrunroj *et al.*, 2012). Fato que ofereceria proteção para R265, porém não teriam proteção para H99 no momento de exposição das linhagens patogênicas aos componentes do sistema imune presentes na corrente sanguínea.

1.2.2 A ecologia e a epidemiologia

Nos anos que precederam a epidemia de Vancouver (Canadá), divulgava-se que *C. gattii* tinha prevalência somente em regiões de clima tropical e subtropical (Kwon-Chung & Bennett, 1984; Ellis & Pfeiffer, 1990; Padhye *et al.*, 1993). Porém, com o surto de criptococose em 1993 na Ilha de Vancouver, região de clima temperado, surgiu uma nova concepção quanto à distribuição global de *C. gattii*. A partir desse ponto, foi considerada sua prevalência tanto em regiões de clima tropical quanto de clima temperado (Figura 2). Além disso, foi realizada uma análise quanto à presença de *C. gattii* em árvores e solo mostrando diferentes padrões de colonização o que reflete uma população dinâmica uma vez que o patógeno é introduzido a novos sítios (Kidd *et al.*, 2004; Kidd *et al.*, 2007; Mak *et al.*, 2010). De alguma forma, há relatos do isolamento, em menor escala, de *C. gattii* em excretas de aves (Abbeg *et al.*, 2006; Springer & Chatuverdi, 2010). *C. gattii* já tinha sido isolado em 54 espécies de árvores nativas de clima temperado, tropical e subtropical. Na atualidade, foi isolado da espécie *Grevillea robusta*, na Argentina, mostrando que o *hábitat* ecológico de *C. gattii* não é restrito a só um único tipo de árvore (Cattana *et al.*, 2013). *C. gattii* compreende os sorotipos B e C contendo os tipos moleculares VGI, VGII, VGIII e VGIV, determinado por PCR combinada com o uso de “primers” aleatórios e por polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP). Ainda, foi descrito ocorrência natural de híbridos BD entre as linhagens de *C. neoformans* e de *C. gattii*, após isso foi isolado um novo híbrido aneuplóide de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A, AFLP1/VNI) e *C. gattii* (sorotipo B, AFLP4/VGI) (Bovers *et al.*, 2006; Bovers *et al.*, 2008). Recentemente, foi confirmado por experimentos que utilizam métodos de tipagem molecular como o RFLP (análise dos fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição) do gene urotidina monofosfato fosforilase (*URA5*) e do gene da fosfolipase (*PLB1*) que o híbrido AB pertence ao tipo molecular VGII (Meyer *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2009; Aminnejad *et al.*, 2012).

Um outro aspecto é que a distribuição geográfica e o grau de virulência diverge entre esses genótipos. Como por exemplo: o genótipo VGI é endêmico na Austrália e foi isolado em diversas regiões do meio ambiente (Figura 2) (Chen *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2003) e o genótipo VGII foi responsável por aproximadamente 95% das infecções criptococcócicas no Canadá e Estados Unidos, além de também ter sido isolado no Brasil (Chen *et al.*, 1999; Kidd *et al.*, 2004; MacDougall *et al.*, 2007; Byrnes *et al.*, 2010). Ademais, os genótipos VGIII foram isolados em regiões Iberoamericanas e na Índia, além disso o genótipo VGIV foi isolado na África do Sul e nos Estados Unidos, sendo que estes são menos frequentes que os citados anteriormente (Chen *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2003).

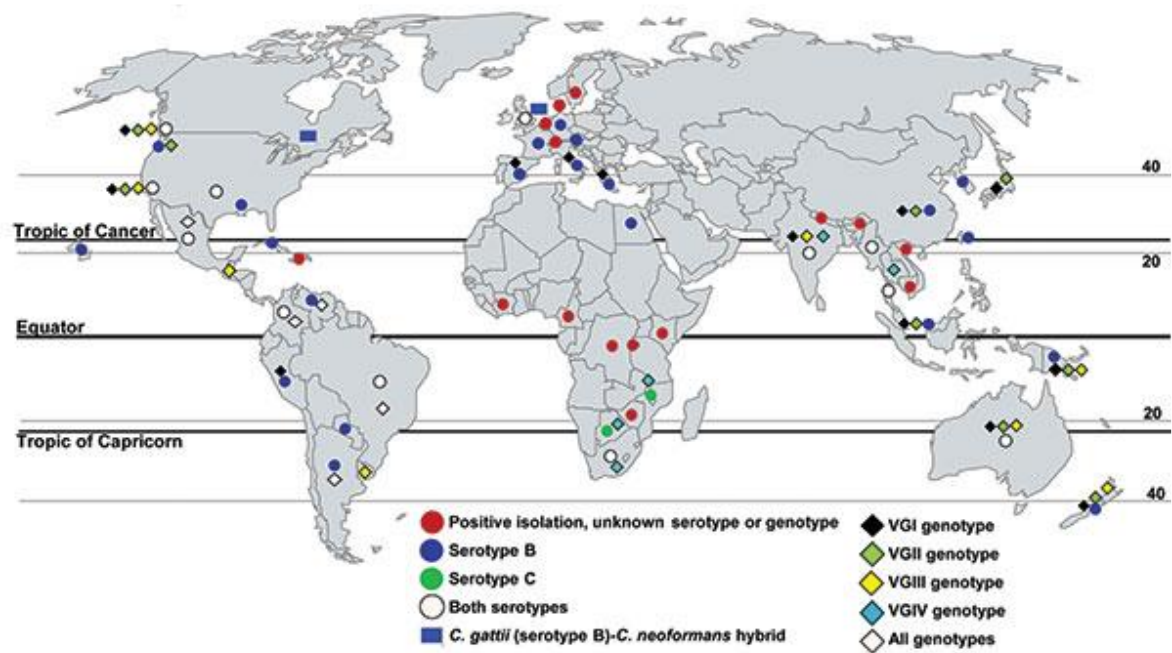


Figura 2| Isolados de *C.gattii* no mundo. Amostras de *C. gattii* isoladas a partir de amostras clínicas humanas, veterinárias e ambientais. Os círculos indicam o sorotipo, os losangos indicam o genótipo e os retângulos indicam híbridos entre *C. gattii* e *C. neoformans*. *C. gattii* é mais amplamente distribuído do que documentado (Springer & Chaturved, 2010).

1.2.3 Os fatores de virulência

O fator de virulência é a capacidade do micro-organismo em replicar-se e disseminar-se dentro do hospedeiro ludibriando as defesas deste. Nas espécies *Cryptococcus neoformans/C.gattii* os principais fatores de virulência são a cápsula polissacarídica, a produção de melanina, o crescimento a 37°C e a utilização de enzimas.

1.2.3.1 A cápsula polissacarídica

A cápsula de *Cryptococcus neoformans/C.gattii* é uma das cápsulas microbianas mais bem estudadas além de ser estruturalmente bem caracterizada (Figura 3). Aquela é produzida na superfície celular em resposta a inúmeros estímulos do meio em que o fungo se encontra. Assim, a cápsula promove a sobrevivência desse patógeno dentro do hospedeiro (McFadden *et al.*, 2007) protegendo-o da desidratação do meio e/ou de predadores naturais como nematódeos ou amebas (Cordero *et al.*, 2013). O invólucro capsular aumenta de tamanho dentro do hospedeiro durante a infecção (cerca de 8 vezes o volume celular), possuindo forte propriedade antifagocítica (Cordero *et al.*, 2013). Dentro do hospedeiro, a cápsula tem muitas funções protetoras tais como: reduzir a resposta imune pelo fato de regular negativamente as citocinas inflamatórias, depletar os componentes do sistema complemento e inibir a apresentação de antígeno pelos monócitos (O'Meara & Alspaugh, 2012). Uma vez dentro dos macrófagos, a cápsula o protege contra as espécies reativas do oxigênio (O'Meara & Alspaugh, 2012). *In vitro*, o invólucro pode ser induzido por altas concentrações de dióxido de carbono (CO₂) (Granger *et al.*, 1985; Bahn *et al.*, 2005), por limitação de ferro (Vartivarian *et al.*, 1993; Lian *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006) e por soro (Zaragoza *et al.*, 2003). A cápsula é composta por dois polissacarídeos, a glucuronoxilomana (GXM) com um maior percentual de massa (90-95%) e a galactoxilomana (GalXM) com menor massa (5-8%) (De Jesus *et al.*, 2010). A cápsula ainda contém em sua composição manoproteínas (MP) com percentual de massa <1%. O

sorotipo do *Cryptococcus* está relacionado à estrutura química da GXM (Bacon *et al.*, 1996). A estrutura capsular é variável de acordo com a linhagem e com o meio em que se encontra, variando também com o curso da infecção. As linhagens de *C. neoformans* são classificadas em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) de acordo com a reatividade de anticorpos específicos contra os polissacarídeos capsulares.

GXM. Estruturalmente a GXM consiste em uma cadeia linear α -(1,3) com resíduos de ácido glicurônico β -(1,2) ligados a resíduos manosil que podem ser 6-O-acetilados e substituídos com unidades de xilosil em ligações β -(1,2)- ou β -(1,4) dependendo do sorotipo (Zaragoza *et al.*, 2009). A GXM inibe a fagocitose da espécie *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* quando opsoninas estão ausentes e são secretadas ou liberadas pelo fungo no tecido circunjacente em grande quantidade. A GXM inibe a resposta inflamatória coibindo a maturação dos macrófagos e a migração dos neutrófilos para os sítios de infecção. Além disso, aumenta a produção de interleucina 10 e regula negativamente a produção do fator de necrose tumoral- α e de interleucina 1 β (McFadden., 2007).

GalXM. É formada por uma cadeia principal de galactano α -(1-6), contendo 4 ramificações curtas de oligossacarídeos. As ramificações são 3-O-ligadas à cadeia principal e consistindo em um trissacarídeo α -Man-(1-3)- α -Man-(1-4)- β -galactosidase com quantidades variáveis de grupos laterais de xilose β -(1-2) ou β -(1-3), além de ácido glicurônico na cadeia lateral. A GalXM causa um profundo efeito deletério no sistema imune porque induz apoptose das células T de memória e dos macrófagos. A GalXM induz a produção de TNF- α , de NO e a expressão de iNOS, além de mediar a apoptose via Fas/FasL em macrófagos. A GalXM também influencia a produção de citocinas e causa apoptose dependente de caspase-3 em células B. O efeito da indução da apoptose das células T é semelhante ao efeito do metotrexato (medicamento padrão ouro para tratamento de artrite reumatóide), por isto estudos consideram a possibilidade de GalXM ser utilizada como nova opção terapêutica para o tratamento de pacientes com artrite reumatóide (Pericolini *et al.*, 2010). Com base nessas evidências, a GalXM é um bom alvo para desenvolvimento de anticorpo e vacinas (Chow *et al.*, 2011). Em camundongos imunizados com GalXM, observou-se um estado de paralisia imunológica caracterizado pelo desaparecimento de células produtoras de anticorpos no baço desses animais (De Jesus *et al.*, 2009).

As Manoproteínas. As MP contém manosilação-O em regiões ricas em serina/treonina a qual aumenta a sua imunogenicidade. Isto ocorre para facilitar seu

reconhecimento pelos receptores de manose nas células dendríticas, resultando em uma eficiente captação, processamento e apresentação do antígeno às células T. Os antígenos das MP induzem respostas pró-inflamatórias, pois ligam-se aos receptores de manose e promovem a liberação de citocinas contra *C. neoformans*. Também, estão relacionados com hipersensibilidade do tipo IV ou tardio. As MP regulam a expressão das citocinas IL-12, IL-6, IL-10, IFN γ , IL-8 e TNF α as quais estão envolvidas na resposta da infecção por *Cryptococcus sp.* Além disso, as MP induzem uma proteção mediada por células da resposta imune contra o *C. neoformans*.

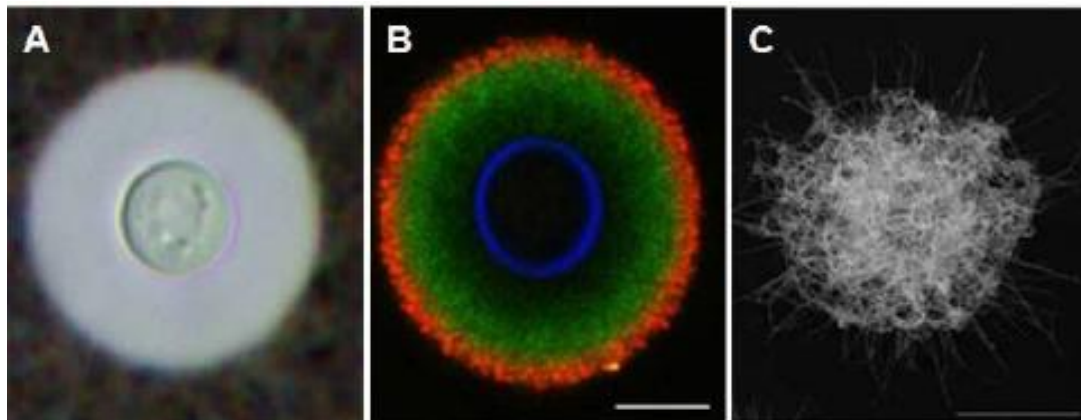


Figura 3| Cápsula polissacarídica de *C. neoformans*. (A) Microscopia óptica de uma célula de *C. neoformans* em presença de tinta nanquin. (B) Microscopia de fluorescência de uma célula de *C. neoformans* marcada com anticorpos específicos para a cápsula (verde e vermelho). A parede celular está evidenciada em azul, por marcação com Calcofluor White. (C) Microscopia eletrônica de varredura de célula de *C. neoformans*, evidenciando as fibras que compõem a cápsula polissacarídica (Zaragoza *et al.*, 2009).

1.2.3.2 A Melanina

A melanina faz parte de uma família de pigmentos naturais hidrofóbicos e negativamente carregados (Garcia-Rivera *et al.*, 2005). Esta é formada pela polimerização oxidativa de *componentes* fenólicos ou indólicos (Rosas *et al.*, 2000). A melanina (Figura 4) tem inúmeras funções biológicas na virulência do microrganismo como proteção contra a luz ultravioleta, contra agentes oxidantes, contra radiação ionizante e resistência às drogas. Estão caracterizadas em dois grupos, dependendo da sua composição química: eumelanina (marrom a preto) (Figura 4) e feomelanina (marrom-avermelhada) (Chatterjee *et al.*, 2012). *C. neoformans* produz melanina apenas na presença de substratos exógenos, trata-se do caso das catecolaminas: L-dopa, metil-L-dopa, epinefrina e norepinefrina (Chatterjee *et al.*, 2012). Por sua vez, a enzima lacase catalisa a síntese de melanina pela oxidação de L-DOPA, dando início a uma série de reações espontâneas que levam a polimerização do pigmento na parede celular da levedura (Eisenman *et al.*, 2007). A lacase é um alvo potencial para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para microrganismos produtores de melanina. Visto que muitos desses utilizam a melanina para manter a estabilidade da parede celular, proteger-se da radiação ultravioleta, do calor e do frio, resistir a metais pesados e a predadores como a ameba (Nosanchuk & Casadevall, 2003). Entre os fungos patogênicos, a síntese de melanina está associada à virulência, possivelmente pelo aumento da resistência desse patógeno dentro do hospedeiro (Nosanchuk & Casadevall, 2003). De acordo com estudos prévios, as células de *C. neoformans* melanizadas são mais resistentes à ação de defensinas antimicrobianas (Doering *et al.*, 1999). Além disso, são mais resistentes à fagocitose pelos macrófagos (Wang *et al.*, 1995). Os genes LAC1 e LAC2 são essenciais para a biossíntese de melanina (Zhu & Williamson, 2004; Missal *et al.*, 2005). Ademais, foram descritos outros genes também essenciais para a formação de melanina tais como VPH1, CLC1, CCC2 e ATX1, embora muitos deles ainda não tenham o mecanismo de ação totalmente elucidado (Erickson *et al.*, 2001; Zhu & Williamson, 2003; Walton *et al.*, 2005).

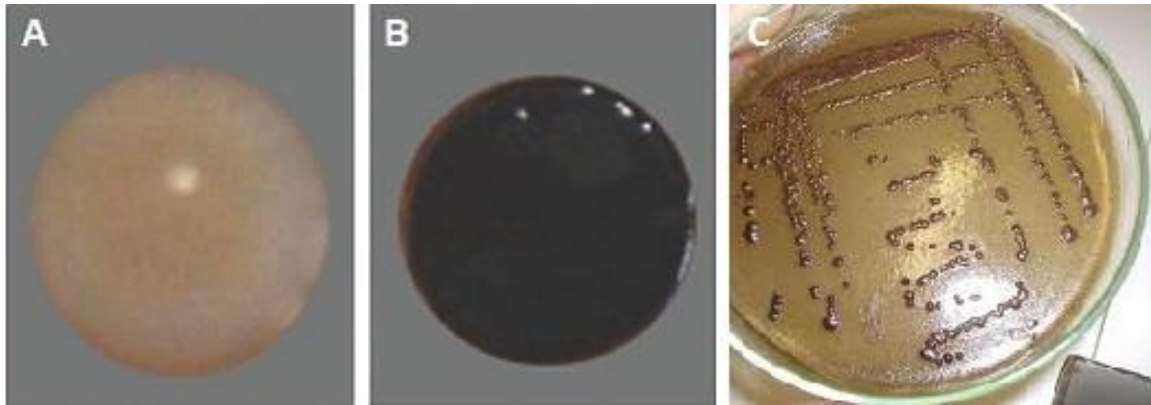


Figura 4| Síntese de melanina por *C. gattii*. (A) Colônia de células de *C. gattii* não melanizadas. (B) Colônia de células de *C. gattii* melanizadas, as duas linhagens são sorotipo B em meio L-Dopa. Adaptações de imagens disponíveis em MA & MAY, 2009 (A e B). (C) Colônias de *C. gattii*, sorotipo B em meio Níger.

1.2.3.3 O desenvolvimento a 37°C

As espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* são termotolerantes, ao contrário de muitos fungos basidiomicetos, por isto o desenvolvimento à temperatura de 37°C é uma característica fundamental para um fungo patogênico humano invasivo. *Cryptococcus neoformans* pode sobreviver no trato gastrointestinal de pombos (~ 40°C) (Swinne-Desgain, 1976). Existem genes que codificam para proteínas de diferentes categorias funcionais e já foram descritos como necessários para o desenvolvimento a 37°C. Quanto às vias de sinalização de *C. neoformans* existem genes que são necessários para desenvolvimento a 37°C, como *RASI*, *CNA1*, *CNBI*, *MPK1*, *CTS1* (Toffaletti *et al.*, 2003; Perfect, 2006). Genes do tipo *STE20* e *CPAI* são necessários para o desenvolvimento em temperaturas muito altas (39 – 40°C), embora sejam dispensáveis para o desenvolvimento a 37°C. Os genes regulados pela temperatura podem (*MGAI*) e/ou não (*AOX1/SOD1*) ser correlacionados com um fenótipo de sensibilidade à temperatura (Perfect, 2006). Foram

identificados genes regulados transcricionalmente pela temperatura que parecem fazer parte de um conjunto de genes relacionados à virulência, são eles: *AOX1*, *SOD1*, *SKN7* e *MGAI* (Perfect, 2006). As proteínas identificadas em *C. neoformans* como essencialmente importantes para o desenvolvimento em altas temperaturas incluem *Ras1*, *PAK*, *Ste 20*, *Cts1*, *Vph1*, *Tsa1* e *Mpk1* (Kraus *et al.*, 2004). A deleção dos genes que codificam essas proteínas resulta em atenuação ou em completa perda de virulência no modelo de criptococose em mamíferos (Kraus *et al.*, 2004). Estudos mostraram que *C. gatti* e *C. neoformans var. neoformans* (sorotipo D) são mais suscetíveis à morte por calor e mais sensíveis ao desenvolvimento em altas temperaturas (37 a 39°C) quando comparados ao *C. neoformans* (sorotipo A), embora ambos se desenvolvam à temperatura do hospedeiro (Perfect, 2005).

1.2.3.4 As enzimas

A captura de nutrientes do organismo hospedeiro pelo patógeno é um dos principais desafios na interação patógeno-hospedeiro, além de ser um dos aspectos fundamentais para que o processo desencadeie uma doença infecciosa. A degradação de macromoléculas do hospedeiro por enzimas microbianas específicas, como por exemplo as proteases, as lipases e as fosfolipases é uma das estratégias mais eficientes e diretas de extrair nutrientes do hospedeiro (Kwaik & Bumann, 2013). Logo, *C. neoformans*, secreta várias enzimas com atividades lipolíticas para facilitar sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Essas enzimas são as lipases e as fosfolipases. As fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas com a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicolipídeos (Ghannoum, 2000). Com base nessa definição, as fosfolipases podem contribuir para a penetração, injúria e lise na célula do hospedeiro (Tucker & Casadevall, 2002). Além disso, as fosfolipases e as proteases de *C. neoformans* podem danificar a membrana celular do macrófago do hospedeiro (Tucker & Casadevall, 2002). A capacidade de *C. neoformans* secretar fosfolipase foi descrita pela primeira vez por Vidotto e colaboradores (1996). Estes pesquisadores encontraram correlação entre a produção de fosfolipases e o tamanho da cápsula em linhagens isoladas de pacientes com “AIDS”. A fosfolipase extracelular

criptocócica exibe atividades de fosfolipase B (PLB), lisofosfolipase (LPL) e lisofosfolipase-transacilase (LPTA) (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). A fosfolipase também aumenta a adesão das células de *C. neoformans* no epitélio pulmonar (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). A forte correlação entre atividade de fosfolipase e virulência foi provada por Cox e colaboradores (2001). Além do mais, a fosfolipase tem papel no “turnover” da membrana celular de *C. neoformans*, na manutenção da integridade da parede celular e na sobrevivência do fungo, principalmente durante o estresse ao calor (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Quando *C. neoformans* possui a expressão da atividade de fosfolipase aumentada, conseqüentemente aumenta a virulência em modelo de infecção murina e, provavelmente, isso seja necessário para a infecção no sistema nervoso central (SNC). Essas informações sugerem que a atividade de fosfolipase extracelular secretada por *C. neoformans* contribua para a virulência desse fungo (Chen *et al.*, 1997). Em trabalho de Wright e colaboradores (2004) demonstraram a presença de duas fosfolipasas secretadas a PLB1 e a LPL1 em *Cryptococcus gattii*, sendo que esta última também é produzida por *C. neoformans* var. *grubii*. Foi proposto que PLB está envolvido no “turnover” e remodelamento dos fosfolipídeos de membrana.

Há uma outra enzima importante para a virulência de *C. neoformans*, trata-se da urease (Singh *et al.*, 2013). A urease é considerada junto com outras enzimas (proteínases, fosfolipasas e lacases) um importante fator de virulência (Torres-Rodríguez *et al.*, 2008). As ureases são metaloenzimas níquel-dependente para sua atividade catalítica (Singh *et al.*, 2013). Catalisam a hidrólise da uréia em amônia e CO₂. São produzidas por plantas, fungos e bactérias, mas não por animais (Stanisçuaski & Carlini, 2012). Foi demonstrado em trabalho de Shi e colaboradores (2010) que a transmigração de *C. neoformans* para o cérebro de camundongo é dependente de urease. Adicionalmente, a urease pode promover a endotoxicidade das células endoteliais levando a abertura das junções entre essas e enfraquecendo a integridade da barreira-hematoencefálica, este último é o mecanismo mais aceito. Embora a urease seja um fator crítico na transmigração de *C. neoformans* do sangue para o cérebro, sua expressão não está relacionada à sobrevivência nem ao desenvolvimento do patógeno nesse órgão (Olszewski *et al.*, 2004). Em fungos patogênicos, a urease pode ter a função de garantir a utilização da uréia dos tecidos do hospedeiro como um nutriente (Singh *et al.*, 2013). Uma vez que a uréia está presente em humanos em concentrações milimolares sendo capaz de atravessar membranas biológicas e ser distribuída uniformemente em todos os tecidos do corpo (tecido adipócito subcutâneo, sistema nervoso central, revestimento fluido epitelial, sangue) (Singh *et al.*, 2013). Um

estudo recente de Singh e colaboradores (2013) caracterizou genética e bioquimicamente as proteínas acessórias requeridas para a ativação do complexo protéico urease. As proteínas acessórias Ure 4, Ure 6 e Ure7 interagem com a proteína Ure1 e são essenciais para a atividade da urease (Singh *et al.*, 2013). Portanto, alguns estudos demonstraram que a atividade da urease é maior em *C. neoformans* do que em *C. gattii*, embora mais estudos se façam necessários para esclarecer o papel da urease em *C. gattii* (Torres-Rodríguez *et al.*, 2008).

1.3 O oxigênio

Há cerca de 2,5 bilhões de anos, os níveis de oxigênio na atmosfera eram muito baixos até a intercorrência da evolução de organismos fotossintéticos como as cianobactérias (Semenza, 2007). As concentrações de oxigênio aumentaram a níveis significativos por volta de 1,5 bilhões de anos, coincidindo com o surgimento dos primeiros eucariotos (Heckman *et al.*, 2001; Hedges *et al.*, 2004; Butler, 2013). O oxigênio é uma importante molécula que impulsionou a transição de vida anaeróbia para aeróbia dos organismos, contudo pode ser uma molécula tóxica dependendo da sua concentração no meio ambiente (Raymond & Segrè, 2006; Ingavale, S. *et al.*, 2008). Por esse motivo, os organismos possuem mecanismos sofisticados para responder às alterações nas concentrações de oxigênio (Butler, 2013). Ademais, a captação de oxigênio do meio ambiente é essencial para a produção de trifosfato de adenosina (ATP) na respiração celular (Chung *et al.*, 2012) e nas vias bioquímicas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos insaturados, tirosina, esteróis e ácido nicotínico (Raymond & Segrè, 2006; Chung *et al.*, 2012). Na maioria dos organismos eucarióticos, o oxigênio molecular é essencial para a fosforilação oxidativa e processos biossintéticos (Goldberg *et al.*, 1988; Ingavale *et al.*, 2008). Para sobreviver em baixas concentrações de oxigênio ou em hipóxia, os organismos desenvolveram mecanismos sensores de oxigênio que ativam um conjunto completo de respostas (Goldberg *et al.*, 1988; Ingavale *et al.*, 2008). No meio ambiente, o oxigênio pode variar de 0 a 21% (*habitat* anóxico a aeróbico) e nos mamíferos a concentração de oxigênio também é distinta em cada órgão ou sistema. Os níveis de oxigênio nos tecidos saudáveis humanos variam entre 2,5 a 9% (pO_2 20 a 70 mmHg), na maioria das células está

presente em torno de 6% (pO₂ 40mmHg), enquanto que em tumores ou feridas são menores ou iguais a 1% (10mmHg) (Nizet & Johnson, 2009; Grahl *et al.*, 2012). Nos pulmões humanos sadios, considerando o início da formação dos sítios de deposição fúngica, os níveis de oxigênio são aproximadamente de 14% (pO₂ 100 a 110mmHg) (Jain & Sznajder, 2005). Por conseguinte, a mudança de normóxia para hipóxia (0,5-5% oxigênio) ou anóxia (0% oxigênio) requer modificação no metabolismo energético da célula fúngica afetando, invariavelmente, as atividades anabólicas (Chung *et al.*, 2012; Grahl *et al.*, 2012).

As concentrações de oxigênio modificam-se na matéria orgânica rapidamente, de acordo com a atividade metabólica da microbiota e das taxas de oxigênio atmosférico (Grahl *et al.*, 2012). Além disso, o solo pode torna-se hipóxico após chuvas fortes ou em decorrência do aumento do CO₂, indicando que o fungo desenvolve-se em ambientes que demandam adaptação à hipóxia. *C. neoformans*/*C.gattii* vivem em seu *habitat* natural compreendido por matéria orgânica em decomposição, solo, água, ar, tronco de árvore e excreta de aves os quais são relativamente pobres em oxigênio (Grahl *et al.*, 2012). Ao infectar um organismo hospedeiro, o patógeno deve ajustar-se às novas condições impostas por este (Moranova *et al.*, 2013) com o intuito de garantir o sucesso da infecção (Chun *et al.*, 2007). Portanto, *C. neoformans* e *C.gattii* devem fazer a transição do meio ambiente para nichos mamíferos diferentes quanto às pressões de oxigênio. Uma vez infectando o mamífero, o patógeno pode localizar-se intracelularmente nas células fagocíticas ou em sítios extracelulares nos pulmões, no sangue e no sistema nervoso central (Kronstad *et al.*, 2012). Estudos recentes esclareceram os mecanismos de adaptação do fungo durante a transição de um tipo de ambiente para outro. A adaptação fúngica é delineada por sua maquinaria molecular através da expressão de funções antifagocíticas, remodelamento do metabolismo do carbono central, expressão do sistema de aquisição de nutrientes e resposta à hipóxia. Fatores de transcrição específicos regulam essas funções bem como a expressão de um ou mais dos principais fatores de virulência do *C. neoformans* (Kronstad *et al.*, 2012). Com relação aos parâmetros que podem afetar o desenvolvimento da infecção fúngica, pode-se citar a temperatura, o potencial de hidrogênio (pH), as fontes de carbono e nitrogênio, a disponibilidade de ferro e outros metais, tensão dos gases (dióxido de carbono e oxigênio) (Chung *et al.*, 2012). Por exemplo, durante a infecção o patógeno e a célula hospedeira interagem ocasionando hipóxia local extrema. Esta é consequência do decréscimo da perfusão sanguínea, a qual é secundária à injúria microvascular, trombose ou pressão intersticial aumentada juntamente com atividades metabólicas do patógeno e

células inflamatórias recrutadas para o local (Chun *et al.*, 2007; Nizet & Johnson, 2009; Grahl *et al.*, 2012).

Foi observado que a capacidade de *C. neoformans* adaptar-se a decrescentes níveis de oxigênio emergiu como outro fator de virulência. Tendo em vista que os níveis de oxigênio presentes nos tecidos mamíferos estão abaixo dos níveis atmosféricos e para que ocorra a evolução da infecção é necessário superar essa barreira (Moranova *et al.*, 2013). Os pulmões são o primeiro sítio de infecção criptocócica. Dependendo da imunidade do hospedeiro, *C. neoformans/C. gattii* pode disseminar-se para o sistema nervoso central causando meningoencefalite além de espalhar-se para outros órgãos (com menor frequência) (Hu *et al.*, 2008; Moranova *et al.*, 2013).

1.3.1 A hipóxia

Conceitualmente, denomina-se hipóxia os níveis de oxigênio entre 0,5% e 3% por volume de ar que perfunde um meio e/ou uma cultura de tecidos (Nizet & Johnson, 2009). Como *in vivo* é mais difícil de saber a concentração exata de oxigênio que a definirá, considera-se hipóxia sempre que a demanda de oxigênio exceder à oferta deste (Nizet & Johnson, 2009). Em contrapartida, a normóxia é a concentração de oxigênio atmosférico ao nível do mar para cultura de tecido ou oxigenação fisiológica em um tecido bem vascularizado ou perfundido (Nizet & Johnson, 2009). Por último, a anóxia é a ausência de oxigênio tanto para cultura de tecidos como para fisiologia humana. A anóxia pode ocorrer em tecidos que tenham áreas de infecção aguda ou danos severos (Nizet & Johnson, 2009). O oxigênio molecular tem função essencial como aceptor de elétrons na geração de energia química via respiração mitocondrial dos microrganismos eucarióticos e é crítico para a biossíntese de esteróis, ácidos graxos mono e polinsaturados, NAD, porfirina e outras vias metabólicas e biossintéticas (Raymond & Segre, 2006; Grahl *et al.*, 2012). Visto que, a disponibilidade de oxigênio para as células eucarióticas é um fator crítico na determinação do metabolismo celular como um todo (Grahl *et al.*, 2012). Assim, em ambientes com baixos níveis de aeração, como por exemplo uma infecção em mamíferos, o microrganismo parasitará o hospedeiro para captação de moléculas biológicas (Butler, 2013). Neste caso, o parasitismo metabólico será a premissa para o seu desenvolvimento.

Além da nutrição por parasitismo, a resposta dos micro-organismos eucarióticos, às baixas condições de oxigênio, é fortemente regulada em nível transcricional (Butler, 2013). O mecanismo exato de como o fungo percebe a ausência de oxigênio não está completamente esclarecido, todavia sabe-se que envolve resposta às baixas concentrações de heme ou de esterol e, possivelmente, a níveis de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio (Butler, 2013). A principal consequência da hipóxia, para algumas espécies fúngicas, é a mudança no metabolismo do carbono central (glicólise e respiração). A adaptação à hipóxia é uma importante característica de virulência em fungos patogênicos (Butler, 2013). Muitas espécies fúngicas já foram bem caracterizadas quanto à resposta transcricional durante os estágios de adaptação aos baixos níveis de oxigênio (Hughes *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2009; Barker *et al.*, 2012). Os genes são expressos de forma diferencial em resposta aos variados níveis de oxigênio e são divididos em dois grupos: genes aeróbicos, expressos em condição de normóxia, e genes hipóxicos, expressos em baixos níveis de oxigênio ou ausência completa desse (Poyton *et al.*, 2009).

1.3.2 A homeostase de Oxigênio

Na adaptação do fungo às oscilações da taxa de oxigênio no meio ambiente existem mecanismos regulatórios que controlam a homeostase de esterol em resposta à concentração de oxigênio do meio ambiente. A oscilação dos níveis de oxigênio tem impacto direto sobre a síntese de esterol devido a presença de múltiplas enzimas que requerem oxigênio nessa via (Espenshade & Hughes, 2007). Outro fator importante para a resposta de *C. neoformans* à hipóxia é a mitocôndria. Tendo em vista que mutantes sensíveis ao cloreto de cobalto e à hipóxia apresentam defeitos na função mitocondrial (Ingavale *et al.*, 2008) produzindo elevados níveis de espécies reativas. Suportando a hipótese de que as espécies reativas possam ser usadas como um mecanismo de detecção de oxigênio em muitos fungos (Butler, 2013).

Os perfis transcricionais obtidos por análises transcritômicas de *C. neoformans* aumentaram em resposta à hipóxia e foram similares àqueles descritos em *C. albicans* referente aos transcritos para genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de heme, metabolismo de ácidos graxos, biossíntese de ergosterol e de resposta ao estresse

(Grahl *et al.*, 2012). Em contraste à *C. albicans*, os genes de *C. neoformans* que codificam proteínas envolvidas na manutenção da parede celular e na biossíntese de cápsula tiveram expressão reduzida e os genes de *C. neoformans* que codificam proteínas envolvidas na respiração tiveram expressão aumentada (Grahl *et al.*, 2012). A resposta transcricional divergente desses dois patógenos pode estar associada aos diferentes nichos ecológicos (Grahl *et al.*, 2012). É importante determinar se esses mecanismos são conservados em *C. gattii*.

Com base no estudo do transcritoma e do proteoma de *A. fumigatus* em hipóxia, foi verificado o aumento dos transcritos que codificam proteínas envolvidas na manutenção da parede celular, no metabolismo de ferro e de esterol e na indução de γ -aminobutirato (GABA) (Barker *et al.*, 2012). Desse modo, os transcritos que tiveram indução atenuada estavam relacionados à biossíntese de ribossomos, terpenóides, ciclo do ácido tricarboxílico, metabolismo de aminoácidos e degradação de RNA. Embora o transcritoma e proteoma tenham sido executados nas mesmas condições de cultivo, nem sempre a modificação dos níveis protéicos refletiu o fator transcricional (Barker *et al.*, 2012).

Em análise do transcritoma de *Aspergillus nidulans*, em situação de hipóxia, observou-se uma forte indução dos transcritos que codificam enzimas para o ciclo do ácido tricarboxílico, porém no estudo proteômico, proteínas da respiração e do ciclo mencionado não foram alterados (Grahl *et al.*, 2012). O êxito das infecções fúngicas invasivas dependem tanto do fungo como dos fatores de defesa liberados pelo hospedeiro que são dinâmicos em resposta à essa interação (Grahl *et al.*, 2012).

1.3.3 Os mecanismos de adaptação à hipóxia

A manutenção da homeostase de oxigênio é essencial para a sobrevivência dos organismos de uma forma geral. Estes percebem as concentrações de oxigênio e respondem aos seus diferentes níveis com mudanças em seu fenótipo. Foi possível obter um melhor entendimento relativo a adaptação à hipóxia com estudos sobre o ciclo celular. Tipicamente, os brotos de *C. neoformans* surgem logo após o início da síntese de DNA na fase exponencial inicial (Takeo *et al.*, 2006). Entretanto, em condição de hipóxia o aparecimento dos brotos foram atrasados para a fase G2 durante a transição para a fase

estacionária, sendo que nessa fase dificilmente os brotos surgem, embora metade das células completem a síntese de DNA (Takeo *et al.*, 2006). O tempo de brotamento foi atrasado no ciclo celular com progressão da fase de crescimento da cultura (Takeo *et al.*, 2006). Takeo e colaboradores (2006) observaram que as células nas fases G1 e G2 estão na fase estacionária e que *C. neoformans* é capaz de sofrer replicação do DNA sem iniciar o brotamento, fator que os diferencia de *S. cerevisiae*. Além disso, a população de células sem brotamento em G2 resultaram de um atraso gradual no início dessa fase S para a G2, ocorrendo retenção na fase G2 sem broto, em algumas linhagens. Ohkusu e colaboradores (2001) identificaram que a causa do atraso no brotamento se devia ao “déficit” de oxigênio sob aeração limitada, resultando, eventualmente em células sem broto presas em G2 (Ohkusu *et al.*, 2001). Esta informação somada à baixa taxa de sobrevivência em condições limitantes de oxigênio indicam que a estratégia central de *C. neoformans* é ajustar sua taxa de proliferação segundo a disponibilidade de oxigênio ao contrário de esforçar-se para sobreviver em anóxia (Moranova *et al.*, 2009). Corroborando com esses dados, estudos de transcriptoma e proteoma revelaram uma redução no metabolismo celular de *A. fumigatus* como sendo um reflexo da regulação do tempo de duração do ciclo celular. Similarmente aos patógenos *C. albicans* e *C. neoformans*, a resposta à hipóxia é caracterizada por mudanças positivas e negativas a níveis de transcrito e proteínas (Barker *et al.*, 2012).

A biossíntese de esterol é um processo dependente de oxigênio. Em várias espécies fúngicas, a concentração de esterol reduzida está relacionada a baixa concentração de oxigênio (Vik & Rine, 2001; Hughes *et al.*, 2005; Davies & Rine, 2006; Chang *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2007). O ergosterol (tipo de esterol) é o equivalente fúngico do colesterol em humanos, sendo um componente da membrana plasmática dos fungos. Por isto, a inibição da biossíntese do ergosterol tem sido o principal alvo de desenvolvimento de drogas antifúngicas (Barker *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2012). As moléculas de esteróis, ácidos graxos e heme requerem oxigênio para a sua biossíntese, exercendo, com isto, a função de sensores indiretos dos níveis de oxigênio no meio em que o fungo se encontra. A alteração dos níveis de oxigênio reflete diretamente na alteração do metabolismo fúngico para biossíntese dessas moléculas (Chung *et al.*, 2012).

Existem proteínas cuja função é regular a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de colesterol (ergosterol) em resposta às mudanças nos níveis de oxigênio celular. Estas são conservadas em muitos eucariotos e denominadas proteína de ligação ao elemento regulatório do esterol (SREBPs) (Brown & Goldstein, 1999; Osborne & Espenshade, 2009; Cheung & Espenshade, 2013). A SREBP representa um fator-chave na

hipóxia fúngica e na sua adaptação a baixos níveis de ferro (Bien & Espenshade, 2010). O ortólogo de SREBP de mamíferos para *C. neoformans* denomina-se Sre1. O fator de transcrição Sre1 é importante para adaptação, crescimento em tecido hospedeiro que tenha limitação de nutrientes (Bien *et al.*, 2009) e para a virulência (Chang *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2012). A Sre1 estimula a produção de esterol em resposta a sua depleção, quando, por exemplo, a síntese de ergosterol (dependente de oxigênio) é limitada pela hipóxia (Bien *et al.*, 2009). Em baixos níveis de esterol e oxigênio, Stp1 (ortólogo da protease sitio-2, em mamíferos) cliva a região N-terminal de Sre1 (Bien *et al.*, 2009). O fator de transcrição N-terminal liga-se a Sre1 no núcleo e ativa a expressão do metabolismo de esterol e de outros genes. A Sre1 é responsável por regular os genes envolvidos na resposta transcricional à hipóxia e pela ativação da proteína Scp1 que é processada pela Stp1 em resposta a depleção de esterol em condição de hipóxia (Todd *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2007; Bien *et al.*, 2009).

A caracterização de SREBP em *C. neoformans* revelou sua importância na regulação da síntese de esterol, sensoriamento de oxigênio e mediação da virulência em camundongos (Chang *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Ingavale *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009; Bien *et al.*, 2009; Ernst & Tielker, 2009; Bien & Espenshade, 2010; Chung *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a Sre1 regula genes para a biossíntese de ergosterol, regula vias de captação de ferro e de cobre e vias de transporte de ferro reduzido ou mediado por sideróforos (Bien & Espenshade, 2010), regula funções relacionadas ao estresse e várias funções metabólicas e de transporte em baixos níveis de oxigênio (1%) (Chang *et al.*, 2007; Kronstad *et al.*, 2012). Uma vez que, a maioria das enzimas dependentes de oxigênio também contém ferro, a resposta à privação de ferro é frequentemente coordenada juntamente em resposta à hipóxia, assim sendo, a necessidade celular por oxigênio, cobre e ferro estão intimamente ligadas. Em vista disso, a Sre1 de *C. neoformans* parece co-regular a ativação da hipóxia dessas três vias de privação de nutrientes (Bien & Espenshade, 2010). Além disso, em *C. neoformans*, a SREBP é altamente conservada e serve como ligação entre biossíntese de esterol, sensoriamento de oxigênio e sensibilidade ao cloreto de cobalto (CoCl₂) (Bien & Espenshade, 2010). Ainda, a sequência de similaridade dos aminoácidos de SREBP tem diferenças entre humanos e ortólogos de fungos, o que sugere a possibilidade de ser um alvo terapêutico (Grahl *et al.*, 2012).

Enquanto a Sre1 de *C. neoformans* é requerida para síntese normal de esterol tanto em condições de hipóxia quanto em condições de normóxia, a Sre1 de *S. pombe* regula

primeiramente enzimas dependentes de oxigênio na via biossintética do ergosterol (Bien & Espenshade, 2010). Similarmente às SREBPs de mamíferos, a Sre1 de *S. pombe* e a Sre1 de *C. neoformans* são ativadas por clivagem proteolítica em resposta à hipóxia e à depleção de ergosterol. Todas essas regulam a manutenção da homeostase celular desse esteróide (Hughes *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007; Bien & Espenshade, 2010, Porter *et al.*, 2010). Em humanos, o regulador central da resposta celular ao estresse causado por hipóxia chama-se fator induzido por hipóxia (HIF-1). Ademais, recentemente foi reconhecido que o HIF-1 controla o estado de ativação e a função microbicida chave das células imunes (Bhandari & Nizet, 2014). Outra importante molécula sensora de oxigênio denomina-se heme. A molécula heme contém o grupo ferro (substrato) que se liga ao oxigênio. Foi melhor caracterizada em *Saccharomyces cerevisiae* (Butler, 2013) sendo a principal molécula detectora de oxigênio nessa espécie tanto no metabolismo aeróbico quanto no anaeróbico. Heme serve como um grupo prostético de muitas proteínas envolvidas em processos biológicos fundamentais como respiração, fotossíntese, metabolismo e transporte de oxigênio (Layer *et al.*, 2010). É a principal molécula a ligar-se ao oxigênio em eucariotos além de ser a principal conectora entre o metabolismo do ferro e da disponibilidade de oxigênio (Chung *et al.*, 2012). As hemoglobinas, mioglobinas, catalases, peroxidases, citocromo P450 e proteínas sensoras de gases como oxigênio ou óxido nítrico dependem de heme como co-fator essencial (Layer *et al.*, 2010).

1.4 A análise proteômica

A proteômica é o estudo de todas as proteínas presentes em uma amostra biológica, proveniente de um determinado genoma (Wasinger *et al.*, 1995; Betts & Smith, 2001). É uma técnica que combina alto-rendimento experimental a algoritmos avançados, para fornecer um entendimento global das proteínas expressas em determinadas células que estejam em condições particulares. Esta inclui técnica para identificação e caracterização de proteínas individualmente em uma amostra, detecção de modificações postraducionais (Pennington *et al.*, 1997) e informação integrada sobre sequências de proteínas a partir de diferentes bancos de dados (Hamady *et al.*, 2005).

Por meio da análise proteômica se consegue obter informações em nível de expressão protéica, isoforma da proteína, distribuição celular e subcelular, função, modificação pos-traducional (PTMs) (Pennington *et al.*,1997). Então, em um primeiro momento pode ser feita uma análise do proteoma constitutivo que é quando todas as proteínas são expressas por um organismo, tecido ou célula em condições normais de cultivo ou fisiológicas. Entretanto, a modificação das condições de cultivo ou mudança na fisiologia do organismo estudado implicará mudanças no proteoma que reflete as condições do organismo em questão (Pennington *et al.*,1997).

Através da análise proteômica é possível acompanhar modificações nas células de organismos de um modo geral. Essas modificações podem ser detectadas durante o ciclo celular, apoptose, o curso de doenças, em resposta a estímulos extracelulares (hormônios, citocinas, estresse), em resposta ao tratamento com drogas, durante a aplicação de agentes tóxicos, em variações ambientais que ocasionam estresse celular e outros. A mudança de expressão protéica em um tecido ou em um tipo celular poderá ser compreendido em cada um desses processos, tendo em vista que a transmissão de informação dentro da célula e atividades subcelulares (transporte de vesículas, transcrição, processamento do RNA mensageiro, transporte pela membrana nuclear) envolvem mudanças dinâmicas e complexas na montagem das proteínas (Pennington *et al.*,1997).

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal analisar o efeito da hipóxia em relação à expressão global das proteínas da levedura patogênica *Cryptococcus gattii*.

2.1 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da hipóxia em relação à expressão dos fatores de virulência de *C. gattii* como o crescimento a 37°C, a melanização e a produção de cápsula polissacarídica

- Avaliar o efeito do tempo de exposição à hipóxia sobre o perfil global proteômico de *C. gattii*
- Identificar as proteínas de *C. gattii* diferencialmente expressas em resposta a três diferentes tempos de exposição à hipóxia 0h, 24h e 48h
- Caracterizar os processos celulares envolvidos na adaptação do fungo à hipóxia

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagem fúngica e condições de crescimento

A linhagem R265, sorotipo B de *C. gattii* foi previamente identificada por Kidd *et al.* (Kidd *et al.*, 2004) e cedida pelo Dr. Wieland Meyer da coleção de cultura de micologia molecular do Laboratório de pesquisa de Micologia Molecular do Hospital Westmead (Universidade de Sidney, Austrália). As culturas foram mantidas em meio YPD sólido (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, ágar 1,5%) a 4°C. A linhagem foi cultivada sob agitação constante de 4,4 x g, em 250 mL de meio YPD contendo extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% em um período de 16 horas. Após esse período, as células fúngicas foram coletadas por centrifugação (7.500 x g por 10 min) e foram lavadas 3 vezes em tampão PBS (137 mM de cloreto de sódio, 2,7 mM de cloreto de potássio, 2 mM de fosfato de potássio, 10 mM de fosfato de sódio). Ainda, foi realizada contagem celular por microscopia ótica em câmara de Neubauer e em seguida foram ressuspensas (1×10^8 células. mL⁻¹) em 100 mL de meio base nitrogenada de levedura (YNB-“yeast nitrogen base”- referência 239210-Becton, Dickinson and company, Sparks, USA). As amostras foram cultivadas à temperatura de 37°C com concentração de oxigênio de 1% (hipóxia) e completa ausência de agitação. Para os cultivos em hipóxia, estes foram preparados e crescidos em estufa a 1% de oxigênio durante 24 e 48h. O cultivo do tempo zero é coletado imediatamente por centrifugação. Como controle, as amostras foram cultivadas em estufa com a concentração de oxigênio atmosférico (aproximadamente 21%

de O₂) e completa ausência de agitação. O experimento de proteômica foi desenhado para que as coletas das células fossem realizadas nos tempos de cultivo de 0h (T0), 24h (T24) e 48h (T48).

3.1.1 Efeito da hipóxia sobre a Curva de desenvolvimento de *C. gattii*

A linhagem R265 de *C. gattii*, previamente cultivada em 100mL de YNB líquido (1×10^8 células. mL⁻¹) foi submetida a três diferentes condições de cultivo à temperatura de 37°C com o objetivo de avaliar a curva de desenvolvimento fúngico. A primeira condição é de normóxia com agitação constante de 4,4 xg, a segunda é de normóxia sem agitação e a terceira é de hipóxia sem agitação. As células foram coletadas nos tempos 0h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h e ressuspensas no meio de cultivo. Após foi coletado 1mL de cada condição de cultivo em cada tempo determinado acima para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm (Biomate 3S- UV-visível espectrofotômetro, Thermo Scientific, Fisher). As amostras que possuíam valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas, portanto, apresentam diferenças entre si. Os dados da curva de crescimento e do tamanho de cápsula foram interpretados, a partir da análise de variância One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p < 05$). Todas estas análises foram realizadas no programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad).

3.2. Análises fenotípicas

3.2.1 Efeito da hipóxia sobre a produção de melanina por *C. gattii*

A produção de melanina foi examinada em placas com agar níger (0,1% de glicose, 10% sementes níger, 2% ágar). Este ensaio foi realizado tanto em condições de normóxia quanto de hipóxia durante um período 48h à temperatura de 37°C. A observação do efeito da concentração de oxigênio sobre a produção de melanina foi realizada nos tempos de 24h e 48h.

3.2.2 Efeito da hipóxia sobre a espessura da cápsula de *C. gattii*

As células de *C. gattii* R265 que haviam sido previamente cultivadas em 100 mL de YNB líquido (1×10^8 células. mL⁻¹) na condição de normóxia com agitação constante 4,4 xg e nas condições de normóxia e hipóxia sem agitação foram coletadas por centrifugação. Logo, as células foram cultivadas durante 48h, à temperatura de 37°C em meio indutor de cápsula definido (glicose 15mM, MgSO₄ 10mM, KH₂PO₄ 29,4mM, glicina 13mM, tiamina 3μM, pH 5,5). Após, foram coletadas 100 μL da suspensão celular de cada condição de cultivo e centrifugadas a 8000 xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 μL de PBS e 100 μL de paraformaldeído, para posterior observação da espessura da cápsula em T48. As células foram fixadas em paraformaldeído e armazenadas a 4°C. Após, foram adicionadas 2 μL de tinta da índia em 5μL dessas células para visualização em microscópio óptico. Todas as condições foram realizadas em triplicata. A formação da cápsula das células de *C. gattii* foi observada por microscopia ótica após ser corado com tinta nanquim. O tamanho relativo da cápsula foi definido como a distância entre a parede celular e a borda externa da cápsula. O programa “Image J” foi utilizado para determinar a medida da cápsula de 100 células de cada amostra, todas realizadas em triplicata. As amostras que possuíram valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas, portanto, apresentam diferenças entre si. Os dados da curva de crescimento e do tamanho de cápsula foram interpretados, a partir da análise de variância One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Todas estas análises foram realizadas no programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad).

3.3. Proteômica

3.3.1 Preparação dos extratos protéicos

Para esse propósito, as células oriundas das condições T0, T24 e T48 foram liofilizadas e rompidas com o uso de gral e pistilo, em nitrogênio líquido, até a formação de um pó fino. As amostras foram ressuspensas em tampão com inibidores de proteases (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 50 μ M TPCK, 5 mM iodoacetamida e 2% CHAPS na proporção de 1 mL de tampão por grama de macerado. O extrato protéico foi submetido à agitação vigorosa em vórtex durante 5 min, foi centrifugada a 10.000 x g, durante 20 min a 10°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado à temperatura de - 20°C. Os sedimentos celulares remanescentes foram suspensos no mesmo tampão e agitados em vórtex durante 5 min. Após, foram sonicados (sonicador VC 601, 25Hz, Sonics e materials Inc.) em banho gelado durante 3 ciclos de 30 s cada, com um minuto de intervalo entre cada ciclo. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados por centrifugação e armazenados a temperatura de - 20°C. Foi realizada a quantificação das proteínas (sobrenadantes da ressuspensão protéica e dos restos celulares) pelo ensaio de Bradford (Biorad, Hercules, CA), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para cada réplica técnica, foram utilizados 50 μ g de extrato protéico total para precipitação com 10% de ácido tricloroacético por 16h a 4°C. Após esse período, as proteínas foram recuperadas por centrifugação a 10.000 x g durante 15 min, o precipitado foi lavado com acetona 80% e seco à temperatura ambiente. Logo, o precipitado protéico foi suspenso em um volume de 20 μ L de tampão de amostra desnaturante (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 40 % glicerol, 4% SDS, 400 μ M β -mercaptoetanol, 0,02% de azul de

bromofenol) aquecido a 95°C por 4 min, após a amostra protéica foi submetida à eletroforese em gel unidimensional (1DE). A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada em um sistema de eletroforese (Mini-PROTEAN® II, Electrophoresis cell system-Bio-Rad), de acordo com Laemmli (Laemmli, 1970). Foram utilizados os marcadores de massa molecular (LMW calibration kit-baixo peso molecular – GE), (HMW calibration kit -alto peso molecular- GE, Benchmark protein ladder, Invitrogen) ou com “prestained SDS-PAGE standarts low-range” (Bio-rad). A eletroforese foi realizada com tensão de 100 Volts (V) por 1,5 h. Após ocorrer a separação das proteínas, o gel foi incubado em corante azul de Coomassie (metanol 20% (v/v), ácido fosfórico 85% (v/v), sulfato de amônio 10% (m/v) e azul de comassie brilhante G-250 (coloidal) 0,05% (m/v) a fim de corar as proteínas durante 24h. Após esse período, o gel foi lavado 3 vezes, durante 20 min, com água destilada (Gauci *et al.*, 2013) e mantido em ácido acético 10% (Kurien *et al.*, 2012).

3.3.3 Digestão em gel

Cada linha do gel contendo as proteínas fracionadas foi fragmentado em 9 pedaços iguais de 0,6 cm de comprimento. Para tanto, cada pedaço foi armazenado em microtubos e descorado com 400 µL de acetonitrila (ACN) 50% em 25 mM bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) e pH 8,0. Ademais, o gel permaneceu em contato com essa solução por 15 min e o excesso de líquido foi removido. A lavagem foi repetida por mais 2 vezes. Então, os géis foram desidratados durante 5 min com ACN 100% em volume suficiente para cobrir os pedaços de gel. Após a ACN foi removida do gel por centrifugação a vácuo (Labconco centrivap cold concentrator) por 5-10 min. As proteínas do gel foram reduzidas com 50 µL DTT 10 mM em 25 mM NH₄HCO₃ por 30 min à temperatura ambiente. A solução redutora foi removida e foram adicionados 50 µL de iodoacetamida 50 mM em 25 mM NH₄HCO₃ por 30 min. Após alquilação, os géis foram lavados com 25 mM NH₄HCO₃ por 10min. Ainda, foram adicionados 100 µL de ACN e incubados por 15 min. Essa solução foi removida e o gel foi completamente seco por centrifugação a vácuo por no mínimo 30 min. O gel foi reidratado com solução de tripsina (20ng/µL em 25mM NH₄HCO₃, pH 8,0). Para cada 50 µg de amostra foi utilizada 1 µg de tripsina. A digestão

foi realizada a 37°C por 16 h. A proteólise foi interrompida pela adição de ácido fórmico 5% e 25-50 µL de solução de ACN 50%. Os peptídeos eluídos foram transferidos para tubos novos e liofilizados por centrifugação a vácuo (18.000 xg) por 2 h.

3.3.4 Análise das amostras por LC-MS/MS

As análises de espectrometria de massas em tandem foram realizadas em um cromatógrafo líquido nanoACQUITY UPLC de ultraeficiência acoplado ao espectrômetro de massas Q-TOF micro (Waters MS Technologies, UK). Os peptídeos previamente digeridos e liofilizados foram solubilizados em 15 µL de ácido fórmico 0,1%. A separação dos peptídeos foi feita em uma coluna de fase reversa BEH130 C18 do cromatógrafo (100 µm/ 1,7 µm; diâmetro e poro, respectivamente), em um fluxo de 600 nl/min. As soluções utilizadas foram: solução A, composta de ácido fórmico (0,1%) em água (99,9%); e solução B, composta de ácido fórmico (0,1%) em acetonitrila (99,9 %). O gradiente utilizado na cromatografia foi de 1 % B a 50 % B em 14 min, seguido de reequilíbrio da coluna. Os peptídeos eluídos foram imediatamente ionizados por eletrospray e analisados em um espectrômetro de massas “Q-TOF micro” (Waters MS Technologies, UK), com aquisição constante durante toda a corrida cromatográfica (30 min). Os espectros de MS foram obtidos na faixa de massa de 200 a 2000 m/z, com tempo de busca de 1 s e intervalos entre essas buscas de 0,1 s. Os espectros em MS/MS foram adquiridos na faixa de massa de 50 a 2000 m/z e com tempos de busca e intervalo iguais aos do modo MS. As amostras foram analisadas em modo DDA (“Data Directed Analysis”), nas quais cada análise completa em modo MS foram seguidas de análises consecutivas em modo MS/MS, sendo selecionados para fragmentação os 3 íons mais intensos com múltiplas cargas (+2 e +3), acima de 10 contagens/segundo. A energia de colisão para a fragmentação dos peptídeos foram ajustadas de acordo com os arquivos de reconhecimento de cargas para os íons peptídicos fragmentados +2 e +3 fornecidos pelo sistema MassLynx (Waters). Os dados em formato “raw” MS/MS foram processados utilizando o Mascot Distiller versão 2.4.2.0 e exportados como arquivo no formato “mascot generic file” (.mgf). As amostras foram analisadas em duas réplicas técnicas. Este trabalho foi realizado na unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de massas (Uniprote-MS, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Brazil).

3.3.5 Análise dos dados de LC- MS/MS

Os espectros de massa foram coletados e pesquisados pela plataforma MASCOT (Matrix Science, Boston, Massachusetts, EUA) contra um banco de dados de *C. gattii* linhagem R265. Todas as sequências de aminoácidos da linhagem R265 de *C. gattii* foram adquiridas no formato FASTA disponível em 5 de agosto de 2009 pelo endereço eletrônico (http://www.broadinstitute.org/annotation/Cryptococcus_neoformans_b/MultiDownloads.html). Deste resultado, os arquivos resultantes foram exportados na extensão “.dat” e analisados no programa Scaffold (V_4.1.1, Proteome Software, Portland, Oregon, EUA) para estimar a expressão diferencial das proteínas identificadas nas diferentes condições biológicas de estudo. Os parâmetros para seleção das proteínas foram a presença de, no mínimo, dois fragmentos de peptídeos por proteína e uma taxa de 95% de probabilidade de identificação da proteína. No entanto, somente proteínas presentes em pelo menos duas replicatas biológicas em cada condição de cultivo (T0, T24 e T48) foram consideradas para análise de expressão diferencial e classificação funcional.

3.3.6 Classificação funcional das proteínas identificadas

Em se tratando da classificação funcional das proteínas identificadas por LC-MS/MS, foram realizadas análises por “Gene Ontology” (GO) utilizando-se o programa Blast2GO (<http://www.blast2go.org>). Para isto, estas sequências foram selecionadas a partir do arquivo “.FASTA” do banco de dados de *C. gattii*. Em princípio, as análises iniciais envolvem o alinhamento (via BLASTp) das sequências de aminoácidos e o mapeamento delas nos termos de GO. A partir disso, foi possível observar em quais processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares que as proteínas analisadas estão associadas. Sendo assim, o programa Blast2GO permitiu a identificação

das proteínas em rotas celulares disponíveis pelo KEGG (Kanehisa & Goto, 2000), contribuindo para a elucidação de possíveis mecanismos celulares envolvidos.

4. Resultados

4.1 Análise do efeito da hipóxia sobre os fatores de virulência de *C. gattii*

Conforme descrito existem elementos regulatórios em *C. gattii* que possibilitam a este infectar o hospedeiro com sucesso, denominados fatores de virulência. Estes fatores são: a síntese de cápsula, a produção de melanina e o crescimento a 37°C (Chaturvedi & Chaturvedi, 2011). A par disso, foram realizados ensaios para se verificar qual a influência da hipóxia em relação ao fenótipo de *C. gattii* tendo como três importantes fatores de virulência: crescimento a 37°C, espessura da cápsula polissacarídica e produção de melanina. O efeito da hipóxia sobre a velocidade de desenvolvimento de *C. gattii* foi observada nesse ensaio de modo que os cultivos fúngicos foram mantidos sem agitação para se evitar a aeração do meio de cultura. Como controle, utilizou-se um cultivo fúngico na condição de normóxia sob agitação constante (4,4 xg). Como previsto, a agitação possui efeito positivo sobre a taxa de crescimento de *C. gattii*, a qual atingiu seu valor máximo em 24h de cultivo (Figura 5). Embora o cultivo de *C. gattii* em normóxia sem agitação tenha atingido o mesmo patamar de densidade ótica que o controle, isso só ocorreu após 72h de incubação. Em condição de hipóxia, a taxa de desenvolvimento de *C. gattii* é baixa mesmo após cultivo de 72h (Figura 5). Sendo assim, a hipóxia teve efeito negativo sobre o crescimento fúngico. Provavelmente, os baixos níveis de oxigênio induzem o fungo a diminuir seu metabolismo celular (metabolismo letárgico) a fim de minimizar o gasto energético. Contudo, é importante se observar que a baixa oxigenação do meio pode ter causado a morte das células fúngicas, em razão disso é necessário uma análise quanto à viabilidade das células durante o período de incubação do fungo nessa condição.

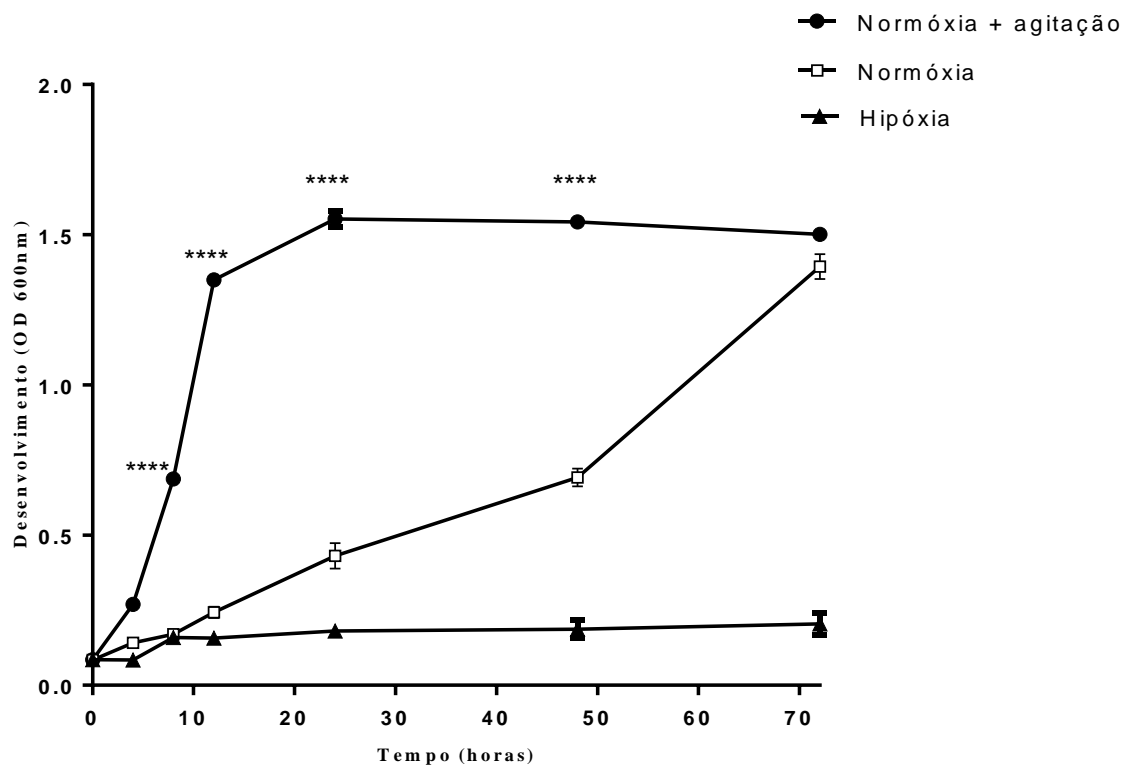


Figura 5| A hipóxia afeta o desenvolvimento de *C. gattii*. Curva do desenvolvimento de *C. gattii* R265 (diluições apropriadas) nas condições de normóxia e hipóxia. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro de luz visível (600 nm) durante 72h a 37°C em condição de normóxia (●) com agitação constante (4,4 xg) e dos controles: normóxia (□) sem agitação e hipóxia (▲) sem agitação. Os dados mostrados são a média ± desvio padrão a partir de três replicatas biológicas. ****P < 0,0001.

A produção de cápsula é um importante fator de virulência para o *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, pois possui forte propriedade antifagocítica (Cordero *et al.*, 2013). A cápsula tem muitas funções protetoras tais como: regular negativamente as citocinas inflamatórias, depletar os componentes do sistema complemento e inibir a apresentação de antígeno pelos monócitos (O'Meara & Alspaugh, 2012).

Em vista disso, verificou-se a influência da hipóxia em relação à espessura da cápsula de *C. gattii* por microscopia ótica após incubação da levedura em condição de normóxia e hipóxia por 48h a 37°C em meio indutor de cápsula. Como controle utilizou-se um cultivo fúngico na condição de normóxia em agitação constante (4,4 xg). Cumpre destacar que não foi possível observar diferença significativa na espessura da cápsula entre as condições de normóxia e hipóxia (Figura 6). No entanto, observando-se o controle do ensaio, fica evidente o efeito positivo da agitação sobre a espessura da cápsula de *C. gattii*. De forma que a agitação para esse ensaio foi um fator determinante para o aumento da espessura da cápsula.

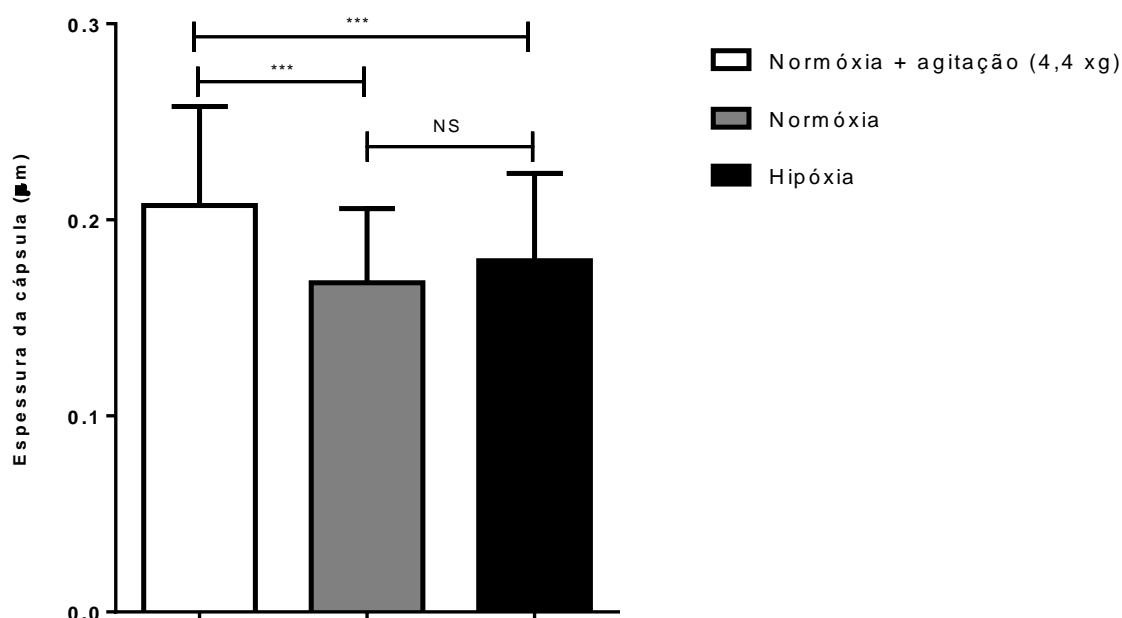


Figura 6| A agitação do cultivo é um fator importante para a formação da cápsula de *C. gattii*. Foram realizadas medidas de 100 células/amostra com triplicatas das três condições. A espessura relativa da cápsula de *C.gattii* equivale a distância entre a parede celular e a borda externa da cápsula. O cultivo controle teve 0,2 µm de cápsula, representando aumento significativo em relação aos outros dois cultivos sem agitação. Os dados mostrados são a média ± desvio padrão a partir de três replicatas biológicas. ***P < 0,0001. NS, não significante.

Além disso, foi realizado um experimento para analisar o efeito da hipóxia sobre a melanização de *C. gattii*. Neste, foi promovido o desenvolvimento de *C. gattii* em meio ágar níger em condições de hipóxia ou normóxia. Pôde-se observar que a condição de hipóxia não favoreceu a melanização do fungo, devido a ausência de oxigênio, contudo na presença desse fica evidente a melanização do mesmo (Figura 7).

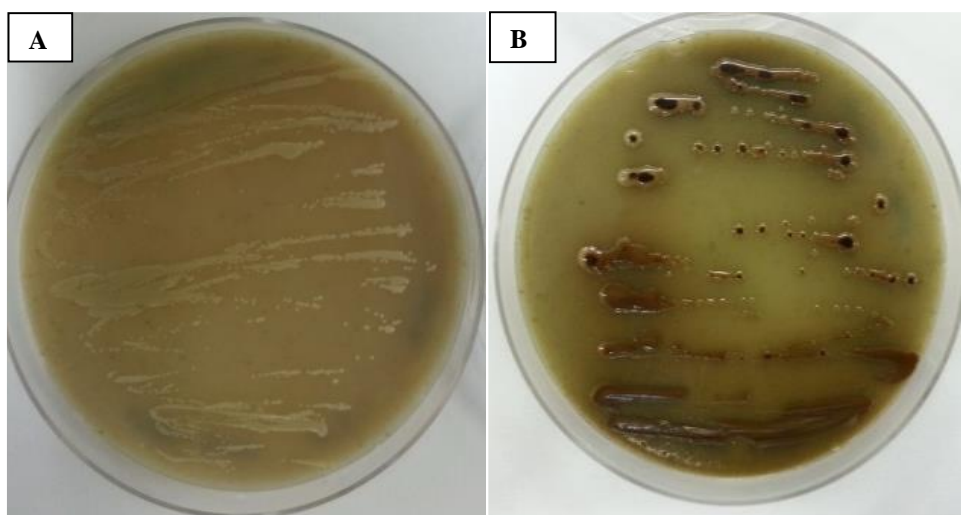


Figura 7| Efeito da hipóxia sobre a melanização *in vitro* de *C. gattii*. As figuras representam o desenvolvimento de *C.gattii* (linhagem R265) em meio ágar Níger com 0,1% glicose. Os cultivos foram expostos por 48h a 37°C em condição de hipóxia (A), na qual não ocorreu melanização e em condição de normóxia (B), na qual ocorreu a melanização.

4.2 Extração e quantificação das proteínas da linhagem R265 de *C. gattii*

4.2.1 Efeito da hipóxia sobre a concentração protéica de *C. gattii*

Os cultivos de (10^6 células. mL⁻¹) de *C.gattii* foram coletados por centrifugação após distintos períodos de incubação (T0, T24 e T48) em condição de hipóxia. Após, foi realizada a extração das respectivas proteínas e a subsequente determinação das concentrações das proteínas totais. Conforme a Tabela 1, observa-se uma concentração protéica maior nos cultivos de T0. Em T24, a concentração protéica é de apenas 1/8 da concentração de T0. Ao passo que o tempo de exposição à hipóxia vai aumentando, a concentração protéica vai diminuindo. Este fato pode significar a diminuição do metabolismo celular fúngico. Em T48 de cultivo, percebe-se uma redução significativa da concentração das proteínas em relação a T0 (Tabela 1). O rendimento, em volume, para as extrações protéicas foi de aproximadamente 10mL, 7mL e 4 mL para T0, T24 e T48, respectivamente.

Tabela 1 |Concentrações das proteínas da linhagem R265 de *C. gattii*. Concentração protéica das réplicas biológicas RB1, RB2 e RB3 em cada tempo de cultivo T0, T24 e T48.

Tempo Cultivo (h)	Réplica Biológica	Concentração protéica (µg/µL)
T0	RB1	6,08
	RB2	7,4
	RB3	5,8
T24	RB1	1,036
	RB2	0,804
	RB3	0,752
T48	RB1	0,276
	RB2	0,11
	RB3	0,102

4.2.2 Separação das proteínas de *C. gattii* por eletroforese em SDS-PAGE

Foi realizada a separação das proteínas por eletroforese em SDS-PAGE (Figura 8) dos extratos protéicos das três réplicas biológicas - (RB1, RB2 e RB3) - de todos os tempos de cultivo (T0, T24 e T48). Para cada réplica biológica (RB) dos tempos estipulados foram realizados duas réplicas técnicas (RT), gerando 6 géis para cada réplica biológica, totalizando 18 géis. Para fins ilustrativos, comparativos e comprobatórios da qualidade das proteínas em gel nos três tempos indicados, está ilustrada na Figura 8 uma réplica técnica (gel) de cada tempo. Como resultado, pode-se afirmar que os géis apresentaram uma boa resolução na separação das proteínas. Quando comparadas as três condições T0, T24 e T48, pode-se observar diferenças no padrão das bandas em cada tempo (Figura 8).

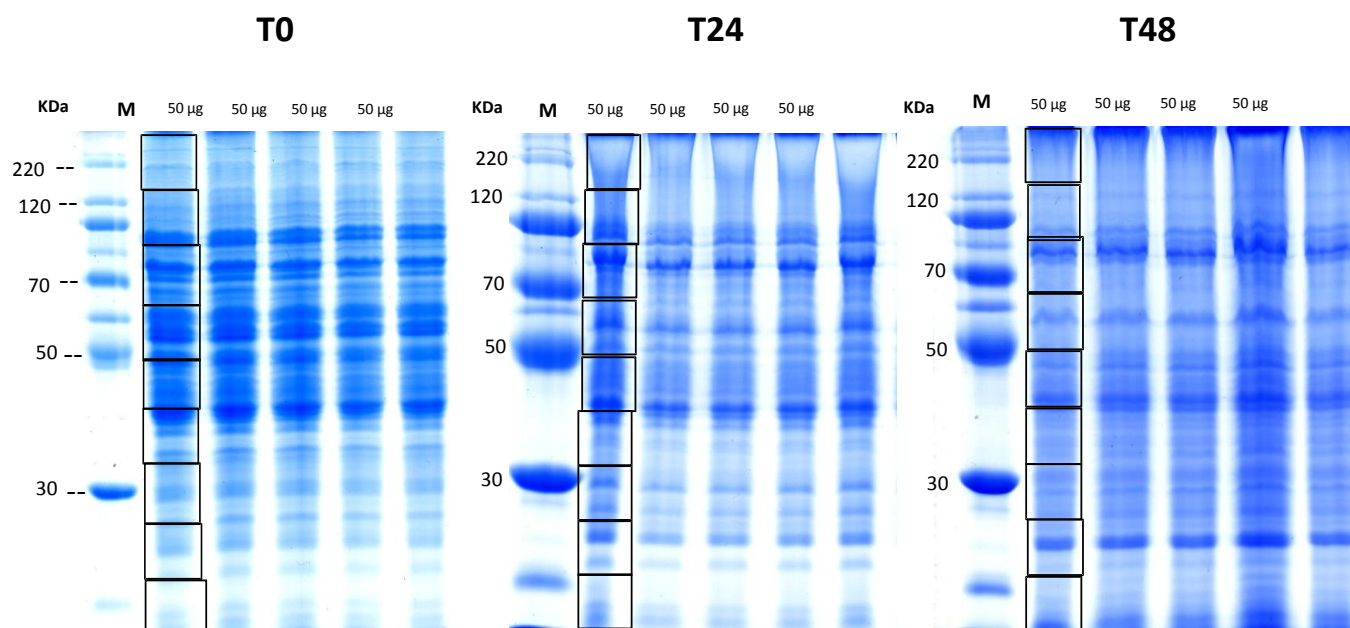


Figura 8| Análise por SDS-PAGE das proteínas de *C. gattii* sob condição de hipóxia. Os géis representam a réplica técnica e biológica 1, provenientes do cultivo de *C.gattii* nas condições T0, T24 e T48. Trabalhando com as concentrações protéicas de 6,08 µg/µL para T0, 1,036 µg/µL para T24 e 0,276 µg/µL para T48, foram aplicadas 50 µg de cada amostra por canaleta de cada gel. Os quadrados representam a excisão de cada um dos 9 fragmentos de 0,6 cm ao longo das canaletas. **M**: marcador de massa molecular protéica (10 a 220 kDa). O corante utilizado foi o Coomassie G-250.

4.3 Identificação e análise da expressão diferencial das proteínas de *C. gattii* sob condição de hipóxia

Neste trabalho, foram identificadas ao todo 190 proteínas (7.291 espectros) considerando-se a soma dos três períodos de exposição de *C. gattii* à hipóxia (T0, T24, T48) (Tabela 8, Anexo). Entretanto, foram selecionadas para análise de expressão diferencial e categorização funcional somente as proteínas presentes em pelo menos duas replicatas biológicas que apresentaram expressão diferencial entre os tempos, as quais correspondem a 130 proteínas (6.764 espectros) (Tabela 7, Anexo). Destas 130 proteínas selecionadas, 87 proteínas estavam presentes em T0, das quais 43 são exclusivas para esse tempo de cultivo. Em T24 foram identificadas 74 proteínas, sendo exclusivas apenas 14. As proteínas comuns somente entre T0 e T24 foram 19. Em T48 foram identificadas 54 proteínas, com exclusividade desse tempo apenas 13. As proteínas comuns somente entre T24 e T48 foram 16. Assim, não ocorreu identificação de proteínas comuns entre T0 e T48. Então, o número de proteínas comuns identificadas em T0, T24 e T48 foi de 25 (Figura 9). Ainda foram identificadas proteínas exclusivas para cada tempo (Tabela 5, Anexo). Das 130 proteínas selecionadas para análise sob hipóxia, 34 tiveram modificação significativa da expressão, considerando-se como ponto de corte a expressão maior que 2 e menor que 0,5, nos tempos T0 e T24 (Tabela 2), T24 e T48 (Tabela 3) e T0, T24 e T48 (Tabelas 4).

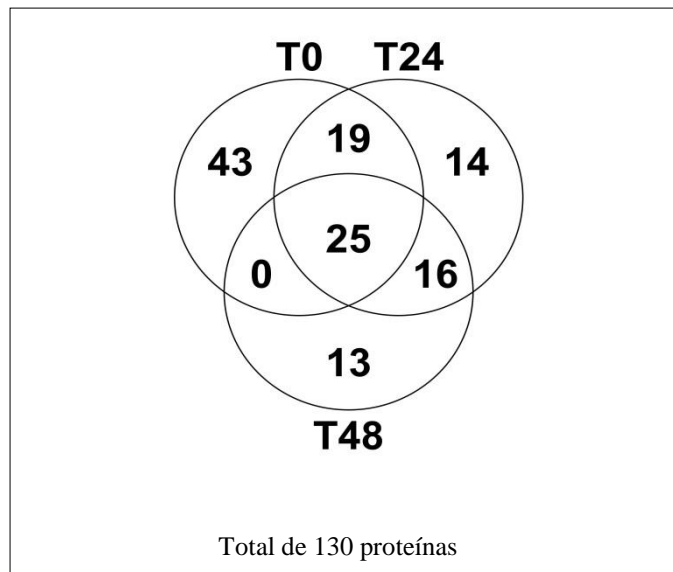


Figura 9| Distribuição das proteínas de *C. gattii* obtidas após desenvolvimento fúngico sob hipóxia. A figura representa a distribuição e sobreposição das proteínas que foram identificadas nos três períodos de cultivo (T0, T24 e T48). Estas proteínas estão presentes em pelo menos 2 replicatas biológicas de cada um desses períodos.

4.3.1 Análises comparativas entre T0 e T24

Os resultados revelam que 19 proteínas de *C. gattii* são comuns somente em T0 e T24 (Tabela 2, Figura 9). Entretanto, apenas duas proteínas tiveram regulação positiva da expressão em T24 quando comparado a T0: a catalase 1 (CNBG_4696), cujo aumento da expressão foi de aproximadamente 5 vezes e a citrato sintase (CNBG_0493), com um aumento da expressão de 2,2 vezes. A citrato sintase (CNBG_1012) foi exclusiva em T0 (Tabela 5, Anexo).

Quatro destas proteínas (Tabela 2) tiveram regulação negativa da sua expressão sendo que a proteína com maior variação de expressão foi a subunidade alfa da ATPase transportadora de íons hidrogênio (CNBG_1793). As 13 proteínas que apresentaram variação da expressão igual a um, não tiveram alteração de expressão entre T0 e T24

como, por exemplo, a ATP sintase subunidade beta (CNBG_1632) (Tabela 2). Dentre as proteínas comuns para T0 e T24, 6 dessas apresentaram variação significativa da sua expressão. Considera-se maior ou igual a 2 e menor ou igual a 0,5 o ponto de corte para variação da expressão (Tabela 2).

Tabela 2| Análise comparativa das proteínas de *C. gattii* R265 identificadas em T0 e T24 sob hipóxia. A variação da expressão é o número de vezes em que as proteínas do T24 estão mais ou menos expressas em relação ao T0. O “Cutoff” utilizado para caracterizar proteínas diferencialmente expressas foi maior ou igual a 2 ou menor ou igual a 0,5.

Tempo	ID Broad Institute	Proteína	Varição da expressão (T24/T0)
T0 e T24	CNBG_4696	catalase 1	5,3
T0 e T24	CNBG_0493	citrate synthase	2,2
T0 e T24	CNBG_2079	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	0,5
T0 e T24	CNBG_0705	aconitase	0,4
T0 e T24	CNBG_2659	conserved hypothetical protein	0,3
T0 e T24	CNBG_1793	H ⁺ -transporting two-sector ATPase subunit alpha	0,1
T0 e T24	CNBG_0031	cyclophilin A	1
T0 e T24	CNBG_0564	oxidoreductase	1
T0 e T24	CNBG_1068	nucleoside-diphosphate kinase	1
T0 e T24	CNBG_1632	ATP synthase beta subunit	1
T0 e T24	CNBG_2132	thiol-specific antioxidant protein 1	1
T0 e T24	CNBG_2278	UDP-xylose synthase	1
T0 e T24	CNBG_2364	malate dehydrogenase	1
T0 e T24	CNBG_2947	adenylate kinase	1
T0 e T24	CNBG_3344	pyruvate kinase	1
T0 e T24	CNBG_3734	phosphoketolase	1
T0 e T24	CNBG_4801	aspartate aminotransferase	1
T0 e T24	CNBG_4912	heat shock protein	1
T0 e T24	CNBG_5573	heat shock protein	1

4.3.2 Análises comparativas entre T24 e T48

Em análises comparativas das proteínas de *C. gattii* entre T24 e T48 observou-se a existência de 16 proteínas comuns entre essas condições (Tabela 3, Figura 9). Dessas proteínas comuns, seis proteínas tiveram regulação positiva da sua expressão em T48, sendo que a expressão mais proeminente foi a da citocromo c oxidase (subunidade V) (CNBG_2961) (Tabelas 3 e 6, 7, 8 - Anexo) com 4,7 vezes mais expressa em T48 em relação a T24. Em seguida é identificada a hexoquinase (CNBG_0168), lactoilglutaciona ligase (CNBG_2826) ambas com 3,3 vezes mais expressas em T48, frutosamina quinase (CNBG_4237) (Tabelas 3 e 6, 7, 8, Anexo) com 2,7 vezes mais expressa em T48, ribose-5-fosfato isomerase (CNBG_5972) (Tabelas 3 e 7, 8, Anexo) com 2,6 vezes mais expressa em T48 e IMP desidrogenase com 2,4 vezes mais expressa em T48. Em contrapartida, a uracil fosforibosiltransferase (CNBG_4048) e a s-adenosilhomocisteína hidrolase (CMBG_6075) (Tabelas 3 e 7, 8- Anexo) tiveram sua expressão reduzida pela metade em T48. Entre as proteínas comuns de T24 e T48, 8 dessas apresentaram variação siginificativa da sua expressão. Considera-se maior ou igual a 2 e menor ou igual a 0,5 o ponto de corte para variação da expressão. As oito proteínas (Tabela 3) com variação da expressão igual a 1, não tiveram variação significativa de expressão.

Tabela 3| Análise comparativa das proteínas de *C. gattii* R265 identificadas em T24 e T48 sob hipóxia. A variação da expressão é o número de vezes em que as proteínas estão mais ou menos expressas em relação à outra. O “Cutoff” utilizado para caracterizar proteínas diferenciamente expressas foi maior ou igual a 2 ou menor ou igual a 0,5.

Tempo	ID Broad Institute	Proteína	Varição da expressão (T48/T24)
T24 e T48	CNBG_2961	cytochrome c oxidase subunit V	4,7
T24 e T48	CNBG_0168	hexokinase	3,3
T24 e T48	CNBG_2826	lactoylglutathione lyase	3,3
T24 e T48	CNBG_4237	fructosamine kinase	2,7
T24 e T48	CNBG_5972	ribose-5-phosphate isomerase	2,6
T24 e T48	CNBG_1468	IMP dehydrogenase	2,4
T24 e T48	CNBG_4048	uracil phosphoribosyltransferase 1	0,5
T24 e T48	CNBG_6075	S-adenosylhomocysteine hydrolase	0,5
T24 e T48	CNBG_0599	copper/zinc superoxide dismutase	1
T24 e T48	CNBG_0672	oxidoreductase	1
T24 e T48	CNBG_2539	enoyl-CoA hydratase	1
T24 e T48	CNBG_3418	inorganic phosphate transporter pho88	1
T24 e T48	CNBG_4876	carboxylesterase	1
T24 e T48	CNBG_5520	cytoplasm protein	1
T24 e T48	CNBG_5977	adenine phosphoribosyltransferase	1
T24 e T48	CNBG_6200	fructose-bisphosphate aldolase	1

4.3.3 Análises comparativas entre T0, T24 e T48

Análises comparativas entre T0, T24 e T48 revelam que 25 proteínas de *C. gattii* são comuns entre todas as condições (Tabela 4, Figura 9 e Tabelas 7 e 8- Anexo). Destas, algumas tiveram aumento de expressão em T24 mantendo-se com expressão constante em T48 como a UDP-glicose desidrogenase (CNBG_4706) e a fosfopiruvato hidratase (CNBG_3703). A transquetolase (CNBG_6174) foi a única proteína com aumento de expressão em T24 que continuou aumentando a expressão em T48, tendo como resultado uma expressão relativa de 7,75 (expressão positiva). A pequena Arf GTPase (CNBG_2340) foi a única proteína com expressão positiva em T24 (4,3vezes) tendo sua expressão reprimida em T48 (em 1/3). Algumas proteínas mantiveram sua expressão constante de T0 a T24 e aumentaram sua expressão em T48 como, por exemplo, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (CNBG_1866) , a proteína de domínio LEA (CNBG_1093) (Tabela 6, Anexo) canal íon seletivo dependente de voltagem (CNBG_3615) e a proteína ATP sintase F1 (subunidade delta) (CNBG_0774) (Tabela 6, Anexo). A proteína citoplasmática (CNBG_5531) e a HSP70 (CNBG_3266) (Tabela 6, Anexo) mantiveram expressão constante em T0 e T24, mas tiveram expressão reprimida em T48 pela metade e em um quinto, respectivamente. Por fim, algumas proteínas não tiveram sua expressão alterada em nenhum dos tempos como a manganês superóxido dismutase (CNBG_2661), a proteína het-c2 (CNBG_2989) (Tabela 6, Anexo) e a proteína hipotética (CNBG_4789) (Tabela 6, Anexo), a nucleosídeo difosfato quinase (CNBG_3998) e a proteína YPT1 de ligação a GTP (CNBG_4617). Ainda, foram identificadas duas ATP sintases (Tabelas 2 e 4) sendo que a ATP sintase (CNBG_3853) (Tabela 4) teve redução de 2,5 vezes na sua expressão em T24 e um aumento de 3,3 vezes em T48 de hipóxia, tendo uma baixa expressão relativa (valor de “cutoff” não significativo). A ATP sintase (CNBG_1632) (Tabela 2) não teve variação na sua expressão em T24 e não foi identificada em T48. Entre as proteínas comuns de T0, T24 e T48, 17 dessas apresentaram variação significativa da sua expressão relativa. Considera-se maior ou igual a 2 e menor ou igual a 0,5 o ponto de corte para variação da expressão. As oito

proteínas (Tabela 3) com variação da expressão igual a 1, não tiveram tiveram variação significativa de expressão

Tabela 4| Análise comparativa da expressão relativa das proteínas de *C. gattii* R265 identificadas em T0, T24 e T48 sob hipóxia. A alteração da expressão é o número de vezes em que as proteínas estão mais ou menos expressas uma em relação à outra. O “Cutoff” utilizado para caracterizar as proteínas diferentemente expressas foi maior ou igual a 2 ou menor ou igual a 0,5. O asterisco (*) significa proteínas hipotéticas reanotadas que permaneceram hipotéticas.

Tempo	ID Broad Institute	Proteína	Varição da expressão (T24/T0)	Varição da expressão (T48/T24)	Expressão relativa (T24/T0) X (T48/T24)
T0, T24, T48	CNBG_4706	UDP-glucose dehydrogenase	5,8	1	5,8
T0, T24, T48	CNBG_3703	Phosphopyruvate hydratase	4,4	1	4,4
T0, T24, T48	CNBG_2340	ARF small monomeric GTPase	4,3	0,3	1,29
T0, T24, T48	CNBG_1047	Glycine hydroxymethyltransferase	4	1	4
T0, T24, T48	CNBG_0629	conserved hypothetical protein	3,7	1	3,7
T0, T24, T48	CNBG_0995	Pyruvate decarboxylase	3,4	1	3,4
T0, T24, T48	CNBG_6174	Transketolase	3,1	2,5	7,75
T0, T24, T48	CNBG_3471	Rab/GTPase	2,9	1	2,9
T0, T24, T48	CNBG_2968	Transaldolase	2,7	1	2,7
T0, T24, T48	CNBG_0997	conserved hypothetical protein*	2,5	1	2,5
T0, T24, T48	CNBG_0575	meiotic recombination related protein	2,4	1	2,4
T0, T24, T48	CNBG_3493	conserved hypothetical protein*	2,4	1	2,4
T0, T24, T48	CNBG_3853	ATP synthase	0,4	3,3	1,32
T0, T24, T48	CNBG_5498	Structural molecule	0,4	4,4	1,76
T0, T24, T48	CNBG_1866	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	4,1	4,1
T0, T24, T48	CNBG_1093	LEA domain protein	1	2,6	2,6
T0, T24, T48	CNBG_3615	voltage-dependent ion-selective channel	1	2,1	2,1
T0, T24, T48	CNBG_0774	conserved hypothetical protein*	1	2	2
T0, T24, T48	CNBG_5531	cytoplasm protein	1	0,5	0,5
T0, T24, T48	CNBG_3266	hsp70	1	0,2	0,2
T0, T24, T48	CNBG_2661	manganese superoxide dismutase	1	1	1
T0, T24, T48	CNBG_2989	conserved hypothetical protein*	1	1	1
T0, T24, T48	CNBG_3998	Nucleoside-diphosphate kinase	1	1	1
T0, T24, T48	CNBG_4617	GTP-binding protein ypt1	1	1	1
T0, T24, T48	CNBG_4789	conserved hypothetical protein*	1	1	1

4.3.4 Análise das proteínas hipotéticas

Um total de 30 proteínas (23% das proteínas identificadas em pelo menos duas replicatas biológicas) foram identificadas como hipotéticas ou proteínas hipotéticas conservadas (Tabela 6, Anexo). As sequências dessas proteínas foram alinhadas e comparadas contra o banco de dados de *C. gattii* não-redundante do NCBI. Detectou-se que 12 dessas proteínas possuem alta similaridade com proteínas de outra linhagem de *C. gattii* e com outra espécie de *Cryptococcus*, sendo eles: *Cryptococcus gattii* WM276, *C. neoformans* JEC21 e *C. neoformans* var. *grubii* (Tabela 6 do Anexo). Apontamos as seguintes proteínas identificadas pelo emprego da ferramenta “BLAST”: proteínas de choque térmico (CNBG_4912), (CNBG_5573) (Tabelas 2 e Tabelas 6, 7, 8 do Anexo) e (CNBG_4499) e a proteína de choque térmico *sks2* (CNBG_0239), proteína 14-3-3 (CNBG_5765) (Tabelas 5 e Tabelas 6, 7, 8 do Anexo), proteína tipo choque térmico- 90 (*hsp90*) (CNBG_4857) (Tabelas 5 e 6, 8 do Anexo), proteína alergênica (CNBG_1981) (Tabelas 5 e Tabelas 6, 7, 8 do Anexo), proteína relacionada a recombinação meiótica (CNBG_0575), proteína de domínio LEA (embriogênese tardia abundante) (CNBG_1093) e proteína de choque térmico-70 (*hsp70*) (CNBG_3266) (Tabelas 4 e Tabelas 6, 7, 8 do Anexo), subunidade V da citocromo C oxidase (CNBG_2961) e frutossamina quinase (CNBG_4237) (Tabelas 3 e Tabelas 6, 7, 8 do Anexo). Algumas destas estão relacionadas ao processo biológico de resposta ao estresse e a mecanismos de virulência como por exemplo: proteína de choque térmico *sks2*, proteína tipo-*hsp90* (De Maio, 2014), proteína 14-3-3 (uma das proteínas mais abundantes das microvesículas com função na virulência de *C. neoformans*) (Rodrigues *et al.*, 2008). Algumas proteínas de choque térmico são sintetizadas somente mediante o acúmulo de proteínas desenoveladas em determinado compartimento celular, outras são constitutivamente ativas tendo uma função normal no enovelamento de proteínas bem como em resposta a agentes estressores (Conner *et al.*, 2005). Outras proteínas identificadas por “Blast” estão envolvidas na meiose como é o caso da proteína relacionada a recombinação meiótica (CNBG_0575) que teve aumento de expressão em 2,4 vezes do T0 para T24. A proteína de domínio LEA (embriogênese tardia

abundante) (CNBG_1093) está envolvida na função de proteção dos organismos contra a dessecação, conferindo a estes alta hidrofiliicidade e termoestabilidade (Liu *et al.*, 2010), tendo aumento de expressão em 2,6 vezes em T48 . A citocromo c oxidase (CNBG_2961) teve sua expressão aumentada em 4,7 vezes do T24 para T48. Esta participa da redução do oxigênio molecular à água (Maréchal *et al.*, 2012) estando envolvida na via metabólica da respiração. A frutosamina quinase (CNBG_4237) teve 2,7 vezes sua expressão aumentada de T24 para T48. Esta enzima descrita em mamíferos é responsável por um mecanismo de reparo protéico (glicação não-enzimática das proteínas) o qual proporciona a homeostase e sobrevivência celular, além de estar envolvida na defesa contra toxinas (Conner *et al.*, 2005) . Homólogos dessa proteína foram encontrados em *Aspergillus sp.*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, embora não tenham sido identificados em *S. cerevisiae* e *S. pombe* (Gemayel *et al.*, 2007). As demais proteínas permaneceram como hipotéticas e proteínas hipotéticas conservadas de *Cryptococcus* (Tabela 6 do Anexo).

4.4 Classificação funcional das proteínas de *C. gattii* envolvidas na adaptação do fungo à hipóxia.

Com o propósito de obter uma visão global dos processos celulares protéicos envolvidos na adaptação de *C. gattii* à hipóxia, foi realizada a classificação funcional das 130 proteínas identificadas por LC-MS/MS (Tabela 7 do anexo) e selecionadas por critérios pré- determinados com auxílio do programa Scaffold. Para isto, foram utilizadas ferramentas de anotação funcional automática como o “Gene Ontology” (GO Consortium) que categorizam as proteínas em classes funcionais (Conesa *et al.*, 2005) com o auxílio da ferramenta computacional Blast2GO. O Blast2Go utiliza o “BLAST” para encontrar homólogos de sequências em formato fasta (Conesa *et al.*, 2005). Com base nisso, foi possível verificar os processos celulares (glicólise/gliconeogênese, fosforilação oxidativa, ciclo do ácido tricarboxílico, etc) nos quais as proteínas de *C. gattii* participam durante a hipóxia. Tomando-se por base os dados obtidos, foi possível verificar que as proteínas analisadas contemplam grande parte dos processos, componentes e funções celulares. Muitas dessas proteínas estão associadas a processos metabólicos tais como: fosforilação oxidativa, metabolismo dos carboidratos, biossíntese de nucleotídeos, transporte

intracelular, transdução de sinal, transporte de íons (ânions), fornecimento de energia (via da pentose-fosfato e síntese de ATP, glicólise) e respiração celular (transporte de oxigênio e de elétrons). Ainda, estão envolvidas na resposta aos fatores estressores (catabolismo de peróxido de hidrogênio), a regulação da expressão gênica, a replicação do DNA (síntese de nucleotídeos), a resposta ao calor, o transporte vesicular entre outros. Adicionalmente, este programa gera valores de contagem espectral e cobertura das proteínas, número de peptídeos únicos, score máximo e mínimo de íons e proteínas.

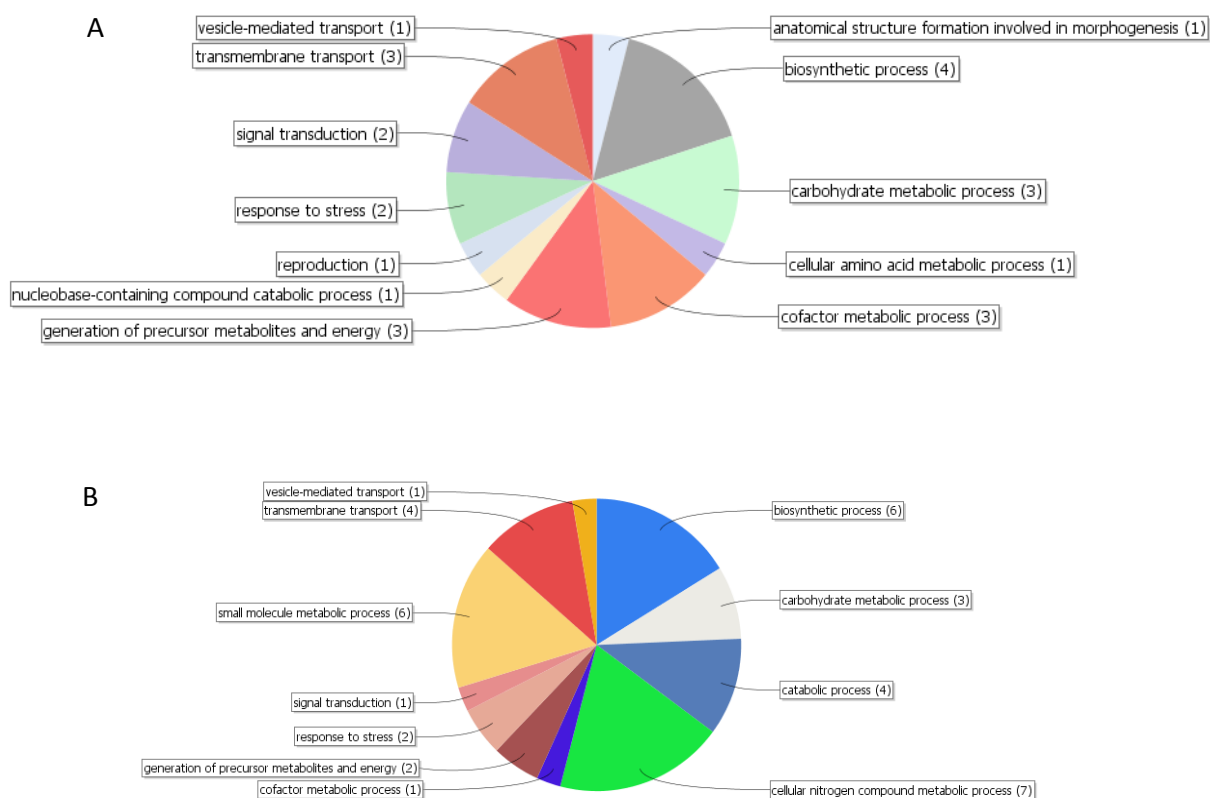


Figura 10| Anotação do “Gene Ontology” das proteínas de *C. gattii* sob condição de hipóxia. As funções moleculares são representadas em gráficos multiníveis. Foi utilizado o “cutoff” igual a 1 para a sequência das proteínas diferencialmente expressas (A) T24 e (B) T48.

4.5 Mapeamento das vias metabólicas de *C. gattii* envolvidas na adaptação do fungo à hipóxia

Convém evidenciar que a exposição de *C. gattii* a condições de hipóxia resultou em um aumento dos níveis de muitas proteínas envolvidas na glicólise, no metabolismo do piruvato, na via respiratória, na via da pentose-fosfato e no metabolismo dos aminoácidos. Com o propósito de observar esses processos, foram realizadas análises no banco de dados do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), a fim de se esclarecer quais as vias metabólicas de *C. gattii* estão envolvidas na sua adaptação à condição de hipóxia. Além disso, as proteínas diferencialmente expressas identificadas neste estudo foram mapeadas nas mesmas vias. Com base em resultados obtidos pelo KEGG, foi possível construir um diagrama representativo das vias metabólicas (Figura 11). As proteínas estão representadas pelo número de identificação e distribuídas no mapa de acordo com a sua participação nas vias/rotas metabólicas. A maioria das vias metabólicas identificadas fazem parte do metabolismo primário dos carboidratos tendo em vista que os microorganismos oxidam carboidratos como fonte primária de energia celular promovendo a respiração. Evidenciam-se proteínas com expressão regulada positivamente em T48 nas vias da glicólise/gliconeogênese, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (CNBG_1866) (Tabela 4) na via metabólica da frutose e manose, a ribose-5- fosfato isomerase (CNBG_5972) (Tabela 3). A via da fosforilação oxidativa utiliza a energia liberada pela oxidação de nutrientes e possui proteínas reguladas positivamente em T24 e T48 como a citocromo c oxidase (CNBG_2961) (Tabelas 3 e Tabela 6 do Anexo) e proteínas que tem expressão reprimida em T24 e aumentada em T48 como é o caso da ATP sintase (CNBG_3853) (Tabela 4) e da molécula estrutural (CNBG_5498) (Tabela 4). No ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) apenas a piruvato decarboxilase (CNBG_0995) (Tabela 4) aumenta sua expressão em T24 e permanece com a mesma expressão em T48, demonstrando que nesse período ainda existem enzimas que fazem parte da respiração celular, sendo que a citrato sintase (CNBG_0493) (Tabela 2) tem sua expressão levemente aumentada em T24. Em contraste, a aconitase (CNBG_0705) (Tabela 2) tem sua regulação

reprimida em T24, isto pode representar uma consequência negativa para o ciclo do ácido tricarboxílico visto que sua função é catalisar a conversão de citrato a isocitrato. Dentre as proteínas mapeadas, algumas participam somente de uma rota metabólica (metabolismo das purinas) como a IMP desidrogenase (CNBG_1468) (Tabela 3) regulada positivamente em T48 e a uracilfosforibosiltransferase-1 (CNBG_4048) (Tabela 3) com regulação negativa da expressão em T48 e participação apenas no metabolismo das pirimidinas. A glicina hidroximetiltransferase (CNBG_1047) (Tabela 4) teve expressão regulada positivamente em T24 mantendo-se em T48, esta participa de três rotas metabólicas: o metabolismo do metano, metabolismo do glioxalato e dicarboxilato e metabolismo da glicina, serina e treonina, tendo como função catalisar a conversão de serina tetrahydrofolato a glicina e metileno, reação que fornece um carbono para a síntese de metionina, timidilato (nucleotídeo pirimidínico encontrado no RNA) e purinas no citoplasma. Portanto, com breve análise do mapa metabólico pode-se verificar que em T48 ainda estão sendo reguladas positivamente proteínas que promovem a regulação de fatores de sobrevivência do fungo tanto em nível de metabolismo energético quanto em nível de replicação celular.

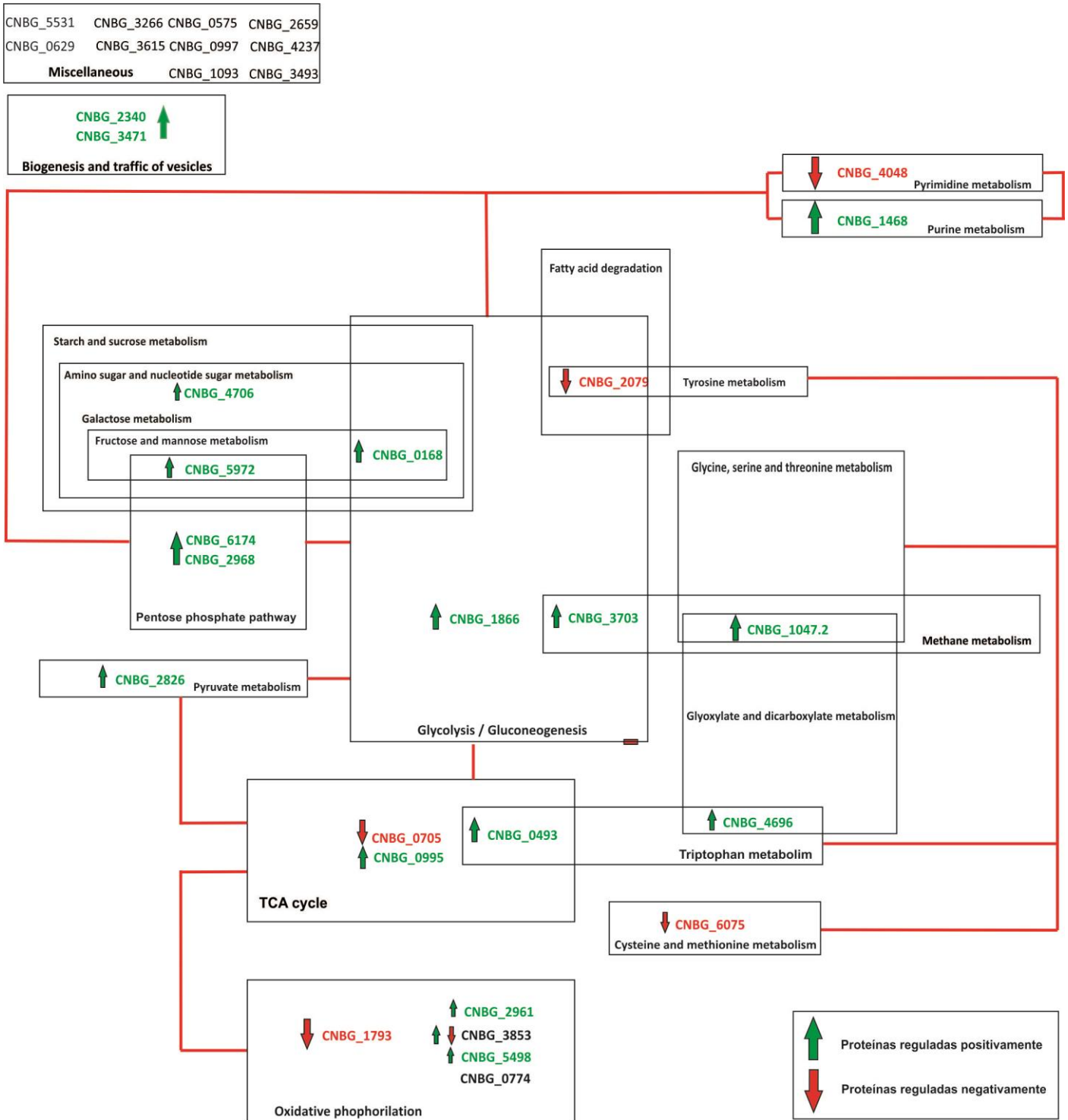


Figura 11| Diagrama das vias metabólicas. As proteínas de *C. gattii* identificadas em T0,T24 e T48 sob hipóxia participam de uma ou mais vias metabólicas. As linhas em vermelho representam a ligação de uma rota metabólica à outra, as flechas indicam a regulação positiva ou negativa das proteínas. Adaptação dos mapas das vias do KEGG.

5. Discussão

É imperioso destacar que o *Cryptococcus gattii* é uma levedura de respiração aeróbia (Goulart *et al.*, 2010) e intracelular facultativa. Esta pode crescer tanto no meio ambiente como em hospedeiros mamíferos de forma livre, em tecidos, em fluidos orgânicos e/ou dentro de macrófagos (Srikanta *et al.*, 2014). A infecção sistêmica ocorre por via inalatória causando infecção pulmonar primária, frequentemente disseminando-se ao cérebro e causando meningite (Srikanta *et al.*, 2014). Por sua vez, os mecanismos que o fungo utiliza para perceber, responder e adaptar-se ao ambiente no qual está inserido são fatores cruciais para que o mesmo se prolifere, provocando a doença. A capacidade do *C.gattii* promover a doença está estreitamente relacionada ao remodelamento e otimização da sua condição metabólica e fisiológica de acordo com o contexto ambiental no qual está inserido. Isso ocorre por vias de sinalização, pequenas GTPases, proteínas regulatórias, fatores de transcrição, outros adaptadores e reguladores diversos (Bahn & Jung, 2013). Quando o *C. gattii* está infectando o pulmão do hospedeiro, as células fúngicas aderidas a esse órgão formam o criptococoma. O criptococoma promove um ambiente de hipóxia extrema (0,5 a 1% de oxigênio), devido ao acúmulo celular e a diminuição da perfusão sanguínea (Chun *et al.*, 2007; Nizet & Johnson, 2009; Grahl *et al.*, 2012). No intuito de entender como ocorre o remodelamento do metabolismo de *C. gattii* linhagem R265 na adaptação à hipóxia, foram realizados ensaios fenotípicos e proteômicos para esse fim. Os ensaios fenotípicos tiveram como objetivo avaliar a espessura da cápsula em hipóxia, pois já foi descrito que variações no meio ambiente externo induzem a formação de cápsula em *C. neoformans* e cada condição externa diferente pode induzir um fenótipo capsular específico variando desde o tamanho até a especificidade antigênica (O'Meara & Alspaugh, 2012). Entre os fatores que influenciam positivamente o tamanho da cápsula estão as baixas concentrações de ferro no meio, CO₂ na concentração de 5%, pH 7, baixos níveis de glicose e nitrogênio, suplementação do meio com manitol (O'Meara & Alspaugh, 2012). Todavia, fatores de estresse como a hipóxia são indutores de cápsula (O'Meara & Alspaugh, 2012). No presente trabalho, o fato de não ter sido observada uma maior indução de cápsula em hipóxia do que em normóxia pode-se levar a algumas pressuposições: as concentrações de CO₂ que foram utilizadas nos ensaios são atmosféricas

(0,03% CO₂), fator que pode ter influenciado a ausência de alteração na espessura da cápsula, os níveis de glicose e nitrogênio adicionados no meio de cultura são os mesmos preconizados em outros trabalhos de hipóxia fúngica. A ausência de diferença significativa da espessura da cápsula em hipóxia em relação à normóxia é congruente com trabalhos de Chun *et al* (2007) em que *C. neoformans* não teve problemas com a formação da cápsula na condição de hipóxia. Assim, fazendo-se um paralelo, neste trabalho, entre a análise fenotípica da cápsula e as análises proteômicas de *C. gattii*, a espessura da cápsula em hipóxia acompanhou o mesmo crescimento da cápsula em normóxia, como se a restrição de oxigênio no fungo estivesse sendo compensado pelo aumento da expressão da Uridina difosfato glicose desidrogenase (UDP-glicose desidrogenase) (5,8 vezes mais expressa) (Tabela 4), enzima fornecedora de ácido glicurônico para a célula criptocócica e importante para a síntese de cápsula. Sustentando essa hipótese, Griffith *et al.*, (2004) observaram que a deleção do gene *ugd1* resultou na redução do ácido glicurônico das células levando a sérias alterações fenotípicas, como por exemplo, o defeito na formação da cápsula e no desenvolvimento a 37°C. Adicionalmente, as linhagens de *Cryptococcus* com deleção do gene *ugd1* foram incapazes de sobreviver em camundongos (Griffith *et al.*, 2004), sendo UGD1 requerido para a biossíntese de cápsula e para a integridade da parede celular além de ser essencial para o crescimento a 37°C (Moyrand *et al.*, 2004, Kronstad *et al.*, 2011). Ainda foi realizada uma análise fenotípica para verificar a biossíntese de melanina em hipóxia e em normóxia. O fungo não se melanizou após 48h em hipóxia. Pode-se apontar que a síntese de melanina está associada à virulência em *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, pois o fungo possui um neurotropismo associado a sua capacidade de converter catecolamina (dopamina, epinefrina e noraepinefrina) em melanina. Além disso, a melanina sintetizada durante a infecção protege o fungo contra mecanismos de defesa imune do hospedeiro. Entretanto, no presente estudo não houve melanização após 48h de hipóxia, porque o oxigênio é um fator determinante para a produção de melanina como já foi observado em trabalho sobre análises genéticas em mutantes de *C. neoformans* sensíveis ao oxigênio nos loci (*oxy1* e *oxy2*) e com deficiência na produção de melanina (Emery *et al.*, 1994).

A proteômica global de *C. gattii* fornece uma visão geral das modificações protéicas em tempos diferentes de adaptação à hipóxia, por sua vez, esses períodos são relativos ao tempo zero. Nesse processo, foram identificadas ao todo 190 proteínas de *C. gattii* (Tabela 8, Anexo) nos tempos 0, 24 e 48h em condição de hipóxia das quais somente 130 proteínas (6.764 espectros) (Tabela 7 do anexo) foram selecionadas com base em

critérios anteriormente descritos. Ainda, sabe-se que na maioria dos organismos eucarióticos, o oxigênio molecular é essencial para a fosforilação oxidativa e processos biossintéticos (Goldberg *et al.*, 1988; Ingavale *et al.*, 2008). Ademais, tem função essencial como acceptor de elétrons na geração de energia química via respiração mitocondrial dos micro-organismos eucarióticos. É fator crítico para a biossíntese de esteróis, ácidos graxos mono e polinsaturados, NAD, porfirina e outras vias metabólicas e biossintéticas (Raymond & Segre, 2006; Grahl *et al.*, 2012). Nesse trabalho, pôde-se observar que a exposição de *C. gattii* à condição de hipóxia aumentou os níveis de expressão de muitas proteínas envolvidas na glicólise, no metabolismo do piruvato, no ciclo do ácido tricarboxílico, na via da pentose-fosfato, no metabolismo dos aminoácidos, na fosforilação oxidativa e no metabolismo do glioxalato/dicarboxilato. Outrossim, outras proteínas identificadas participam do transporte celular, tráfego de vesículas e vias desconhecidas. Desse modo, a presença de quantidades suficientes de oxigênio promove a fosforilação oxidativa que fornece a maior parte de ATP necessário ao organismo. Entretanto, na ausência de quantidades suficientes de oxigênio, a glicólise deve ser estimulada para fornecer ATP necessário (Raymond & Segre, 2006).

Com base no perfil transcricional sobre a interação entre o *C. neoformans*, o tecido pulmonar do hospedeiro e as células fagocíticas, foi revelado o remodelamento do metabolismo do carbono central (Hu *et al.*, 2008). Isto ocorreu porque no período entre 8 e 24h de infecção, houve um aumento da expressão dos transcritos que codificam enzimas da via do glioxalato, gliconeogênese, β -oxidação, biossíntese de aminoácidos, proteínas transportadoras e de resposta ao estresse (Hu *et al.*, 2008). O perfil transcriptômico do trabalho citado é congruente com o perfil proteômico presente trabalho em *C. gattii* no qual observou-se o aumento da expressão de enzimas da via do glioxalato, gliconeogênese, β -oxidação, biossíntese de aminoácidos, proteínas transportadoras, via das pentoses, transporte vesicular, ciclo do ácido cítrico e proteínas de resposta ao estresse. A expressão das proteínas da via glicolítica de *C. gattii* parece ter aumentado de forma semelhante ao que acontece em *C. neoformans*, *C. albicans* e *A. fumigatus* quando submetidos à hipóxia (Setiadi *et al.*, 2006, Chun *et al.*, 2007). Em hipóxia, os transcritos de *C. neoformans* tiveram regulação positiva para o metabolismo dos carboidratos, via da glicólise, respiração mitocondrial, metabolismo do estresse, tráfego de vesículas (Chun *et al.*, 2007) e em *C. albicans* ocorreu regulação positiva dos genes glicolíticos como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAP1*), piruvato descarboxilase (*PDC11*), regulação positiva dos genes de resposta ao estresse como a Catalase (*CAT1*), proteína de choque térmico

HSP70 (*SSA1*). Estes resultados corroboram com os encontrados no corrente trabalho sobre *C. gattii*. O resultado da análise da expressão diferencial de proteínas mostrou que a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi a proteína que apresentou maior expressão positiva em 24 e 48h de hipóxia (Tabela 4), coincidindo com o resultado dos transcritos e do proteoma de *A. fumigatus* em 24h de hipóxia (Barker *et al.*, 2012). Outra enzima da via glicolítica em *C. gattii* que teve notável aumento de expressão em condição de hipóxia é a Fosfopiruvato hidratase (Enolase) (Tabela 4) (López-Villar *et al.*, 2006). Segundo Miura *et al.*, (2013), em *S. cerevisiae*, a Enolase sob condição de hipóxia proporciona aumento do metabolismo do carbono para favorecer a biossíntese de lipídeos e de proteínas independentemente do ciclo do ácido tricarboxílico. Tal mecanismo pode ser importante para que as leveduras em condição de hipóxia forneçam rapidamente energia e substrato para a biossíntese de lipídeos e proteínas independentemente do ciclo do ácido tricarboxílico, ajustando-se, às mudanças do ambiente (Miura *et al.*, 2013). A participação da Enolase na via glicolítica se dá na produção de piruvato, estando associada à via sintética de ácidos graxos, nucleotídeos e de outros aminoácidos. A hipóxia é um gatilho para a Enolase formar sítios celulares em *S. cerevisiae* (Miura *et al.*, 2013). Ocorre que as enzimas glicolíticas como a Enolase se reorganizam espacialmente reunindo-se em um mesmo sítio na célula e esse processo facilita a glicólise, além do mais a reorganização espacial pode ser um novo mecanismo para a eficiente produção de energia sem a participação do ciclo do TCA em hipóxia (Miura *et al.*, 2013). Como o *S. cerevisiae* possui muitos processos biológicos em comum com outras células eucarióticas esses mecanismos podem ser conservados entre as espécies. Em *P. brasiliensis*, a enolase possui função na via glicolítica e papel de adesão (Marcos *et al.*, 2012).

No presente estudo observou-se proteínas sendo expressas positivamente na via da glicólise. Este fato pode levar a produção de metilglioxal (aldeído altamente tóxico para a célula). A Glioxalase I (lactosilglutationa ligase) (Tabela 3) expressa positivamente em 48h de hipóxia atua no sistema de detoxificação de metilglioxal catalisando sua conversão a glutationa. A glioxalase I participa do metabolismo do piruvato (via da glicólise), provavelmente pelo seu papel de detoxicação celular, prevenindo reações de glicação mediadas pelo metilglioxal, glioxal e outros aldeídos (Thornalley *et al.*, 2003).

Por sua vez, estudos prévios demonstraram que a cadeia respiratória mitocondrial regula a taxa de fosforilação oxidativa e identificaram a citocromo c oxidase como enzima chave dessa regulação (Burke & Poyton, 2008). A cadeia respiratória mitocondrial gera espécies reativas as quais promovem o estresse oxidativo da célula. As concentrações de

espécies reativas aumentam quando cessa o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória em decorrência do bloqueio da respiração (Castello *et al.*, 2008). Em leveduras, a concentração das espécies reativas é transitória e o estresse oxidativo é transiente, porque as células passam de normóxia à anóxia constantemente. A mitocôndria e a citocromo c oxidase são responsáveis pela indução de alguns genes relacionados à hipóxia em leveduras e mamíferos expostos a níveis reduzidos de oxigênio (Castello *et al.*, 2008). O oxigênio regula o nível de transcrição gênica de várias subunidades da citocromo c oxidase de levedura, como por exemplo no *S.cerevisiae*, além de regulá-la pós-transcricionalmente (Burke & Poyton, 2008).

É oportuno dizer que o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) marca o ponto central do sistema metabólico, sendo responsável pela oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos. As enzimas dessa via catalisam uma série de reações, tendo como produto final três NADHs, um FADH₂ e um GTP. Nesse trabalho, a Citrato Sintase (Tabela 2), primeira enzima do TCA, teve sua expressão regulada positivamente, isto pode ser uma indicação de que a enzima esteja catalisando a produção de citrato. Além disso, ela pode ter sido expressa positivamente pelo fato da célula fúngica estar com baixas concentrações de suprimento energético nesse momento de hipóxia como ATP, Acetil-CoA, e NADH, fato que levaria a sua indução. No estudo de Vodisch *et al.*, (2011) em *A. fumigatus*, foi comprovado aumento da taxa de NADP/NADPH durante a hipóxia, indicando que tanto a via biossintética de NADPH está reduzida como o mecanismo de consumo de NADPH está aumentado em razão do sistema de defesa do estresse oxidativo ou nitrosativo estarem mais ativos em hipóxia. A citrato sintase também é inibida pelos subprodutos succinil-CoA e pelo citrato (Lee *et al.*, 2007), mas como ela foi expressa positivamente, leva-se a questionar se esses subprodutos estão sintetizados em quantidades satisfatórias para tal reação nesse tempo de hipóxia. Ainda, a ATP citrato sintase (Tabela 5, Anexo) aparece como proteína exclusiva em T0, isto é congruente com o fato do metabolismo fúngico energético estar muito ativo nesse tempo de cultivo. Adicionalmente, foram identificadas 12 proteínas ribossomais exclusivas em T0 (Tabela 5, Anexo), indicando células metabolicamente ativas (síntese protéica). Somando-se a isso, o passo seguinte no ciclo do TCA é o de isomerização do citrato pela ação da aconitase, tendo função na produção de energia celular e respiração, além de ser considerada importante marcador do metabolismo oxidativo. Em estudo de *C. albicans* sob hipóxia, a regulação gênica da citrato sintase foi positiva, enquanto que a enzima aconitase teve sua expressão reprimida após 24h nesta condição (Setiadi *et al.*, 2006). A cadeia respiratória mitocondrial produz espécies reativas

inclusive óxido nítrico o qual possui papel regulatório na cadeia respiratória (Choksi *et al.*, 2004). A aconitase possui um centro sulfúrico ferroso que é sensível ao óxido nítrico. O óxido nítrico inibe a aconitase e o NADH. Em estudo de Missall *et al* (2006) sobre a resposta transcricional de *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *Histoplasma capsulatum* ao óxido nítrico, sugeriu a existência de similaridade e sobreposição entre resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo em *C. neoformans*. Com base nessas informações, uma hipótese para a regulação negativa da aconitase no presente trabalho é a inibição da enzima por óxido nítrico ou pela ausência do subproduto citrato.

Em princípio, a enzima representativa do TCA foi a piruvato descarboxilase (Tabela 4) com expressão regulada positivamente em *C. gattii* sob hipóxia no presente estudo, corroborando com os achados de Barker *et al.*, (2012) para o transcrito e proteoma de *A. fumigatus* em hipóxia. O gene *pdca* da piruvato descarboxilase foi isolado de *A. nidulans* confirmando a existência de uma via de fermentação alcoólica, apesar desse fungo ser um organismo aeróbio obrigatório. Muitos eucariotos aeróbios obrigatórios, como *Aspergillus nidulans* e *Zea mays*, podem resistir a períodos de significativo estresse anaeróbio, sendo que sua sobrevivência depende da conversão do piruvato a etanol e esta via é finamente regulada (Lockington *et al.*, 1997). Em *Pichia anomala*, a piruvato decarboxilase foi expressa durante crescimento anaeróbico tendo sido regulado positivamente 4 vezes em resposta à limitação de oxigênio, demonstrando que a transcrição dos genes da via fermentativa é regulada pela hipóxia e por fontes de carbono, mas a regulação pós-transcricional pode ter papel principal em regular o fluxo metabólico (Fredlund *et al.*, 2006).

Em leveduras, a glicose é catabolizada por duas vias fundamentais: pela via da glicólise e pela via oxidativa da pentose-fosfato que produz NADPH e ribose-5-fosfato. A riboneogênese é uma via que converte intermediários glicolíticos em ribose-5-fosfato sem a produção de NADPH, iniciando-se com a síntese de transquetolase. Por isto, é uma enzima-chave na via não-oxidativa da pentose-fosfato tendo importante função como substrato entre a via da pentose-fosfato e glicólise, fazendo uma ligação reversível entre as duas vias metabólicas. Além disso, fornece precursores para a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos aromáticos. No presente trabalho foram identificadas transquetolase em T0, T24 e T48 (Tabela 4) com aumento da sua expressão em T24 e T48, além de ter sido identificada como única em T0 (Tabela 5, Anexo). A transquetolase juntamente com a transaldolase (Tabela 4) catalisam várias reações chaves da cadeia não-oxidativa da via da pentose fosfato (Zhao & Zhong, 2009). Em conjunto com outras transformações

enzimáticas e químicas, a transquetolase catalisa reações que fornecem uma rota importante e conveniente para os açúcares, análogos de açúcares, inibidores de glicoprocessamento de enzima e carboidratos.

Na oxidação da glicose e na via do ácido tricarbóxico ocorre a produção de NADH no citosol celular. Apesar disso, a membrana mitocondrial interna não apresenta uma proteína transportadora de NADH, por isto apenas os elétrons do NADH citosólico são transportados para dentro da mitocôndria por um sistema de lançadeiras. Na primeira fase do transporte de elétrons, no citosol a reação de produção de NAD⁺ e malato é catalisada pela malato-desidrogenase citosólica e na matriz esta enzima catalisa a reoxidação de malato para a produção de NADH e oxalacetato. Neste trabalho, a malato desidrogenase (CNBG_2364) (Tabela 2 e 7, 8, Anexo) não teve variação da sua expressão em 24h de hipóxia apesar da contagem espectral ter sido um pouco maior nesse tempo em relação ao tempo zero .

No processo de transporte de elétrons, ocorre transferência de elétrons do NADH e do FADH₂ para o O₂ e isto ocorre nos centros redox ligados às proteínas. Além disso, a produção de ATP ocorre via oxidação de NADH e FADH₂. Os elétrons são transportados do complexo I e II para o complexo III e IV. O complexo I é também denominado NADH-desidrogenase ou NADH-coenzima Q-oxidoreductase. Neste trabalho, a proteína NADH-desidrogenase (CNBG_1144) (Tabela 5, 7, 8 do Anexo) foi identificada como proteína exclusiva em 24h de hipóxia. O papel da NADH desidrogenase é promover a transferência de elétrons de NADH para a Coenzima Q (ubiquinona), bombeando quatro prótons para fora da matriz mitocondrial. O complexo II continua lançando elétrons na cadeia de transporte de elétrons. Os complexos III e IV acionam a fosforilação oxidativa. O complexo IV ou citocromo c-oxidase (Cox ou Cco) é a enzima terminal da cadeia de transporte de elétrons. A citocromo c-oxidase catalisa a oxidação da citocromo c reduzido (gerado pelo complexo II) e do oxigênio molecular para produzir água. No presente trabalho, a subunidade V da citocromo c oxidase (Cco) (Tabela 3 e Tabelas 6, 7, 8 do Anexo) teve um importante aumento da sua expressão em 48h de hipóxia, sendo o resultado coerente com achados em Burke & Poyton (2008). Tendo em vista que esta proteína é regulada positiva e negativamente de acordo com a concentração de oxigênio presente no meio.

A cadeia mitocondrial respiratória e a citocromo c oxidase (Cco) estão implicadas na indução de alguns genes responsivos à hipóxia em leveduras (*S. cerevisiae*) (Castello *et al.*, 2008). A resposta de leveduras à hipóxia é observada pela expressão diferencial das

subunidades das isoformas homólogas (Va e Vb) da Cco, as quais os genes *COX 5a* e *COX 5b* são inversamente regulados pelas concentrações de oxigênio. Em condição de hipóxia ou anóxia, a isoforma expressa da proteína é a subunidade Vb (Castello *et al.*, 2008). Com isto, o aumento de expressão da citocromo c oxidase, neste trabalho, pode ser decorrente da regulação dos genes *COX 5a* e *COX 5b*, tendo sido regulado positivamente o gene *COX 5b*, com isto aumentando a isoforma Vb da respectiva proteína.

Na presença de oxigênio, a maioria da energia produzida pelas células eucarióticas é gerada pela fosforilação oxidativa mitocondrial. O resultado é a geração de gradientes de prótons e íons que atravessam a membrana mitocondrial os quais são usados pela ATP sintase para a síntese de ATP (Burke & Poyton, 2008). A ATP sintase ou F₁F₀-ATPase (complexo V da cadeia respiratória mitocondrial) faz parte da última etapa da fosforilação oxidativa. Esta enzima atua no transporte de prótons para dentro da mitocôndria possibilitando a síntese de ATP (Yoshida *et al.*, 2001). A energia necessária para esse processo provém da diferença de potencial eletroquímico do próton gerada pela respiração. No entanto, em torno de 95% do ATP produzido diariamente pelos organismos é sintetizado pela ATP sintase. A ATP sintase é uma família de proteínas com similaridade estrutural, sendo formada por dois subdomínios F₁ e F₀ e subunidades que estão acopladas no espaço intermembrana mitocondrial (F₀) ou na matriz (F₁) (Tetaud *et al.*, 2014). Neste trabalho, foram identificadas mais de uma ATP sintase subunidade beta (Tabelas 2 e 4) sendo que somente a da Tabela 4 apresentou diferença na sua expressão. ATP sintase (Tabela 4) teve 2,5 vezes a expressão reduzida em T24 e 3,3 vezes aumentada em T48. Em trabalho com *C. albicans* sob hipóxia, a ATP sintase teve regulação gênica negativa (Setiadi *et al.*, 2006). Uma explicação para o desenvolvimento de leveduras em meios pobres de oxigênio é que tais espécies devem ter desenvolvido a capacidade de modificar propriedades da sua F₁F₀-ATP sintase para ajustar-se ao ambiente (Clark-Walker, 2003). Então, a redução de oxigênio pode induzir a expressão de modificadores (formação de isoformas) que aumentam a atividade de ATPase-F₁ a baixos níveis de ATP. Em normóxia, a formação de potencial de membrana mitocondrial interno ocorre pela exportação de prótons da cadeia respiratória durante a passagem dos elétrons para oxigênio (Clark-Walker, 2003). Entretanto em hipóxia, não ocorre a exportação de prótons, em decorrência da interrupção do transporte de elétrons requerendo, dessa forma, uma estratégia diferente para manter o potencial de membrana mitocondrial interno. Contudo, em *S. cerevisiae* o complexo F₁F₀ permanece intacto durante o crescimento em anóxia, apesar da ausência dos componentes transportadores de elétrons da fosforilação oxidativa

(Clark-Walker, 2003). Isto corrobora com o fato da ATP sintase (Tabela 2), neste trabalho, não ter variado sua expressão em 24h de hipóxia.

Por sua vez, outra via metabólica que apresentou regulação positiva da expressão protéica de *C. gattii* sob hipóxia, nesse estudo, foi a via do glioxalato e dicarboxilato. Ratificando esse achado, no trabalho de Rude *et al.*, (2002) foi observado que os genes da via do glioxalato são regulados positivamente durante a infecção, além de serem importantes em outros fungos patogênicos para a virulência, embora sejam dispensáveis para a virulência em *C. neoformans* (Rude *et al.*, 2002, Loftus *et al.*, 2005, Idnurm *et al.*, 2007, Hu *et al.*, 2008).

A catalase pertence a maior família de genes antioxidantes identificada para *C. neoformans* e fornece proteção contra o estresse oxidativo (espécies reativas). Entretanto, a perda total do gene da catalase nesse patógeno não altera a resistência *in vitro* ao estresse oxidativo intra ou extracelular (Giles *et al.*, 2006). Somado a isso, a catalase age com outros constituintes do sistema de defesa antioxidante, fazendo parte de uma resposta robusta ao estresse oxidativo (Giles *et al.*, 2006). Em *S. cerevisiae* por exemplo: a citocromo c peroxidase mitocondrial e a catalase citoplasmática exibem atividades compensatórias e intercambiáveis (Cui & Churchill, 2003). A expressão representativa da catalase no presente trabalho pode estar ligada a uma resposta ao estresse oxidativo. Tendo em vista que o ambiente hipóxico pode ocasionar a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelo metabolismo celular fúngico. Além disso, a β-oxidação de ácidos graxos também é fonte de (H₂O₂), aumentando a expressão da catalase. Conforme o trabalho de Upadhyia e colaboradores (2013), sobre a expressão diferencial dos genes relacionados à oxidação-redução, processos metabólicos e catabólicos, foi identificado um importante papel da função mitocondrial e ubiquitinação da catalase na resistência ao estresse oxidativo. Todavia, alguns genes identificados nessa categoria envolvem os demonstrados como importantes na resistência ao estresse em *C. neoformans* e outras espécies fúngicas como o gene *CAT1* da catalase (Upadhyia *et al.*, 2013). Esse gene exibiu regulação positiva em mais de um tempo do experimento sugerindo seu prolongado envolvimento em combater o estresse induzido por H₂O₂ (Upadhyia *et al.*, 2013).

A exposição de *C. gattii* à hipóxia levou a regulação positiva da expressão das proteínas da via da pentose-fosfato, da mesma forma que em *A. fumigatus* (Vodisch *et al.*, 2011). A transaldolase é importante para a resistência ao estresse oxidativo em outros organismos (Juhnke *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a atividade da transaldolase está correlacionada com a atividade antioxidante da catalase (Missall *et al.*, 2006). Em análise

proteômica de *A. nidulans* foi descrito o mesmo resultado para essas enzimas sob condição de hipóxia (Shimizu *et al.*, 2009).

As Rab/GTPase são hidrolases que regulam vários processos na célula como crescimento, diferenciação, movimento celular e transporte de vesículas lipídicas. Possuem um papel central na organização das vias secretórias e endocíticas. Estudo recente mostrou que algumas dessas proteínas estão envolvidas no tráfego de membrana ou organização do citoesqueleto (Gillingham *et al.*, 2007). As proteínas que formam a superfamília das Ras são Arf, Rab, Ran, Ras e Rho (Wennerberg *et al.*, 2005) sendo que a Rab foi identificada em T0, T24 e T48 (Tabela 4) com aumento na sua expressão, como exclusiva do T24 (Tabela 5, Anexo) e exclusiva do T48 (Tabela 5, Anexo). Ainda, a proteína Rho foi identificada como exclusiva do T24 (Tabela 5, Anexo). A Arf foi identificada nos três tempos (Tabela 4) com aumento de expressão significativa em T24. A principal característica da Arf e da pequena proteína G é que ambas ligam-se a moléculas efetoras específicas dependentes de GTP (Gillingham *et al.*, 2007). Muitos patógenos manipulam a membrana interna das células a fim de formar vacúolos para replicarem-se dentro ou para prevenir expressão de proteínas na sua superfície que sejam reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro. Dada a importância das proteínas Arf na dinâmica da membrana, alguns patógenos expressam reguladores dessa família (Gillingham *et al.*, 2007). Em estudo feito sobre a regulação da morfogênese e da patogênese de *C. neoformans* foi demonstrado que as diversas classes de GTPases possuem funções distintas dependente de Ras (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). A Ras é o regulador central da proliferação em todos os eucariotos. Em *C. neoformans* a Ras1 e Rho-GTPases regulam a morfogênese (crescimento polarizado), termotolerância e a progressão do ciclo celular (Alspaugh *et al.*, 2000). *C. neoformans* produz um único sistema de interação entre essas proteínas Arf de sinalização *in vivo* (Ballou *et al.*, 2012). O fenótipo microbiano e esses eixos de sinalização são componentes essenciais para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro e estabelecimento da doença (Ballou *et al.*, 2012). Em *S. cerevisiae*, a manutenção da integridade celular é controlada Rho1 GTPase e em *C. neoformans* Rho1 é essencial para a viabilidade celular e supõe-se que seja funcionalmente similar a Rho1 de *S. cerevisiae*. Ainda, foi demonstrado que a pequena proteína Rho GTPase é importante em resposta ao choque térmico (Lam *et al.*, 2013). Além disso, a autofagia é induzida em condições de privação porque aumenta a disponibilidade de nutrientes (por exemplo, aminoácidos) provenientes da degradação de proteínas e outras macromoléculas. Algumas Rab e Arf

GTPases envolvidas na regulação das vias de transporte de membranas secretórias e endocíticas possuem função na autofagia (Segev, 2001).

Em síntese, a regulação positiva ou negativa da expressão protéica nos diferentes processos bioquímicos decorrentes da situação de hipóxia pode ser um fator crucial para a proteção e manutenção da célula fúngica *in vitro* ou no hospedeiro. Outro fator que a hipóxia pode exercer influência é no crescimento fúngico e na melanização. Embora, neste trabalho a hipóxia não tenha exercido influência sobre a produção de cápsula. Ainda, foram identificadas proteínas que participam da adaptação fúngica à hipóxia como as proteínas que participam do metabolismo primário necessário para produção de energia celular. Adicionalmente observou-se as modificações do fluxo protéico nas vias metabólicas glicolítica, pentose-fosfato, glioxalato, ácido tricarbóxico, fosforilação oxidativa entre outras que podem ter ocorrido a fim de compensar a redução do aporte de oxigênio para dentro da célula fúngica. Desse modo, a estratégia metabólica de aumentar ou diminuir a expressão protéica como compensação da redução de oxigênio é um fator que pode aumentar as chances do fungo de permanecer vivo no ambiente hipóxico, prosseguindo com a infecção, efetivando sua virulência.

6. Conclusões

Como se depreende do que foi estudado até aqui, pode-se concluir em razão disso, o seguinte:

- De acordo com a condição de hipóxia utilizada neste trabalho observou-se que a hipóxia afetou o crescimento celular de *C. gattii*, não promovendo a melanização do mesmo em 48h de hipóxia e não promovendo o aumento da espessura da cápsula de *C. gattii*.
- A hipóxia é um fator crítico para o desenvolvimento fúngico tendo em vista que este processo pode alterar a abundância da expressão de proteínas que fazem parte do metabolismo energético da célula desse micro-organismo.
- *C. gattii* parece compensar a redução dos níveis de oxigênio com o aumento da expressão de proteínas da respiração celular, proteínas do ciclo do ácido tricarboxílico, da via da fosforilação oxidativa e da via da glicólise/gliconeogênese.
- *C. gattii* em condição de hipóxia sofre remodelamento da expressão protéica do metabolismo dos carboidratos e dos aminoácidos. Sendo que algumas das proteínas dessas rotas metabólicas participam concomitantemente de outras vias metabólicas, como por exemplo: a citrato sintase que participa do TCA e do metabolismo do triptofano.
- As rotas metabólicas estão interligadas de forma que o aumento ou a redução da expressão protéica de uma rota vai induzir ou bloquear o funcionamento da outra

via metabólica, como por exemplo: *C. gattii* apresentou expressão positiva das proteínas da via da glicólise/gliconeogênese, as quais podem ter induzido aumento de expressão da piruvato descarboxilase, no ciclo do TCA.

7. Perspectivas

Em virtude do que foi mencionado, apresenta-se as perspectivas abaixo:

- Determinar o consumo de glicose do meio de cultura em 24 e 48h de hipóxia a fim de verificar a influência do consumo de glicose na expressão das proteínas do metabolismo do carbono, via glicolítica, ciclo do TCA e fosforilação oxidativa.
- Realizar ensaio de viabilidade celular para se verificar os resultados da leitura da curva de crescimento em hipóxia são em função do baixo metabolismo celular ou são em função da presença de células mortas.
- Realizar ensaio de “Western Blot” ou ensaios enzimáticos das proteínas catalase e gliceraldeído-3-fosfato com o intento de confirmar os achados em proteômica. Essas proteínas são importantes para o estresse oxidativo e glicólise, respectivamente.

ANEXOS

Tabela 5| Proteínas de *C. gattii* R265 identificadas exclusivamente em T0, T24 e T48 sob hipóxia

Tempo	ID Broad Institute	Proteína exclusiva
T0	CNBG_0140	60S ribosomal protein L10
T0	CNBG_0179	40S ribosomal protein S16
T0	CNBG_0519	60S ribosomal protein L9
T0	CNBG_0793	60S ribosomal protein L18-A
T0	CNBG_1273	60S ribosomal protein L7
T0	CNBG_1288	40S ribosomal protein S4
T0	CNBG_2387	40S ribosomal protein S8
T0	CNBG_2962	40S ribosomal protein
T0	CNBG_5375	60S ribosomal protein L6
T0	CNBG_5466	40S ribosomal protein S3ae-a
T0	CNBG_5992	60S ribosomal protein L20
T0	CNBG_0239	conserved hypothetical protein
T0	CNBG_0419	conserved hypothetical protein
T0	CNBG_0547	Transketolase
T0	CNBG_1012	ATP-citrate synthase
T0	CNBG_1429	Actin
T0	CNBG_1432	Isocitrate dehydrogenase
T0	CNBG_1489	Elongation factor 1-gamma
T0	CNBG_1643	Small subunit ribosomal protein 14
T0	CNBG_1816	Ketol-acid reductoisomerase
T0	CNBG_1904	Glycogen phosphorylase
T0	CNBG_2051	L10e protein
T0	CNBG_2246	Phosphoglycerate kinase
T0	CNBG_2389	Orotidine monophosphate pyrophosphorylase
T0	CNBG_2499	Phosphomannomutase
T0	CNBG_3052	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase
T0	CNBG_3166	Phosphogluconate dehydrogenase
T0	CNBG_3405	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
T0	CNBG_3719	Deoxyribose-phosphate aldolase
T0	CNBG_3846	Glycine dehydrogenase
T0	CNBG_3860	Glutamate dehydrogenase
T0	CNBG_3878	Zinc-binding dehydrogenase
T0	CNBG_3964	Flavo-hemoglobin
T0	CNBG_4499	conserved hypothetical protein*
T0	CNBG_4834	Translation elongation factor EF1-alpha
T0	CNBG_4857	Hsp90 protein like
T0	CNBG_5138	Phosphoglucomutase
T0	CNBG_5247	Fatty acid synthase beta subunit
T0	CNBG_5278	conserved hypothetical protein
T0	CNBG_5551	Glucose-6-phosphate isomerase
T0	CNBG_5683	MMS2 protein
T0	CNBG_5765	14-3-3 protein
T0	CNBG_5905	Translation elongation factor 2

Tempo	ID Broad Institute	Proteína exclusiva
T24	CNBG_0257	HHE domain-containing protein
T24	CNBG_1144	NADH dehydrogenase
T24	CNBG_5282	6-phosphogluconolactonase
T24	CNBG_1212	Electron carrier
T24	CNBG_5545	CIP1 protein
T24	CNBG_1829	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
T24	CNBG_2284	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
T24	CNBG_4076	Rab11 protein
T24	CNBG_3175	SNARE protein YKT6
T24	CNBG_3502	Aminotransferase
T24	CNBG_3197	conserved hypothetical protein
T24	CNBG_1981	conserved hypothetical protein
T24	CNBG_1497	conserved hypothetical protein
T24	CNBG_0463	conserved hypothetical protein

Tempo	ID Broad Institute	Proteína exclusiva
T48	CNBG_6127	Histone h2b
T48	CNBG_1355	Endopeptidase
T48	CNBG_1745	Chitin deacetylase
T48	CNBG_3206	Rab small monomeric GTPase
T48	CNBG_3628	Diamine N-acetyltransferase
T48	CNBG_1460	3-isopropylmalate dehydrogenase
T48	CNBG_4216	Mitochondria fission 1 protein
T48	CNBG_2881	conserved hypothetical protein
T48	CNBG_1302	conserved hypothetical protein
T48	CNBG_0624	conserved hypothetical protein
T48	CNBG_4297	conserved hypothetical protein
T48	CNBG_4796	conserved hypothetical protein
T48	CNBG_4819	conserved hypothetical protein

Tabela 6 | Classificação putativa das proteínas hipotéticas da linhagem R265 de *C. gattii* sob hipóxia

Tempo	ID Broad Institute	ID NCBI	Proteína	Espécie Relacionada	e-Value	Similaridade (%)	Identidade (%)
T0	CNBG_0239.2	XP_003192118.1	Heat Shock protein sks2	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	100	99
T0	CNBG_0419.2	XP_003191973.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	98	97
T0	CNBG_4499.2	XP_003193467.1	Heat Shock protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	99	99
T0	CNBG_4857.2	XP_003197339.1	Hsp90 like protein (cytoplasmic chaperone)	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	99	99
T0	CNBG_5278.2	XP_003194445.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	99	98
T0	CNBG_5765.2	XP_567951.1	14-3-3 protein	<i>C. neoformans</i> JEC21	0	100	100
T24	CNBG_0463.2	XP_003191920.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	95	93
T24	CNBG_1497.2	XP_003191381.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	97	94
T24	CNBG_1981.2	XP_003194582.1	Allergen protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	2,00E-162	99	97
T24	CNBG_3197.2	XP_003196767.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	96	96
T48	CNBG_0624.2	XP_003193613.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	1,00E-86	100	99
T48	CNBG_1302.2	XP_003191569.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	2,00E-139	89	86
T48	CNBG_2881.2	XP_003195957.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	96	95
T48	CNBG_4297.2	XP_003197048.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	4,00E-176	98	97
T48	CNBG_4796.2	XP_003197236.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	93	92
T48	CNBG_4819.2	XP_003197248.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	5,00E-166	90	90
T0,T24	CNBG_2659.2	XP_003195716.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	8,00E-135	95	94
T0,T24	CNBG_4912.2	XP_003197358.1	Heat Shock protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	96	96
T0,T24	CNBG_5573.2	XP_003191259.1	Heat Shock protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	100	99
T0, T24, T48	CNBG_0575.2	XP_003193516.1	Meiotic recombination related protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	99	98
T0, T24, T48	CNBG_4789.2	XP_003197291.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	5,00E-94	100	100
T0, T24, T48	CNBG_0629.2	XP_003193549.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	98	98
T0, T24, T48	CNBG_0774.2	XP_003193665.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	2,00E-140	99	99
T0, T24, T48	CNBG_0997.2	XP_003193905.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	3,00E-174	98	98
T0, T24, T48	CNBG_1093.2	XP_003191775.1	LEA domain protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	86	83
T0, T24, T48	CNBG_2989.2	XP_003196561.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	3,00E-135	98	97
T0, T24, T48	CNBG_3266.2	XP_003192735.1	Hsp70	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	100	99
T0, T24, T48	CNBG_3493.2	XP_003192954.1	conserved hypothetical protein	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	0	99	99
T24, T48	CNBG_2961.2	XP_003196574.1	subunit V Cytochrome C oxidase	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	2,00E-114	97	96
T24, T48	CNBG_4237.2	AFR95291.1	Fructosamine kinase	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	0	95	90

Tabela 7 | Proteínas (130) identificadas em *C.gattii* por LC MS/MS sob condição de hipóxia em T0, T24 e T48

ID Broad Institute	Proteína	T0 Contagem Espectral	T0 Cobertura (%)	T0 Peptídeos Únicos	T24 Contagem Espectral	T24 Cobertura (%)	T24 Peptídeos Únicos	T48 Contagem Espectral	T48 Cobertura (%)	T48 Peptídeos Únicos	Ion Score MAX ^a	Ion Score MIN ^a	Proteína Score MAX ^a	Proteína Score MIN ^a
CNBG_0031	Cyclophilin A	5	29	17	10	32	6	0	0	0	132	31,7	30,7	28,2
CNBG_0140	60S ribosomal protein L10	3	9	6	0	0	0	0	0	0	71,1	34,3	30,7	28,1
CNBG_0168	Hexokinase	0	0	0	1	7	1	4	11	4	171	49,3	29,4	27,4
CNBG_0179	40S ribosomal protein S16	4	22	13	0	0	0	0	0	0	76,6	35,4	29,1	27,9
CNBG_0239	Heat shock protein sks2	9	11	10	0	0	0	0	0	0	113	34,6	30,8	28,1
CNBG_0257	HHE domain-containing protein	0	0	0	6	23	4	0	0	0	99,4	33,8	29,7	27,6
CNBG_0493	Citrate synthase	9	12	10	18	18	10	0	0	0	98,1	30,8	30,4	26,9
CNBG_0519	60S ribosomal protein L9	3	15	9	0	0	0	0	0	0	85,3	31,4	29,7	28,4
CNBG_0547	Transketolase	6	11	9	0	0	0	0	0	0	109	35	30,2	27,5
CNBG_0564	Oxidoreductase	2	8	5	4	0	3	0	0	0	91,3	33,9	30,1	26,9
CNBG_0575	Proteína relacionada a recombinação meiótica	7	7	7	17	11	9	13	13	8	91,5	30,5	30,6	28
CNBG_0599	Copper/zinc superoxide dismutase	0	0	0	4	29	3	4	25	2	129	41,5	29,7	28,4
CNBG_0672	Oxidoreductase	0	0	0	7	20	5	13	24	8	104	30,7	30,4	27,8
CNBG_0705	Aconitase	6	6	6	2	3	1	0	0	0	86,8	33,8	29,7	27,5
CNBG_0793	60S ribosomal protein L18-A	6	16	11	0	0	0	0	0	0	134	34,9	30,9	28,4
CNBG_0995	Pyruvate decarboxylase	11	10	7	43	21	12	48	24	12	189	31,3	30,6	27,3
CNBG_1012	ATP-citrate synthase	6	4	5	0	0	0	0	0	0	91,3	33,8	30,3	28
CNBG_1047	Glycine hydroxymethyltransferase	3	7	5	12	20	9	9	10	5	98,1	31	30,3	28
CNBG_1068	Nucleoside-diphosphate kinase	3	17	10	4	16	3	0	0	0	120	41,5	30,6	28,3
CNBG_1093	LEA domain protein	13	10	8	16	9	9	41	14	15	199	32,6	30,9	26,9
CNBG_1144	NADH dehydrogenase	0	0	0	1	6	1	0	0	0	70,7	33,4	28,1	27,3
CNBG_1212	Electron carrier	0	0	0	5	45	3	0	0	0	85,3	32	30	27,3
CNBG_1273	60S ribosomal protein L7	2	13	8	0	0	0	0	0	0	80,1	32,9	29,7	27,2
CNBG_1288	40S ribosomal protein S4	3	11	7	0	0	0	0	0	0	73,1	32,6	30	29,3
CNBG_1355	Endopeptidase	0	0	0	0	0	0	10	13	6	141	33,7	29,8	28,1
CNBG_1429	Actin	5	9	7	0	0	0	0	0	0	111	36,6	30,8	28,2
CNBG_1432	Isocitrate dehydrogenase	1	8	5	0	0	0	0	0	0	88,6	44,6	28,8	28,4
CNBG_1460	3-isopropylmalate dehydrogenase	0	0	0	0	0	0	6	15	4	111	35,5	30,4	28,3
CNBG_1468	IMP dehydrogenase	0	0	0	3	6	2	5	7	4	98,7	32,4	30	27,9
CNBG_1489	Elongation factor 1-gamma	7	13	10	0	0	0	0	0	0	108	34,7	30,3	27,9
CNBG_1632	ATP synthase beta subunit	19	23	21	15	19	9	0	0	0	109	31,4	30,5	27,6
CNBG_1643	Small subunit ribosomal protein 14	2	16	9	0	0	0	0	0	0	71,4	34,6	29	28,8
CNBG_1745	Chitin deacetylase	0	0	0	0	0	0	3	8	3	81,6	39,1	30,5	26,3
CNBG_1793	H ⁺ -transporting two-sector ATPase subunit α	15	19	17	2	6	2	0	0	0	135	40,7	30,3	27,8
CNBG_1816	Ketol-acid reductoisomerase	3	9	6	0	0	0	0	0	0	92,5	31,7	29,6	26,7
CNBG_1829	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	0	0	0	1	11	1	0	0	0	71,1	38,5	28,8	28,4
CNBG_1866	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	15	4	11	22	5	43	31	9	130	32,5	30,3	27,6
CNBG_1904	Glycogen phosphorylase	6	5	6	0	0	0	0	0	0	74,8	35,3	30,4	28,3
CNBG_2051	L10e protein	4	9	6	0	0	0	0	0	0	91,9	34	29,3	28,2

ID Broad Institute	Proteína	T0 Contagem Espectral	T0 Cobertura (%)	T0 Peptídeos Únicos	T24 Contagem Espectral	T24 Cobertura (%)	T24 Peptídeos Únicos	T48 Contagem Espectral	T48 Cobertura (%)	T48 Peptídeos Únicos	Ion Score MAX ^a	Ion Score MIN ^a	Proteína Score MAX ^a	Proteína Score MIN ^a
CNBG_2 079	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	23	21	22	14	18	8	0	0	0	157	33,3	31,7	27,4
CNBG_2 132	Thiol-specific antioxidant protein 1	5	14	10	7	14	3	0	0	0	71,4	30,6	31,5	27,9
CNBG_2 246	Phosphoglycerate kinase	4	8	6	0	0	0	0	0	0	75,1	34,8	31	27,9
CNBG_2 278	UDP-xylose synthase	5	9	7	6	11	5	0	0	0	106	31,7	29,7	27,9
CNBG_2 284	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	0	0	0	2	16	2	0	0	0	90,7	43,6	28,5	27,5
CNBG_2 340	Arf small monomeric GTPase	1	12	7	8	35	5	2	14	1	125	33,3	30,3	27,3
CNBG_2 364	Malate dehydrogenase	17	36	27	24	41	9	0	0	0	111	32,8	30	26,9
CNBG_2 387	40S ribosomal protein S8	3	13	8	0	0	0	0	0	0	104	45	29,9	27,9
CNBG_2 389	Orotidine monophosphate pyrophosphorylase	1	11	6	0	0	0	0	0	0	73,6	52,3	29,7	28,3
CNBG_2 499	Phosphomannomutase	5	24	15	0	0	0	0	0	0	105	35,5	29,6	28
CNBG_2 539	Enoyl-CoA hydratase	0	0	0	7	19	5	5	13	2	122	35	31,3	27,5
CNBG_2 661	Manganese superoxide dismutase	4	14	9	8	19	3	6	16	3	126	38,7	29,3	27,9
CNBG_2 826	Lactoylglutathione lyase	0	0	0	2	17	2	5	17	3	62,3	31,7	30	28
CNBG_2 947	Adenylate kinase	9	25	17	8	31	5	0	0	0	173	31,6	30,8	27,3
CNBG_2 961	Subunit V cytochrome c oxidase	0	0	0	2	26	2	7	33	4	126	36,5	31,2	27,3
CNBG_2 962	40S ribosomal protein	3	15	9	0	0	0	0	0	0	103	37,2	29,3	28,7
CNBG_2 968	Transaldolase	18	34	10	47	41	12	45	41	12	145	30,1	31	28
CNBG_3 052	5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate homocysteine S-methyltransferase	3	6	5	0	0	0	0	0	0	112	38,7	29,8	28,3
CNBG_3 166	Phosphogluconate dehydrogenase	21	22	21	0	0	0	0	0	0	110	30,2	29,9	28
CNBG_3 175	SNARE protein YKT6	0	0	0	1	10	1	0	0	0	106	38,8	30,7	28,4
CNBG_3 206	Rab small monomeric GTPase	0	0	0	0	0	0	3	22	2	103	33,1	29,9	27,5
CNBG_3 266	Hsp70	17	19	18	19	13	10	4	4	2	141	30,8	30,5	27
CNBG_3 344	Pyruvate kinase	5	7	6	4	5	2	0	0	0	87,8	35,7	30,1	27,8
CNBG_3 405	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2	6	4	0	0	0	0	0	0	92,5	33,5	28,5	27,8
CNBG_3 418	Inorganic phosphate transporter pho88	0	0	0	3	17	2	1	14	1	104	50,2	30,1	28,2
CNBG_3 471	Rab/GTPase	2	22	12	8	26	3	8	28	3	108	35,4	31,4	27,8
CNBG_3 502	Aminotransferase	0	0	0	1	5	1	0	0	0	45,8	35,8	30,1	28,6
CNBG_3 615	Voltage-dependent ion-selective channel	10	24	7	18	40	10	40	52	13	147	32,5	30	27,8
CNBG_3 628	Diamine N-acetyltransferase	0	0	0	0	0	0	5	17	3	72,2	36,2	29,5	28,4
CNBG_3 703	Phosphopyruvate hydratase	8	16	5	32	31	10	56	37	12	184	31	31,2	25,3
CNBG_3 719	Deoxyribose-phosphate aldolase	1	11	6	0	0	0	0	0	0	69,5	40,5	28,6	28,4
CNBG_3 734	Phosphoketolase	31	14	12	42	17	17	0	0	0	126	30,8	30,1	27,7
CNBG_3 846	Glycine dehydrogenase	1	3	2	0	0	0	0	0	0	92,7	46,7	29,4	28,3
CNBG_3 853	ATP synthase	7	23	15	4	13	2	13	36	7	125	34,6	30,7	28
CNBG_3 860	Glutamate dehydrogenase	7	16	11	0	0	0	0	0	0	113	31,2	29,4	27,9
CNBG_3 878	Zinc-binding dehydrogenase	9	17	13	0	0	0	0	0	0	122	34,2	31	28
CNBG_3 964	Flavo-hemoglobin	8	11	10	0	0	0	0	0	0	94,2	47	29,3	27,6
CNBG_3 998	Nucleoside-diphosphate kinase	5	26	15	8	26	3	13	42	4	155	31,9	29	26,6

ID Broad Institute	Proteína	T0 Contagem Espectral	T0 Cobertura (%)	T0 Peptídeos Únicos	T24 Contagem Espectral	T24 Cobertura(%)	T24 Peptídeos Únicos	T48 Contagem Espectral	T48 Cobertura (%)	T48 Peptídeos Únicos	Ion Score MAX ^a	Ion Score MIN ^a	Proteína Score MAX ^a	Proteína Score MIN ^a
CNBG_4048	Uracil phosphoribosyltransferase	0	0	0	5	14	4	3	21	2	107	35,9	30	27,1
CNBG_4076	Rab11 protein	0	0	0	1	10	1	0	0	0	81	37,3	29,8	29,6
CNBG_4216	Mitochondria fission 1 protein	0	0	0	0	0	0	5	29	3	120	38,5	29,5	26,9
CNBG_4237	Frutosamina quinase	0	0	0	3	13	3	9	18	4	162	38,9	31,5	26,4
CNBG_4499	Conserved hypothetical protein	9	9	9	0	0	0	0	0	0	120	34,6	30	28,2
CNBG_4617	GTP-binding protein ypt1	5	17	11	13	36	7	15	43	9	126	34	31,4	27,6
CNBG_4696	catalase 1	4	6	5	22	12	7	0	0	0	130	30,7	31,4	26,1
CNBG_4706	UDP-glucose dehydrogenase	5	7	3	32	23	12	55	39	15	156	31,1	30,6	26,5
CNBG_4789	conserved hypothetical protein	3	16	9	8	33	4	8	44	4	115	36,5	31,7	28,3
CNBG_4801	aspartate aminotransferase	5	9	7	4	9	3	0	0	0	96,1	36,3	30,4	28,3
CNBG_4834	Translation elongation factor EF1-alpha	5	6	6	0	0	0	0	0	0	68,6	31,4	30,6	28
CNBG_4857	Hsp90-like protein (cytoplasmic chaperone)	5	8	6	0	0	0	0	0	0	109	39,1	29,5	27,5
CNBG_4876	Carboxylesterase	0	0	0	3	10	2	4	12	3	83,6	37,6	29,3	28,3
CNBG_4912	Heat shock protein	10	12	11	15	21	10	0	0	0	139	31	30,4	26,5
CNBG_5138	Phosphoglucomutase	7	10	9	0	0	0	0	0	0	89,1	31,6	29,7	28,1
CNBG_5247	Fatty acid synthase beta subunit	7	2	5	0	0	0	0	0	0	135	35,6	29,8	28,2
CNBG_5282	6-phosphogluconolactonase	0	0	0	4	10	2	0	0	0	99,7	49,2	29,6	28,3
CNBG_5375	60S ribosomal protein L6	5	20	13	0	0	0	0	0	0	97,9	34,4	28,9	27,9
CNBG_5466	40S ribosomal protein S3ae-a	2	12	7	0	0	0	0	0	0	121	35	29,9	28
CNBG_5498	Structural molecule	6	21	13	4	27	3	11	39	6	132	36,4	29,8	28,3
CNBG_5520	Cytoplasm protein	0	0	0	8	17	4	8	22	5	142	33,6	30,3	26,5
CNBG_5531	Cytoplasm protein	5	21	13	11	28	4	6	25	3	143	33,2	29,2	27
CNBG_5545	CIP1 protein	0	0	0	1	10	1	0	0	0	78,9	45,5	30,2	27
CNBG_5551	Glucose-6-phosphate isomerase	2	7	4	0	0	0	0	0	0	66,3	37,8	30,3	27,8
CNBG_5573	Heat shock protein	9	13	11	9	17	7	0	0	0	187	31,6	30,6	26,9
CNBG_5683	MMS2 protein	3	5	4	0	0	0	0	0	0	125	43,5	29,7	28,3
CNBG_5765	14-3-3 protein	15	37	26	0	0	0	0	0	0	104	33	31,8	27,7
CNBG_5905	Translation elongation factor 2	7	6	7	0	0	0	0	0	0	69,1	30,5	30,1	26,9
CNBG_5972	Ribose-5-phosphate isomerase	0	0	0	6	22	4	16	40	9	179	37,6	30,2	26,9
CNBG_5977	Adenine phosphoribosyltransferase	0	0	0	6	26	4	3	16	3	115	35	30,7	27,9
CNBG_5992	60S ribosomal protein L20	3	17	10	0	0	0	0	0	0	91,1	34,7	30,4	28,2
CNBG_6075	S-adenosylhomocysteine hydrolase	0	0	0	6	13	4	2	7	2	84,5	31,5	30,8	28,3
CNBG_6127	Histone h2b	0	0	0	0	0	0	11	29	4	115	33	31,3	27,9
CNBG_6174	Transketolase	6	8	4	19	17	11	44	27	16	102	30,7	31,9	26,8

ID Broad Institute	Proteína	T0 Contagem Espectral	T0 Cobertura (%)	T0 Peptídeos Únicos	T24 Contagem Espectral	T24 Cobertura (%)	T24 Peptídeos Únicos	T48 Contagem Espectral	T48 Cobertura (%)	T48 Peptídeos Únicos	Ion Score MAX ^a	Ion Score MIN ^a	Proteína Score MAX ^a	Proteína Score MIN ^a
CNBG_6200	Fructose-bisphosphate aldolase	0	0	0	6	16	3	4	11	2	137	30,6	30,4	27,4
CNBG_5278	Conserved hypothetical protein	9	5	7	0	0	0	0	0	0	116	39,9	29,3	28,2
CNBG_4796	Conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	0	7	7	4	113	40,6	30,2	27,8
CNBG_4819	Conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	0	2	9	2	127	37,9	29,8	28,2
CNBG_4297	Conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	0	1	8	1	82	45,1	29,4	28,6
CNBG_2989	Conserved hypothetical protein	4	18	11	11	39	5	6	18	2	178	41,3	30	26,5
CNBG_3493	Conserved hypothetical protein	3	12	8	8	13	3	7	18	4	121	31,5	29,1	27,2
CNBG_3197	Conserved hypothetical protein	0	0	0	3	5	2	0	0	0	71,9	38,3	29	28,7
CNBG_2881	Conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	0	2	3	2	84,4	48,5	29,5	28,5
CNBG_2659	Conserved hypothetical protein	16	42	29	8	36	5	0	0	0	130	33,8	31,5	28,3
CNBG_1981	Conserved hypothetical protein	0	0	0	1	12	1	0	0	0	67,9	48,5	28,6	27,8
CNBG_1497	Conserved hypothetical protein	0	0	0	1	13	1	0	0	0	159	72	29,5	26,6
CNBG_1302	Conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	0	4	16	3	112	36,6	29,6	28,5
CNBG_0997	Conserved hypothetical protein	2	11	7	6	24	5	4	14	3	109	32,3	30,8	28,3
CNBG_0629	Conserved hypothetical protein	3	11	7	12	21	8	7	17	5	94,2	36,4	30,8	28,1
CNBG_0774	Conserved hypothetical protein	6	25	15	9	32	4	18	58	8	169	32,2	29,7	26,5
CNBG_0624	Conserved hypothetical protein	0	0	0	0	0	0	1	15	1	75,7	39,3	29,2	28,9
CNBG_0463	Conserved hypothetical protein	0	0	0	2	8	2	0	0	0	95,5	44,9	28,9	28,4
CNBG_0419	Conserved hypothetical protein	1	8	5	0	0	0	0	0	0	77,4	36,3	29	28,1

^a Score do MASCOT corresponde a $-10 \times \log(P)$, em que P é a probabilidade de se observar um evento aleatório. Scores individuais > 22 indicam identidade ou homologia para $p \leq 0,05$.

Tabela 8| Lista das 190 das proteínas de *C.gattii* identificadas por LC MS/MS sob condição de hipóxia em T0, T24 e T48

ID Broad Institute	Proteína
CNBG_2968	Transaldolase
CNBG_0995	Pyruvate decarboxylase
CNBG_3703	Phosphopyruvate hydratase
CNBG_4706	UDP-glucose dehydrogenase
CNBG_3734	Phosphoketolase
CNBG_6174	Transketolase
CNBG_1093	Predicted protein
CNBG_3615	Voltage-dependent ion-selective channel
CNBG_1866	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
CNBG_1632	ATP synthase beta subunit
CNBG_2364	Malate dehydrogenase
CNBG_2079	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase
CNBG_4617	GTP-binding protein ypt1
CNBG_4696	Catalase 1
CNBG_3166	Phosphogluconate dehydrogenase
CNBG_0493	Citrate synthase
CNBG_1047	Glycine hydroxymethyltransferase
CNBG_3998	Nucleoside-diphosphate kinase
CNBG_2132	Thiol-specific antioxidant protein 1
CNBG_5531	Cytoplasm protein
CNBG_3853	ATP synthase
CNBG_0672	Oxidoreductase
CNBG_1793	H ⁺ -transporting two-sector ATPase subunit alpha
CNBG_5972	Ribose-5-phosphate isomerase
CNBG_5498	Structural molecule
CNBG_2989	Conserved hypothetical protein
CNBG_2661	Manganese superoxide dismutase
CNBG_2947	Adenylate kinase
CNBG_4789	Conserved hypothetical protein
CNBG_5520	Cytoplasm protein
CNBG_6200	Fructose-bisphosphate aldolase
CNBG_3471	Rab/GTPase
CNBG_0031	Cyclophilin A
CNBG_2340	ARF small monomeric GTPase
CNBG_2539	Enoyl-CoA hydratase
CNBG_6127	Histone h2b
CNBG_0705	Aconitase
CNBG_5977	Adenine phosphoribosyltransferase
CNBG_0257	HHE domain-containing protein
CNBG_3344	Pyruvate kinase
CNBG_2278	UDP-xylose synthase
CNBG_4499	Conserved hypothetical protein
CNBG_5414	YjgF family translation initiation inhibitor

ID Broad Institute	Proteína
CNBG_1212	Electron carrier
CNBG_6075	S-adenosylhomocysteine hydrolase
CNBG_3878	Zinc-binding dehydrogenase
CNBG_0168	Hexokinase
CNBG_0599	Copper/zinc superoxide dismutase
CNBG_1468	IMP dehydrogenase
CNBG_4048	Uracil phosphoribosyltransferase 1
CNBG_4801	Aspartate aminotransferase
CNBG_5551	Glucose-6-phosphate isomerase
CNBG_1355	Endopeptidase
CNBG_1460	3-isopropylmalate dehydrogenase
CNBG_1068	Nucleoside-diphosphate kinase
CNBG_3860	Glutamate dehydrogenase
CNBG_5905	Translation elongation factor 2
CNBG_5138	Phosphoglucomutase
CNBG_4876	Carboxylesterase
CNBG_0564	Oxidoreductase
CNBG_3964	Flavo-hemoglobin
CNBG_3206	RAB small monomeric GTPase
CNBG_1012	ATP-citrate synthase
CNBG_2826	Lactoylglutathione lyase
CNBG_2499	Phosphomannomutase
CNBG_5282	6-phosphogluconolactonase
CNBG_1829	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
CNBG_5247	Fatty acid synthase beta subunit
CNBG_4834	Translation elongation factor EF1-alpha
CNBG_1489	Elongation factor 1-gamma
CNBG_0140	60S ribosomal protein L10
CNBG_3047	Aldehyde reductase
CNBG_2284	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
CNBG_1904	Glycogen phosphorylase
CNBG_0793	60S ribosomal protein L18-A
CNBG_0547	Transketolase
CNBG_4216	Mitochondria fission 1 protein
CNBG_5375	60S ribosomal protein L6
CNBG_5463	Leucyl aminopeptidase
CNBG_3418	Inorganic phosphate transporter pho88
CNBG_6205	3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase
CNBG_1432	Isocitrate dehydrogenase
CNBG_3628	Diamine N-acetyltransferase
CNBG_2962	40S ribosomal protein
CNBG_1816	ketol-acid reductoisomerase
CNBG_1288	40S ribosomal protein S4
CNBG_0179	40S ribosomal protein S16
CNBG_1429	Actin

ID Broad Institute	Proteína
CNBG_4420	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta
CNBG_1144	NADH dehydrogenase
CNBG_4076	Rab11 protein
CNBG_2852	Phosphoribosylformylglycinamide synthase
CNBG_2246	Phosphoglycerate kinase
CNBG_5422	Sui1 protein
CNBG_2316	60S ribosomal protein L24
CNBG_0519	60S ribosomal protein L9
CNBG_3846	Glycine dehydrogenase
CNBG_2051	L10e protein
CNBG_5683	MMS2 protein
CNBG_5992	60S ribosomal protein L20
CNBG_3175	SNARE protein YKT6
CNBG_5807	Glycogen debranching enzyme
CNBG_3281	Phosphatase
CNBG_3405	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
CNBG_3052	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase
CNBG_1745	Chitin deacetylase
CNBG_3502	Aminotransferase
CNBG_5466	40S ribosomal protein S3ae-a
CNBG_2387	40S ribosomal protein S8
CNBG_5469	20S proteasome subunit
CNBG_1643	Small subunit ribosomal protein 14
CNBG_1273	60S ribosomal protein L7
CNBG_5839	60S ribosomal protein L11
CNBG_2617	40S ribosomal protein S7
CNBG_4399	Cytochrome-b5 reductase
CNBG_0721	40S ribosomal protein S13
CNBG_3948	Ribosomal protein L12
CNBG_0274	Chaperone heat-shock protein
CNBG_1015	Multiprotein-bridging factor 1
CNBG_5545	CIP1 protein
CNBG_4184	ATP synthase subunit gamma
CNBG_4805	Ribosomal protein L13
CNBG_2923	40S ribosomal protein S0
CNBG_5248	Fatty acid synthase complex protein
CNBG_3943	60S ribosomal protein L15
CNBG_5603	Ras2 protein (364 aa)
CNBG_3719	Deoxyribose-phosphate aldolase
CNBG_3347	Myo inositol monophosphatase
CNBG_4938	Glutathione-S-transferase
CNBG_4161	Coproporphyrinogen oxidase
CNBG_3456	Thioredoxin
CNBG_1784	Acetyl-CoA carboxylase

ID Broad Institute	Proteína
CNBG_3060	grpE protein
CNBG_3070	mitochondrion protein
CNBG_2389	orotidine monophosphate pyrophosphorylase
CNBG_4659	maltose O-acetyltransferase
CNBG_4318	ribosomal protein L4
CNBG_3690	HmpI protein
CNBG_3733	beta-fructofuranosidase
CNBG_1661	ubiquitin-conjugating enzyme E2
CNBG_3748	cytoplasm protein
CNBG_4808	glucosamine-6-phosphate isomerase
CNBG_4651	succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase
CNBG_4851	cytoplasm protein
CNBG_2346	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
CNBG_5724	microtubule binding protein
CNBG_0686	elongation factor 3
CNBG_2849	O-methyltransferase
CNBG_0025	cyclophilin A
CNBG_0077	oxoglutarate dehydrogenase
CNBG_0723	glycerol kinase
CNBG_5879	conserved hypothetical protein
CNBG_3266	conserved hypothetical protein
CNBG_0575	conserved hypothetical protein
CNBG_2659	conserved hypothetical protein
CNBG_0774	conserved hypothetical protein
CNBG_3493	conserved hypothetical protein
CNBG_4912	conserved hypothetical protein
CNBG_5573	conserved hypothetical protein
CNBG_0629	conserved hypothetical protein
CNBG_1228	conserved hypothetical protein
CNBG_0290	conserved hypothetical protein
CNBG_5635	conserved hypothetical protein
CNBG_1497	conserved hypothetical protein
CNBG_0419	conserved hypothetical protein
CNBG_4297	conserved hypothetical protein
CNBG_0568	conserved hypothetical protein
CNBG_3164	conserved hypothetical protein
CNBG_3684	predicted protein
CNBG_2193	conserved hypothetical protein
CNBG_0624	conserved hypothetical protein
CNBG_3634	conserved hypothetical protein
CNBG_3117	conserved hypothetical protein
CNBG_4819	conserved hypothetical protein
CNBG_4857	conserved hypothetical protein
CNBG_5267	conserved hypothetical protein
CNBG_0463	conserved hypothetical protein

ID Broad Institute	Proteína
CNBG_2881	conserved hypothetical protein
CNBG_1981	conserved hypothetical protein
CNBG_1302	conserved hypothetical protein
CNBG_4796	conserved hypothetical protein
CNBG_3197	conserved hypothetical protein
CNBG_0239	Conserved hypothetical protein
CNBG_5278	Conserved hypothetical protein
CNBG_2961	Hypothetical protein
CNBG_5765	Conserved hypothetical protein
CNBG_0997	Conserved hypothetical protein
CNBG_4237	Conserved hypothetical protein
CNBG_5006	Conserved hypothetical protein

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M. A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, n. 2, p. 83-91, Feb 2006. ISSN 0301-486X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16463091> >.

ABU KWAIK, Y.; BUMANN, D. Microbial quest for food in vivo: 'nutritional virulence' as an emerging paradigm. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 6, p. 882-90, Jun 2013. ISSN 1462-5822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23490329> >.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar 2003. ISSN 0028-0836. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634793> >.

ALBRECHT, D. *et al.* Integration of transcriptome and proteome data from human pathogenic fungi by using a data warehouse. **J Integ Bioinformat**, v. 4, p. e52, 2007.

ALCAZAR-FUOLI, L. *et al.* *Aspergillus fumigatus* C-5 sterol desaturases Erg3A and Erg3B: Role in sterol biosynthesis and antifungal drug susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 453 - 460, 2006.

ALSPAUGH, J. A. *et al.* RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 36, n. 2, p. 352-65, Apr 2000. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792722> >.

AMINNEJAD, M. *et al.* Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 337-46, Jun 2012. ISSN 1573-0832. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081254> >.

ASKEW, C. *et al.* Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 5, p. e1000612, 2009.

BACON, B. E. *et al.* Structure of the O-deacetylated glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* Cap70 as determined by 2D NMR spectroscopy. **Carbohydr Res**, v. 283, p. 95-110, Mar 1996. ISSN 0008-6215. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901265> >.

BAHN, Y. S. *et al.* Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. **Curr Biol**, v. 15, n. 22, p. 2013-20,

Nov 2005. ISSN 0960-9822. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16303560> >.

BAHN, Y. S.; JUNG, K. W. Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus*. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 12, p. 1564-77, Dec 2013. ISSN 1535-9786. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078305> >.

BALLOU, E. R. *et al.* Ras1 acts through duplicated Cdc42 and Rac proteins to regulate morphogenesis and pathogenesis in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genet**, v. 9, n. 8, p. e1003687, 2013. ISSN 1553-7404. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950731> >.

BARKER BM, K. K., VÖDISCH M, MAZURIE A, KNIEMEYER O, CRAMER RA. Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. 2012.

BARRON, M.; MADINGER, N. Opportunistic fungal infections, part 2: *Candida* and *Aspergillus*. **Infect Med**, v. 25, p. 498 - 505, 2008.

BAUM, E. *et al.* Identification and characterization of new inhibitors of the *Escherichia coli* MurA enzyme. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 3182 - 3188, 2001.

BECKER-RITT, A. B. *et al.* Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 971-83, Dec 2007. ISSN 0041-0101. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825863> >.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J Roy Stat Soc**, v. 57, p. 289 - 300, 1995.

BERGMANN, S. *et al.* alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Mol Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 1273-87, Jun 2001. ISSN 0950-382X. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11442827> >.

BETTS, J. C.; SMITH, M. A. Proteomics. **Methods Mol Med**, v. 54, p. 315-34, 2001. ISSN 1543-1894. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21341085> >.

BHANDARI, T.; NIZET, V. Hypoxia-Inducible Factor (HIF) as a Pharmacological Target for Prevention and Treatment of Infectious Diseases. **Infect Dis Ther**, Jun 2014. ISSN 2193-8229. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25134687> >.

BIEN, C. M. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Site-2 protease is required for virulence and survival in the presence of azole drugs. **Mol Microbiol**, v. 74, n. 3, p. 672-90, Nov 2009. ISSN 1365-2958. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818023> >.

BIEN, C. M.; ESPENSHADE, P. J. Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 3, p. 352-9, Mar 2010. ISSN 1535-9786. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20118213> >.

BLATZER, M. *et al.* SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Genet**, v. 7, p. e1002374, 2011.

BLOSSER, S.; CRAMER, R. SREBP dependent triazole susceptibility in *Aspergillus fumigatus* is mediated through direct transcriptional regulation of *erg11A/cyp51A*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 248 - 257, 2012.

BOELTE, K. *et al.* Rgs2 mediates pro-angiogenic function of myeloid derived suppressor cells in the tumor microenvironment via upregulation of MCP-1. **PloS One**, v. 6, p. e18534, 2011.

BONATTI, H. *et al.* Successful management of postpneumonectomy *Aspergillus* pleural empyema by combined surgical and anti-fungal treatment with voriconazole and caspofungin. **Mycoses**, v. 53, p. 448 - 454, 2010.

BOVERS, M. *et al.* Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 599-607, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696655> >.

AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 7, p. 1105-8, Jul 2008. ISSN 1080-6059. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598632> >.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 20, p. 11041-8, Sep 1999. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500120> >.

BROWN, S. M.; CAMPBELL, L. T.; LODGE, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 320-5, Aug 2007. ISSN 1369-5274. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707685> >.

BUI, T. *et al.* Isolates of *Cryptococcus neoformans* from infected animals reveal genetic exchange in unisexual, alpha mating type populations. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 10, p. 1771-80, Oct 2008. ISSN 1535-9786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552280> >.

BURKE, P. V.; POYTON, R. O. Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase. **J Exp Biol**, v. 201, n. Pt 8, p. 1163-75, Apr 1998. ISSN 0022-0949. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9510528> >.

BUTLER, G. Hypoxia and Gene Expression in Eukaryotic Microbes. **Annu Rev Microbiol**, Jun 2013. ISSN 1545-3251. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23808338> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684347> >.

Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942> >.

A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002205, Sep 2011. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909264> >.

CADIEUX, B. *et al.* The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **J Infect Dis**, v. 207, n. 8, p. 1339-47, Apr 2013. ISSN 1537-6613. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322859> >.

CARRICONDE, F. *et al.* Clonality and α -a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population--an emerging outbreak in Australia. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16936, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383989> >.

CASTELLO, P. R. *et al.* Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. **Cell Metab**, v. 3, n. 4, p. 277-87, Apr 2006. ISSN 1550-4131. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581005> >.

Oxygen-regulated isoforms of cytochrome c oxidase have differential effects on its nitric oxide production and on hypoxic signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 24, p. 8203-8, Jun 2008. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388202> >.

CATTANA, M. E. *et al.* Native trees of the Northeast Argentina: Natural hosts of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Rev Iberoam Micol**, Jun 2013. ISSN 2173-9188. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810786> >.

CHANG, Y. *et al.* Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 64, p. 614 - 629, 2007.

CHANG, Y. C. *et al.* Molecular mechanisms of hypoxic responses via unique roles of Ras1, Cdc24 and Ptp3 in a human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genet**, v. 10, n. 4, p. e1004292, Apr 2014. ISSN 1553-7404. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24762475> >.

CHATTERJEE, S. *et al.* Using solid-state NMR to monitor the molecular consequences of *Cryptococcus neoformans* melanization with different catecholamine precursors. **Biochemistry**, v. 51, n. 31, p. 6080-8, Aug 2012. ISSN 1520-4995. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22765382> >.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 11, p. 564-71, Nov 2011. ISSN 1878-4380. Available at: < <http://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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984867> >.

CHEN, S. *et al.* Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 499-508, Aug 2000. ISSN 1058-4838. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987712> >.

CHEN, S. C. *et al.* Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **J Infect Dis**, v. 175, n. 2, p. 414-20, Feb 1997. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203663> >.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635827> >.

CHEUNG, R.; ESPENSHADE, P. J. Structural requirements for sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage in fission yeast. **J Biol Chem**, v. 288, n. 28, p. 20351-60, Jul 2013. ISSN 1083-351X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729666> >.

CHOKSI, K. B. *et al.* Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1688, n. 2, p. 95-101, Mar 2004. ISSN 0006-3002. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990339> >.

CHONG, H. S. *et al.* Time-course proteome analysis reveals the dynamic response of *Cryptococcus gattii* cells to fluconazole. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42835, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880118> >.

CHOW, S. K.; CASADEVALL, A. Evaluation of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan-protein conjugate as vaccine candidate against murine cryptococcosis. **Vaccine**, v. 29, n. 10, p. 1891-8, Feb 2011. ISSN 1873-2518. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238568> >.

CHOWDHARY, A. *et al.* Temperate climate niche for *Cryptococcus gattii* in Northern Europe. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 1, p. 172-4, Jan 2012. ISSN 1080-6059. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261398> >.

CHUN, C. D.; LIU, O. W.; MADHANI, H. D. A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 2, p. e22, Feb 2007. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319742> >.

CHUNG, D.; HAAS, H.; CRAMER, R. A. Coordination of hypoxia adaptation and iron homeostasis in human pathogenic fungi. **Front Microbiol**, v. 3, p. 381, 2012. ISSN 1664-302X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133438> >.

CLARK-WALKER, G. D. Kinetic properties of F1-ATPase influence the ability of yeasts to grow in anoxia or absence of mtDNA. **Mitochondrion**, v. 2, n. 4, p. 257-65, Mar 2003. ISSN 1567-7249. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120326> >.

COLEMAN, S. *et al.* Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 276, p. 244 - 250, 2001.

CONNER, J. R.; BEISSWENGER, P. J.; SZWERGOLD, B. S. Some clues as to the regulation, expression, function, and distribution of fructosamine-3-kinase and fructosamine-3-kinase-related protein. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1043, p. 824-36, Jun 2005. ISSN 0077-8923. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037310> >.

CORDERO, R. J. *et al.* Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. **J Immunol**, v. 190, n. 1, p. 317-23, Jan 2013. ISSN 1550-6606. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233725> >.

COSTA, S. O. P. *et al.* First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 662-4, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722095> >.

CRAMER, R.; RIVERA, A.; HOHL, T. Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: What have we learned? **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, p. 315 - 322, 2011.

CRAMER, T. *et al.* HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell**, v. 112, p. 645 - 657, 2003.

CROSS, F.; BLAKE, C. The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. **Mol Cell Biol**, v. 13, p. 3266 - 3271, 1993.

CROWE, J. D. *et al.* *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1637-51, Mar 2003. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622818> >.

CUI, X.; CHURCHILL, G. A. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. **Genome Biol**, v. 4, n. 4, p. 210, 2003. ISSN 1465-6914. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702200> >.

D'SOUZA, C. A. *et al.* Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. **MBio**, v. 2, n. 1, p. e00342-10, 2011. ISSN 2150-7511. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304167> >.

DAMERVAL, C. *et al.* Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, p. 52 - 54, 1986.

DATTA, K. *et al.* Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. 1185-91, Aug 2009. ISSN 1080-6059. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19757550> >.

DAVIES, B.; RINE, J. A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 174, p. 191 - 201, 2006.

DE GROOT, M. *et al.* Quantitative proteomics and transcriptomics of anaerobic and aerobic yeast cultures reveals post-transcriptional regulation of key cellular processes. **Microbiology**, v. 153, p. 3864 - 3878, 2007.

DE HOON, M. *et al.* Open source clustering software. **Bioinformatics**, v. 20, p. 1453 - 1454, 2004.

DE JESUS, M. *et al.* Galactoxylomannans from *Cryptococcus neoformans* varieties *neoformans* and *grubii* are structurally and antigenically variable. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 7, p. 1018-28, Jul 2010. ISSN 1535-9786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20061411> >.

Galactoxylomannan-mediated immunological paralysis results from specific B cell depletion in the context of widespread immune system damage. **J Immunol**, v. 183, n. 6, p. 3885-94, Sep 2009. ISSN 1550-6606. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684080> >.

DE MAIO, A. Extracellular Hsp70: Export and Function. **Curr Protein Pept Sci**, Mar 2014. ISSN 1875-5550. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24694368> >.

DEHDASHTI, S. J. *et al.* A high-throughput screening assay for assessing the viability of *Cryptococcus neoformans* under nutrient starvation conditions. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, n. 21, p. 6823-9, Aug 2013. ISSN 1618-2650. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812880> >.

DELGADO, M. *et al.* The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. **Microbiology**, v. 147, p. 411 - 417, 2001.

DIANO, A. *et al.* Physiology of *Aspergillus niger* in oxygen-limited continuous cultures: Influence of aeration, carbon source concentration and dilution rate. **Biotechnol Bioeng**, v. 103, p. 956 - 965, 2009.

DOERING, T. L. *et al.* Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Med Mycol**, v. 37, n. 3, p. 175-81, Jun 1999. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421849> >.

DONOFRIO, F. C. *et al.* Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 6, p. 706-13, Jun 2009. ISSN 0022-2615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429745> >.

DOPAÑO, J.; CARAZO, J. Phylogenetic reconstruction using an unsupervised growing neural network that adopts the topology of a phylogenetic tree. **J Mol Evol**, v. 44, p. 226 - 233, 1997.

DOY, C. *et al.* Genomic clones of *Aspergillus nidulans* containing AlcA, the structural gene for alcohol dehydrogenase and AlcR, a regulatory gene for ethanol metabolism. **DNA**, v. 4, p. 105 - 114, 1985.

DYBALLA, N.; METZGER, S. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. **J Vis Exp**, n. 30, 2009. ISSN 1940-087X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684561> >.

Fast and sensitive coomassie staining in quantitative proteomics. **Methods Mol Biol**, v. 893, p. 47-59, 2012. ISSN 1940-6029. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665293> >.

EDEN, E. *et al.* Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. **PLoS Comput Biol**, v. 3, p. e39, 2007.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, n. 3, p. 931-40, Feb 2012. ISSN 1432-0614. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173481> >.

EISENMAN, H. C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 12, p. 3954-62, Dec 2007. ISSN 1350-0872. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048910> >.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans var. gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-4, Jul 1990. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199524> >.

EMERY, H. S. *et al.* Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5694-7, Dec 1994. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7960156> >.

ERICKSON, T. *et al.* Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on VPH1. **Mol Microbiol**, v. 42, n. 4, p. 1121-31, Nov 2001. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737651> >.

ERNST, J.; TIELKER, D. Responses to hypoxia in fungal pathogens. **Cell Microbiol**, v. 11, p. 183 - 190, 2009.

ESPENSHADE, P. J.; HUGHES, A. L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. **Annu Rev Genet**, v. 41, p. 401-27, 2007. ISSN 0066-4197. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17666007> >.

FERREIRA, M. *et al.* The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol**, v. 43, p. S313 - S319, 2005.

FLECK, C.; BROCK, M. *Aspergillus fumigatus* catalytic glucokinase and hexokinase: expression analysis and importance for germination, growth, and conidiation. **Eukaryot Cell**, v. 9, p. 1120 - 1135, 2010.

FRASER, J. A. *et al.* Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1360-4, Oct 2005. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222245> >.

FRASER, J. A.; HEITMAN, J. Evolution of fungal sex chromosomes. **Mol Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 299-306, Jan 2004. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14756773> >.

FRASER, J. A. *et al.* Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 5, p. 1036-45, Oct 2003. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555486> >.

FREDLUND, E. *et al.* Oxygen and carbon source-regulated expression of PDC and ADH genes in the respiratory yeast *Pichia anomala*. **Yeast**, v. 23, n. 16, p. 1137-49, Dec 2006. ISSN 0749-503X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17133621> >.

GALANIS, E. *et al.* Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 251-7, Feb 2010. ISSN 1080-6059. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113555> >.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 10, p. 3204-9, Oct 1999. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488178> >.

GARCIA-RIVERA, J. *et al.* Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 12, p. 989-98, Dec 2005. ISSN 1087-1845. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289955> >.

GARZIA, A. *et al.* The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces brlA expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol**, v. 75, p. 1314 - 1324, 2010.

GATLIN, C. L. *et al.* Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography-microspray and nanospray mass spectrometry. **Anal Biochem**, v. 263, n. 1, p. 93-101, Oct 1998. ISSN 0003-2697. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9750149> >.

GAUCI, V. J.; PADULA, M. P.; COORSSSEN, J. R. Coomassie blue staining for high sensitivity gel-based proteomics. **J Proteomics**, v. 90, p. 96-106, Sep 2013. ISSN 1876-7737. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428344> >.

GEMAYEL, R. *et al.* Many fructosamine 3-kinase homologues in bacteria are ribulosamine/erythrosamine 3-kinases potentially involved in protein deglycation. **FEBS**

J, v. 274, n. 17, p. 4360-74, Sep 2007. ISSN 1742-464X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681011> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627494> >.

GILES, S. S. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 9, p. 1447-59, Sep 2006. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963629> >.

GILLINGHAM, A. K.; MUNRO, S. The small G proteins of the Arf family and their regulators. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 579-611, 2007. ISSN 1081-0706. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506703> >.

GOLDBERG, M. A.; DUNNING, S. P.; BUNN, H. F. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. **Science**, v. 242, n. 4884, p. 1412-5, Dec 1988. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2849206> >.

GOLDMAN, D. *et al.* *Cryptococcus neoformans* induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta in human microglia: role of specific antibody and soluble capsular polysaccharide. **Infect Immun**, v. 69, n. 3, p. 1808-15, Mar 2001. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179358> >.

GOULART, L. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genes preferentially expressed during rat macrophage infection. **Med Mycol**, v. 48, n. 7, p. 932-41, Nov 2010. ISSN 1460-2709. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20302549> >.

GRAHL, N.; CRAMER, R. Regulation of hypoxia adaptation: an overlooked virulence attribute of pathogenic fungi? **Med Mycol**, v. 48, p. 1 - 15, 2010.

GRAHL, N. *et al.* In vivo hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. **PLoS Pathog**, v. 7, p. e1002145, 2011.

Hypoxia and fungal pathogenesis: to air or not to air? **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 5, p. 560-70, May 2012. ISSN 1535-9786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22447924> >.

GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **J Clin Invest**, v. 76, n. 2, p. 508-16, Aug 1985. ISSN 0021-9738. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3928681> >.

GRANVOGL, B.; PLÖSCHER, M.; EICHACKER, L. A. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, n. 4, p. 991-1002, Oct 2007. ISSN 1618-2642. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17639354> >.

GRIFFITH, C. L. *et al.* UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 49, p. 51669-76, Dec 2004. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383535> >.

GURCAN, S. *et al.* Antifungal susceptibilities of *Aspergillus spp.* strains isolated from invasive aspergillosis cases. **Mikrobioloji Bulteni**, v. 44, p. 273 - 278, 2010.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-85, Dec 2004. ISSN 1615-9853. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543535> >.

HAAS, H. *et al.* The *Aspergillus nidulans* GATA factor SreA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. **J Biol Chem**, v. 274, p. 4613 - 4619, 1999.

HALL, L.; DENNING, D. Oxygen requirements of *Aspergillus* species. **J Med Microbiol**, v. 41, p. 311 - 315, 1994.

HAMADY, M. *et al.* Key challenges in proteomics and proteoinformatics. Progress in proteins. **IEEE Eng Med Biol Mag**, v. 24, n. 3, p. 34-40, 2005 May-Jun 2005. ISSN 0739-5175. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15971839> >.

HAN, K.; SEO, J.; YU, J. Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (G alpha) signalling. **Mol Microbiol**, v. 53, p. 529 - 540, 2004.

HECKMAN, D. S. *et al.* Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1129-33, Aug 2001. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498589> >.

HEDGES, S. B. *et al.* A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. **BMC Evol Biol**, v. 4, p. 2, Jan 2004. ISSN 1471-2148. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005799> >.

HEITMAN, J.; MICROBIOLOGY, A. S. F. *Cryptococcus*: From Human Pathogen to Model Yeast. Amer Society for Microbiology, 2011. ISBN 9781555815011. Available at: < <http://books.google.com.br/books?id=8-AXQwAACAAJ> >.

HERRERO, J.; VALENCIA, A.; DOPAZO, J. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. **Bioinformatics**, v. 17, p. 126 - 136, 2001.

HIRAYAMA, T. *et al.* Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Gen Genet**, v. 249, p. 127 - 138, 1995.

HOWARD, S.; PASQUALOTTO, A.; DENNING, D. Azole resistance in allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus bronchitis*. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, p. 683 - 688, 2010.

HU, G. *et al.* Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. **Mol Microbiol**, v. 69, n. 6, p. 1456-75, Sep 2008. ISSN 1365-2958. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18673460> >.

HUANG, D.; SHERMAN, B.; LEMPICKI, R. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc**, v. 4, p. 44 - 57, 2008.

HUFFNAGLE, G. A. Casadevall and J.R. Perfect, *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 147, n. 1, p. 59-60, 1999. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1007095100541> >.

HUGHES, A. *et al.* 4-Methyl sterols regulate fission yeast SREBP-Scap under low oxygen and cell stress. **J Biol Chem**, v. 282, p. 24388 - 24396, 2007.

HUGHES, A. L.; TODD, B. L.; ESPENSHADE, P. J. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. **Cell**, v. 120, n. 6, p. 831-42, Mar 2005. ISSN 0092-8674. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797383> >.

HULL, C. M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Genet**, v. 36, p. 557-615, 2002. ISSN 0066-4197. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429703> >.

HUMPHERY-SMITH, I.; CORDWELL, S. J.; BLACKSTOCK, W. P. Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. **Electrophoresis**, v. 18, n. 8, p. 1217-42, Aug 1997. ISSN 0173-0835. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298643> >.

IDNURM, A. *et al.* Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 753-64, Oct 2005. ISSN 1740-1526. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16132036> >.

Peroxisome function regulates growth on glucose in the basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 1, p. 60-72, Jan 2007. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041184> >.

INGAVALE, S. S. *et al.* Importance of mitochondria in survival of *Cryptococcus neoformans* under low oxygen conditions and tolerance to cobalt chloride. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 9, p. e1000155, 2008. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802457> >.

JAIN, M.; SZNAJDER, J. I. Effects of hypoxia on the alveolar epithelium. **Proc Am Thorac Soc**, v. 2, n. 3, p. 202-5, 2005. ISSN 1546-3222. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222038> >.

JUHNKE, H. *et al.* Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. **Mol Gen Genet**, v. 252, n. 4, p. 456-64, Sep 1996. ISSN 0026-8925. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879247> >.

JUNG, W. H. *et al.* Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Biol**, v. 4, n. 12, p. e410, Nov 2006. ISSN 1545-7885. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17121456> >.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 27-30, Jan 2000a. ISSN 0305-1048. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592173> >.

KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 27-30, Jan 2000b. ISSN 0305-1048. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592173> >.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim Pol**, v. 56, n. 2, p. 211-24, 2009. ISSN 1734-154X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19543556> >.

KATSU, M. *et al.* The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **FEMS Yeast Res**, v. 4, n. 4-5, p. 377-88, Jan 2004. ISSN 1567-1356. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734018> >.

KIDD, S. E. *et al.* *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 1, p. 51-7, Jan 2007. ISSN 1080-6040. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17370515> >.

A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 2004. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572442> >.

KISHI, K. *et al.* Clinical features and high-resolution CT findings of pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients. **Respir Med**, v. 100, n. 5, p. 807-12, May 2006. ISSN 0954-6111. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239102> >.

KNIEMEYER, O. *et al.* Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Curr Genet**, v. 49, p. 178 - 189, 2006.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. [One hundred years of cryptococcosis. Medical mycology in the 19th century in Greifswald]. **Mycoses**, v. 37 Suppl 1, p. 28-33, 1994. ISSN 0933-7407. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7854363> >.

KOHONEN, T. Self-organizing maps. 1997.

KRAUS, P. R. *et al.* Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249-60, Oct 2004. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470254> >.

KROCKENBERGER, M. B. *et al.* Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus gattii* infection: a rat model. **Mycopathologia**, v. 170, n. 5, p. 315-30, Nov 2010. ISSN 1573-0832. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552280> >.

KRONSTAD, J. *et al.* Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 2, p. 109-18, Feb 2012. ISSN 1535-9786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22140231> >.

KRONSTAD, J. W.; HU, G.; JUNG, W. H. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol**, v. 21, n. 9, p. 457-65, Sep 2013. ISSN 1878-4380. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810126> >.

KURIEN, B. T. *et al.* Coomassie Brilliant Blue Removal/Disposal from Gel Destain and Used Gel Stain in an Environment-Friendly Manner. In: (Ed.). **Protein Electrophoresis: Humana Press**, v.869, 2012. p.607-616. (Methods in Molecular Biology).

KWON-CHUNG, K. J. A new species of Filobasidiella, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia**, v. 68, n. 4, p. 943-6, 1976 Jul-Aug 1976. ISSN 0027-5514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/790173> >.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. **Am J Epidemiol**, v. 108, n. 4, p. 337-40, Oct 1978. ISSN 0002-9262. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/364979> >.

Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am J Epidemiol**, v. 120, n. 1, p. 123-30, Jul 1984. ISSN 0002-9262. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6377880> >.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 60, n. 2, p. 602-5, Feb 1992. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730495> >.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Med Mycol**, v. 38 Suppl 1, p. 205-13, 2000. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204147> >.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 574-87, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696653> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LAFON, A. *et al.* G-protein and cAMP-mediated signaling in Aspergilli: a genomic perspective. **Fungal Genet Biol**, v. 43, p. 490 - 502, 2006.

- LAI, L. *et al.* Comparison of the transcriptomic "stress response" evoked by antimycin A and oxygen deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics**, v. 9, p. 627, 2008.
- LAM, W. C.; GERIK, K. J.; LODGE, J. K. Role of *Cryptococcus neoformans* Rho1 GTPases in the PKC1 signaling pathway in response to thermal stress. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 1, p. 118-31, Jan 2013. ISSN 1535-9786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23159519> >.
- LAU, S. K. *et al.* Proteome profiling of the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii* extracellular proteins and identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an important adhesion factor for conidial attachment. **FEBS J**, v. 280, n. 24, p. 6613-26, Dec 2013. ISSN 1742-4658. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24128375> >.
- LAYER, G. *et al.* Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. **Protein Sci**, v. 19, n. 6, p. 1137-61, Jun 2010. ISSN 1469-896X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20506125> >.
- LEE, H. *et al.* Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 65, p. 1018 - 1033, 2007.
- LEE, H. C.; HON, T.; ZHANG, L. The molecular chaperone Hsp90 mediates heme activation of the yeast transcriptional activator Hap1. **J Biol Chem**, v. 277, n. 9, p. 7430-7, Mar 2002. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751848> >.
- LEE, Y. J.; HOE, K. L.; MAENG, P. J. Yeast cells lacking the CIT1-encoded mitochondrial citrate synthase are hypersusceptible to heat- or aging-induced apoptosis. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 9, p. 3556-67, Sep 2007. ISSN 1059-1524. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615299> >.
- LENGELER, K. B. *et al.* Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. **Eukaryot Cell**, v. 1, n. 5, p. 704-18, Oct 2002. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12455690> >.
- LESSING, F. *et al.* The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. **Eukaryot Cell**, v. 6, p. 2290 - 2302, 2007.
- LIAN, T. *et al.* Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 55, n. 5, p. 1452-72, Mar 2005. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15720553> >.
- LIEBMANN, B. *et al.* cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene pksP and in defense against killing by macrophages. **Mol Genet Genomics**, v. 269, p. 420 - 435, 2003.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 401-16, Jul 2009. ISSN 1567-7257. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460306> >.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346> >.

LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 1017-21, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846346> >.

LIN, X. *et al.* alpha AD alpha hybrids of *Cryptococcus neoformans*: evidence of same-sex mating in nature and hybrid fitness. **PLoS Genet**, v. 3, n. 10, p. 1975-90, Oct 2007. ISSN 1553-7404. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953489> >.

Diploids in the *Cryptococcus neoformans* serotype A population homozygous for the alpha mating type originate via unisexual mating. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 1, p. e1000283, Jan 2009. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180236> >.

LIPATOVA, Z. *et al.* Regulation of selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 18, p. 6981-6, May 2012. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509044> >.

LIU, H. *et al.* *Aspergillus fumigatus* AcuM regulates both iron acquisition and gluconeogenesis. **Mol Microbiol**, v. 78, p. 1038 - 1054, 2010.

LIU, Y. *et al.* [Functions of late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerance of organisms: a review]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 26, n. 5, p. 569-75, May 2010. ISSN 1000-3061. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20684298> >.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDeltaCt) Method. **Methods**, v. 25, p. 402 - 408, 2001.

LOCKINGTON, R. A.; BORLACE, G. N.; KELLY, J. M. Pyruvate decarboxylase and anaerobic survival in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 191, n. 1, p. 61-7, May 1997. ISSN 0378-1119. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9210590> >.

LOFTUS, B. J. *et al.* The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1321-4, Feb 2005. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653466> >.

LÓPEZ-VILLAR, E. *et al.* Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, p. S107-18, Apr 2006. ISSN 1615-9861. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16544286> >.

MACPHERSON, S. *et al.* *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1745-52, May 2005. ISSN 0066-4804. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855491> >.

MARCOS, C. M. *et al.* Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. **FEMS Yeast Res**, v. 12, n. 5, p. 557-70, Aug 2012. ISSN 1567-1364. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443156> >.

MARR, K. A. *Cryptococcus gattii* as an important fungal pathogen of western North America. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, n. 6, p. 637-43, Jun 2012. ISSN 1744-8336. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22734955> >.

MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans var. grubii* (serotype A) strains. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3365-7, Sep 2001. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526180> >.

MARÉCHAL, A. *et al.* Yeast cytochrome c oxidase: a model system to study mitochondrial forms of the haem-copper oxidase superfamily. **Biochim Biophys Acta**, v. 1817, n. 4, p. 620-8, Apr 2012. ISSN 0006-3002. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925484> >.

MASUO, S. *et al.* Global gene expression analysis of *Aspergillus nidulans* reveals metabolic shift and transcription suppression under hypoxia. **Mol Genet Genomics**, v. 284, p. 415 - 424, 2010.

MAYR, M. *et al.* Metabolic homeostasis is maintained in myocardial hibernation by adaptive changes in the transcriptome and proteome. **J Mol Cell Cardiol**, v. 50, p. 982 - 990, 2011.

MCCLELLAND, E. E. *et al.* The Role of Host Gender in the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* Infections. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63632, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741297> >.

MCFADDEN, D. C. *et al.* Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 8, p. 1464-73, Aug 2007. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17601878> >.

MCGILL, S. *et al.* Cryptococcosis in domestic animals in Western Australia: a retrospective study from 1995-2006. **Med Mycol**, v. 47, n. 6, p. 625-39, 2009. ISSN 1460-2709. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306217> >.

MEIJER, W. *et al.* ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. **Autophagy**, v. 3, p. 106 - 116, 2007.

METIN, B.; FINDLEY, K.; HEITMAN, J. The mating type locus (MAT) and sexual reproduction of *Cryptococcus heveanensis*: insights into the evolution of sex and sex-determining chromosomal regions in fungi. **PLoS Genet**, v. 6, n. 5, p. e1000961, May 2010. ISSN 1553-7404. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502678> >.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 189-95, Feb 2003. ISSN 1080-6040. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603989> >.

MISSALL, T. A. *et al.* Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 1, p. 202-8, Jan 2005. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643075> >.

Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 3, p. 518-29, Mar 2006. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524907> >.

MIURA, N. *et al.* Spatial reorganization of *Saccharomyces cerevisiae* enolase to alter carbon metabolism under hypoxia. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 8, p. 1106-19, Aug 2013. ISSN 1535-9786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748432> >.

MODUN, B.; MORRISSEY, J.; WILLIAMS, P. The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel functions. **Trends Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 231-7, May 2000. ISSN 0966-842X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10785640> >.

MOLEZ, J. F. The historical question of acquired immunodeficiency syndrome in the 1960s in the Congo River basin area in relation to cryptococcal meningitis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 3, p. 273-6, Mar 1998. ISSN 0002-9637. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546402> >.

MORANOVA, Z.; KAWAMOTO, S.; RACLAVSKY, V. Hypoxia sensing in *Cryptococcus neoformans*: biofilm-like adaptation for dormancy? **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 153, n. 3, p. 189-93, Sep 2009. ISSN 1213-8118. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851430> >.

MORANOVA, Z. *et al.* The CRZ1/SP1-like gene links survival under limited aeration, cell integrity and biofilm formation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, Apr 2013. ISSN 1213-8118. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640031> >.

MOYRAND, F.; JANBON, G. UGD1, encoding the *Cryptococcus neoformans* UDP-glucose dehydrogenase, is essential for growth at 37 degrees C and for capsule biosynthesis. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 6, p. 1601-8, Dec 2004. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590833> >.

NEUHOFF, V. *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-62, Jun 1988. ISSN 0173-0835. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466658> >.

NEWCOMB, L.; HALL, D.; HEIDEMAN, W. AZF1 is a glucose-dependent positive regulator of CLN3 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 22, p. 1607 - 1614, 2002.

NGAMSKULRUNGROJ, P. *et al.* The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, 2012. ISSN 2150-7511. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570277> >.

Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 251-8, Feb 2011. ISSN 1469-0691. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20331682> >.

NIESSEN, S.; MCLEOD, I.; YATES, J. R. Silver Staining, Digestion, and Extraction of Peptides from an Acrylamide Gel for MS Analysis. **CSH Protoc**, v. 2006, n. 7, 2006. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484678> >.

NIZET, V.; JOHNSON, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 9, p. 609-17, Sep 2009. ISSN 1474-1741. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704417> >.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 7, p. 1945-51, Jul 2003. ISSN 1350-0872. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855745> >.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 3, p. 387-408, Jul 2012. ISSN 1098-6618. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763631> >.

OHKUSU, M.; HATA, K.; TAKEO, K. Bud emergence is gradually delayed from S to G2 with progression of growth phase in *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 194, n. 2, p. 251-255, 2001. ISSN 1574-6968. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb09478.x> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111322> >.

OSBORNE, T. F.; ESPENSHADE, P. J. Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. **Genes Dev**, v. 23, n. 22, p. 2578-91, Nov 2009. ISSN 1549-5477. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933148> >.

PADHYE, A. A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in India. **J Med Vet Mycol**, v. 31, n. 2, p. 165-8, 1993. ISSN 0268-1218. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8509953> >.

PARK, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PARK, M.; DO, E.; JUNG, W. H. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 41, n. 2, p. 67-72, Jun 2013. ISSN 1229-8093. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874127> >.

PENNINGTON, S. R. *et al.* Proteome analysis: from protein characterization to biological function. **Trends Cell Biol**, v. 7, n. 4, p. 168-73, Apr 1997. ISSN 0962-8924. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708936> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16055314> >.

Cryptococcus neoformans: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 463-8, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696642> >.

PERFECT, J. R.; LANG, S. D.; DURACK, D. T. Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. **Am J Pathol**, v. 101, n. 1, p. 177-94, Oct 1980. ISSN 0002-9440. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7004196> >.

PERICOLINI, E. *et al.* The microbial capsular polysaccharide galactoxylomannan inhibits IL-17A production in circulating T cells from rheumatoid arthritis patients. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53336, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308194> >.

Role of CD45 signaling pathway in galactoxylomannan-induced T cell damage. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12720, 2010. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856869> >.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med Mycol**, v. 45, p. 321 - 346, 2007.

PLUMB, R. *et al.* Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 18, n. 19, p. 2331-7, 2004. ISSN 0951-4198. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15384155> >.

PORTER, J. *et al.* Ergosterol regulates sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage in fission yeast. **J Biol Chem**, v. 285, p. 41051 - 41061, 2010.

POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 7, p. 332-40, Sep 2009. ISSN 1879-3061. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733481> >.

POYTON, R. O. *et al.* Mitochondria and hypoxic signaling: a new view. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1177, p. 48-56, Oct 2009. ISSN 1749-6632. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845606> >.

PRICE, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. **MBio**, v. 2, n. 3, p. e00103-11, 2011. ISSN 2150-7511. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21652778> >.

PRIEBE, S. *et al.* FungiFun: a web-based application for functional categorization of fungal genes and proteins. **Fungal Genet Biol**, v. 48, p. 353 - 358, 2011.

PUTTIKAMONKUL, S. *et al.* Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Mol Microbiol**, v. 77, p. 891 - 911, 2010.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761-74, Nov 2011. ISSN 1474-1768. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993244> >.

RASO, T. F. *et al.* Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 355-62, Aug 2004. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473361> >.

RAYMOND, J.; SEGRÈ, D. The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1764-7, Mar 2006. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556842> >.

REES, J. R. *et al.* The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay area, 1992-1993: results of population-based laboratory active surveillance. **Clin Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 1138-47, Nov 1998. ISSN 1058-4838. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9827260> >.

RIDDLE, S. R. *et al.* Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 278, n. 2, p. L407-16, Feb 2000. ISSN 1040-0605. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666126> >.

RINTALA, E. *et al.* Low oxygen levels as a trigger for enhancement of respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 461, 2009. ISSN 1471-2164. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19804647> >.

RODRIGUES, M. L. *et al.* Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, Jan 2008. ISSN 1535-9786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039940> >.

ROSAS, A. L. *et al.* Isolation and serological analyses of fungal melanins. **J Immunol Methods**, v. 244, n. 1-2, p. 69-80, Oct 2000. ISSN 0022-1759. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033020> >.

RUDE, T. H. *et al.* Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 70, n. 10, p. 5684-94, Oct 2002. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228298> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012. ISSN 1746-0921. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075448> >.

SALZANO, A. M.; CRESCENZI, M. Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. **Ann Ist Super Sanita**, v. 41, n. 4, p. 443-50, 2005. ISSN 0021-2571. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569912> >.

SANTOS, W. R. *et al.* Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-8, Dec 2008. ISSN 1678-8060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148422> >.

SCHMELZ, S.; NAISMITH, J. Adenylate-forming enzymes. **Curr Opin Struct Biol**, v. 19, p. 666 - 671, 2009.

SCHRETTL, M. *et al.* HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog**, v. 6, p. e1001124, 2010.

Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **J Exp Med**, v. 200, p. 1213 - 1219, 2004.

Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. **PLoS Pathog**, v. 3, p. 1195 - 1207, 2007.

SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. **Mol Microbiol**, v. 70, p. 27 - 43, 2008.

SEGEV, N. Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. **Sci STKE**, v. 2001, n. 100, p. re11, Sep 2001. ISSN 1525-8882. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11579231> >.

SEMENZA, G. L. Life with oxygen. **Science**, v. 318, n. 5847, p. 62-4, Oct 2007. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17916722> >.

SETIADI, E. R. *et al.* Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. **J Mol Biol**, v. 361, n. 3, p. 399-411, Aug 2006. ISSN 0022-2836. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854431> >.

SHEN, W. *et al.* The *Neurospora rca-1* gene complements an *Aspergillus flbD* sporulation mutant but has no identifiable role in *Neurospora* sporulation. **Genetics**, v. 148, p. 1031 - 1041, 1998.

SHEVCHENKO, A. *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**, v. 68, p. 850 - 858, 1996.

SHI, M. *et al.* Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1683-93, May 2010. ISSN 1558-8238. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424328> >.

SHIMIZU, M. *et al.* Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. **Proteomics**, v. 9, p. 7 - 19, 2009.

SINGH, A. *et al.* Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013. ISSN 2150-7511. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23653445> >.

SONE, H.; AKANUMA, H.; FUKUDA, T. Oxygenomics in environmental stress. **Redox Rep**, v. 15, p. 98 - 114, 2010.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety gattii. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11346263> >.

SOUZA, L. K. *et al.* Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 3, 2013. ISSN 1678-9849. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856876> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20031037> >.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, Feb 2014. ISSN 1097-0061. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375706> >.

STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R. Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. **Toxins (Basel)**, v. 4, n. 2, p. 55-67, Feb 2012. ISSN 2072-6651. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474566> >.

STEEN, B. R. *et al.* Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Genome Res**, v. 12, n. 9, p. 1386-400, Sep 2002. ISSN 1088-9051. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213776> >.

STEIN, T. *et al.* Azf1p is a nuclear-localized zinc-finger protein that is preferentially expressed under non-fermentative growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet**, v. 34, p. 287 - 296, 1998.

SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. **Sabouraudia**, v. 14, n. 3, p. 313-7, Nov 1976. ISSN 0036-2174. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/793055> >.

SYNNOTT, J. *et al.* Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 9, p. 1734 - 1746, 2010.

TAKEO, K. *et al.* [Cell cycle control and CDC28/Cdc2 homologue and related gene cloning of *Cryptococcus neoformans*]. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47, n. 4, p. 257-62, 2006. ISSN 0916-4804. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17086156> >.

TETAUD, E. *et al.* The depletion of F1 subunit {varepsilon} in yeast leads to an uncoupled respiratory phenotype that is rescued by mutations in the proton-translocating subunits of F0. **Mol Biol Cell**, v. 25, n. 6, p. 791-9, Mar 2014. ISSN 1939-4586. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451261> >.

THORNALLEY, P. J. Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. Pt 6, p. 1343-8, Dec 2003. ISSN 0300-5127. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14641060> >.

TODD, B. *et al.* Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. **Mol Cell Biol**, v. 26, p. 2817 - 2831, 2006.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; GUTIÉRREZ-GALLEGO, R. [Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*]. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 1, p. 27-31, Mar 2008. ISSN 1130-1406. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338924> >.

TRILLES, L. *et al.* Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455-62, Aug 2008. ISSN 1678-8060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797758> >.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3165-70, Mar 2002. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880650> >.

UPADHYA, R. *et al.* Global transcriptome profile of *Cryptococcus neoformans* during exposure to hydrogen peroxide induced oxidative stress. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55110, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23383070> >.

VAGNOLI, P.; COONS, D.; BISSON, L. The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 160, p. 31 - 36, 1998.

VAN DEN BERG, M. *et al.* The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. **J Biol Chem**, v. 271, p. 28953 - 28959, 1996.

VARTIVARIAN, S. E. *et al.* Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **J Infect Dis**, v. 167, n. 1, p. 186-90, Jan 1993. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418165> >.

VIDOTTO, V. *et al.* Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 136, n. 3, p. 119-23, 1996-1997 1996. ISSN 0301-486X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276940> >.

VIK A; RINE, J. Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 19, p. 6395-405, Oct 2001. ISSN 0270-7306. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533229> >.

VODISCH, M. *et al.* Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Proteomics**, v. 9, p. 1407 - 1415, 2009.

Analysis of the *Aspergillus fumigatus* proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. **J Proteome Res**, v. 10, p. 2508 - 2524, 2011.

VORATHAVORN, V. I.; SYKES, J. E.; FELDMAN, D. G. Cryptococcosis as an emerging systemic mycosis in dogs. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, Aug 2013. ISSN 1476-4431. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981166> >.

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 5, p. 1381-96, Sep 2005. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102007> >.

WANG, L.; ZHAI, B.; LIN, X. The link between morphotype transition and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 6, p. e1002765, 2012. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22737071> >.

WANG, X.; DARWICHE, S.; HEITMAN, J. Sex-induced silencing operates during opposite-sex and unisexual reproduction in *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 193, n. 4, p. 1163-74, Apr 2013. ISSN 1943-2631. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23378067> >.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect Immun**, v. 63, n. 8, p. 3131-6, Aug 1995. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622240> >.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 3, p. 242-7, Mar 2001. ISSN 1087-0156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11231557> >.

WASINGER, V. C. *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 7, p. 1090-4, Jul 1995. ISSN 0173-0835. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498152> >.

WATANABE, S. *et al.* Fumarate reductase activity maintains an energized membrane in anaerobic *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog**, v. 7, p. e1002287, 2011.

WEBSTER, K. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. **J Exp Biol**, v. 206, n. Pt 17, p. 2911 - 2922, 2003.

WEI, H. *et al.* A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. **Fungal Genet Biol**, v. 41, p. 148 - 156, 2004.

WEIDNER, G. *et al.* Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the *pyrG* gene encoding orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. **Curr Genet**, v. 33, p. 378 - 385, 1998.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 5, p. 843-6, Mar 2005. ISSN 0021-9533. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731001> >.

WEZENSKY, S.; CRAMER, R. Implications of hypoxic microenvironments during invasive aspergillosis. **Med Mycol**, v. 49, p. S120 - 124, 2011.

WIESER, J.; ADAMS, T. Flbd encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. **Genes Dev**, v. 9, p. 491 - 502, 1995.

WILLGER, S.; GRAHL, N.; CRAMER, R. *Aspergillus fumigatus* metabolism: Clues to mechanisms of in vivo fungal growth and virulence. **Med Mycol**, v. 47, p. S72 - S79, 2009.

WILLGER, S. *et al.* A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Plos Pathog**, v. 4, p. e1000200, 2008.

WIŚNIEWSKI, J. R. *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nat Methods**, v. 6, n. 5, p. 359-62, May 2009. ISSN 1548-7105. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19377485> >.

WRIGHT, L. C. *et al.* Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Biochem J**, v. 384, n. Pt 2, p. 377-84, Dec 2004. ISSN 1470-8728. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320865> >.

WU, B. *et al.* Pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients. **Clin Invest Med**, v. 32, n. 1, p. E70-7, 2009. ISSN 1488-2353. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19178882> >.

XIAO, P. *et al.* *Aspergillus fumigatus* flbB encodes two b-zip proteins required for proper asexual development and gliotoxin production. **Eukaryot Cell**, v. 9, p. 1711 - 23, 2010.

YASMIN, S. *et al.* Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Proc Natl Acad Sci USA**,

YORIMITSU, T.; KLIONSKY, D. Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. **Mol Biol Cell**, v. 16, p. 1593 - 1605, 2005.

YOSHIDA, M.; MUNHEYUKI, E.; HISABORI, T. ATP synthase-a marvellous rotary engine of the cell. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 9, p. 669-77, Sep 2001. ISSN 1471-0072. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533724> >.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO(2). **Infect Immun**, v. 71, n. 11, p. 6155-64, Nov 2003. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573631> >.

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

ZHAI, B. *et al.* Congenic strains of the filamentous form of *Cryptococcus neoformans* for studies of fungal morphogenesis and virulence. **Infect Immun**, v. 81, n. 7, p. 2626-37, Jul 2013. ISSN 1098-5522. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670559> >.

ZHAO, J.; ZHONG, C. J. A review on research progress of transketolase. **Neurosci Bull**, v. 25, n. 2, p. 94-9, Apr 2009. ISSN 1673-7067. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19290028> >.

ZHENG, L.; ROEDER, R.; LUO, Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. **Cell**, v. 114, p. 255 - 266, 2003.

ZHU, P. *et al.* Congenic strains for genetic analysis of virulence traits in *Cryptococcus gattii*. **Infect Immun**, v. 81, n. 7, p. 2616-25, Jul 2013. ISSN 1098-5522. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670558> >.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. A CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 1271-81, Nov 2003. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622414> >.

Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 1, p. 1-10, Oct 2004. ISSN 1567-1356. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381117> >.

Curriculum Vitae resumido

Bemfica, C.S.B.

1. Dados pessoais

Nome: Cláudia Sperotto Bemfica Balaguez

Nascimento: Porto Alegre/RS – Brasil

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves,9500 Bairro; Agronomia POA/RS

Telefone profissional: 51-3308-7767 e-mail: claudiabemfica@gmail.com

2. Formação

Farmacêutica/Bioquímica- Universidade Católica do Rio Grande do Sul (1996-2001)

Pós-graduação *stricto sensu*- Mestrado em Biologia celular e Molecular- Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2011-2013)

3. Estágios

UFRGS- Centro de Biotecnologia (CBIOT) (2010-2011) Estágio: laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, orientador: profa. Dra. Marilene Henning Vainstein. Trabalho com proteômica global do fungo patogênico *Cryptococcus gattii* . Bolsa CNPQ

Universidade de São Paulo – USP (2002 – 2003) Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman. Trabalho com *Candida sp.* e *Aspergillus sp.* Análise comparativa entre técnicas de identificação dos fungos por PCR tempo real, microbiologia clássica e kits de detecção laboratoriais.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre- Farmácia Básica: atendimento farmacêutico (remunerado), Laboratório de Bioquímica: testes bioquímicos: gasometria, teste de suor em recém nascidos pré-maturos, etc (1999-2000)

Projeto Juventude Solidária- convênio entre PUCRS e Governo do Estado do RS no Município de Santana do Livramento. Prestação de serviços comunitários para pessoas carentes do subúrbio do Município, como orientação do uso de medicamentos, cuidados com a saúde e higiene pessoal, orientação e prevenção quanto ao uso de drogas lícitas e ilícitas (remunerado)(1998)

Laboratório de Análises Clínicas Santa Helena (1998)- estagiária- análises bioquímicas, análise de urina, hemograma

Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (1998)- estagiária- setor de hemograma e imunologia

Laboratório de Bioquímica e Genética Molecular do Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS, sob orientação da dra. Ivana Beatrice da Cruz. Realizou testes bioquímicos de triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL em amostras de pacientes com hipertensão arterial (1998)

Monitora da disciplina de Histologia e Embriologia Geral no curso de Farmácia com carga horária total de 30 horas, sob responsabilidade do prof. Casemiro Garcia Fernandez (1997).

4. Artigos Completos e publicados

MARTINS, L.M., ANDRADE, H. M, VAINSTEIN, M.H, WANKE, B., SCHRANK, A., **BALAGUEZ, C.B.**, SANTOS, P.R., SANTI, L., PIRES, S. F, SILVA, A.S., DE CASTRO, J. A. F., BRANDÃO, R. M. S.S., DO MONTE, S. J. H. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii* : novel candidate antigens for diagnosis. Future Microbiology (Print). Fator de Impacto(2012 JCR): 4,0180, v.8, p.549 , 2013.

Peres, Alessandra, Lérias, Aline Grimaldi, de Aguiar, Ana Karine Kramer, Silva, Andrew Oliveira, Costa, Caroline Borges, **Bemfica, Cláudia**, de Vargas, Daiani Machado, Andrade, Dieime de Souza, Engelke, Douglas Senna, Pires, Elisa Nicoloso Simões.

As time goes by ... Would CD4+ T cells depletion induce early immunosenescence in HIV infected patients? Medical Hypotheses. Fator de Impacto(2012 JCR): 1,0540, v.74, p.208 - 209, 2010.

LARA, G. M, TEDESCO, D. S., WIECZOREK, Pedro L, **BEMFICA, C. S.**

Homocisteína, Arteriosclerose e Trombose. Revista Newslab. , v.41, p.178 - 190, 2000

5. Resumos e trabalhos apresentados em Congressos

Balaguez, C.S.B.; Correa, J.F.; Staats, C.C.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. **Proteômica comparativa da resposta de *Cryptococcus gattii* quando submetido à privação de glicose.** 27º Reunião de Genética de Micro-organismos. Guarujá,SP (2010).

Balaguez, CB., Ferraz J ; Staats, CC ; Schrank, A ; Vainstein, MH **Identificação de proteínas de *Cryptococcus gattii* diferencialmente expressas sob o efeito de privação de glicose.** Congresso Latinoamericano de microbiologia. Montevideo, Uruguai (2010)

Balaguez, C.S.B.; Correa, J.F.; Staats, C.C.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. **Proteoma comparativo da resposta de *Cryptococcus gattii* à privação de glicose.** XIII REUNIÃO ANUAL PPGBCM. Porto Alegre, RS (2011).

Comparative Proteomic of the glucose starvation influence on *Cryptococcus gattii* . Balaguez, CSB; Santos, PR; Schrank, A^{1,2}; Vainstein, MH. 28º Reunião de Genética de Micro-organismos.Foz do Iguaçu, Paraná (2012).

Proteômica comparativa de *Cryptococcus gattii* quando submetido à condição de hipóxia. Balaguez, C.S.B. ;Santos,P.R ; Schrank, A;Staats, C.C.; Vainstein, M.H. XIV REUNIÃO ANUAL PPGBCM. Porto Alegre, RS (2012).

Bemfica, C.S.; Oliveira, E., Santos,P.R; Staats, C.C.; Vainstein, M.H. **Análise proteômica de *Cryptococcus gattii* em diferentes tempos de exposição sob condição de hipóxia.** XV REUNIÃO ANUAL PPGBCM. Porto Alegre, RS (2013).

