



Dissertação de Mestrado  
Ana Leticia de Souza Gutierrez  
IBCCF  
UFRJ  
2007

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**GLICOINOSITOLFOSFORIL CERAMIDAS DE *Cryptococcus*  
*neoformans*: ESTRUTURA QUÍMICA DE CEPAS SELVAGEM  
E MUTANTES**

**Ana Leticia de Souza Gutierrez**

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ana Leticia de Souza Gutierrez**

**GLICOINOSITOLFOSFORIL CERAMIDAS DE *Cryptococcus*  
*neoformans*: ESTRUTURA QUÍMICA DE CEPAS SELVAGEM  
E MUTANTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientação: Norton Heise

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2007

**Glicoinositolfosforil ceramidas de *Cryptococcus neoformans*: estrutura química de cepas selvagem e mutantes**

Ana Leticia de Souza Gutierrez

Orientador: Prof. Dr. Norton Heise

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Norton Heise  
Professor Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ  
Orientador

---

Prof. Dr. Paulo Bisch  
Prof. Titular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ  
Presidente

---

Profa. Dra. Leila Maria Lopes Bezerra  
Prof. Adjunto, Instituto de Biologia – UERJ

---

Prof. Dr. Octavio Augusto Ceva Antunes  
Prof. Titular, Instituto de Química, CCMN – UFRJ

---

Prof. Dr. Ronaldo Mohana Borges  
Prof. Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ  
Revisor

---

Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti  
Prof. Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ  
Suplente Interno

---

Prof. Dr. Eliezer Jesus Barreira  
Prof. Titular, Faculdade de Farmácia, CCS – UFRJ  
Suplente Externo

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Glicobiologia do Programa de Parasitologia e Biologia Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação do Prof. Norton Heise.

Dedico esta dissertação de Mestrado  
ao meu querido e amado filho, Guilherme Frederico,  
que é a luz de todos os meus dias;  
aos meus pais, Fidel Ciro (*in memoriam*) e Marília,  
que sempre foram e são as bases para o meu crescimento  
e ao meu irmão, Luiz Felipe,  
que além de todas as qualidades de irmão, é meu grande amigo

“Para se designarem coisas novas são precisos termos novos. (...).  
O homem que julga infalível a sua razão está bem perto do erro. (...).  
O que caracteriza um estudo sério é a continuidade que se lhe dá.”

Allan Kardec, *Le Livre des Esprits*  
(O Livro dos Espíritos) Paris, 1857.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por tudo. Principalmente por me fazer nascer em uma família tão maravilhosa, por colocar em meu caminho tão bons amigos e tão boas oportunidades.
- Ao meu filho, Guilherme Frederico, por ser o melhor dos presentes que Deus me enviou e por dar sentido a todos meus sorrisos.
- Aos meus pais, Fidel (*in memoriam*) e Marília, por toda minha formação e meus bons momentos, principalmente os da minha infância, e serem excelentes exemplos para minha vida e ao meu irmão, Luiz Felipe, por cuidar sempre de mim.
- Ao Prof. Norton Heise pela orientação.
- Aos professores José Osvaldo Previato e Lúcia Mendonça Previato por serem mais que orientadores, serem educadores. Por me ensinarem desde a glicobiologia à percepção de um mundo científico. Pelo apoio em todos os momentos, nos últimos dez anos. Por conhecerem minhas qualidades e minhas limitações e, mesmo assim, exigirem sempre o meu melhor. Por perceberem que, quando retornei ao laboratório para o Mestrado, eu já não era mais aquela menina, aluna de iniciação científica, mas uma mulher, com todas as obrigações e responsabilidades que cabem a esta designação. Pelo exemplo de cientistas que são. Pelos momentos alegres de conversas agradáveis e por aqueles que me fizeram amadurecer. Pela generosidade de cada ensinamento. Por virem ao laboratório nos finais de semana. Por presenciá-los estudando SEMPRE. Por me ensinarem que ninguém sabe tanto que não tenha nada a aprender e que o importante é a continuidade do estudo. Finalmente, por serem do jeito que são: simples, generosos, honestos, sinceros e leais. Muito obrigada.
- A Prof<sup>a</sup> Adriane R. Todeschini pelo auxílio na análise dos espectros de RMN e pela amizade tão querida que me faz acreditar que existem pessoas verdadeiramente boas no mundo.
- Ao Prof. Ronaldo S. Mohana Borges pela colaboração nos espectros de MALDI-TOF e por ter sido um professor exemplar e muito dedicado às aulas do curso de “Introdução a RMN” da pós-graduação.
- Ao Dr. Yann Gualdel, Dra. Bernadete Coddeville e Dr. Jean-Michel Wieruszkeski da Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université des Sciences et Technologies de Lille, France, pela colaboração nos experimentos de ESI-MS/MS e RMN.
- Ao aluno de doutorado Manoel N. Melo, da Universidade de Lisboa, e a pós-doutora Katherine A. Mattos pelo auxílio na análise dos espectros de RMN, além da agradável companhia.

- Ao amigo Orlando A. Agrellos Filho por ter me auxiliado em todos os momentos desta dissertação, pelo auxílio na edição de figuras, por todos esses anos de convivência, onde aprendi tanto e que talvez não consiga retribuir o tanto de ajuda que me foi dada. Obrigada.
- Ao Dr. James Strougo e ao Dr. José Eduardo C. de Castro pelo incentivo e pela enorme compreensão, fundamentais para elaboração desta dissertação.
- A Sônia Nogueira e Moisés Barcellos pelo incentivo e compreensão constantes, mesmo antes do início do Mestrado.
- A Sandra Maria de B. Oliveira, Diogo L. C. Rodrigues, da secretaria de pós-graduação, e Terezinha A. P. de P. Oliveira, da secretaria do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, por sempre me auxiliarem com carinho, atenção e um grande sorriso no rosto.
- A D. Helena H. Matt e a Adiolênia M. B. Branquinho pelo cuidado com o meu filho.
- Ao amigo Victor Saraiva por ter me emprestado seu livro para que eu pudesse estudar para a seleção do Mestrado, sem me conhecer direito: só para me ajudar. “Valeu, amigo”.
- Aos amigos que são e que já foram do Laboratório de Glicobiologia, Alexandre, Ana Acácia, Ana Paula, Bianca, Carolina, Daniel Passos, Elaine, Eliane, Érika, Fernanda, Frederico, Iaralice, Lana, Layla, Leonardo, Letícia, Luciana, Mariane, Mônica, Sebastião, Suellen, Wagner, por tornarem a convivência no laboratório extremamente agradável.
- Aos amigos Ana Paula (Pola), Alessandra Amorim, Alessandry Bastos, Bernadete, Carlos Alexandre Rodrigues, Daniel Fucs, Daniel Gibaldi, Denise Iskin, Elaine Poly, Flávia R. Barbosa, Fernanda S. Cardoso, Inês, Isabela Guimarães, Juliana Manasfi, Júlio Diniz, Kelly “Fucs”, Leonardo Cunha, Lílian Trujilho, Luis Carlos Campos, Marcelo E. Lamas, Márcia Ferrelli, Márcia Murta, Marcos Mello, Martin Bonamino, Miguel Mello, Miriam Broitman, Roberto Franco, Rosilane Taveira, Sabrina Chaves, por participarem de alguma forma e em alguns (muitos) momentos do desenvolvimento desta dissertação, quando em muitos instantes um simples sorriso ou uma simples palavra ou apenas por compartilharem dias felizes (e dias ruins também), me incentivaram (e incentivam). Sei que carinho não se agradece, se retribui. Espero poder retribuir. Obrigada.
- Aos meus irmãos, Fidel Roberto, Teresa e Carlos Henrique, meus sobrinhos, Paula, Pedro, Tatiana e Débora, a minha cunhada Valéria, por toda ternura e incentivo necessários para minha vida.
- A aqueles que eu possa ter esquecido de citar aqui e que fazem parte da minha história, obrigada (pela compreensão também).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Habitat natural de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	20
Figura 2: Diferenças fenotípicas entre os teleomorfos de <i>C. neoformans</i> ( <i>F. neoformans</i> ) e <i>C. gattii</i> ( <i>F. bacillispora</i> ).....	22
Figura 3: Reação observada em agar CGB por <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	22
Figura 4: Modelo do ciclo de vida do <i>C. neoformans</i> .....	25
Figura 5: Via de virulência do <i>C. neoformans</i> .....	28
Figura 6: Esquema da célula de <i>Cryptococcus neoformans</i> e fotomicrografia demonstrando a cápsula polissacarídica.....	32
Figura 7: As seis unidades repetitivas de GXM encontradas nos diferentes sorotipos.....	36
Figura 8: Estrutura da GalXM.....	37
Figura 9: Manoproteínas Cda2/MP-98 e MP-88 de <i>C. neoformans</i> .....	39
Figura 10: Estrutura do GIPC isolado da cepa selvagem sorotipo A de <i>C. neoformans</i> .....	40
Figura 11: Biossíntese de esfingolipídios em fungos.....	42
Figura 12: Modelo para o mecanismo da UDP-xilose sintase.....	48
Figura 13: Esquema do mecanismo da UDP-glucose desidrogenase de <i>S. pyogenes</i> .....	49
Figura 14: HPTLC. Homogeneidade dos GIPCs.....	65
Figura 15: Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos obtidos após metanólise e trimetilsililação dos GIPCs purificados.....	66
Figura 16: Espectros de fragmentação obtido por GC/MS dos ésteres metílicos trimetilsililados dos GIPCs purificados.....	67
Figura 17: Cromatograma dos metil glicosídeos obtidos após metanólise e trimetilsililação dos GIPCs purificados.....	69
Figura 18: MALDI-TOF-MS dos GIPCs da cepa selvagem NE241 (A) e das cepas mutantes NE321 (B) e NE178 (C) de <i>C. neoformans</i> .....	72
Figura 19: ESI-MS dos PI-oligosacarídeos permetilados obtidos dos GIPCs da cepa selvagem NE241 (A) e das cepas mutantes NE321 (B) e NE178 (C) de <i>C. neoformans</i> ....	75
Figura 20: Espectro obtido por ESI-MS/MS do PI-oligosacarídeo permetilado obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.....	78

Figura 21: Espectro obtido por ESI-MS/MS do PI-oligossacarídeo nativo obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.....	79
Figura 22: Espectro obtido por ESI-MS/MS do Ins-oligossacarídeo permetilado obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.....	80
Figura 23: Espectro obtido por ESI-MS/MS do isômero Pen <sub>1</sub> Hex <sub>4</sub> InsP permetilado obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.....	81
Figura 24: Espectro obtido por ESI-MS/MS do isômero desfosforilado Pen <sub>1</sub> Hex <sub>4</sub> Ins permetilado obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.....	82
Figura 25: Espectro obtido por ESI-MS/MS dos PI-oligossacarídeos permetilados obtidos dos GIPCs purificados das cepas mutantes NE321 ( <b>A</b> ) e NE178 ( <b>B</b> ).....	83
Figura 26: Espectro obtido por RMN <sup>1</sup> H 1D dos PI-oligossacarídeos obtidos dos GIPCs purificados das cepas NE178 ( <b>A</b> ), NE321 ( <b>B</b> ) e NE241 ( <b>C</b> ) de <i>C. neoformans</i> .....	89
Figura 27: Etapas da síntese de GXM.....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas dos Ins-oligossacarídeos de GIPCs isolados das cepas cap67 e WT444 de <i>C. neoformans</i> descritos previamente em Heise <i>et al.</i> , 2002.....	51
Tabela 2: Comparação da composição química dos GIPCs de diferentes amostras de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	70
Tabela 3: Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ dos PI-oligossacarídeos dos GIPCs de <i>C. neoformans</i> , observados nos experimentos de RMN 2D, TOCSY e HSQC.....	90
Tabela 4: Estruturas moleculares dos GIPCS das cepas selvagem e mutantes de <i>C. neoformans</i> .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3KSR	3-cetodihidroesfingosina redutase
BCL	Base de cadeia longa
BSTFA	Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CneF	antígenos de <i>C. neoformans</i> isolados do filtrado do meio de cultura
DHS	Dihidroesfingosina
DHCerS	Ceramida sintase
DTH	Resposta immune do tipo hipersensibilidade tardia
ESI-QTOF-MS	<i>Nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry</i>
Galp	Galactopiranoze
GalXM	Galactoxilomanana
GC	Cromatografia gás-líquida
GC-MS	Cromatografia gás-líquida acoplada à espectrometria de massas
GIPC	Glicoinositolfosforil ceramida
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GXM	Glucuronoxilomanana
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta resolução
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Ins	Inositol
IPC	Inositolfosforilceramida
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
Manp	Manopiranoze

MIPC	Manosil-inositolfosforilceramida
[M(IP) <sub>2</sub> C]	Inositolfosforil-manosil-inositolfosforilceramida
MP	Manoproteínas
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
PGF	Gradiente de campo de pulso
PHS	Fitoesfingosina
PI	Fosfatidilinositol
RMN	Ressonância magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ROESY	<i>Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy</i>
SPH	Esfingosina
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
UDP	Uridina difosfato
UGD	UDP-glucose desidrogenase
<i>Δugd1</i>	Deleção do gene que codifica a UDP-glucose desidrogenase
UXS	UDP-xilose sintase
<i>Δuxs1</i>	Deleção do gene que codifica a UDP-xilose sintase
YPD	Extrato de levedura, peptone e glucose

## RESUMO

GUTIERREZ, Ana Leticia de Souza. **Glicoinositolfosforil ceramidas de *Cryptococcus neoformans***: estrutura química de cepas selvagem e mutantes. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Biofísica – Biologia Celular) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

*Cryptococcus neoformans* é um fungo oportunista que contém uma cápsula polissacarídica considerada um dos principais fatores de virulência. Este fungo causa uma micose sistêmica, sendo a meningite a manifestação clínica mais comum. Os indivíduos mais suscetíveis à infecção são aqueles deficientes em linfócitos T, resultado de infecção pelo vírus HIV, doenças linfoproliferativas ou por terapias imunossupressoras.

Algumas glicanas de fungos estão ligadas a esfingofosfolipídios e estão presentes na membrana citoplasmática, formando os glicoinositolfosforil ceramidas (GIPCs) que são glicolipídios não encontrados em células de mamíferos. Em fungos, os esfingolipídios contendo fosforilinositol são essenciais ao crescimento, viabilidade e são mortos por inibidores da inositolfosforilceramida (IPC) sintase, uma enzima essencial a biossíntese de glicoesfingolipídios. Portanto, a biossíntese de esfingolipídios contendo fosforilceramidas é um alvo promissor para o desenvolvimento de agentes antifúngicos mais efetivos.

Através de estudos prévios em nosso laboratório, GIPCs de *C. neoformans* contendo glicanas complexas, com estruturas não anteriormente caracterizadas, foram isoladas e diferenças moleculares entre uma cepa selvagem encapsulada (sorotipo A) e um mutante acapsular foram observadas. Embora ambas sintetizem GIPCs contendo na posição O-2 da segunda manose distal do inositol uma cadeia lateral formada por uma unidade de xilose, os GIPCs do mutante acapsular (Cap67) foram mais heterogêneos (Heise *et al.*, 2002. *Glycobiology*. 12:409-420). Nesta dissertação apresentamos as estruturas de GIPCs de *C. neoformans* isoladas da cepa selvagem NE241 (KNH99 $\alpha$ ) (sorotipo A) e dos mutantes *Auxs1* cepa NE178 (deletada no gene que codifica a UDP-xilose sintase) e *Augd1* cepa NE321 (deletada no gene que codifica a UDP-glucose desidrogenase). As estruturas foram determinadas por espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. O GIPC da cepa selvagem NE241 tem como estrutura predominante  $\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 6)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 3)[\text{Xylp}(\beta 1 \rightarrow 2)]\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{Galp}(\beta 1 \rightarrow 6)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{InsP}$ -fitoceramida. A principal estrutura dos GIPCs dos mutantes NE178 e NE321 é  $\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{Galp}(\beta 1 \rightarrow 6)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{InsP}$ -fitoceramida. No mutante NE321, há a expressão de uma estrutura isomérica minoritária contendo  $\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{Galp}(\beta 1 \rightarrow 6)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{InsP}$ -fitoceramida. Em conclusão, os GIPCs dos mutantes são heterogêneos e, em relação à cepa selvagem NE241, não apresentam  $\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 6)\text{Manp}$  no final não redutor da cadeia glicana, portanto as cepas mutantes não transferem  $\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 6)$  para a cadeia oligoglicana dos GIPCs, além de não conter unidades de xilose. Nós discutimos, ainda, sobre a especificidade das estruturas dos substratos aceptores para as glicosiltransferases que não havia, até o momento, sido caracterizadas em *C. neoformans* e que podem ser compostos potenciais para novos alvos de drogas antifúngicas.

**Palavras Chaves:** *Cryptococcus neoformans*; glicoinositolfosforil ceramidas; espectrometria de massas; espectroscopia de ressonância magnética nuclear; sorotipo A; mutantes; UDP-xilose sintase; UDP-glucose desidrogenase.

## ABSTRACT

GUTIERREZ, Ana Leticia de Souza. **Glicoinsitolfosforil ceramidas de *Cryptococcus neoformans***: estrutura química de cepas selvagem e mutantes. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Biofísica – Biologia Celular) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

*Cryptococcus neoformans* is an opportunistic fungus surrounded by a polysaccharide capsule, which is the most prominent virulence factor. This fungus causes a systemic mycosis, which meningitis is the most common clinical manifestation. The individuals more susceptible to infection have T lymphocyte deficiency resulting from HIV infection, lymphoproliferative diseases, or immunosuppressive therapy.

Some fungal glycans are linked to sphingophospholipid, forming a membrane glycoinositolphosphoryl ceramides (GIPCs), which are not present in mammalian cells. In fungi, phosphorylinositol-containing sphingolipids are essential for growth and viability and are killed by inhibitors of inositolphosphorylceramides (IPC) synthase, a crucial glycosphingolipid biosynthetic enzyme. Therefore, the biosynthesis of phosphorylinositol-containing sphingolipids is a promising target for the development of more effective antifungal agents.

Previously, we have isolated a novel family of complex GIPCs from *C. neoformans* and structural differences between wild type encapsulated (serotype A) and mutant acapsular cells were characterized. Although both synthesize GIPCs bearing a xylose sidechain linked to O-2 of the second mannose distal to inositol, the GIPCs from acapsular mutant (Cap67) were more heterogeneous in their glycan chains (Heise *et al.*, 2002 *Glycobiology*. 12:409-420). In this thesis we present the structures of GIPCs from *C. neoformans* wild type NE241 (KNH99 $\alpha$ ) (serotype A) and from the  $\Delta$ *uxs1* mutant strain NE178 (deleted in the gene encoding UDP-xylose synthase) and from the  $\Delta$ *ugd1* mutant strain NE 321 (deleted in the gene encoding UDP-glucose dehydrogenase). The structures were determined by a combination of tandem mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The main GIPC from NE241 wild type had the structure  $\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 6)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 3)[\text{Xylp}(\beta 1 \rightarrow 2)]\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{Galp}(\beta 1 \rightarrow 6)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{InsP}$ -phytoceramide. Whereas the major structure from GIPCs of NE178 and NE321 mutants had,  $\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{Galp}(\beta 1 \rightarrow 6)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{InsP}$ -phytoceramide; and minor structures of  $\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{Galp}(\beta 1 \rightarrow 6)\text{Manp}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{InsP}$ -phytoceramide, in NE321 mutant. In summary, the GIPCs from mutants were heterogeneous in the linkage of nonreducing end mannose residues; do not contain xylose; and are unable to transfer  $\alpha\text{Manp}(1 \rightarrow 6)$  to oligoglycan chain. We discuss about the specificity of substrate acceptor structures for glycosyltransferases that have not been before characterized in *C. neoformans*, which could be potential targets for new antifungal compounds.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, glycoinsitolfosforil ceramides; mass spectrometry; nuclear magnetic spectroscopy; serotype A; mutants, UDP-xylose synthase; UDP-glucose dehydrogenase.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 CLASIFICAÇÃO TAXONÔMICA E HABITAT NATURAL.....	20
1.2 ESPÉCIES DE <i>Cryptococcus</i> .....	20
1.2.1 Diferenças entre <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	21
1.2.2 <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> .....	23
1.3 CICLO DE VIDA.....	24
1.3.1 Conjugação.....	24
1.3.2 Frutificação Monocariótica.....	26
1.4 VIRULÊNCIA DO <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	27
1.4.1 Mecanismo de sobrevivência intracelular de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	30
1.5 CRIPTOCOCCOSE. SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA E PATOGENICIDADE.....	31
1.6 ENVELOPE CELULAR DE <i>C. neoformans</i> .....	32
1.6.1 Parede celular.....	33
1.6.2 Cápsula Polissacarídica.....	34
1.6.2.1 Glucuronoxilomana (GXM).....	35
1.6.2.2 Galactoxilomana (GalXM).....	37
1.6.2.3 Manoproteínas (MP).....	38
1.6.3 Glicoinositolfosforilceramidas (GIPCs).....	40
1.6.3.1 Biossíntese de GIPC.....	41
1.6.3.2 Inibidores da via de biossíntese de esfingolípídios em fungos.....	44
1.6.3.3 Importância dos GIPCs.....	45
1.7 GENES REQUERIDOS PARA A FORMAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS CAPSULARES...	46
1.7.1 Genes requeridos para a <i>O</i> -acetilação da GXM.....	46
1.7.2 Genes requeridos para a xilosilação dos componentes capsulares.....	47
1.7.3 Genes requeridos para a síntese de ácido glucurônico.....	48
2 OBJETIVOS.....	53

2.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	53
2.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	53
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	55
3.1	<i>Cryptococcus neoformans</i> .....	55
3.2	<b>MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO</b> .....	55
3.3	<b>OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR</b> .....	56
3.4	<b>OBTENÇÃO DOS GIPCS</b> .....	56
3.4.1	<b>Extração do polissacarídeo capsular e peptídeos-polissacarídeos</b> .....	56
3.4.2	<b>Extração de glicoconjugados ancorados à membrana plasmática</b> .....	56
3.4.3	<b>Purificação dos Glicoinositolfosforilceramidas (GIPCs)</b> .....	57
3.4.4	<b>Obtenção dos fosfoinositol-oligossacarídeos (PI-oligossacarídeos) a partir dos GIPCs</b> .....	58
3.4.5	<b>Purificação dos PI-oligossacarídeos</b> .....	58
3.5	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS</b> .....	59
3.5.1	<b>Análise por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC)</b> ..	59
3.5.2	<b>Identificação dos monossacarídeos</b> .....	59
3.5.3	<b>Identificação dos ácidos graxos</b> .....	59
3.6	<b>MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS</b> .....	60
3.6.1	<b>Cromatografia gás-líquida (GC)</b> .....	60
3.6.2	<b>Comatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)</b> .....	60
3.6.3	<b>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF-MS)</b> .....	60
3.6.4	<b>Nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (ESI-QTOF-MS)</b> .....	61
3.6.5	<b>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	61
4	<b>RESULTADOS</b> .....	64
4.1	<b>ISOLAMENTO DOS GIPCS DAS CEPAS MUTANTES NE178 E NE321 E DA CEPA SELVAGEM NE241 E ANÁLISE POR CROMATOLOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPTLC)</b> .....	64
4.2	<b>CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA PORÇÃO LIPÍDICA DOS GIPCS DAS CEPAS DE <i>C. neoformans</i></b> .....	64
4.3	<b>CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PORÇÃO OLIGOSSACARÍDICA DOS GIPCS DAS CEPAS MUTANTES E SELVAGEM DE <i>C. neoformans</i></b> .....	68

<b>4.4</b>	<b>ANÁLISE DOS GIPCs DA AMOSTRAS MUTANTES E SELVAGEM POR MALDI-TOF-MS.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS PI-OLIGOSSCARÍDEOS POR ESI-MS.....</b>	<b>73</b>
<b>4.6</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS PI-OLIGOSSCARÍDEOS POR ESI-MS/MS.....</b>	<b>76</b>
<b>4.7</b>	<b>ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DOS PI-OLIGOSSACARÍDEOS.....</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>106</b>



# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CLASIFICAÇÃO TAXONÔMICA E HABITAT NATURAL

O *Cryptococcus* pertence ao Reino, Fungi; Filo, Basidimicota; Subfilo, Basidimicotina; Ordem, Sporidiales; Família, Sporidiobolaceae; Gênero: *Filobasidiella* (*Cryptococcus*). A fonte ambiental majoritária de espécies *Cryptococcus* é o solo contaminado por excretos de pombos (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*) ou árvores de eucalipto e madeira em decomposição (*Cryptococcus gattii*) (Callejas *et al.*, 1998; Chakrabarti *et al.*, 1997; Lazera *et al.*, 1998; Mahmoud, 1999) (Figura 1). *C. neoformans* var. *neoformans* está distribuído no mundo todo, enquanto *C. gattii* é restrito aos trópicos e ao hemisfério Sul (Boekhout *et al.*, 1997).

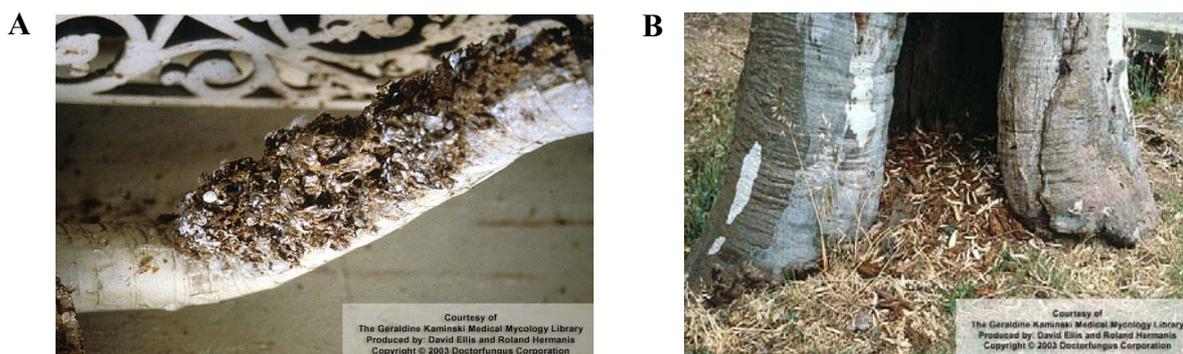


Figura 1: (A) excreto de pombo, habitat natural de *C. neoformans* var. *neoformans*. (B) madeira em decomposição, na cavidade da árvore de *Eucalyptus camaldulensis*, habitat natural de *C. gattii*. (Imagens adaptadas de <http://www.doctorfungus.org/>).

### 1.2 ESPÉCIES DE *Cryptococcus*

O *Cryptococcus neoformans*, agente etiológico da criptococose, é considerado uma espécie homogênea desde 1949, quando a existência de quatro sorotipos foi descrita. Os sorotipos foram classificados, em A, B, C e D, de acordo com as propriedades antigênicas da cápsula polissacarídica (Kwon-Chung e Varma, 2006).

O reconhecimento de uma diversidade genética foi possível após a descoberta do heterotalismo em *C. neoformans*. Em 1975, o primeiro teleomorfo do *C. neoformans* foi

descrito como *Filobasidiella neoformans* oriundo da conjugação entre duas cepas do sorotipo D e entre cepas dos sorotipos A e D (Kwon-Chung, 1975; 1976). A segunda espécie teleomórfica descrita foi *Filobasidiella bacillispora*, proveniente da conjugação entre duas cepas compatíveis dos sorotipos B e C (Kwon-Chung, 1976). A correlação entre os sorotipos e os dois diferentes teleomorfos indicaram que as diferenças entre esses dois sorogrupos não estão limitadas apenas às suas propriedades antigênicas. Estudos subsequentes mostraram que as duas espécies são distintas em relação a seus nichos ecológicos (Kwon-Chung e Bennett, 1978; Ellis e Pfeiffer, 1990), epidemiologia (Kwon-Chung e Bennett, 1984), bioquímica (Bennett *et al.*, 1978; Polacheck e Kwon-Chung, 1980, 1986; Min e Kwon-Chung, 1986; Kwon-Chung *et al.*, 1987) e genética (Wickes *et al.*, 1994; <http://www.bcgsc.ca/gc/CRYPTOCOCCUS/>).

### 1.2.1 Diferenças entre *C. neoformans* e *C. gattii*

A separação das cepas de *C. neoformans* em duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* (*C. bacillisporus*) foi baseada em diferenças morfológicas entre seus teleomorfos, respectivamente, *F. neoformans* e *F. bacillispora* e nas diferenças bioquímicas entre os anamorfos. Embora as diferenças de tamanho e forma dos basidiosporos produzidos por *F. neoformans* e *F. bacillispora* sejam evidentes (Figura 2) a morfologia de seus anamorfos não apresenta diferença marcante que permita distinção (Kwon-Chung e Varma, 2006). As células leveduriformes de *C. gattii* são elípticas ou em forma de gota, enquanto que tal formato é raramente observado em *C. neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 1982). Entretanto, as duas espécies podem ser distinguidas com mais confiabilidade pelos seus fenótipos observados quando os fungos são crescidos em determinados meios de cultura. Diferenças bioquímicas são claramente observadas. Cepas de *C. neoformans* crescidas em agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) não reagem positivamente, diferente das cepas de *C. gattii* (Figura 3). A reação que ocorre nesse

meio de cultura pode ser usada como diagnóstico para a separação entre as duas espécies. O agar CGB foi formulado baseado-se nas diferenças entre *C. neoformans* e *C. gattii* em relação à utilização da glicina como fonte de nitrogênio e carbono e nas diferenças de suscetibilidade à L-canavanina, um análogo da arginina (Min e Kwon-Chung, 1986; Polacheck e Kwon-Chung, 1986). A reação positiva produzida por *C. gattii* no agar CGB e a reação negativa do *C. neoformans* indicam diferença no metabolismo de nitrogênio entre essas espécies (Polacheck e Kwon-Chung, 1986). Outras diferenças fenotípicas podem ser distinguidas utilizando o kit comercial de sorotipagem (Crypto Kit, Japão).

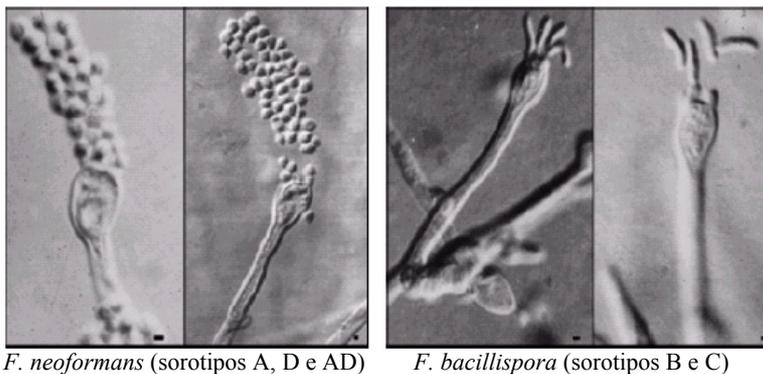


Figura 2: Diferenças fenotípicas entre os teleomorfos de *C. neoformans* (*F. neoformans*) e *C. gattii* (*F. bacillispora*) (barra = 1  $\mu$ m) (Kwon-Chung e Varma, 2006).

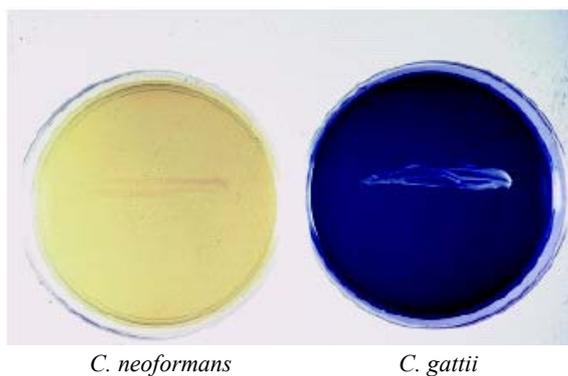


Figura 3: Reação observada em agar CGB por *C. neoformans* e *C. gattii*. (48 h / 30 °C) (Kwon-Chung e Varma, 2006).

### 1.2.2 *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*

A descoberta do heterotalismo em *C. neoformans* foi primeiramente descrita em cepas do sorotipo D. Culturas isoladas de basidiosporos foram obtidas por micromanipulação de esporos produzidos por conjugação entre um isolado clínico NIH12 (*MAT $\alpha$* ) e um isolado do ambiente NIH433 (*MATa*). A recombinação genética foi confirmada pela análise da progênie do cruzamento - cepas B-3501 (*MAT $\alpha$* ) e B-3502 (*MATa*) - a geração  $F_1$  de NIH12 x NIH433. Também foi descrita a conjugação entre cepas do sorotipo A com sorotipo D e a produção de basidiosporos viáveis, embora a caracterização genética da progênie não tenha sido feita (Kwong-Chung e Varma, 2006). Após as seqüências de DNA de alguns genes terem sido disponibilizadas, tais como as dos genes *ura5*, *lac1* e *cap59* (Edman e Kwon-Chung, 1990; Williamson, 1994; Chang e Kwon-Chung, 1994), foi possível ser feita uma análise filogenética. As sequências que compreendem as diferentes subunidades dos genes de RNA ribossomal genômico ou mitocondrial também contribuíram para a análise filogenética (Fell *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000). Os resultados observados na diversidade da seqüência de DNA levaram os autores à proposição de uma nova variedade, *C. neoformans* var. *grubii*, para acomodar as cepas do sorotipo A (Franzot *et al.*, 1999), ficando as cepas do sorotipo D agrupadas na variedade *neoformans*. Porém, alguns investigadores sugerem que as diferenças genéticas entre as cepas dos sorotipos D e A justificariam a criação de uma nova espécie para a variedade de *C. neoformans* var. *grubii*. No entanto, outros autores sugerem que essas propostas necessitam ser examinadas sob o conceito biológico de espécie.

A caracterização genética de cepas do sorotipo AD, que reagem tanto com o soro anti-A quanto anti-D, foi feita. Observou-se que essas cepas são diplóides ou

aneuplóides, contendo seqüências específicas tanto do sorotipo A quanto do sorotipo D (Cogliati *et al.*, 2001; Lengeler *et al.*, 2001). Após a análise genética de um grande número de cepas do sorotipo AD *MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$*  do meio ambiente e de isolados clínicos ficou evidente que estas cepas eram produto da conjugação entre as cepas dos sorotipos A e D (Tanaka *et al.*, 1999; Cogliati *et al.*, 2001; Lengeler *et al.*, 2001).

### 1.3 CICLO DE VIDA

O *C. neoformans* é isolado do meio ambiente e de pacientes sob a forma semelhante à levedura que se divide por brotamento. Entretanto, o fungo também pode sofrer uma transição dimórfica para o crescimento na forma de filamentos por duas vias distintas de diferenciação, a conjugação e a frutificação monocariótica (Figura 4). A filamentação permite aumentar a superfície de contato para a busca por nutrientes e permite a produção de esporos que podem ser considerados agentes infecciosos.

#### 1.3.1 Conjugação

O ciclo sexual do *C. neoformans* envolve a fusão de células haplóides de tipos conjugantes opostos ( $\alpha$  e **a**) para produção de filamentos dicarióticos e foi descrito há pelo menos trinta anos (Kwon-Chung, 1975; Kwon-Chung, 1976; para revisão, Fraser *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2003). As três variedades de *Cryptococcus* mostram diferenças no comportamento da conjugação. A conjugação em *C. neoformans* var. *neoformans* é resistente e não é específica à cepa; enquanto no *C. neoformans* var. *grubii* a conjugação é considerada específica (Nielsen *et al.*, 2003; Litvintseva *et al.*, 2003). As cepas de *C. gattii* isoladas de diversas fontes são predominantemente estéreis em laboratório. No entanto, quando as células  $\alpha$  e **a** são encontradas no mesmo ambiente, não há evidências de recombinação (Fraser *et al.*, 2003; Halliday e Carter, 2003).

O tipo conjugante é considerado um fator de virulência em *C. neoformans*. Estudos epidemiológicos mostraram que isolados clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans* são geralmente do tipo conjugante  $\alpha$  (cerca de 96 %) sendo o tipo conjugante mais virulento (Kwon-Chung *et al.*, 1992; Kwon-Chung *et al.*, 1978). Embora a maioria dos isolados clínicos de *C. neoformans* var. *grubii* seja, também, do tipo conjugante  $\alpha$ , os tipos conjugantes  $\alpha$  e **a** são igualmente virulentos (Nielsen *et al.*, 2003). Entretanto, na coinfeção, utilizando ambos os tipos conjugantes, o  $\alpha$  é capaz de atingir o sistema nervoso central (Nielsen *et al.*, 2005).

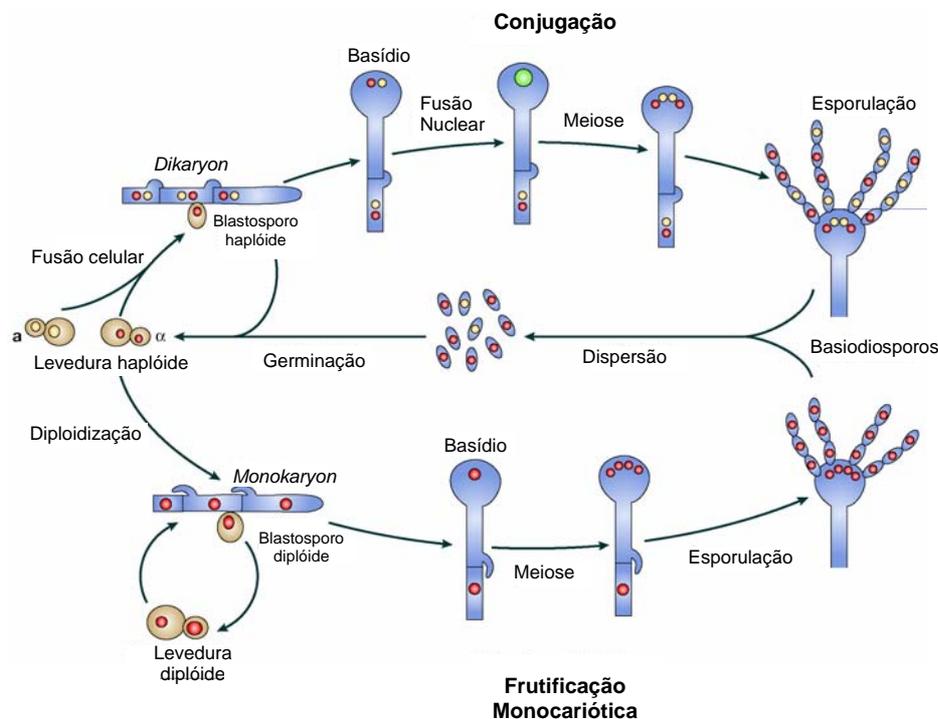


Figura 4: **Modelo proposto para o ciclo de vida do *C. neoformans*** (Idnurm *et al.*, 2005). Em resposta a limitação de nutrientes, as células  $\alpha$  e **a** secretam peptídeos-ferormônios que desencadeiam a fusão célula-célula. A fusão nuclear é demorada e o dicarionte resultante inicia o crescimento em filamentos. Os dois núcleos parentais migram de maneira coordenada na hifa dicariótica e, pela formação de septos que separam as células, um núcleo é transferido para a penúltima célula da hifa através de um “grampo” conector. No estágio de desenvolvimento do basídio, os dois núcleos fusionam e sofrem meiose, produzindo quatro produtos meióticos que sofrem mitose e brotam da superfície do basídio formando as cadeias de basidiosporos. Durante a frutificação monocariótica, células de um tipo conjugante, por exemplo células  $\alpha$ , tornam-se diplóides ( $\alpha / \alpha$ ) tanto por endoduplicação quanto por fusão nuclear, após a fusão de duas células. A hifa monocariótica diplóide forma um “grampo” conector rudimentar que não está fusionado à célula anterior. No estágio de desenvolvimento do basídio, ocorre a meiose e basidiosporos haplóides são produzidos em quatro cadeias.

### 1.3.2 Frutificação monocariótica

As cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* também podem se diferenciar e sofrer frutificação monocariótica. Durante a frutificação, as células  $\alpha$  (e em menor grau as células a) respondem à limitação de nutrientes por filamentação e esporulação. Inicialmente, a frutificação monocariótica foi considerada ser haplóide, mitótica e assexuada. No entanto, estudos mais recentes mostraram que a reprodução sexuada pode ocorrer entre células do mesmo tipo conjugante (Lin *et al.*, 2005).

A conjugação e a frutificação monocariótica possuem características morfológicas similares. Porém, as hifas produzidas durante a frutificação são mononucleadas, com “grampos” de conexão que não estão fusionados, enquanto que as hifas produzidas durante a conjugação contêm dois núcleos e os “grampos” de conexão estão fusionados. A conjugação e a frutificação são estimuladas por condições ambientais similares – falta de nitrogênio, dessecação, ausência de luz e ferormônios – e ambos os processos envolvem o desenvolvimento de hifas com “grampos” de conexão e a produção de estruturas frutificantes que produzem quatro cadeias de esporos (Wickes *et al.*, 1996).

A frutificação sem o par conjugante oposto pode oferecer uma vantagem de sobrevivência ao *C. neoformans*, particularmente nas mudanças de ambiente e em ambientes extremos. A característica mais curiosa da frutificação monocariótica é a predominância das células  $\alpha$  (Wickes *et al.*, 1996; Tschärke *et al.*, 2003). Essa observação explicaria porque as células  $\alpha$  são mais abundantes no meio ambiente e nos isolados clínicos. Vários estudos vêm sendo feitos visando a identificação, nas células  $\alpha$ , de genes específicos para a frutificação monocariótica e se essa frutificação ocorre em células de *C. neoformans* var. *grubii* ou *C. gattii* (para revisão, Idnurm *et al.*, 2005).

#### 1.4 VIRULÊNCIA DO *Cryptococcus neoformans*

O gênero *Cryptococcus* inclui cerca de 37 espécies, porém apenas as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são patogênicas. Embora o *Cryptococcus* seja um fungo oportunista que acomete pacientes imunocomprometidos, há descrição de criptococose em indivíduos que são imunocompetentes (Speed e Dunt, 1995). *C. neoformans* está distribuído por todos os ambientes, sendo, comumente, isolado de excreto de aves, solo e árvores. A exposição primária ao *Cryptococcus* pela inalação de esporos ou células de leveduras dessecadas é assintomática, podendo levar à cura ou desenvolver uma infecção latente com granulomas nos pulmões ou nos linfonodos (Sukroongreung *et al.*, 1998). Nos indivíduos imunocomprometidos, os fungos podem alastrar-se dos pulmões para o sistema nervoso central e causar meningoencefalite que é fatal se não for tratada (Liu *et al.*, 2002) (Figura 5).

Três principais fatores de virulência são descritos em *C. neoformans*, a cápsula polissacarídica, a produção de melanina e a habilidade de crescer na temperatura corporal do homem. A cápsula, que é composta por glucuronoxilomanana (GXM) (88 %), galactoxilomanana (GalXM) (10 %) e manoproteínas (MPs) (2%), está presente em isolados do meio ambiente e pode proteger as células da desidratação (Vartivarian *et al.*, 1993; Granger *et al.*, 1985; Aksenov *et al.*, 1973).

A síntese da cápsula pode ser induzida por soro, limitação de ferro e níveis fisiológicos de CO<sub>2</sub> (Zaragoza *et al.*, 2003); interfere na fagocitose pelos macrófagos e elimina os componentes do sistema complemento, inibindo a resposta imune do hospedeiro à infecção (Bose *et al.*, 2003; McFadden e Casadevall, 2001). A cápsula polissacarídica é continuamente desprendida do fungo, podendo ter efeitos deletérios ao sistema imune do hospedeiro. Os componentes capsulares que são desprendidos após o fungo ter sido fagocitado pelos macrófagos podem promover a sobrevivência

intracelular do fungo, o que pode ser crucial para o estado de latência da doença por um longo período (Idnurm *et al.*, 2005).

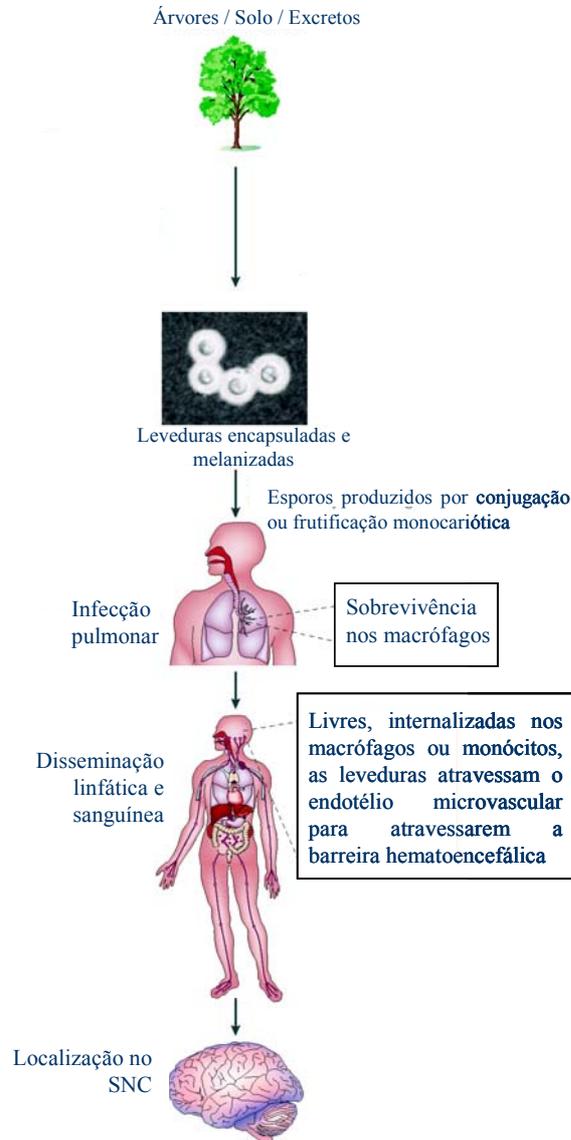


Figura 5: **Via de virulência do *C. neoformans*** (Idnurm *et al.*, 2005). Os fungos sobrevivem no solo, árvores e excretos de aves, onde podem interagir com animais ou predadores do solo, mantendo sua virulência. Os humanos inalam células de leveduras dessecadas ou esporos, podendo contrair a forma pulmonar da doença. Se o hospedeiro encontra-se imunocomprometido, o fungo pode se propagar dos pulmões e penetrar no sistema nervoso central (SNC) através dos microcapilares da barreira hematoencefálica. A infecção do SNC representa a forma mais grave da criptococose.

A melanina é um pigmento que parece proteger o *C. neoformans* da radiação ultravioleta. Há evidências que células melanizadas estão presentes nos excretos de pombos (Nosanchuk *et al.*, 1999). Durante o desenvolvimento da doença, a melanina pode ser gerada pela oxidação de catecolaminas encontradas, principalmente, no cérebro do hospedeiro. A melanina protege o fungo dos radicais livres tóxicos que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro (Zhu e Williamson, 2004; Nosanchuk *et al.*, 2000; Casadevall *et al.*, 2000).

O *C. neoformans* é capaz de crescer na temperatura corporal dos mamíferos (37 °C) permitindo a infecção em humanos (Alspaugh *et al.*, 2000). Cepas virulentas de *Cryptococcus* são isoladas do meio ambiente. No solo, o *C. neoformans* está em contato com outros microrganismos e este fato sugere que os fatores de virulência poderiam servir como mecanismos de defesa contra predadores (Casadevall *et al.*, 2003). Em outros animais, a criptococose já foi identificada, particularmente nas infecções causadas por *C. gattii* (O'Brien *et al.*, 2004; Lester *et al.*, 2004). A virulência das cepas pode ser mantida pela infecção em pequenos roedores ou outros mamíferos que, após a morte, reintroduzem as cepas virulentas ao meio ambiente. Animais infectados por *C. neoformans*, em condições laboratoriais, liberam o fungo por exalação, criando uma outra via, onde a virulência pode ser mantida no meio ambiente (Nosanchuk *et al.*, 2003). Como consequência, a virulência é mantida em um ciclo. No entanto, durante a infecção em humanos, a rota da doença pode culminar na infecção do sistema nervoso central. Evidências de transmissão humano-humano ou humano-ambiente-humano são poucas. Já foi descrita a transmissão do fungo por instrumentos médicos contaminados ou por transplante de tecidos infectados (Wang *et al.*, 2005).

A habilidade do *Cryptococcus* de resistir à fagocitose pelos macrófagos alveolares é uma característica importante na infecção pulmonar e para a dormência ou

latência (Luberto *et al.*, 2003; Tucker e Casadevall, 2002; Murphy, 1998; Huffnagle e Lipscomb, 1998). As infecções latentes podem ser reativadas em resposta à imunidade comprometida e o fungo nos pulmões se propaga através da corrente sanguínea ou sistema linfático para outros órgãos, incluindo o cérebro (Garcia-Hermoso *et al.*, 1999). Isso demonstra que a criptococose meningocócica é devida à habilidade do *C. neoformans* atravessar a barreira hematoencefálica. O *C. neoformans* pode ser recuperado do sangue periférico como célula livre ou internalizado em células mononucleares (macrófagos ou neutrófilos) (Santangelo *et al.*, 2004; Chrétien *et al.*, 2002), sendo transportado aos microcapilares onde interage com a barreira hematoencefálica (Olszewski *et al.*, 2004). Há resultados que indicam que o fungo atravessa as células endoteliais diretamente por transcitose (movimento de células através de outras células) ou por um mecanismo tipo “cavalo de Tróia” (carreado por fagócitos mononucleares).

#### **1.4.1 Mecanismo de sobrevivência intracelular de *Cryptococcus neoformans***

Uma das primeiras propostas para a patogênese criptococcal era semelhante ao modelo, também proposto, para as bactérias encapsuladas. O polissacarídeo capsular do *Cryptococcus* preveniria a fagocitose e a doença seria causada pelo acúmulo de microrganismos e polissacarídeo ao redor das células, resultando na compressão do tecido do hospedeiro (Littman, 1959; Sheppe, 1924). Quando opsonizadas pelo sistema complemento ou anticorpos, as células fagocíticas seriam capazes de internalizar o *C. neoformans*, a partir de resultados observados *in vitro*. Em humanos, a fagocitose do *C. neoformans* por monócitos é seguida da acidificação do fagossoma e fusão fagolisossomal (Levitz *et al.*, 1999). Entretanto, a fagocitose não está sempre envolvida com a morte do fungo. Existem evidências *in vitro* que o *C. neoformans* é capaz de replicar-se intracelularmente (Diamond *et al.*, 1973 e 1972; Lee *et al.*, 1995; Levitz e

DiBenedetto, 1989). Estudos *in vivo*, utilizando murinos, demonstraram que o *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo que além de ser internalizado por macrófagos alveolares, também, poderia ser fagocitado por neutrófilos (Feldmesser *et al.*, 2000). O mecanismo para o parasitismo intracelular inclui a permeabilização da membrana fagossomal e o acúmulo dos polissacarídeos capsulares em vesículas citoplasmáticas (Tucker e Casadevall, 2002; Feldmesser *et al.*, 2001).

Os estudos de interação entre o *C. neoformans* e macrófagos alveolares demonstraram que é possível a sobrevivência e replicação do fungo intracelularmente, levando a lise do macrófago (Lee *et al.*, 1995; Tucker e Casadevall, 2002; Feldmesser *et al.*, 2000). Recentemente, Alvarez e Casadevall (2006) demonstraram que o *C. neoformans* pode sair do macrófago através da extrusão do fagossoma. Após esta extrusão fagossomal, tanto o fungo quanto o macrófago permanecem viáveis. Esse mecanismo sugere que o *C. neoformans* pode escapar dos macrófagos de mamíferos para continuar sua propagação e disseminação (Alvarez e Casadevall, 2006).

## 1.5 CRIPTOCOCCOSE. SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA E PATOGENICIDADE

*C. neoformans* var. *neoformans* é um fungo encapsulado que causa uma micose sistêmica, cuja manifestação clínica mais grave é a meningite criptococcócica (Mitchell e Perfect, 1995). A criptococcose acomete tanto pacientes imunocomprometidos quanto imunocompetentes. A AIDS é o fator de predisposição mais comum para o desenvolvimento da criptococcose (Abadi *et al.*, 1999) e é também a causa do aumento na incidência da doença, mas o principal fator de risco para a criptococcose é a deficiência na imunidade mediada por células (Barchiesi *et al.*, 2005). Assim, os indivíduos mais suscetíveis à infecção são aqueles que possuem deficiência em linfócitos T resultante de infecção pelo vírus HIV; doenças linfoproliferativas ou

terapias imunossupressoras, tais como, pacientes transplantados ou tratados com quimioterapia antineoplásica ou por longo período de tratamento com corticosteróides (Mitchell e Perfect, 1995; Buchanan e Murphy, 1998; Collier *et al.*, 1998; Korfel *et al.*, 1998; Urbini *et al.*, 2000). Em pacientes com AIDS, a criptococose é considerada a segunda maior causa de morte, depois da tuberculose (French *et al.*, 2002). A criptococose também pode comprometer a pele, pulmões, próstata, trato urinário, olhos, miocárdio, ossos e articulações (Bailly *et al.*, 1991; Baldwin *et al.*, 1988; Barber *et al.*, 1995; Beck *et al.*, 1955; Burch *et al.*, 1975; Durden *et al.*, 1994; Gurevitz *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1987; Newton *et al.*, 1994; Seaton *et al.*, 1997; Sobel *et al.*, 1999).

### 1.6 ENVELOPE CELULAR DE *C. neoformans*

Além da membrana plasmática, o *C. neoformans* está envolvido por uma parede celular composta por glucanas (James *et al.*, 1990) e por uma cápsula polissacarídica que como mencionado acima é descrita como essencial à virulência do fungo (Bulmer *et al.*, 1967; Fromtling *et al.*, 1982; Kwon-Chung e Rhodes, 1986).

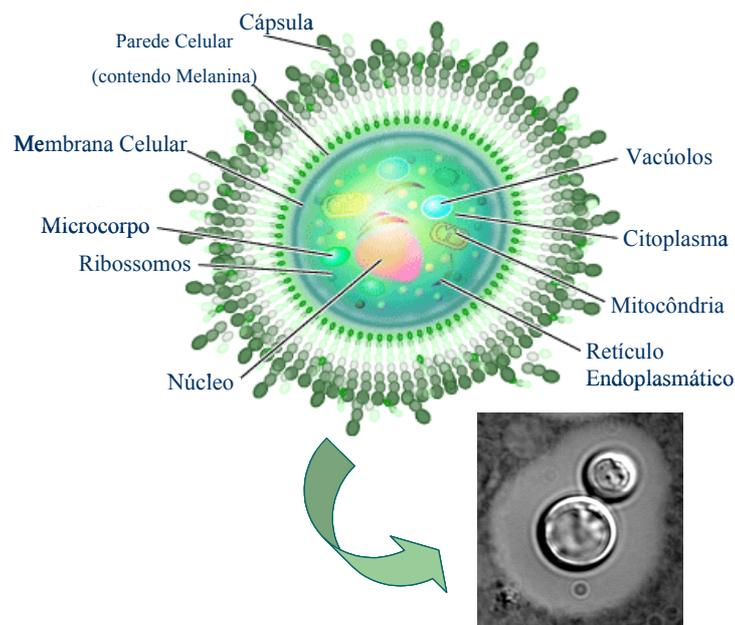


Figura 6: Esquema da célula de *Cryptococcus neoformans* e fotomicrografia demonstrando a cápsula polissacarídica.

### 1.6.1 Parede celular

James e colaboradores (1990) purificaram a parede celular de um mutante acapsular Cap67 de *C. neoformans* e caracterizaram seus componentes como 86 % de glucose e 7,3 % de *N*-acetil glucosamina. Embora esse mutante não sintetize GXM, é capaz de sintetizar GalXM e MPs. Quatro frações foram isoladas contendo D-glucopirranana, sendo duas insolúveis em água (Gi 1 e 2) e duas solúveis em água (Gs 1 e 2). As estruturas das D-glucopirrananas foram determinadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e por espectrometria de massas de seus derivados per-*O*-metilados. A fração Gi-1 é formada por  $\alpha$ -(1→3)-D-glucopirranana (97 %) linear, com algumas ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1→4) (3 %); a fração Gs-1 e Gs-2 contêm  $\beta$ -(1→6)-D-glucopirrananas ramificadas, havendo substituição na posição *O*-3 (10–12 %) por dissacarídeos formados de  $\beta$ -D-glucopirranose-(1→3)- $\beta$ -D-glucopirranose. A fração Gs-2 é mais ramificada do que a fração Gs-1; a fração Gi-2 é composta por 80 % da estrutura encontrada na fração Gi-1 e 20 % da glucana encontrada nas frações Gs-1 e Gs-2.

Reese e Doering (2003) demonstraram que o componente da parede celular  $\alpha$ -(1→3)-D-glucopirranana é necessário para a associação da cápsula à levedura. A inibição pós-transcrição da expressão da  $\alpha$ -1,3-glucana sintase gerou células incapazes de manter ligadas ao seu redor os componentes da cápsula, apesar de haver a síntese dos polissacarídeos capsulares. As células de *Cryptococcus* resultantes desse experimento tiveram um crescimento lento e eram acapsulares. Para compreender o mecanismo de ligação da cápsula à célula, os autores realizaram um ensaio utilizando material capsular liberado para o meio de cepas selvagens de *C. neoformans*; um mutante acapsular CAP59 de *C. neoformans*; células de *Saccharomyces cerevisiae* e células de *Candida albicans*. Esse ensaio demonstrou que o material capsular oriundo de *C. neoformans* selvagem ligou-se à cepa acapsular, mas não foi capaz de se ligar às células de

*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. A  $\alpha$ -1,3-glucana é encontrada na parede celular de muitos fungos além de *C. neoformans*, incluindo fungos patogênicos como, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Klimpel e Goldman, 1988; James *et al.*, 1990; Hogan e Klein, 1994; Borges-Walmsley *et al.*, 2002), mas não é um componente da parede celular de *S. cerevisiae* (Lipke e Ovalle, 1998) nem de *C. albicans* (Klis *et al.*, 2001). Nesse artigo foi demonstrado um novo modelo de ligação da cápsula polissacarídica à célula de levedura (Reese e Doering, 2003).

Mais recentemente, Reese e colaboradores (2007) observaram que as células de *Cryptococcus* deletadas no gene da  $\alpha$ -glucana sintase são sensíveis à temperatura e têm dificuldades no brotamento. Confirmaram, também, que os componentes capsulares não estão ligados às células, mas continuam sendo liberados para o meio extracelular. Observaram, ainda, que embora haja a ausência da  $\alpha$ -glucana da parede celular, há um aumento de quitina/quitosana e uma redistribuição da  $\beta$ -glucana nas frações da parede celular. Como resultado interessante, os autores verificaram que os mutantes sem  $\alpha$ -glucana são incapazes de crescer em camundongos (modelo de infecção *in vivo*), mas continuam causando a morte em nematódeos (Reese *et al.*, 2007).

### 1.6.2 Cápsula polissacarídica

*C. neoformans* é o único eucarioto encapsulado capaz de infectar humanos e a presença da cápsula polissacarídica confere ao fungo algumas características patogênicas comparáveis às bactérias encapsuladas, como por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*. Entretanto, a cápsula de *C. neoformans* tem características únicas encontradas em microrganismo eucariótico, uma estrutura que, devido ao seu tamanho e complexidade estrutural, torna as cápsulas

bacterianas estruturas extremamente mais simples (McClelland *et al.*, 2006; McFadden *et al.*, 2006).

Os componentes do polissacarídeo capsular, tanto o que está ainda associado às células quanto o que é liberado para o meio, impede a resposta imune do hospedeiro por alterar o processo de defesa como a fagocitose, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a migração de leucócitos (Buchanan e Murphy, 1998). A cápsula também confere proteção às células fúngicas contra dessecação e é essencial para a formação do biofilme criptococcal (Martinez e Casadevall, 2005).

A cápsula polissacarídica do *C. neoformans* possui dois polissacarídeos majoritários: glucuronoxilomanana (GXM) e a galactoxilomanana (GalXM), além de manoproteínas (MPs).

#### **1.6.2.1 Glucuronoxilomana (GXM)**

As GXMs são polímeros de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-manopirranana lineares, substituídos por uma unidade de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) ácido glucurônico em cada terceira manose e com graus variados de 6-*O*-acetilação (Cherniak *et al.*, 1998; Cherniak e Sundstrom, 1994; Cherniak *et al.*, 1988). A cada trissacarídeo, a manose é substituída por unidades de xilose, que estão unidas por ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) ou  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 7) (Cherniak *et al.*, 1998). As manoses que estão xilosiladas, normalmente, não são *O*-acetiladas (Moyrand *et al.*, 2004; Janbon *et al.*, 2001; Cherniak *et al.*, 1988).

As GXM são determinantes dos quatro sorotipos descritos até o momento: A, B, C e D e AD. As cepas dos sorotipos A e D são mais comumente associados a doenças em humanos. A GXM das cepas dos sorotipos B e C apresenta um número maior de unidades de xilose quando comparado a GXM de cepas dos outros sorotipos (Figura 7) (Cherniak *et al.*, 1998).

A GXM forma uma estrutura de massa molecular alta que se auto-associa formando um emaranhado de fibras (Gadebusch *et al.*, 1964; Turner e Cherniak, 1991; McFadden *et al.*, 2006). A GXM pode ser liberada da cápsula e acumulada nos tecidos durante a infecção. É proposto que as respostas imunes podem ser moduladas e até mesmo inibidas pela GXM, aumentando a patogenicidade do *C. neoformans* (Vecchiarelli, 2000). Alguns autores tentaram relacionar as altas concentrações de GXM nos tecidos com o aumento da viscosidade dessas moléculas, causando disfunções nos mecanismos da célula hospedeira (Graybill *et al.*, 2000), entretanto, recentemente, McFadden e colaboradores (2006) mostraram que o polissacarídeo aniônico não aumenta *in vivo* a viscosidade em concentrações relevantes. Além disso, já havia sido demonstrada que a GXM apresenta uma estrutura mais maleável devido a sua característica aniônica (Gates *et al.*, 2004).

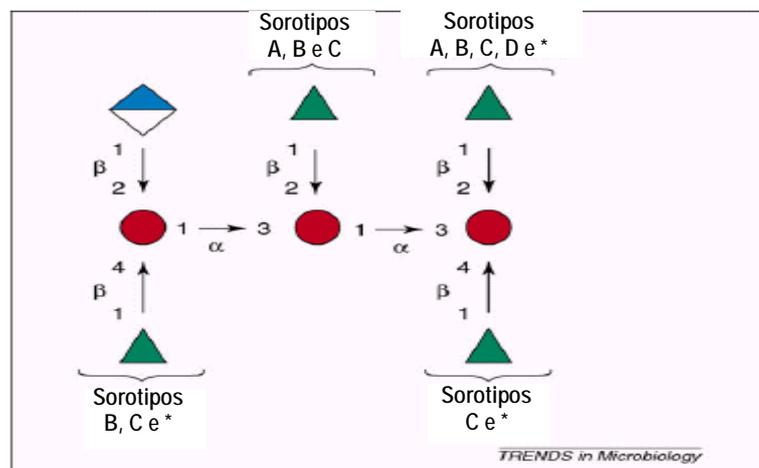


Figura 7: As seis unidades repetitivas de GXM encontradas nos diferentes sorotipos. Diferentes cepas podem conter uma ou mais unidades repetitivas. Cada unidade repetitiva contém três manoses (círculos vermelhos) e um ácido glucurônico (losango azul e branco). A cadeia lateral de xilose (triângulos verdes) que predominam nos sorotipos A, B, C e D estão designados com os sorotipos correspondentes no final. Uma quinta unidade repetitiva, que não é predominante em nenhum sorotipo, contém xilose na cadeia lateral e está designada com um asterisco (\*). Uma sexta unidade repetitiva que não contém xilose também foi identificada (McFadden *et al.*, 2006).

### 1.6.2.2 Galactoxilomanana (GalXM)

GalXM é formada por uma cadeia principal de unidades de galactose ( $\alpha(1\rightarrow6)$  galactana) que possui ramificações de  $\beta(1\rightarrow3)$ -galactose- $\alpha(1\rightarrow4)$ -manose- $\alpha(1\rightarrow3)$ -manose. Por sua vez, esta seqüência de açúcares ramificados pode estar ligada a unidades de xilose como  $\beta(1\rightarrow3)$  ou  $\beta(1\rightarrow2)$  (James e Cherniak, 1992; Vaishnav *et al.*, 1998) (Figura 8). Os primeiros resultados sobre a estrutura da GalXM demonstraram que as unidades monossacarídicas possuíam configuração piranosídica. No entanto, galactose na forma furanosídica também foi identificada (Vaishnav *et al.*, 1998). Foi caracterizado um gene em *C. neoformans* que codifica uma UDP-galactopiranosose mutase, que converte a galactopiranosose em galactofuranose (Beverley *et al.*, 2005). GalXM possui uma massa molecular menor que a GXM,  $1,01 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  versus  $1,7-7,4 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  e, conseqüentemente, mais moles de GalXM do que de GXM podem estar presentes no polissacarídeo capsular (McFadden *et al.*, 2006).

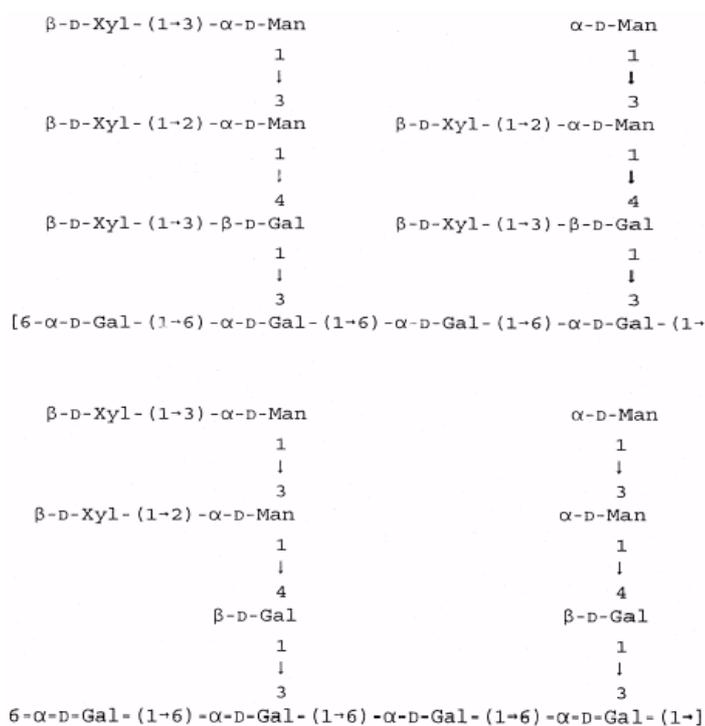


Figura 8: GalXM é formada por uma  $\alpha(1\rightarrow6)$ -galactana. O polissacarídeo está ramificado na posição 3 de resíduos alternados de galactose por uma cadeia lateral de  $\alpha\text{-D-Man}-(1\rightarrow3)\text{-}\alpha\text{-D-Man}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Gal}$ . A cadeia lateral pode estar substituída por zero a três unidades terminais de  $\beta$ -xilose (Vaishnav *et al.*, 1998).

### 1.6.2.3 Manoproteínas (MPs)

O envolvimento de células T para a defesa efetiva contra a criptococose levou investigadores a procurarem antígenos que estimulassem a resposta imune mediada por células e que poderiam ser utilizados como candidatos à vacina (Levitz e Specht, 2006). Inicialmente, Murphy (1988) isolou do filtrado do meio de cultura de *C. neoformans* antígenos denominados CneF que eram capazes de estimular, em camundongos imunizados com estes antígenos, resposta imune do tipo hipersensibilidade tardia (DTH) e a produção de citocinas. O fracionamento do CneF e a sua capacidade de se ligar à coluna de Concanavalina A sugeriram a presença de unidades de manose nessas frações, sugerindo a presença de manoproteínas. As manoproteínas, mas não outros componentes do CneF, são as responsáveis pelas respostas DTH (Murphy *et al.*, 1988). Além disso, a estimulação por manoproteínas de células mononucleares do sangue periférico em pacientes que se recuperaram da criptococose resultou em respostas linfoproliferativas e produção de citocinas (Hoy *et al.*, 1989; Levitz e North, 1997).

De acordo com a eluição na coluna de cromatografia de afinidade por Concanavalina A três manoproteínas denominadas, MP-1, MP-2 e MP-4, foram caracterizadas (Walenkamp *et al.*, 1999). Outras manoproteínas de *C. neoformans* foram descritas de acordo com a massa molecular, MP98 (Levitz *et al.*, 2001), MP88 (Huang *et al.*, 2002), MP84 e MP115 (Biondo *et al.*, 2005). MP98 e MP88 eram capazes de estimular hibridomas de células T (Levitz *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002); enquanto que MP84 e MP115 reagem com soros de pacientes e de outros animais com criptococose (Biondo *et al.*, 2005).

As estruturas químicas das manoproteínas criptococais são semelhantes (Figura 9) incluindo, seqüências do peptídeo sinal que direcionam a proteína para a superfície celular; uma região C-terminal, rica em serina/treonina, que serve como sítio de

extensiva *O*-glicosilação e uma região para a presença de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Huang *et al.*, 2002).

A manoproteína MP115 difere das outras manoproteínas pelas seguintes características: a região rica em Serina/Treonina é *N*-terminal e não possui sítio de ligação para âncora GPI. Uma vez que a âncora GPI é utilizada para ligar proteínas à parede celular, vários autores acham interessante determinar se MP115 difere das outras MPs em sua localização celular (Biondo *et al.*, 2005).

Pela análise do genoma de *C. neoformans*, mais de quarenta prováveis manoproteínas contendo sequência de peptídeo sinal na região *N*-terminal, região rica em serina/treonina na região *C*-terminal e região de ligação à âncora GPI, foram identificadas (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/cna1/cna1.shtml>).

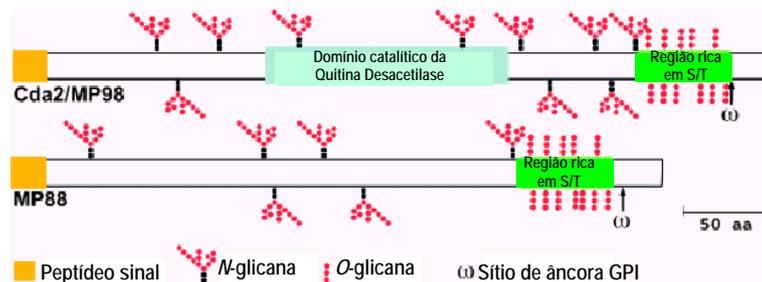


Figura 9: Manoproteínas Cda2/MP-98 e MP-88 de *C. neoformans* (Levitz e Specht, 2006).

Mais recentemente, Eigenheer e colaboradores (2007) fizeram uma análise proteômica das proteínas secretadas e das proteínas ligadas à parede celular de um mutante acapsular Cap59 de *C. neoformans*. As proteínas foram identificadas das células intactas e da parede celular isolada. Em ambos experimentos as proteínas extracelulares foram liberadas após tratamento com tripsina ou  $\beta$ -glucanase. Por esses estudos, os autores identificaram vinte e nove proteínas extracelulares contendo sequência sinal na região *N*-terminal e em mais da metade dessas proteínas uma região

para âncora tipo GPI. Entre as novas proteínas identificadas, cinco eram ancoradas por GPI, com extensas regiões ricas em serina e treonina mas sem um função aparente; uma aspártico protease GPI-ancorada e uma metaloprotease com similaridade estrutural a uma metaloprotease elastinolítica de *Aspergillus fumigatus* (Miyoshi e Shinoda, 2000). Estes estudos sugerem que o *C. neoformans* possui a maquinaria necessária para direcionar à parede celular proteínas ancoradas por GPI (Eigenheer *et al.*, 2007).

### 1.6.3 Glicoinositolfosforilceramidas (GIPCs)

Os GIPCs são glicosfingolipídios de membrana que contêm uma ligação fosfodiéster entre o inositol e a porção ceramida. Por sua vez, as unidades de inositol podem ser substituídas por unidades de açúcar (Figura 10).

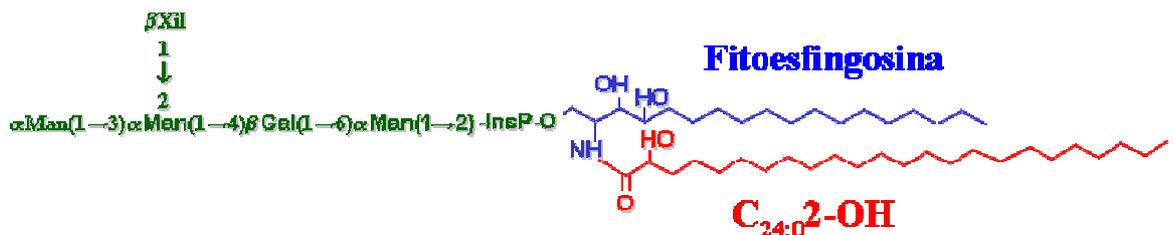


Figura 10: Estrutura do GIPC isolado da cepa selvagem sorotipo A de *C. neoformans* (Heise *et al.*, 2002).

Os esfingolipídios são componentes de membranas de células eucarióticas, sendo encontrados em membrana plasmática, do retículo endoplasmático, do Golgi e dos lisossomos. A presença de esfingolipídios em membranas de mitocôndria (Bionda *et al.*, 2004) e do núcleo (Watanabe *et al.*, 2004) também foi demonstrada. Mais de 300 espécies de esfingolipídios com diferenças em sua porção polar já foram descritas (para revisão, Fahy *et al.*, 2005).

Os esfingolipídios podem ser definidos como lipídios que contêm uma base de cadeia longa (BCL) composta de 18 a 20 átomos de carbono, contendo grupamentos hidroxil no carbono-1 (C-1) e no carbono-3 (C-3) e um grupamento amino no carbono-2 (C-2). As principais BCL encontradas em eucariotos são, esfingosina (SPH);

esfinganina ou dihidroesfingosina (DHS) e a 4-hidroesfinganina ou fitoesfingosina (PHS). Em *Saccharomyces cerevisiae* são descritos dois tipos de BCL, DHS e PHS, sendo, predominante a presença de PHS, que contém um grupamento hidroxil adicional no carbono-4 (C-4) (para detalhes estruturais ver Dickson e Lester, 1999).

As bases de cadeia longa encontram-se *N*-aciladas no grupamento amino livre do C-2 por um ácido graxo, formando a ceramida. Posteriormente, os componentes polares são adicionados à hidroxila do C-1, formando os diferentes esfingolipídios. Em fungos, o principal fosfoesfingolipídio é a inositolfosforilfitoceramida (IPC) (Fahy *et al.*, 2005). GIPCs foram isolados de plantas (Laine e Hsieh, 1987), fungos (Dickson e Lester, 1999) e protozoários (para revisão, Lester e Dickson, 1993).

#### 1.6.3.1 Biossíntese de GIPC

A biossíntese dos GIPCs inicia-se na síntese dos esfingolipídios. A primeira etapa é caracterizada pela condensação de L-serina e de palmitoil-CoA, formando em 3-cetodihidroesfingosina (3-cetoesfinganina), pela serina palmitoiltransferase (SPT) (Figura 11, [1]). O ácido graxo predominante em fungos e em mamíferos é o palmitoil-CoA, no entanto, estearil-CoA também pode ser utilizado. A 3-cetodihidroesfingosina, um intermediário instável, é rapidamente reduzido à dihidroesfingosina (DHS) pela ação da 3-cetodihidroesfingosina redutase (3KSR) dependente de NADPH (Figura 11, [2]).

Na próxima etapa de biossíntese, o grupamento acil, do substrato doador ácido graxo-CoA, é adicionado ao grupo amino livre da DHS, gerando dihidroceramida (Figura 11, [4]). Ao contrário do observado em *S. cerevisiae*, que contém apenas um tipo de cadeia de ácido graxo (C<sub>26:0</sub>-OH), as dihidroceramidas identificadas em células de mamíferos possuem uma vasta heterogeneidade. Cadeias de acil-CoA com comprimentos variados (C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>) podem ser adicionadas, podendo apresentar diferentes

graus de insaturação e hidroxilação (Morell & Radin, 1970; Futerman e Hannun, 2004; Merrill, 2002). Essa diferença entre fungos e mamíferos pode estar associada à falta de especificidade da ceramida sintase animal ao tipo de ácido graxo-CoA. Em células de mamíferos, uma família de genes que codifica diferentes ceramidas sintases, com especificidade em relação à utilização do ácido graxo-CoA foi caracterizada (Venkataraman *et al.*, 2002; Riebeling *et al.*, 2003).

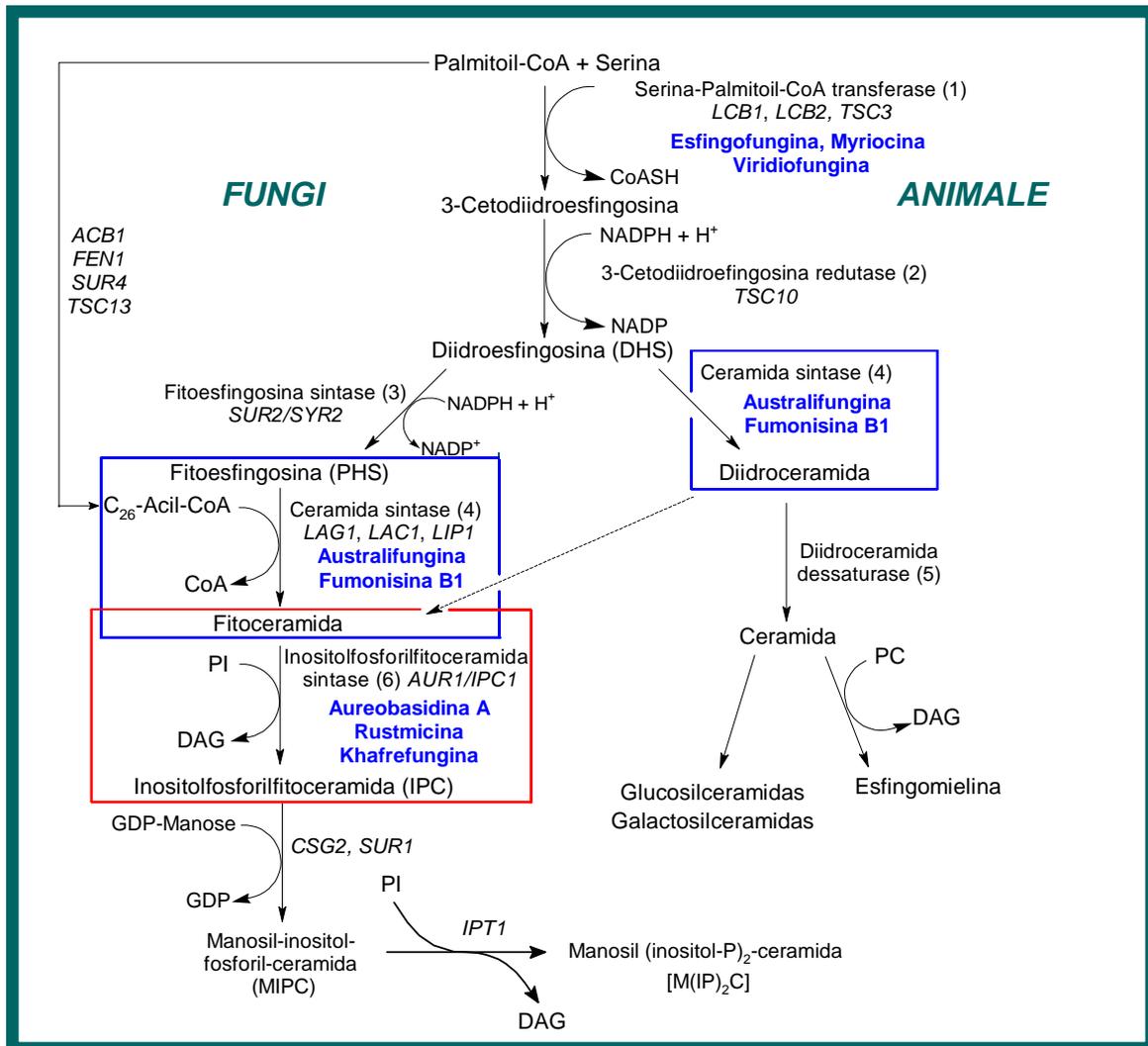


Figura 11: **Biossíntese de esfingolipídios em fungos e em mamíferos.** Os intermediários, os substratos e as enzimas conhecidas estão indicados conforme descrito no texto: [1] serina palmitoil transferase; [2] 3-cetodiidroesfingosina redutase; [3] fitoesfingosina sintase; [4] ceramida sintase; [5] Diidroceramida dessaturase; [6] Inositolfosforilceramida sintase. Os inibidores das biossíntese de esfingolipídios estão indicados em azul ao lado das respectivas etapas. Adaptado de Dickson (1998); Gillard *et al.* (1998); Futerman & Riezman (2005).

A reação de *N*-acilação em *S. cerevisiae* é catalisada pela ceramida sintase dependente de acil-CoA (DHCerS) Essa atividade é especificamente inibida pela micotoxina Fumonisina B1 (FB1) (Wang *et al.*, 1991).

A enzima 4-dihidroesfingosina/dihidroceramida hidroxilase catalisa a hidroxilação na posição C-4 da BCL da DHS (Figura 11, Reação [3]) e, em menor proporção, da dihidroceramida (Figura 11, seta pontilhada). A partir desta etapa, a biossíntese de esfingolipídios é diversificada, dependendo do organismo (fungo ou mamífero). Em fungos, a hidroxilação da dihidroceramida forma a fitoceramida (Figura 11, [3]) (Lester & Dickson, 1993).

Em fungos, pela atividade da fosfatidilinositol:ceramida fosforilinositol transferase (IPC sintase) codificada pelo gene *aur1*, também denominado *ipc1* (Nagiec *et al.*, 1997) há a transferência de fosforilinositol, a partir de fosfatidilinositol (PI), para a hidroxila do C-1 da fitoceramida, formando o inositolfosforilfitoceramida (IPC) (Fig. 11, Reação [6]). Células animais não codificam a enzima IPC sintase. Na próxima etapa, o IPC é manosilado, formando o manosil-inositolfosforilceramida (MIPC). Uma molécula de PI pode ser transferida para a molécula de MIPC gerando IP-manosil-IPC [M(IP)<sub>2</sub>C].

Em resumo, as etapas iniciais da via de biossíntese de esfingolipídios são conservadas em fungos e animais. As diferenças encontradas são, a síntese de PHS e traços de DHS em fungos, que não são capazes de sintetizar esfingomielina. Por outro lado, a esfingomielina é sintetizada em células animais.

A etapa da via de biossíntese de esfingolipídios que é encontrada apenas em fungos é a transferência de fosforilinositol, a partir de PI, para a hidroxila do C-1 da fitoceramida, formando o inositolfosforilceramida (IPC). Os genes que codificam a

enzima IPC sintase já foram sequenciados em várias espécies de fungos (Heidler & Radding, 2000).

### 1.6.3.2 Inibidores da via de biossíntese de esfingolipídios em fungos.

A via biossintética de formação de esfingolipídios foi apontada como um excelente alvo para a quimioterapia antifúngica (Nagiec *et al.*, 1997). A primeira etapa é limitante, catalisada pela serina palmitoil transferase (SPT) e inibida por substratos suicidas como as  $\beta$ -cloro-L-alaninas e a cicloserina (Merril *et al.*, 1993). Os inibidores mais potentes e seletivos incluem os produtos naturais, estruturalmente semelhantes aos ácidos graxos, esfingofunginas (Zweerink *et al.*, 1992; Horn *et al.*, 1992), lipoxamycinas (Mandala *et al.*, 1994), myriocina (ISP-1) (Miyake *et al.*, 1995) e viridiofunginas (Mandala *et al.*, 1997).

Diversos inibidores da ceramida sintase já foram descritos, tais como Fumonisina B1 (Wang *et al.*, 1991) e o seu análogo estrutural, a toxina alternaria (Merrill *et al.*, 1993). Ambos inibidores apresentam semelhança estrutural à fitoesfingosina, que é a BCL predominante em fungos. A Australifungina, isolada do fungo *Sporormiella australis* (Mandala *et al.*, 1995) é capaz de inibir a atividade de ceramida sintase em leveduras, porém não é um análogo estrutural da fitoesfingosina. Os inibidores mencionados também atuam na via biossintética de formação de esfingolipídios em mamíferos, causando o acúmulo de dihidroesfingosina (DHS) e toxidez às células. Existem também inibidores direcionados contra a IPC sintase dos fungos. A Aureobasidina A (Takesako *et al.*, 1993), Khafrefungina (Mandala *et al.*, 1997) e Rustmicina (Mandala, *et al.*, 1998).

Os inibidores da biossíntese de esfingolipídios têm sido valiosos nos estudos das vias biossintéticas *de novo* em fungos (Dickson & Lester, 1999, Dickson & Lester, 2002), em linhagens de células animais (Dickson, 1998, Gillard *et al.*, 1998, van

Echten-Deckert *et al.*, 1998) e em *Plasmodium falciparum* (Gerold & Schwarz, 2001; Smith *et al.*, 2002).

### 1.6.3.3 Importância dos GIPCs

Vários trabalhos têm descrito que os esfingolipídios e os seus precursores podem desempenhar diversas funções em células eucarióticas, incluindo sinalizações celulares, tais como participação na transdução de sinal durante a resposta ao estresse mediado por temperatura (“heat stress”); regulação da homeostase de cálcio; formação de regiões especializadas de membrana (“lipid rafts”); regulação do ciclo celular; participação no tráfico de membranas, influenciando o endereçamento de proteínas ancoradas via glicosilfosfatidilinositol (GPI) e regulação da endocitose na etapa de internalização (para revisão, Dickson, 1998; Dickson e Lester, 2002; Merrill, 2002; Futerman e Hannun, 2004).

A função dos GIPCs em fungos ainda não foi estabelecida. Em *Saccharomyces cerevisiae*, os esfingolipídios contendo fosforilinositol são essenciais para a viabilidade da célula (Dickson e Lester, 1999). Mutantes de *S. cerevisiae* que não sintetizam esfingolipídios não são viáveis (Lester *et al.*, 1993b; Nagiec *et al.*, 1997). Além disso, fungos patogênicos como *C. neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Histoplasma capsulatum* são mortos pelos inibidores da IPC sintase, confirmando ser uma enzima essencial à biossíntese de glicoesfingolipídios (Takesako *et al.*, 1993; Mandala *et al.*, 1997; 1998). Esses resultados sugerem que as enzimas envolvidas na biossíntese dos esfingolipídios contendo fosforilinositol são alvos promissores para o estudo e desenvolvimento de agentes antifúngicos (Dickson e Lester, 1999; Nagiec *et al.*, 1997).

A estrutura dos GIPCs vem sendo caracterizada em diferentes fungos. Ceramida-(fosforilinositol)<sub>2</sub>-manose, ceramida-fosforilinositol-manose e ceramida-fosforilinositol

foram identificadas em *C. neoformans* (Vicent e Klig, 1995). Compostos similares foram descritos em *S. cerevisiae* (Smith e Lester, 1974), *Neurospora crassa* (Lester *et al.*, 1974), *H. capsulatum* (Barr *et al.*, 1984), *Phytophthora capsici* (Lhome *et al.*, 1990) e *C. albicans* (Wells *et al.*, 1996). Estruturas mais complexas foram também encontradas nos patógenos *Aspergillus niger*, *H. capsulatum* (Lester e Dickson, 1993), *Paracoccidioides brasiliensis* (Levery *et al.*, 1998), *Sporothrix schenckii* (Penha *et al.*, 2000, 2001; Toledo *et al.*, 2001) e *C. neoformans* (Heise *et al.*, 2002).

## 1.7 GENES REQUERIDOS PARA A FORMAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS CAPSULARES

Quatro genes associados à cápsula, *cap10*, *cap59*, *cap60* e *cap64* foram clonados, sequenciados e são essenciais à síntese dos componentes capsulares. No entanto, as funções bioquímicas dos produtos dos genes *cap* não estão ainda definidas. Recentemente, a relação entre a cápsula polissacarídica e os quatro genes associados à cápsula foi parcialmente elucidada. A seqüência nucleotídica de fragmentos dos quatro genes *cap* foi analisada por relações filogenéticas, sendo observada uma concordância com a classificação convencional dentro das variedades e sorotipos do *C. neoformans*. A expressão dos quatro genes *cap* e do tamanho da cápsula foram examinados usando dois meios de cultura contendo diferentes quantidades de glucose e os resultados mostraram que os genes *cap* devem ser importantes na elaboração da cápsula polissacarídica extracelular (revisto por Okabayashi *et al.*, 2007).

### 1.7.1 Genes requeridos para a O-acetilação da GXM

Genes envolvidos, mas não essenciais para a formação da cápsula, têm sido descobertos por complementação em mutantes deficientes nos componentes capsulares, como por exemplo, em mutantes com alterações estruturais específicas na GXM. Dois

desses genes, *cas1* e *cas3*, estão envolvidos na acetilação da GXM (Janbon *et al.*, 2001; Moyrand *et al.*, 2004).

Análises biológicas de cepas com polissacarídeos deficientes na acetilação têm demonstrado a importância do grupo acetil no reconhecimento desses polímeros via anticorpo, na ativação do sistema complemento, na eliminação do soro e tecidos e na inibição do recrutamento de neutrófilos (Otteson *et al.*, 1994; Ellerbroek *et al.*, 2004; McFadden e Casadevall, 2004; Kozel *et al.*, 2003). Estudos sobre virulência utilizando cepas  $\Delta cas1$ , que não codificam *cas1*, sugerem que o grupo acetil na GXM reduz a virulência do fungo (Kozel *et al.*, 2003).

### 1.7.2 Genes requeridos para a xilosilação dos componentes capsulares

UDP-xilose é o substrato para a síntese de numerosos glicoconjugados, tais como, proteoglicanos, que são moléculas abundantes na matriz extracelular e na superfície de células animais, polissacarídeos de plantas (xiloglucanas e xilanas) e polissacarídeos capsulares de certos fungos. Estudos desenvolvidos por White e colaboradores (1990) sugerem que xilose ligada a lipídios é formada *in vitro* por membranas criptococais, mas não foi determinado se este componente possui papel na síntese da cápsula polissacarídica (White *et al.*, 1990). A xilose também está presente em glicoinositolfosforilceramidas (GIPCs) da membrana celular de *C. neoformans* cepa selvagem do sorotipo A e do mutante acapsular Cap67 (Heise *et al.*, 2002).

A via de síntese de UDP-xilose é de particular interesse em *C. neoformans* devido às modificações nos componentes capsulares GXM e GalXM. Muitos genes são importantes para a adequada xilosilação da GXM. A enzima UDP-xilose sintase (UXS) possui uma atividade UDP-ácido glucurônico descarboxilase e converte UDP-ácido glucurônico a UDP-xilose (Bar-Peled *et al.*, 2004; Bar-Peled *et al.*, 2001) (Figura 12).

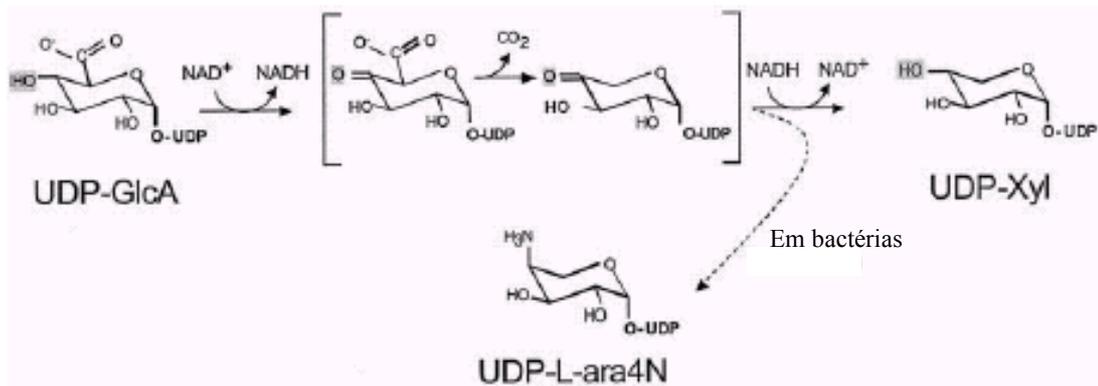


Figura 12: Modelo para o mecanismo da UDP-xilose sintase (Bar-Peled *et al.*, 2001)

A UXS é necessária tanto para a xilosilação da cápsula quanto para a virulência do *C. neoformans*. Mutantes no gene *uxs1* produzem GXM sem  $\beta$ -(1→2)-xilose (Moyrand *et al.*, 2002). A importância do *uxs1* para a  $\beta$ -(1→4)-xilose não pode ser determinada, pois a cepa utilizada continha somente  $\beta$ -(1→2)-xilose (McFadden *et al.*, 2006). Os genes *cas31*, *cas32*, *cas33*, *cas34* e *cas35* são homólogos do *cas3* e estão envolvidos na adição ou inibição da cadeia lateral de xilose na GXM (Moyrand *et al.*, 2004). Experimentos utilizando uma cepa  $\Delta$ *uxs1*, que não codifica UXS, sugerem que a presença de unidades de xilose na estrutura da GXM contribui para a virulência retardando a taxa de deposição do fator C3 do sistema complemento e alterando a eliminação da GXM no baço (Kozel *et al.*, 2003; Moyrand *et al.*, 2002).

### 1.7.3 Genes requeridos para a síntese de ácido glucurônico

O ácido glucurônico é um componente essencial para síntese de polissacarídeos de muitas bactérias e eucariotos (Roberts, 1996; Sugahara e Kitagawa, 2000). Nas células eucarióticas, a biossíntese de tais polissacarídeos começa no citoplasma com a síntese de precursores ligados a nucleotídeos, UDP-xilose, UDP-ácido glucurônico, GDP-manose entre outros. Os precursores são então transportados para regiões de organelas específicas, tais como Golgi e retículo endoplasmático, e transferidos para o polissacarídeo nascente via ação de glicosiltransferases. A enzima chave na biossíntese

do ácido glucurônico é a UDP-glucose desidrogenase (UGD) que converte UDP-glucose a UDP-ácido glucurônico, reação dependente da oxidação de  $\text{NAD}^+$  (Feingold e Frazen, 1981). A disponibilidade da UGD recombinante de *Streptococcus pyogenes* (Dougherty e van de Rjin, 1993) proporcionou a primeira investigação do mecanismo catalítico da enzima em bactérias, como mostrado na figura 13 (Campbell *et al.*, 2000). Uma mutação no gene que codifica esta enzima promove a ausência de UDP-ácido glucurônico (Binari *et al.*, 1997). Entretanto, em plantas existe uma via de salvação como parte da via de oxidação do inositol (Seitz *et al.*, 2000).

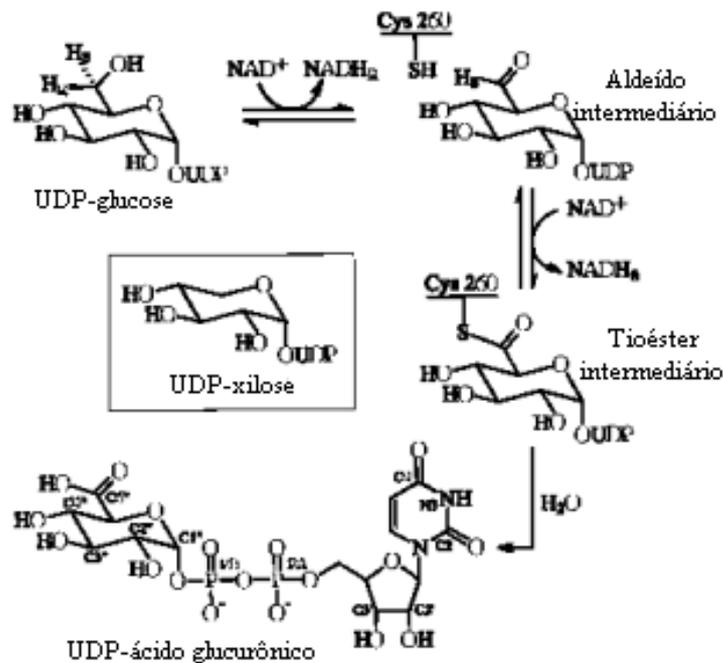


Figura 13: Esquema do mecanismo da UDP-glucose desidrogenase de *S. pyogenes* (Campbell *et al.*, 2000).

Em *C. neoformans*, o gene que codifica a UGD foi clonado e a enzima caracterizada. A enzima recombinante é fortemente inibida por UDP-xilose e NADH. Em *C. neoformans* a UGD forma um dímero (Bar-Peled *et al.*, 2004), semelhante ao que ocorre em bactérias (Campbell *et al.*, 2000; Schiller *et al.*, 1976). Entretanto, em eucariotos superiores a UGD é um hexâmero, ocorrendo como “trímeros de dímeros” (Gainey *et al.*, 1972; Frazen *et al.*, 1980; Jaenicke e Rudolph, 1986; Frazen *et al.*, 1983).

Estudos sobre o papel da UGD na biologia do *C. neoformans* foram realizados utilizando cepas do sorotipo A, *C. neoformans* var. *grubii* (Moyrand e Janbon, 2004), e cepas do sorotipo D, *C. neoformans* var. *neoformans* (Griffith *et al.*, 2004). A deleção do gene *ugd1*, que codifica a UGD, resultou em cepas mutantes  $\Deltaugd1$  com as seguintes características: (a) ausência de UDP-ácido glucurônico e de UDP-xilose, indicando que não foi utilizada uma via alternativa para a produção de UDP-ácido glucurônico; (b) modificações na parede celular, revelada pelas alterações na sensibilidade ao dodecil sulfato de sódio (SDS), NaCl e sorbitol; (c) deficiência morfológica no processo de brotamento; (d) ausência de cápsula polissacarídica e (e) ausência de crescimento a 37 °C. Essas características sugerem fortemente que a UGD está envolvida na virulência do *C. neoformans*, uma vez que as cepas mutantes  $\Deltaugd1$  mostraram-se acapsulares e avirulentas. Com a disponibilidade do genoma do *C. neoformans* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/cna1/cna1.shtml>), outras famílias de genes associadas à formação da cápsula também têm sido identificadas (Janbon, 2004; Bose *et al.*, 2003).

Em estudos anteriores (Heise *et al.*, 2002), a estrutura de GIPCs isolados de uma cepa selvagem encapsulada do sorotipo A (amostra 444) e de um mutante acapsular cap67 de *C. neoformans* (Jacobson *et al.*, 1982) foram caracterizados (Tabela 1).

Visando a comparação das estruturas encontradas nas cepas citadas acima, esta dissertação estendeu este estudo com uma cepa selvagem NE241 (KNH99 $\alpha$  – sorotipo A) e de duas cepas mutantes, NE178 e NE321, que não codificam, respectivamente, as enzimas UDP-xilose sintase ( $\Delta usx1$ ) e UDP-glucose deshidrogenase ( $\Delta ugd1$ ). Essas enzimas são necessárias para a xilosilação da glucuronoxilomanana e para a virulência do *C. neoformans* (Bar-Peled *et al.*, 2004; Bar-Peled *et al.*, 2001; Moyrand *et al.*, 2002; Moyrand e Janbon, 2004; Griffith *et al.*, 2004; McFadden *et al.*, 2006). A fim de

verificar se as enzimas UXS e UGD envolvidas, respectivamente, na biossíntese de xilose e ácido glucurônico, também estão envolvidas em etapas de glicosilação dos GIPCs, no presente estudo, nós isolamos, purificamos e caracterizamos por métodos físico-químicos, espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D e 2D e espectroscopia de massas uma série de GIPCs de *C. neoformans* e discutimos as diferenças estruturais entre os GIPCs sintetizados por uma cepa selvagem do sorotipo A e por mutantes  $\Delta uxs1$  e  $\Delta ugd1$ .

Tabela 1: Estruturas dos Ins-oligossacarídeos de GIPCs isolados das cepas cap67 e WT444 de *C. neoformans* descritos previamente em Heise *et al.*, 2002

GIPC A	$\begin{array}{c} \beta\text{Xyl} \\ \downarrow \\ 2 \\   \\ \alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Galp}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-P} \end{array}$
GIPC B	$\begin{array}{c} \beta\text{Xyl} \\ \downarrow \\ 2 \\   \\ \alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Galp}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-P} \end{array}$
GIPC C	$\begin{array}{c} \beta\text{Xyl} \\ \downarrow \\ 2 \\   \\ \alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Galp}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-P} \end{array}$
GIPC D	$\begin{array}{c} \beta\text{Xyl} \\ \downarrow \\ 2 \\   \\ \alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Galp}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-P} \end{array}$



# **OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar as moléculas dos GIPCs das cepas de *C. neoformans* :
  - selvagem encapsulada NE241 (KHN99 $\alpha$ ), sorotipo A;
  - mutante acapsular NE321 (*MAT* $\alpha$ ), sorotipo A mutante  $\Delta$ *ugd1::NAT1*, não codifica UDP-glucose desidrogenase;
  - mutante encapsulado NE178 (*MAT* $\alpha$ ), sorotipo D mutante  $\Delta$ *uxs1::ADE2*, não codifica UDP-xilose sintase.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair e purificar os GIPCs;
- ✓ Analisar a composição oligossacarídica, composição de ácidos graxos e base de cadeia longa dos GIPCs;
- ✓ Determinar a estrutura molecular completa dos GIPCs;
- ✓ Comparar as estruturas dos GIPCs descritas nesta dissertação com as descritas nas cepas selvagem WT444 (sorotipo A) e mutante acapsular Cap67 (Heise *et al.*, 2002);
- ✓ Avaliar os efeitos das mutações na biossíntese dos GIPCs.



# **METODOLOGIA**

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 *Cryptococcus neoformans*

Forma encapsulada (cepa selvagem):

- *C. neoformans*, amostra NE 241 (KHN99 $\alpha$ ), sorotipo A (Nielsen *et al.*, 2003).

Forma acapsular (cepa mutante):

- *C. neoformans*, amostra NE 321 (*MAT $\alpha$* ), sorotipo A mutante  $\Delta$ *ugd1::NAT1*, não codifica UDP-glucose desidrogenase. Não cresce a temperatura de 37 °C (Moyrand e Janbon, 2004).

Forma encapsulada (cepa mutante):

- *C. neoformans*, amostra NE178 (*MAT $\alpha$* ), sorotipo D mutante  $\Delta$ *uxs1::ADE2*, não codifica UDP-xilose sintase. Há a ausência de xilosilação nos polissacarídeos capsulares (GXM e GalXM) (Moyrand *et al.*, 2002).

Todas as amostras foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Guilhem Janbon (Institut Pasteur, Paris, França).

#### 3.2 MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As cepas de *C. neoformans* foram mantidas em meio YPD sólido, contendo (g.L<sup>-1</sup>): extrato de levedura (10.0), peptona (20.0), dextrose (20.0) e ágar (20.0), incubadas a 30 °C.

Para obtenção de massa celular, as células foram crescidas em: (i) meio YPD, contendo (g.L<sup>-1</sup>): extrato de levedura (10.0), peptona (20.0) e dextrose (20.0), incubadas a 30 °C e (ii) meio sintético CDC B 2550 (Cherniak *et al.*, 1982) contendo (g.L<sup>-1</sup>): glucose (40.0), fosfato de potássio monobásico monohidratado (1.36), uréia (1.29), glutamato de

sódio (1.0), sulfato de magnésio heptahidratado (0.3), suplementado com tiamina.HCl (2 mg.L<sup>-1</sup>) e biotina (10 µg.L<sup>-1</sup>), pH 7,0.

A forma encapsulada mutante NE178 *Δuxs1* foi cultivada no meio sintético a 30 °C. As outras amostras foram crescidas no meio YPD a 30 °C. Todos os cultivos foram realizados sob agitação (110 rpm) em agitador New Brunswick.

### **3.3 OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR**

Após um período de 72/96 h, as células resultantes do crescimento (item 3.2) foram recuperadas por centrifugação a 7960 g em centrífuga Beckman Coulter™ modelo J2-MC, por 15 min a 4 °C e lavadas três vezes com NaCl 0,9%. Foram obtidos em torno de 150 g de cada amostra (peso úmido) para extração das glicomoléculas de *C. neoformans*.

### **3.4 OBTENÇÃO DOS GIPCS**

Para a obtenção dos GIPCs foi feita uma extração fracionada, como descrito abaixo.

#### **3.4.1 Extração do polissacarídeo capsular e peptídeos-polissacarídeos**

Os polissacarídeos capsulares, os polissíveis peptídeos-polissacarídeos da parede celular e as glucanas foram extraídos segundo Previato *et al.* (1979a; 1979b). As células foram ressuspensas em 2 volumes de tampão citrato 0,02 M pH 7,0 e submetidas à extração por autoclavagem a 120 °C por 90 min. Após resfriamento, as células foram separadas por centrifugação a 7960 g, por 15 min a 4 °C. Este procedimento foi repetido três vezes para as cepas encapsuladas e duas vezes para a cepa acapsular. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram guardadas a -20 °C.

#### **3.4.2 Extração de glicoconjugados ancorados à membrana plasmática**

As células extraídas de acordo com o item 3.4.1 foram submetidas à extração com fenol 40% aquoso a 80 °C (Osborn 1966, Previato *et al.*, 1990). A massa celular foi ressuspensa em água destilada a 80 °C até um volume de 200 mL. Igual volume de fenol

80% aquoso a 80 °C foi adicionado lentamente à suspensão. A extração foi realizada a 80 °C em banho-maria, sob forte agitação, durante 20 minutos. Após resfriamento, o extrato foi centrifugado a 1850 g, por 30 min a 4 °C. A fase aquosa foi recuperada e o resíduo restante foi submetido à nova extração com adição de água destilada a 80 °C, num volume igual ao adicionado anteriormente. A extração foi processada nas mesmas condições. As fases aquosas da 1ª e 2ª extrações foram reunidas, dialisadas em água corrente por 48 horas, em saco de diálise com 29 mm de diâmetro e poro de exclusão de 12-14 kDa, concentrada em evaporador rotatório, congelada e liofilizada.

O material liofilizado foi submetido à extração com 460 mL de clorofórmio:metanol:água (10:10:3 v/v/v) por 48 horas sob agitação (Lederkremer *et al.*, 1977). O material solúvel foi filtrado em filtro sinterizado, concentrado em evaporador rotatório e liofilizado. O material insolúvel no sistema de solventes foi solubilizado em água destilada e liofilizado para posteriores análises.

### 3.4.3 Purificação dos Glicoinositolfosforilceramidas (GIPCs)

Os GIPCs obtidos da fração solúvel em clorofórmio:metanol:água (10:10:3 v/v/v), das amostras NE241 (sorotipo A), NE178 (mutante  $\Delta uxs1$ ) e NE321 (mutante  $\Delta ugd1$ ), foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de octil-sepharose (20 x 1 cm), eluída em um gradiente de acetato de amônio 100 mM (solvente A) e n-propanol (solvente B).

As frações foram dissolvidas em n-propanol 5% em acetato de amônio 100 mM, numa concentração de 5 mg/mL e centrifugadas a 12000 rpm por 1 minuto. Foram aplicados na coluna 10 mg de amostra/corrida.

Após a lavagem da coluna com 20 mL do solvente A e 20 mL de n-propanol 5% em acetato de amônio 100 mM, a coluna foi eluída conforme o seguinte gradiente: (i) 0-30

minutos: 5% de n-propanol; (ii) 30,1-90 minutos: 5-70% de n-propanol; (iii) 90,1-100 minutos: 70% de n-propanol; (iv) 100,1 minutos: 5% de n-propanol.

O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e o volume de cada fração coletada foi de 2 mL. As frações contendo os GIPCs foram localizadas, após aplicação de 2  $\mu$ L em placa de sílica gel 60 (MERCK, Darmstadt, Germany), pela vaporização com orcinol 0,2% / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% e aquecimento a 120 °C por 5 min (Humbel e Collak, 1975).

#### **3.4.4 Obtenção dos fosfoinositol-oligossacarídeos (PI-oligossacarídeos) a partir dos GIPCs**

Os GIPCs de *C. neoformans* purificados das amostras NE241, NE178 (mutante  $\Delta$ *uxs1*) e NE 321 (mutante  $\Delta$ *ugd1*) foram submetidos à hidrólise alcalina com KOH 2% a 100 °C por 6 h (modificado de Smith e Lester, 1974). Após neutralização com ácido acético glacial, o material foi submetido à cromatografia de troca catiônica em coluna (2 x 4 cm) de Dowex 50W-X8 (mesh 25-50). Os PI-oligossacarídeos foram eluídos com três volumes de água Milli-Q e liofilizados.

#### **3.4.5 Purificação dos PI-oligossacarídeos**

Os PI-oligossacarídeos obtidos no item 3.4.4 foram ressuspensos em 0,5 mL de água Milli-Q e fracionados por cromatografia de gel filtração em coluna (0,8 cm de diâmetro x 110 cm de altura) de Bio Gel P-4 (extra fina) eluída com água Milli-Q. Frações de 1,0 mL foram recolhidas e a presença de açúcar foi monitorizada pela aplicação de 2  $\mu$ L em placa de sílica gel 60 e vaporização com orcinol 0,2% / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% e aquecimento a 120 °C por 5 min (Humbel e Collak, 1975). Os PI-oligossacarídeos foram recuperados no volume de exclusão da coluna.

### **3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.5.1 Análise por cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC)**

A homogeneidade dos GIPCs purificados, como descrito no item 3.4.3, foi verificada por HPTLC em placa de vidro recoberta com sílica gel 60 (MERCK, Darmstadt, Germany). Foi utilizado clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio 1 M (10:10:3 v/v/v) como sistema de solventes.

As amostras foram solubilizadas em n-propanol 5% em água Milli-Q numa concentração de 1 µg/mL. Foram aplicados 2 µL de cada amostra. Os GIPCs foram revelados pela vaporização com orcinol 0,2% / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% e aquecimento a 120 °C por 5 min (Humbel e Collak, 1975).

#### **3.5.2 Identificação dos monossacarídeos**

A composição monossacarídica dos GIPCs foi determinada como descrito por Sweeley *et al.*, 1963. Aproximadamente, 100 µg de cada amostra foram metanolizadas com 0,5 mL de HCl 0,5 M em metanol, por 18 h a 100 °C. Após chegar à temperatura ambiente, foram realizadas três extrações com 1 volume de heptano. A fase metanólica foi evaporada sob corrente de N<sub>2</sub> e os metil-glicosídeos foram trimetilsililados com bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)/piridina (1:1 v/v) por 1 h à temperatura ambiente.

#### **3.5.3 Identificação dos ácidos graxos**

Após a metanólise descrita no item 3.5.2, os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram extraídos com heptano. Os extratos foram reunidos e evaporados sob corrente de N<sub>2</sub>. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram derivatizados com BSTFA/piridina (1:1 v/v) por 1 h à temperatura ambiente.

### **3.6 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS**

#### **3.6.1 Cromatografia gás-líquida (GC)**

Os metil-glicosídeos derivatizados, como descrito no item 3.5.2, foram analisados por GC utilizando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (25 m x 0,25 mm ID), sendo o hidrogênio o gás carreador. A programação de temperatura utilizada foi de 120 °C a 240 °C (2 °C/min). Os metil-glicosídeos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões autênticos comerciais (SIGMA).

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos derivatizados como descrito no item 3.5.3 foram analisados por GC utilizando a coluna descrita anteriormente. A programação de temperatura utilizada foi de 180 °C a 280 °C (3 °C/min). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões autênticos comerciais (SIGMA).

#### **3.6.2 Comatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)**

As análises por GC-MS foram realizadas em espectrômetro de massas quadrupolo Shimadzu GC-MS-QP5050, interligado ao cromatógrafo gasoso Schimadzu GC 17A equipado com uma coluna capilar DB-1. A energia de ionização utilizada foi de 70 eV e a corrente de ionização de 0,2 mA. A programação de temperatura utilizada foi de 120 °C a 240 °C (2 °C/min) para os metil-glicosídeos e de 180 °C a 280 °C (3 °C/min) para os ésteres metílicos dos ácidos graxos.

#### **3.6.3 *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* (MALDI-TOF-MS)**

O espectro de massa do tipo MALDI foi realizado no espectrômetro Voyager DE-Pro MALDI-TOF de Applied Biosystems, equipado com laser de nitrogênio de 337 nm. O instrumento foi operado com o modo refletor para íons negativos com uma voltagem de aceleração de 20 kV e sem time-lag (Rosa *et al.*, 2006).

Cerca de 50 µg dos GIPCs purificados, como descrito no item 3.4.3, foram solubilizados em ácido fórmico 5% numa concentração de 100 µg/mL. Dez microlitros da solução de cada amostra foram misturados a um volume igual de solução de matriz Norharmane<sup>®</sup> (Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.) a 10 mg/mL em acetonitrila 50% aquosa (Nonami *et al.*, 1998). Um microlitro desta mistura foi aplicado numa placa de Teflon de 96 *spots* e evaporado à temperatura ambiente. O espectro foi calibrado internamente usando moléculas desprotonadas de angiotensina I (1294.670 *m/z*) e ACTH clip 18-34 (2463.183 *m/z*) como referências.

#### **3.6.4 *Nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (ESI-QTOF-MS)***

Os PI-ologossacarídeos foram dissolvidos em metanol 50%/ácido fórmico 0,1% aquoso (v/v) e carregados nas agulhas de paládio do nanoeletrospray cobertos com borosilicato (Protana Inc. Odense, Dinamarca). O eletrospray estável foi obtido numa voltagem capilar entre 1200 e 1800 V. Utilizou-se argônio como gás de colisão. A energia de colisão e a pressão do argônio foram sintonizadas para otimizar o padrão de fragmentação dos íons precursores individuais.

#### **3.6.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN foram obtidos no espectrômetro Bruker Unity 600 equipado com um gradiente de campo de pulso (PFG) e uma sonda PFG de tripla ressonância de 5 mm, a temperatura da sonda foi de 30 °C, como descrito previamente em Heise e colaboradores (2002).

Uma seqüência de pulso padrão foi utilizada para os espectros de próton 1D, TOCSY e ROESY, exceto para a inclusão das seqüências de echo spin nos programas de pulso do TOCSY e ROESY. O espectro de correlação heteronuclear (HSQC) foi obtido

utilizando a seqüência de Wider e Wuthrich (1993) empregando gradientes de campo de pulso para suprimir sinais indesejados. Esses foram otimizados para  $^1J_{C,H}$  de 150 Hz (tempo de decaimento = 3,3 mseg) ou  $^nJ_{C,H}$  de 20 Hz (tempo de decaimento = 25 mseg). Os deslocamentos químicos de  $^1H$  e  $^{13}C$  foram referenciados, respectivamente, a um padrão interno de acetona a 2.225 ppm e 31.50 ppm.



# **RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ISOLAMENTO DOS GIPCS DAS CEPAS MUTANTES NE178 E NE321 E DA CEPA SELVAGEM NE241 E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPTLC)

Os GIPCs purificados por cromatografia de afinidade em coluna de octil-Sepharose, foram submetidos a HPTLC, migrando como bandas duplas (Figura 14). Os valores da migração relativa ( $R_f$ ) dos GIPCs dos mutantes NE178 e NE321 foram idênticos e maiores que o encontrado para o GIPC da cepa selvagem NE241.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA PORÇÃO LIPÍDICA DOS GIPCS DAS CEPAS DE *C. neoformans*

Os ácidos graxos dos GIPCs foram isolados após metanólise com 0,5 mL de HCl 0,5 M em metanol por 18h a 100 °C e extração com heptano. Os ácidos graxos foram analisados sob a forma de ésteres metílicos trimetilsililados e identificados por comparação com uma mistura de padrões por GC e pelo padrão de fragmentação por GC-MS.

O cromatograma dos GIPCs purificados das cepas mutantes NE178 E NE321 (Figura 14A) revelou a presença de  $C_{24:0}$  2-OH,  $C_{25:0}$  2-OH,  $C_{24:0}$  2,3-di OH e  $C_{26:0}$  2-OH. Na amostra selvagem NE241, observou-se a presença de  $C_{24:0}$  2-OH,  $C_{25:0}$  2-OH e  $C_{26:0}$  2-OH, mas um percentual menor de  $C_{24:0}$  2,3-di OH (Figura 15B).

A presença dos ácidos graxos foi confirmada pelo padrão de fragmentação observado por análise de GC-MS (Figura 16). O ácido graxo  $C_{24:0}$  2,3-di OH foi confirmado pela presença do íon fragmento 397  $m/z$  ( $M^+ - 161$ ) que corresponde a fragmentação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  (Figura 16C).

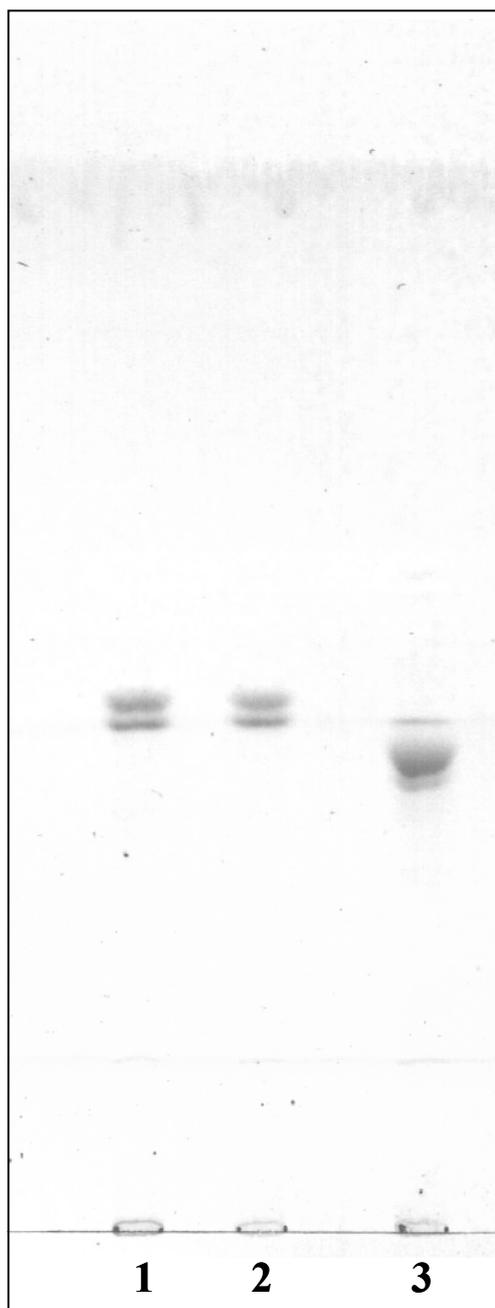


Figura 14: HPTLC. Homogeneidade dos GIPCs das cepas mutantes NE178 (linha 1), NE321 (linha 2) e da cepa selvagem NE241 (linha 3) de *C. neoformans*. Foi utilizado clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio 1M (10:10:3 v/v/v) como sistema de solventes. Os GIPCs foram revelados com orcinol 0,2% / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% a 120 °C / 5 min.

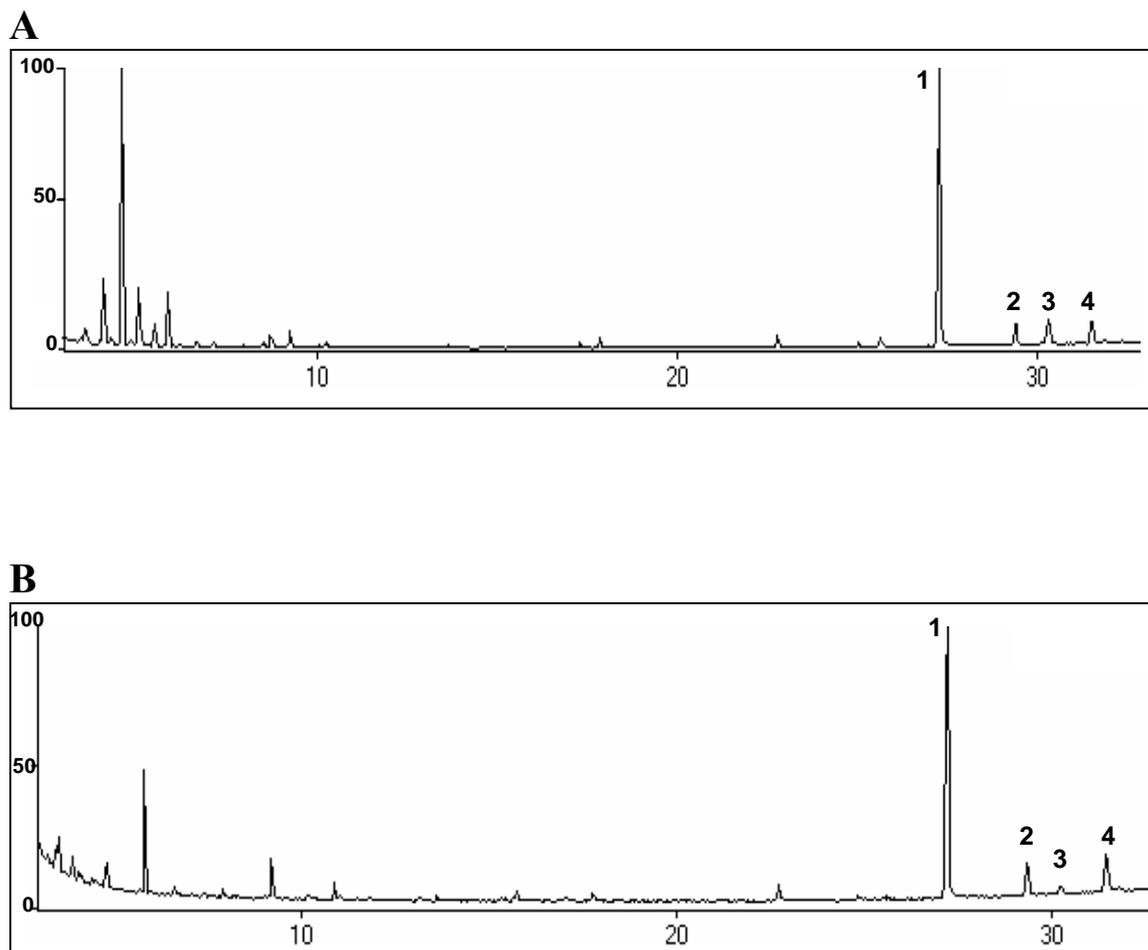


Figura 15: Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos obtidos após metanólise e trimetilsilação dos GIPCs purificados das cepas mutantes NE178 E NE321 (**A**) e da cepa selvagem NE241 (**B**) de *C neoformans* . Os picos assinalados correspondem aos derivados trimetilsililados: (1) 2-[(trimetilsilil)oxi] Tetracosanoato de metila, (2) 2-[(trimetilsilil)oxi] Pentacosanoato de metila, (3) 2, 3-bis[(trimetilsilil)oxi] Tetracosanoato de metila e (4) 2-[(trimetilsilil)oxi] Hexacosanoato de metila.

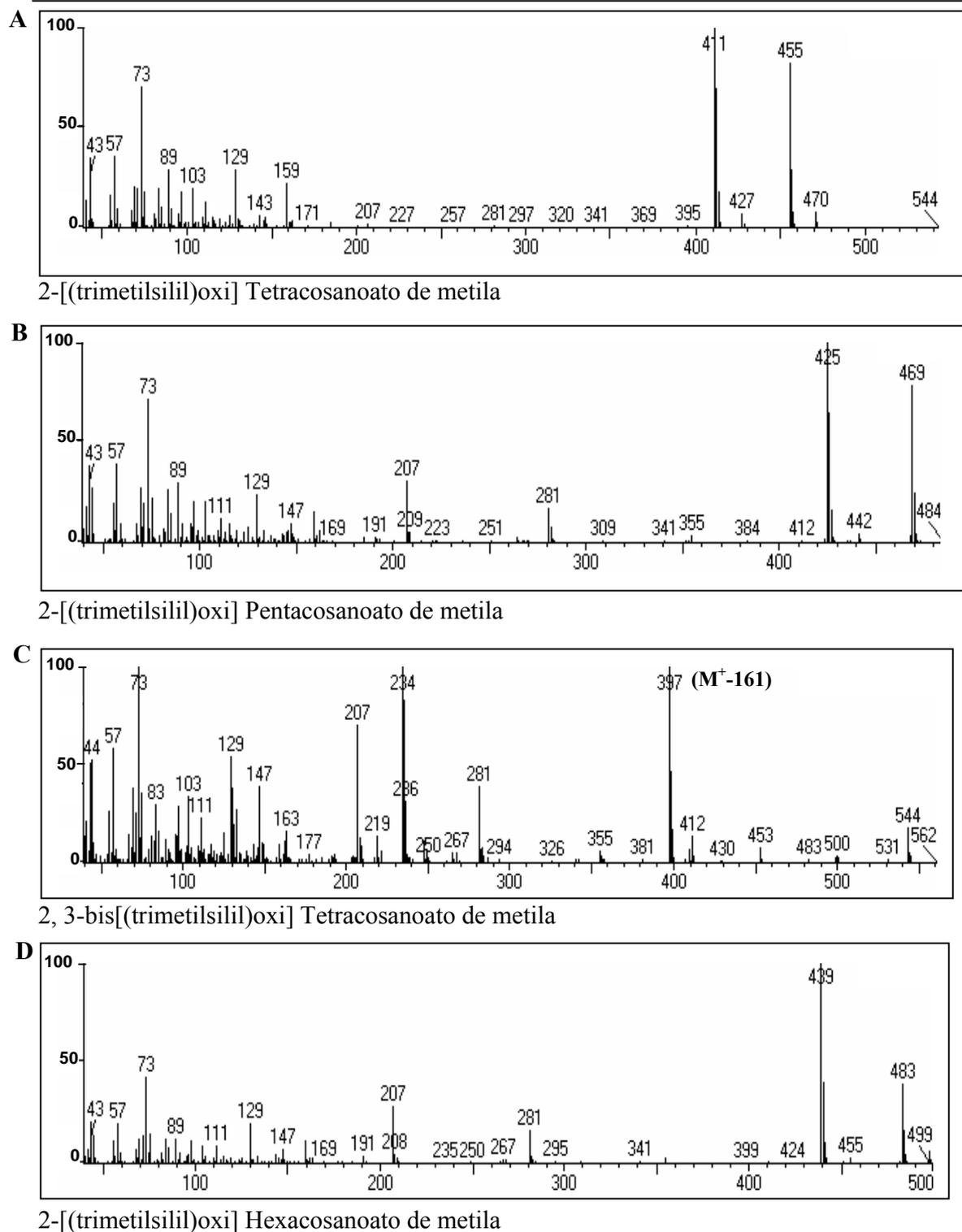


Figura 16: Espectros de fragmentação obtido por GC/MS dos ésteres metílicos trimetilsililados dos GIPCs purificados das cepas mutantes NE321 e NE 178 e da cepa selvagem NE241. (A) C<sub>24:0</sub> 2-OH, (B) C<sub>25:0</sub> 2-OH, (C) , C<sub>24:0</sub> 2,3-di OH e (D) C<sub>26:0</sub> 2-OH

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PORÇÃO OLIGOSSACARÍDICA DOS GIPCS DAS CEPAS MUTANTES E SELVAGEM DE *C. neoformans*

Os monossacarídeos dos GIPCs foram isolados após metanólise com 0,5 mL de HCl 0,5 M em metanol por 18h a 100 °C. Os monossacarídeos foram analisados sob a forma de metil glicosídeos trimetilsililados e identificados por comparação com uma mistura de padrões por GC.

O cromatograma dos GIPCs das cepas mutantes NE178 e NE321, revelou a presença de manose e galactose, em uma razão molar de 3:1 (Figura 17A). Na amostra selvagem NE241, observou-se a presença de manose, galactose e xilose, em uma razão molar de 4:1:1 (Figura 17B).

A tabela 2 ilustra as razões molares dos monossacarídeos e o percentual dos ácidos graxos descritos na composição química das cepas selvagem NE241, mutantes NE178 e NE321, e a comparação com as descritas para cepa selvagem WT444 (sorotipo A) e mutante acapsular Cap67 (Heise *et al.*, 2002).

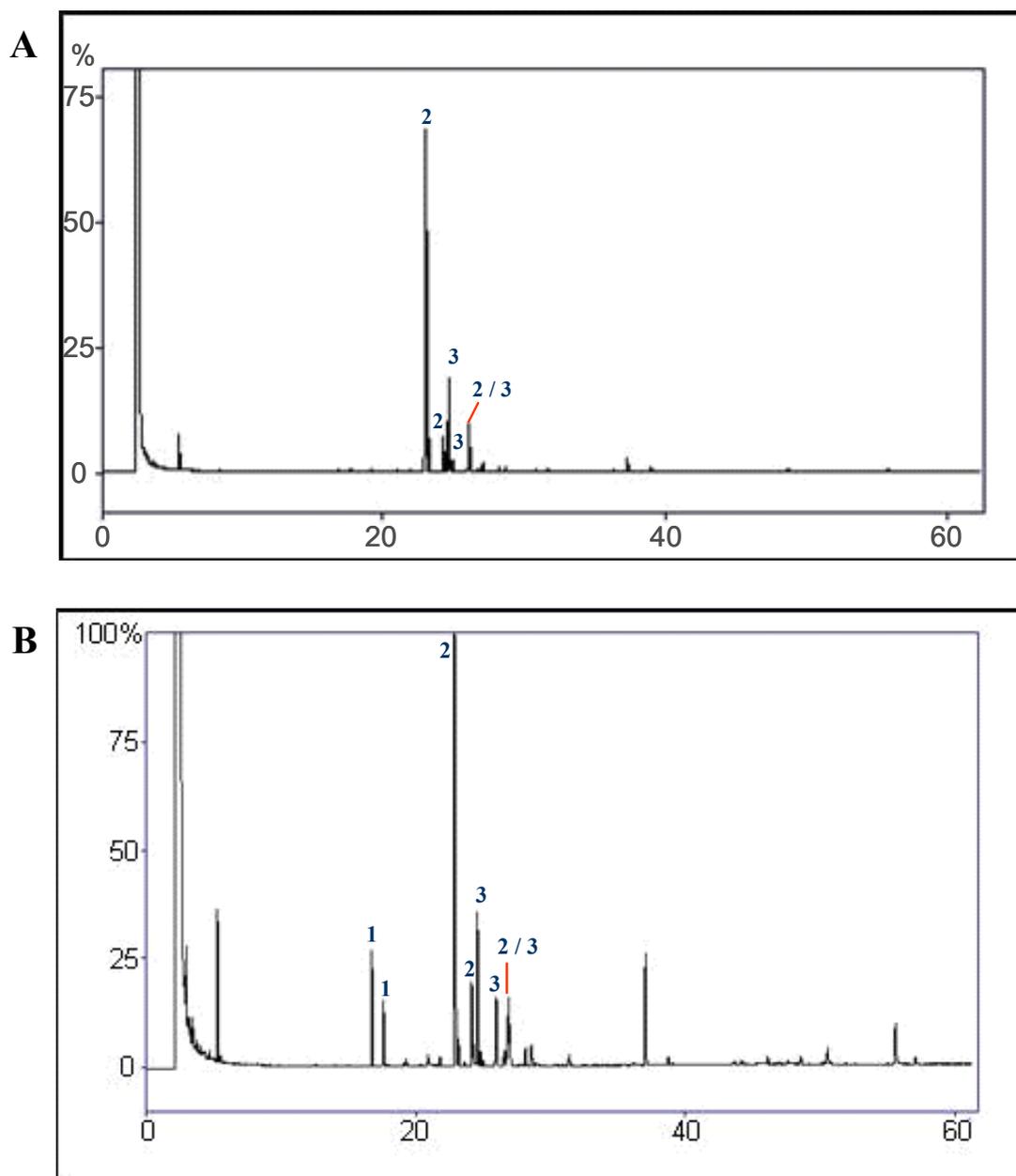


Figura 17: Cromatograma dos metil glicosídeos obtidos após metanólise e trimetilsililação dos GIPCs purificados das cepas mutantes NE178 e NE321 (A) e da cepa selvagem NE241 (B) de *C. neoformans*. Os picos assinalados correspondem aos derivados trimetilsililados: (1) xilose, (2) manose e (3) galactose.

Tabela 2: Comparação da composição química dos GIPCs de diferentes amostras de *Cryptococcus neoformans* (\* Heise *et al.*, 2002).

Composto	NE241	NE178	NE321	WT*	Cap 67*
Manose	4	3	3	3	5
Galactose	1	1	1	1	1
Xilose	1	-	-	1	1
<b>Ácidos graxos (%)</b>					
C <sub>24:0</sub> 2-OH	75	80	60	62	48
C <sub>24:0</sub> 2,3-diOH	6	7	9	-	37
C <sub>25:0</sub> 2-OH	10	6	19	20	-
C <sub>25:0</sub> 2,3-diOH	-	-	-	-	15
C <sub>26:0</sub> 2-OH	9	7	12	18	-

#### 4.4 ANÁLISE DOS GIPCS DA AMOSTRAS MUTANTES E SELVAGEM POR MALDI-TOF-MS

A figura 18 representa o MALDI-TOF íon-negativo dos GIPCs das cepas de *C. neoformans*, demonstrando moléculas desprotonadas onde o tamanho da cadeia oligossacarídica, o tipo de ceramida e a homogeneidade relativa podem ser deduzidos.

No espectro do GIPC da amostra selvagem NE241 (Figura 18A), três moléculas desprotonadas foram observadas em 1868,4, 1884,3 e 1896,4 *m/z*. O incremento de 16 entre 1868,4 e 1884,3 *m/z* e o de 28 entre 1868,4 e 1896,4 *m/z* não se referem a nenhum monossacarídeo, mas pode ser consistente com a presença de três espécies de fitoceramidas compostas de fitoesfingosina C<sub>18:0</sub> *N*-aciladas com C<sub>24:0</sub> 2-OH, C<sub>24:0</sub> 2,3-diOH e C<sub>26:0</sub> 2-OH, respectivamente, ligadas ao PI-oligossacarídeo contendo Pen<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>InsP.

O espectro do GIPC da amostra mutante NE321 (Figura 18B) foi aparentemente mais complexo com dois grupos de tripletos de moléculas desprotonadas em 1574,0, 1589,0, 1660,2 e 1736,2, 1752,2, 1764,2 *m/z*. A diferença de 162 na *m/z* entre os dois grupos de tripletos sugere a presença de duas séries de glicoinositolfosforil fitoceramidas, diferindo na composição de seus ácidos graxos e contendo quatro ou cinco resíduos de

hexoses. Assim, a análise do espectro de MALDI-TOF-MS mostrou que os sinais do principal tripleto do GIPC do mutante NE321 em 1574,0, 1589,0 e 1660,2  $m/z$  (Figura 17B) diferem dos picos correspondentes no GIPC da amostra selvagem NE241, em 1868,4, 1884,3 e 1896,4  $m/z$ , pela massa de 294, correspondente a um resíduo de pentose e um resíduo de hexose. Já o espectro do GIPC do mutante NE178 (Figura 18C) mostrou moléculas desprotonadas em 1574,0, 1590,0 e 1602,1, consistentes com a composição de Hex4InsP ligados a espécies de fitoceramidas idênticas as descritas para o mutante acapsular NE321 e a cepa selvagem NE241.

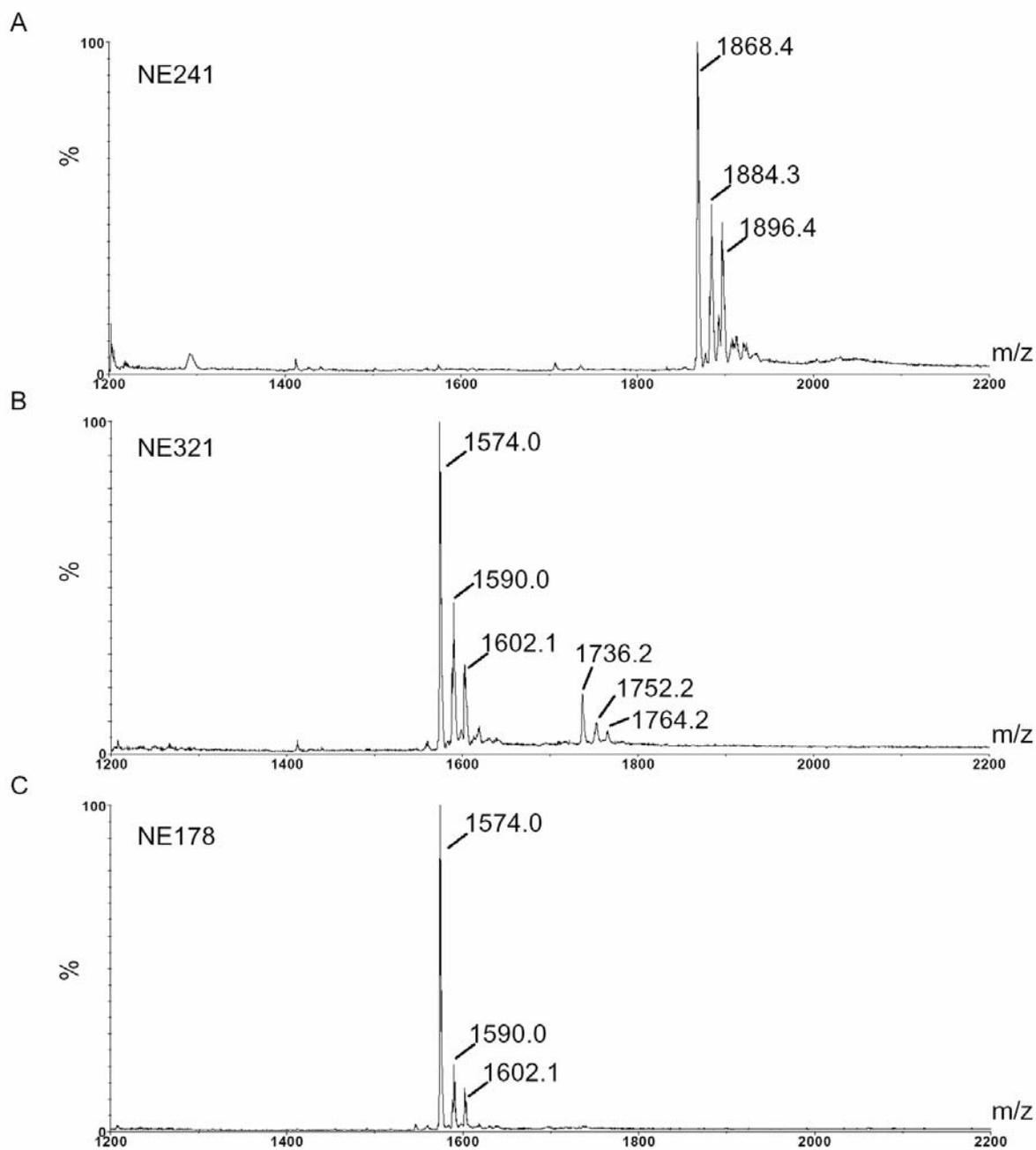


Figura 18: MALDI-TOF-MS dos GIPCs da cepa selvagem NE241 (A) e das cepas mutantes NE321 (B) e NE178 (C) de *C. neoformans*.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PI-OLIGOSSACARÍDEOS POR ESI-MS

A fim de determinar a sequência dos resíduos de monossacarídeos, os GIPCs foram submetidos a hidrólise alcalina e os PI-oligossacarídeos obtidos foram permetilados e analisados por ESI-MS e ESI-MS/MS. Os PI-oligossacarídeos das três amostras de *C. neoformans* exibiram perfis diferentes no ESI-MS, assim como o observado no MALDI-TOF-MS dos GIPCs intactos. A análise por ESI dos PI-oligossacarídeos da cepa selvagem NE241 (Figura 19A) mostrou um íon-pseudomolecular majoritário  $[M+Na]^+$  em 1561,3  $m/z$  correspondente a  $Pen_1Hex_5InsP$ . Além deste sinal majoritário, íons minoritários em 1357,3, 1467,4 e 1263,3  $m/z$  foram correlacionados a  $Pen_1Hex_4InsP$ ,  $Pen_1Hex_5Ins$  e  $Pen_1Hex_4Ins$ , respectivamente. Esses dois últimos sinais são compatíveis com a perda do grupo fosfato dos dois oligossacarídeos fosforilados durante o processo de hidrólise alcalina como comprovado posteriormente pelo sequenciamento MS/MS.

A análise por ESI dos PI-oligossacarídeos da cepa mutante NE321 (Figura 19B) mostrou um íon-pseudomolecular majoritário  $[M+Na]^+$  em 1197,3  $m/z$  correspondente a  $Hex_4InsP$ , assim como um íon minoritário em 1401,3  $m/z$  correspondente a  $Hex_5InsP$ . Assim como nos PI-oligossacarídeos dos GIPCs de NE241, ambos oligossacarídeos fosforilados dos GIPCs do mutante NE321 são acompanhados por seus pares desfosforilados em 1103,3 e 1307,3  $m/z$ , respectivamente.

O ESI-MS do PI-oligossacarídeo do mutante NE178 (Figura 19C) mostrou apenas a presença de  $Hex_4InsP$  e  $Hex_4Ins$  em 1197,2 e 1103,3  $m/z$ , respectivamente.

É possível concluir que a natureza do PI-oligossacarídeo liberado pela degradação alcalina é consistente com a análise do GIPC intacto. GIPCs isolados das cepas mutantes NE321 e NE178 de *C. neoformans* diferem claramente daqueles purificados da cepa selvagem NE241 não apenas pela ausência da unidade de pentose em suas cadeias

oligossacarídicas, mas também pelo menor número de resíduos de hexose na cadeia: os mutantes possuem quatro unidades de hexose, enquanto a cepa selvagem possui cinco. Além disso, os PI-oligossacarídeos do mutante NE321 diferem daqueles observados no mutante NE178, pela presença de um PI-pentassacarídeo minoritário (Hex<sub>5</sub>InsP) além do PI-tetrassacarídeo majoritário (Hex<sub>4</sub>InsP).

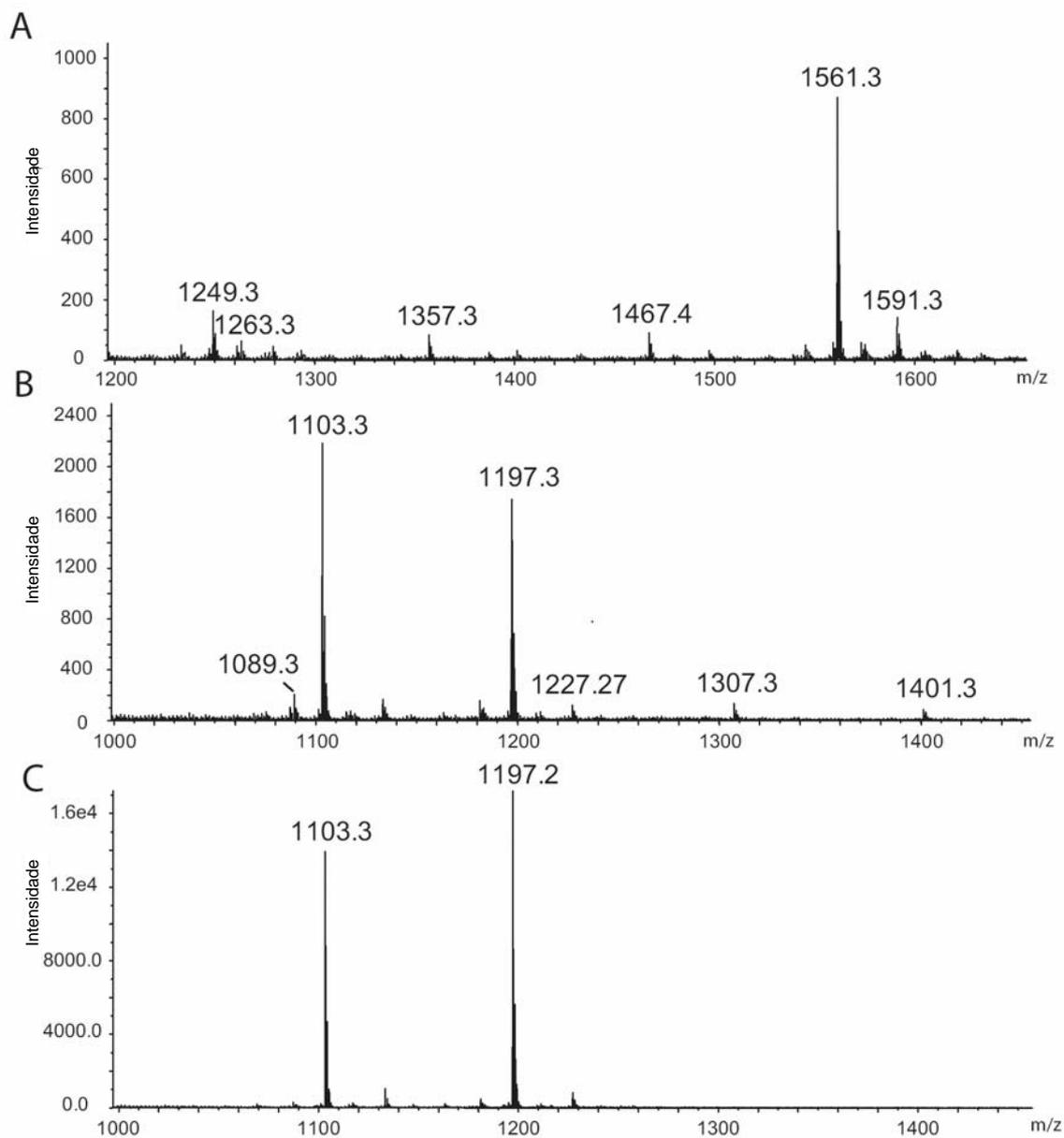


Figura 19: ESI-MS dos PI-oligosacarídeos permetilados obtidos dos GIPCs da cepa selvagem NE241 (A) e das cepas mutantes NE321 (B) e NE178 (C) de *C. neoformans*.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS PI-OLIGOSSCARÍDEOS POR ESI-MS/MS

As estruturas dos PI-oligossacarídeos foram também avaliadas pela análise da fragmentação dos seus derivados permetilados por ESI-MS/MS. O padrão de fragmentação no modo positivo do íon proveniente do 1561,3  $m/z$  da cepa selvagem NE241 de *C. neoformans* (Figura 20) é caracterizado pela perda do grupo fosforil dimetilado como um fragmento tipo B em 1435,3  $m/z$ . Então, foram observadas as clivagens recorrentes das ligações glicosídicas entre as hexoses tais como os íons fragmentos B/Y e C/Y. Suas formas equivalentes nos terminais não redutores também são observadas como íons do tipo C. Nesta base, dois distintos isômeros de Pen<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>InsP foram distinguidos conforme a posição do resíduo de pentose na cadeia de oligohexose. A observação de intensos íons fragmentos do tipo B em 1217,3, 1013,2, 649,1, 445,1 e 241  $m/z$  é consistente com a estrutura majoritária Hex-Hex-[Pen]-Hex-Hex-InsP, onde o ponto de ramificação está localizado na terceira Hex distal ao resíduo de inositol. O posicionamento do resíduo de pentose foi confirmado pela presença do anel de clivagem <sup>3,5</sup>A em 1101,3 e 897,2  $m/z$ . Além deste composto majoritário, a presença de íons fragmentos minoritários do tipo B/Y e C em 825,2 e 667,1  $m/z$  indicam a presença de um isômero minoritário de estrutura Hex-Hex-Hex-[Pen]-Hex-InsP, onde o ponto de ramificação está localizado na segunda hexose distal ao resíduo de inositol. A presença dos dois isômeros de Pen<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>InsP foi confirmada pela fragmentação MS/MS de ambos os compostos nativos em 1225,2  $m/z$  (Figura 21) e dos derivados permetilados de seus correspondentes desfosforilados em 1467,4  $m/z$  (Figura 22). Um padrão de fragmentação muito similar foi observado para o derivado permetilado de Pen<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>InsP de NE241 em 1357,3  $m/z$  (Figura 23) comparado ao derivado permetilado Pen<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>InsP (Figura 20). Ambos PI-oligossacarídeos diferem somente na presença de uma unidade de Hex no terminal não redutor. Assim como para Pen<sub>1</sub>Hex<sub>5</sub>InsP, dois

isômeros diferem no posicionamento do resíduo da pentose na segunda ou terceira hexose distal ao resíduo de inositol. Esta identificação foi feita baseada no padrão de fragmentação descrito anteriormente (Figura 20). A presença de dois isômeros também foi confirmada pela análise dos derivados permetilados de Pen<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>Ins em 1263,4 *m/z* (Figura 24).

Um padrão de fragmentação similar foi também obtido dos PI-oligossacarídeos sódicos cationizados dos mutantes NE321 e NE178 de *C. neoformans*. Como observado nas figuras 25 A e B, a fragmentação do íon pseudomolecular em 1197,3 *m/z* de ambas cepas mutantes mostrou um padrão similar indicativo de um PI-oligossacarídeo linear Hex-Hex-Hex-Hex-InsP. Eles são caracterizados pela recorrente liberação de unidades de Hex do terminal não redutor como íons do tipo Y bem como íons fragmentos secundários do tipo B/Y e C/Y, seguido da liberação do grupo fosforil. Estes são completados por uma série completa de íons fragmentos do tipo C em 259,1 (C<sub>1</sub>), 463,1 (C<sub>2</sub>), 667,2 (C<sub>3</sub>) e 871,3 (C<sub>4</sub>) *m/z* separados por 204 *m/z*, correspondente a um arranjo linear de resíduos de hexoses. Assim, a análise da fragmentação tanto dos íons dos derivados permetilados em 1401 *m/z* quanto das amostras nativas em 1093 *m/z* confirmam a presença de um PI-oligossacarídeo linear Hex<sub>5</sub>InsP na cepa mutante NE321 (espectro não mostrado). Como já mencionado, este isômero não está presente nos GIPCs do mutante NE178 de *C. neoformans*.

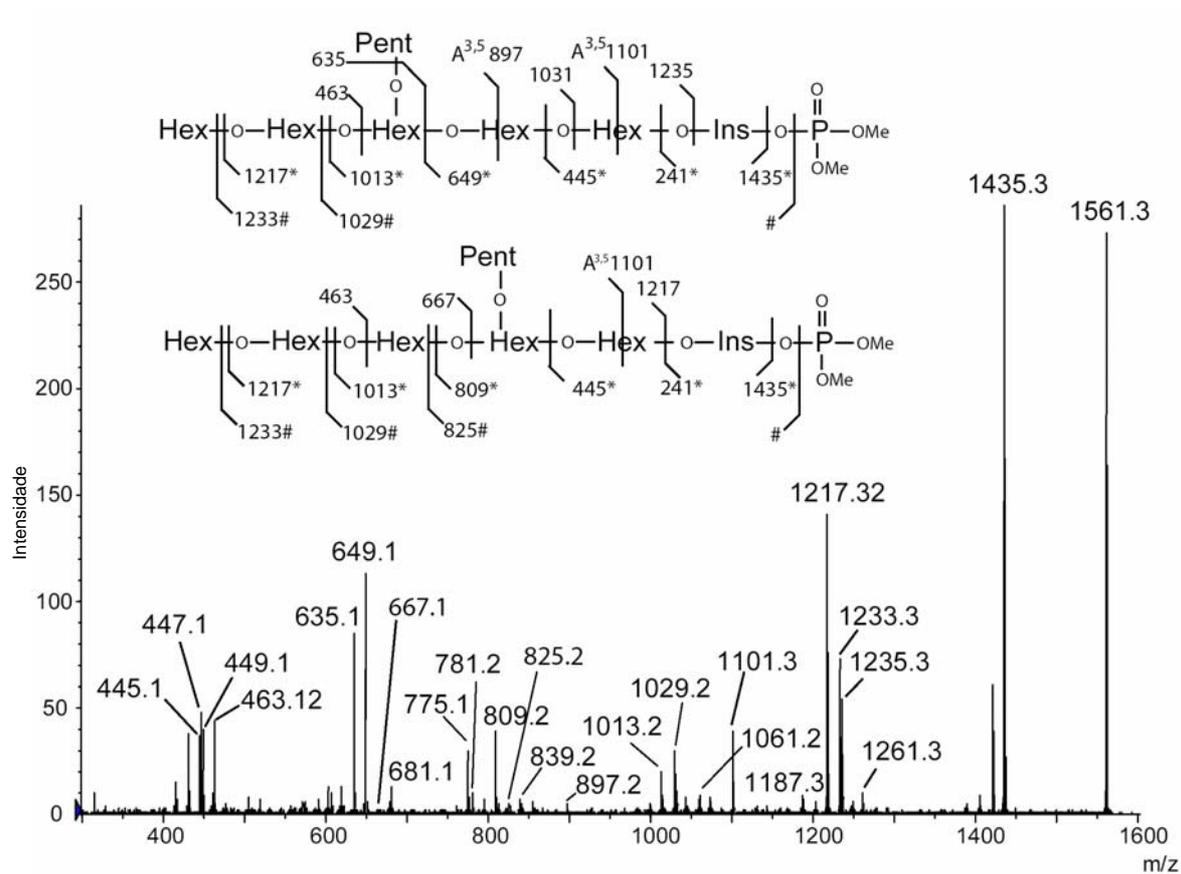


Figura 20: Espectro obtido por ESI-MS/MS do PI-oligosacarídeo permetilado obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.

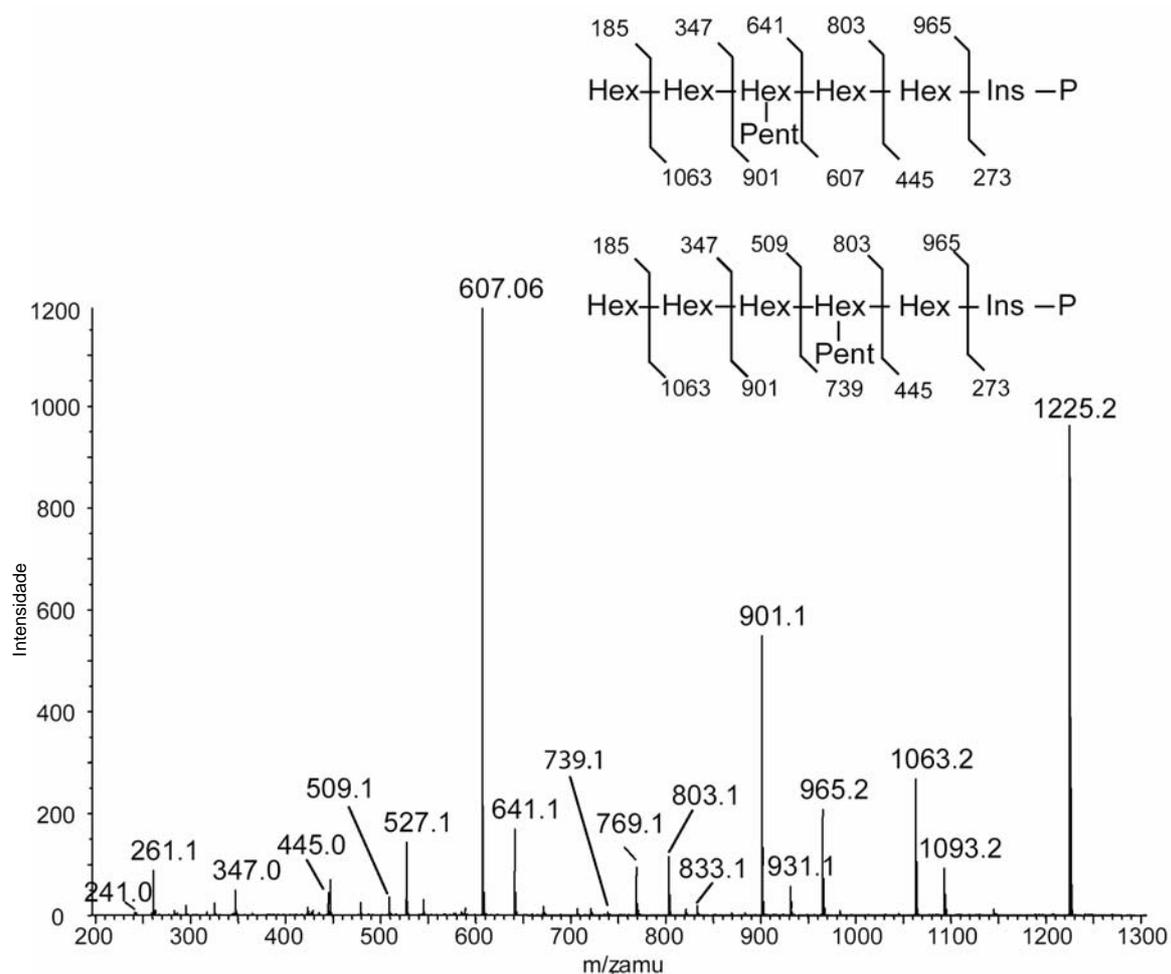


Figura 21: Espectro obtido por ESI-MS/MS do PI-oligosacarídeo nativo obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.

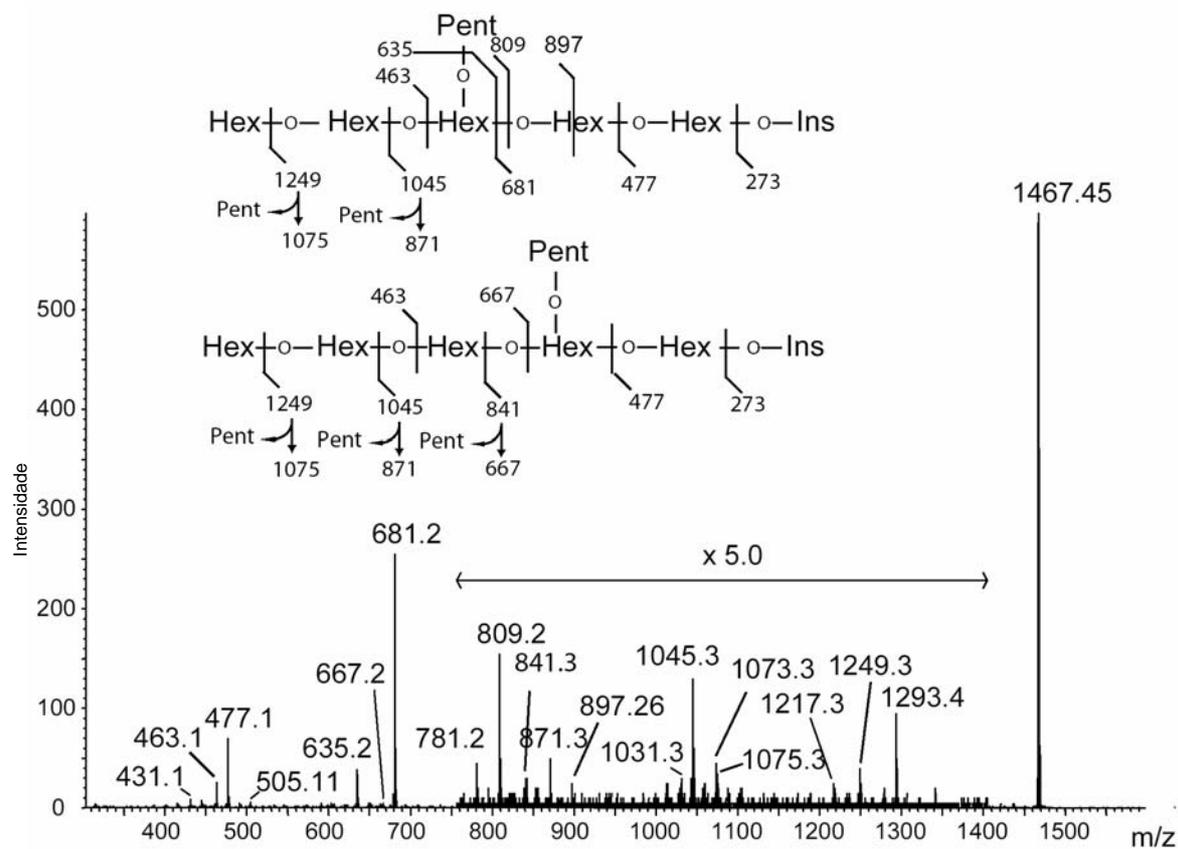


Figura 22: Espectro obtido por ESI-MS/MS do Ins-oligosacarídeo permetilado obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.

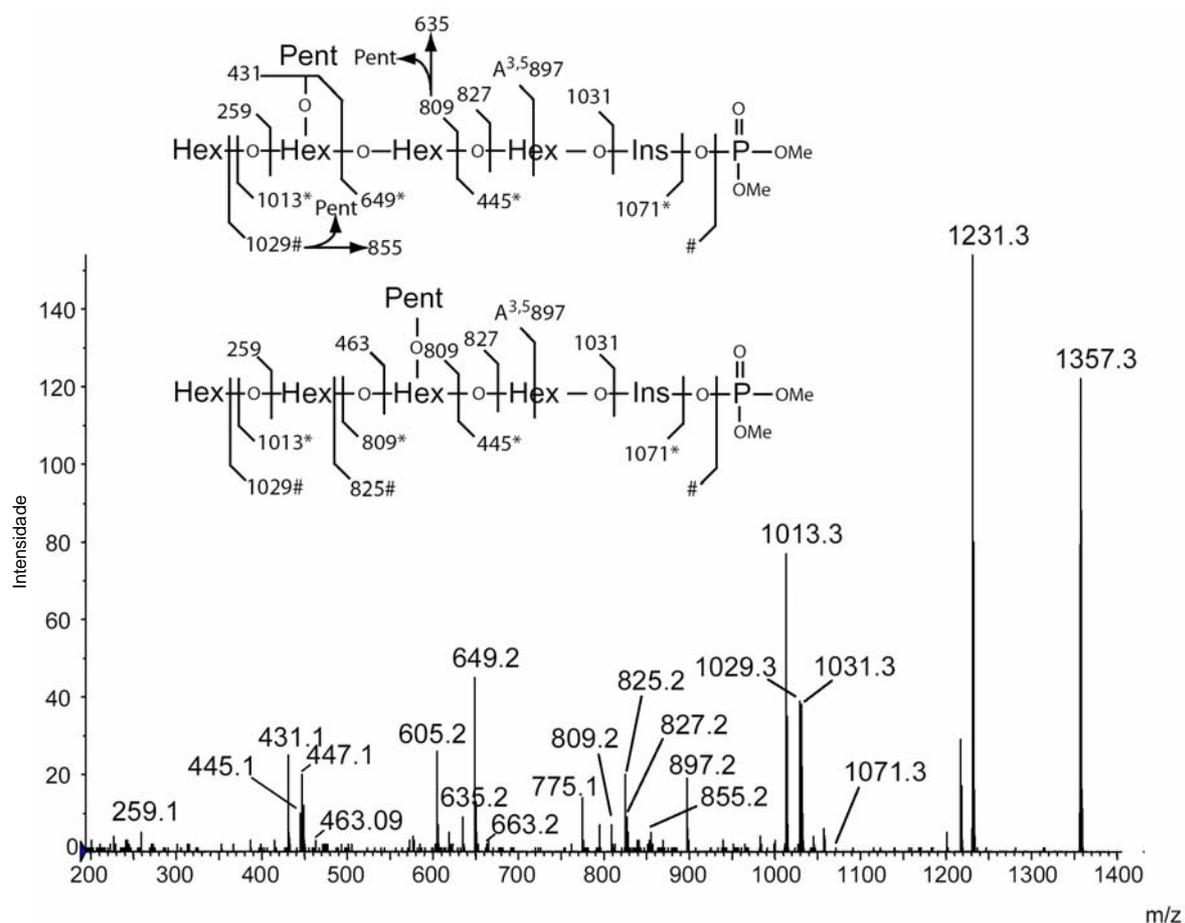


Figura 23: Espectro obtido por ESI-MS/MS do isômero Pen<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>InsP permetilado obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.

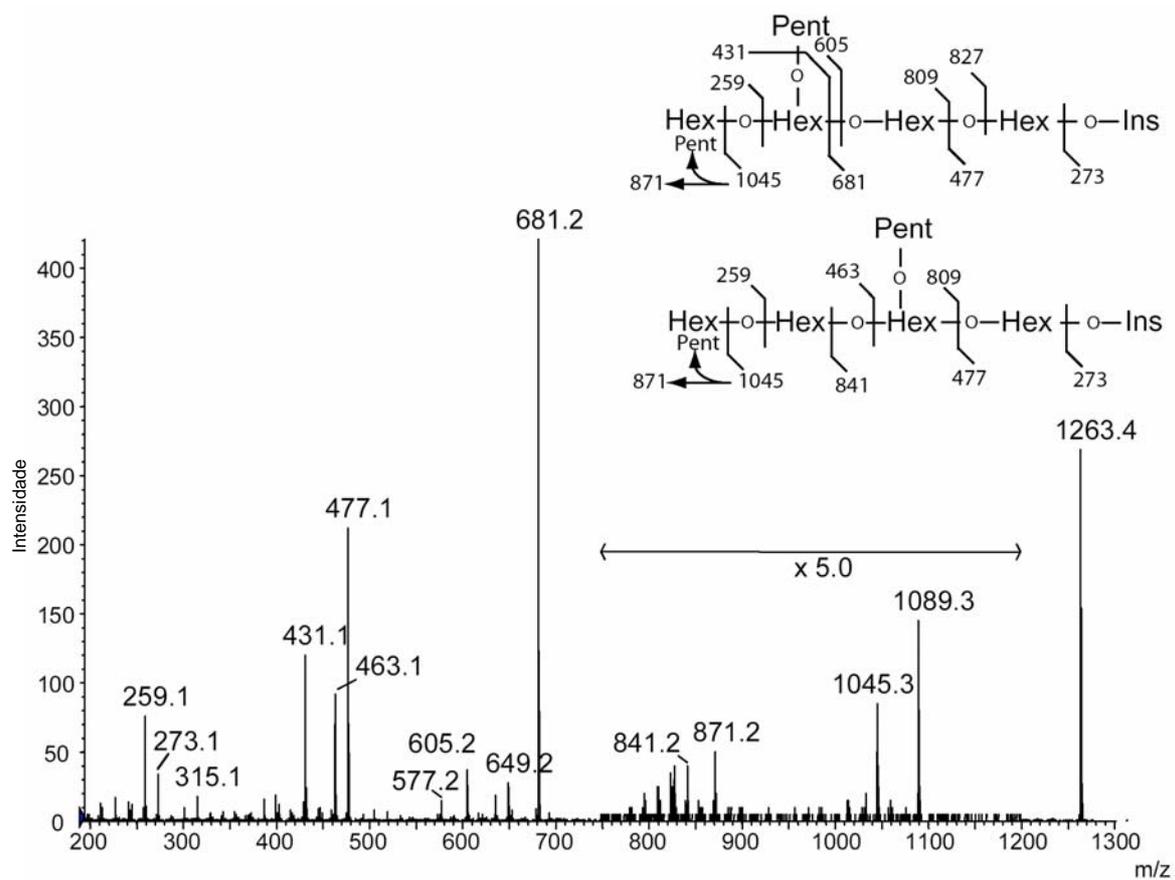


Figura 24: Espectro obtido por ESI-MS/MS do isômero desfosforilado Pen<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>Ins permitilado obtido do GIPC purificado da cepa selvagem NE241.

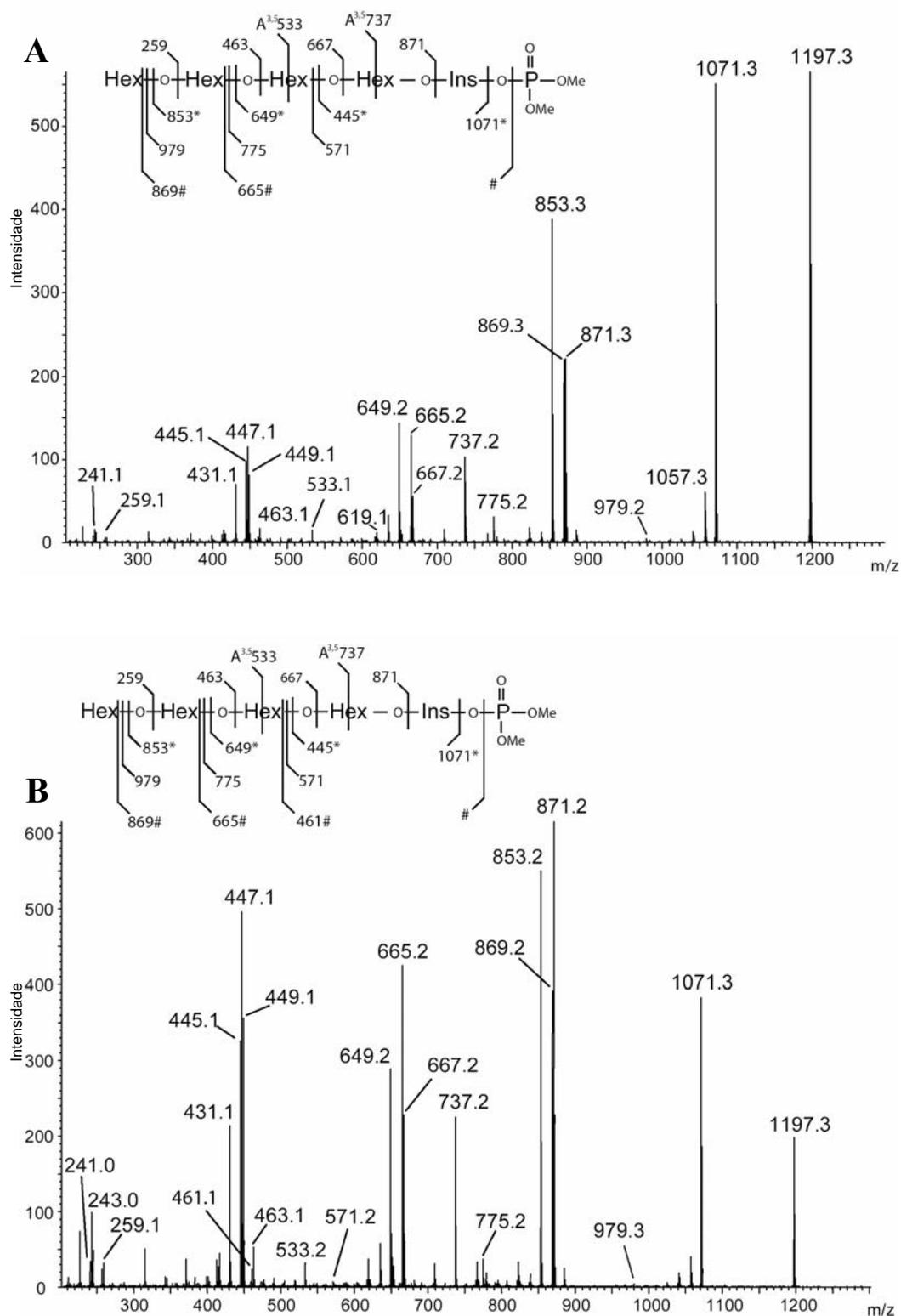


Figura 25: Espectro obtido por ESI-MS/MS dos PI-oligosacarídeos permetilados obtidos dos GIPCs purificados das cepas mutantes NE321 (A) e NE178 (B).

#### 4.7 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DOS PI-OLIGOSSACARÍDEOS

As estruturas sugeridas pela análise de ESI-MS e ESI-MS/MS foram complementadas pela análise de RMN. Os PI-oligossacarídeos obtidos por hidrólise alcalina dos GIPCs dos dois mutantes NE178 e NE321 e da cepa selvagem NE241 (KHN99 $\alpha$ ) de *C. neoformans* foram analisados por RMN de próton, o qual foi transferido para o experimento de espectroscopia de correlação total (TOCSY) e espectro de correlação heteronuclear  $^{13}\text{C}$  (HSQC). As informações sobre as ligações e as seqüências dos monossacarídeos foram obtidas por ROESY.

Cinco ressonâncias foram observadas na região de prótons anoméricos no espectro de RMN 1D do PI-oligossacarídeo obtido do GIPC do mutante NE178 (Figura 26A) em 5,172, 5,129, 5,086, 4,820 e 4,468 ppm. Os quatro sinais observados em campo mais baixo foram assinalados como  $\alpha$ -Man $p$  e o sinal em campo mais alto foi assinalado como um resíduo de  $\beta$ -Gal $p$ . A configuração anomérica  $\alpha$  das unidades de manose foram estabelecidas a partir dos deslocamentos químicos dos prótons H-3 e H-5. A configuração anomérica  $\beta$  do resíduo de galactose foi estabelecida pela magnitude de  $^3J_{\text{H1-H2}}$  dos deslocamentos químicos do H-1 e C-1. Quase todas as ressonâncias dos resíduos de  $\alpha$ -Man $p$ ,  $\beta$ -Gal $p$  e Ins foram claramente assinalados nos experimentos de TOCSY e pelos espectros de HSQC (Tabela 3). O resíduo de Ins-1-P designado Ins(1) e o resíduo de Ins designado Ins(1a) foram identificados pela ausência de ressonâncias anoméricas e pela presença de dois sinais em campo de baixa energia em 4,257 e 4,094 ppm, os quais exibiram no espectro de ROESY (não mostrado) Noes com o H-1 da Man(1) em 5,172 ppm e com a Man(1a) em 4,086 ppm, respectivamente. Esta heterogeneidade do Ins é devida a desfosforilação parcial do Ins-1-P durante a hidrólise alcalina dos GIPCs. As ressonâncias

em 4,257 e 4,094 ppm podem ser atribuídas aos H-2 do Ins(1) e do Ins(1a), respectivamente, uma vez que a ligação entre  $\alpha$ -Manp e Ins é do tipo (1→2) em todas as estruturas dos GIPCs de *C. neoformans* que já foram até então determinadas (Heise *et al.*, 2002).

A sequência dos monossacarídeos e as ligações encontradas nas estruturas dos PI-oligossacarídeos foram determinadas pelos espectros de ROESY. Os Noes inter-resíduos foram observados entre:

1. H-1 da  $\beta$ -Galp e H-6 da  $\alpha$ -Manp(1) em 3,871 ppm;
2. H-6 da  $\alpha$ -Manp(1a) em 3,840 ppm e H-1 da  $\alpha$ -Manp(2) em 4,820 ppm e também com o H-4 da  $\beta$ -Galp em 4,023 ppm;
3. H-1 da  $\alpha$ -Manp(3) em 5,129 ppm e H-3 da  $\alpha$ -Manp(2) em 3,957 ppm.

Confirmações adicionais destas seqüências foram fornecidas pelos dados de deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3). A ressonância do C-3 no resíduo designado  $\alpha$ -Manp(2) foi observada em campo de baixa energia em 81,04 ppm, enquanto que na  $\alpha$ -Manp(3) e  $\alpha$ -Manp(1), assim como em sistemas modelos onde a posição 3 não está glicosilada seus valores são tipicamente entre 71-73 ppm. O deslocamento químico em campo de baixa energia do C-6 da  $\alpha$ -Manp(1) em 71,34 ppm é consistente com a glicosilação na posição O-6. No dissacarídeo  $\alpha$ -Manp(1→6)-Manp, o sinal do C-6 é em 67 ppm (Heise *et al.*, 2002). Baseado nos dados de RMN, a estrutura do PI-oligossacarídeo do mutante NE178 pode ser  $\alpha$ -Manp(1→3)- $\alpha$ -Manp(1→4)- $\beta$ -Galp(1→6)- $\alpha$ -Manp(1→2)-InsP.

O espectro 1D de RMN de  $^1\text{H}$  do PI-oligossacarídeo do mutante NE321 (Figura 26B) difere do espectro do mutante NE178 (Figura 26A) pela presença da ressonância de dois prótons anoméricos minoritários que sugere um baixo grau de heterogeneidade

associado com as cadeias oligossacarídicas. Estes sinais foram assinalados como resíduos de  $\alpha$ -Manp e designados como Man(3a) em 5.16 ppm e Man(2a) em 4.99 ppm. No espectro de ROESY (não mostrado), os Noes inter-resíduos foram observados entre:

1. H-1 da  $\alpha$ -Manp(3a) e H-2 da  $\alpha$ -Manp(2a) em 4,14 ppm;
2. H-1 da  $\alpha$ -Manp(2a) e H-4 da  $\beta$ -Galp(2a) em 4,023 ppm.

Estes dados são consistentes com a sequência  $\alpha$ -Manp(1→2)- $\alpha$ -Manp(1→4)- $\beta$ -Galp. A confirmação desta sequência também foi fornecida pelos dados obtidos dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  obtidos do espectro de HSQC (Tabela 3) que mostrou que a ressonância assinalada como C-2 da  $\alpha$ -Manp(2a) em 77,88 ppm está deslocada para um campo mais baixo comparada com o sinal correspondente do C-2 da  $\alpha$ -Manp(2) no PI-oligossacarídeo do mutante NE178 (Tabela 3). A porção restante da estrutura demonstrou um padrão idêntico de Noes do PI-oligossacarídeo do mutante NE178. Esses dados demonstraram que os PI-oligossacarídeos do mutante NE321 são uma mistura de dois isômeros:  $\alpha$ -Manp(1→3)- $\alpha$ -Manp(1→4)- $\beta$ -Galp(1→6)- $\alpha$ -Manp(1→2)-InsP e  $\alpha$ -Manp(1→2)- $\alpha$ -Manp(1→4)- $\beta$ -Galp(1→6)- $\alpha$ -Manp(1→2)-Ins-1-P.

O espectro 1D de RMN de  $^1\text{H}$  do PI-oligossacarídeo da amostra selvagem NE241 de *C. neoformans* mostrou algumas similaridades com o espectro do PI-oligossacarídeo do mutante NE178, exceto pela presença de três ressonâncias anoméricas adicionais. Estas foram assinaladas como dois resíduos de  $\alpha$ -Manp (5,122 ppm e 4,89 ppm) e um resíduo de  $\beta$ -Xylp (4,354 ppm). A presença do sistema de spin da  $\alpha$ -Manp em 5,122 ppm, designada Man(1a) foi atribuída a  $\beta$ -Galp(1→6)- $\alpha$ -Manp(1→2)-Ins-6-P, resultante da migração do fosfato durante a hidrólise alcalina do GIPC. Este sistema de spin adicional do Ins, designado Ins(1a'), foi identificado pela ausência de uma ressonância anomérica e pela

presença do H-2 em campo baixo em 4,087 ppm. No espectro de ROESY, um intenso pico cruzado foi observado entre o H-2 do Ins em 4,087 ppm e o H-1 da Man(1a') em 5,122 ppm, indicando uma ligação glicosídica do tipo 1→2 entre estas duas unidades. O sistema de spin Ins(1a') foi apoiado pela presença dos sinais em campo baixo de energia do H-5 em 3,408 ppm e do C-6 em 80,00 ppm (Tabela 3).

No PI-oligossacarídeo da cepa selvagem NE241, a sequência e a ligação entre as unidades de açúcar foram deduzidas a partir dos seguintes argumentos:

- a. Os deslocamentos químicos do próton (Figura 26C) e do carbono foram muito similares aos do  $\alpha\text{-Manp}(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-Manp}(1\rightarrow3)[\beta\text{-Xylp}(1\rightarrow2)]\alpha\text{-Manp}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-Galp}(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-Manp}(1\rightarrow2)\text{-Ins-1-P}$  encontrado no Ins-oligossacarídeo obtido do GIPC da cepa mutante Cap67 de *C. neoformans* (Heise *et al.*, 2002). Como o Ins-oligossacarídeo do mutante Cap67 foi isolado por amoniólise, os sinais de H-1 correspondentes a Man ligada ao Ins(1) ou Ins(1a') não foram observados e foi substituído pela ressonância do H-1 da Man(1a) (Tabela 3);
- b. A análise por ESI-MS/MS mostrou claramente que o resíduo de Xyl é terminal e está localizado na Man(2);
- c. No espectro de ROESY (não mostrado), um Noe entre H-1 da Man(4) com H-5 e H-6 da Man(3) em 3,889 e 3,651 ppm, respectivamente, sugeriu uma ligação do tipo 1→6 entre eles. A ressonância em campo de alta energia do C-1 da Man(4) em 102,39 ppm é consistente com um resíduo ligado do tipo  $\alpha\text{-Manp}(1\rightarrow6)$ . A ressonância do H-1 da Man(3) indicou por sua vez um Noe inter-resíduo com o H-3 da Man(2) em 4,010 ppm, demonstrando a evidência de uma ligação do tipo  $\alpha(1\rightarrow3)$ . O próton anomérico do resíduo terminal de Xyl apresentou Noes com o H-

1 e H-2 da Man(2) em 4,972 e 4,047 ppm, respectivamente, sendo consistente com uma ramificação  $\beta$ -Xylp(1 $\rightarrow$ 2)Man que foi confirmada pela posição do deslocamento químico em campo de baixa energia do C-2 da Man(2) em 80,83 ppm. Os Noes restantes entre Man(2), Gal, Man(1) e Ins foram iguais aos descritos para os PI-oligossacarídeos da cepa mutante NE178;

- d. A confirmação adicional da sequência do PI-oligossacarídeo da cepa selvagem NE241 foi realizada através dos dados dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3).

As estruturas dos PI-oligossacarídeos da cepa encapsulada NE241 e das cepas mutantes NE321 e NE178 estão ilustradas na Tabela 4.

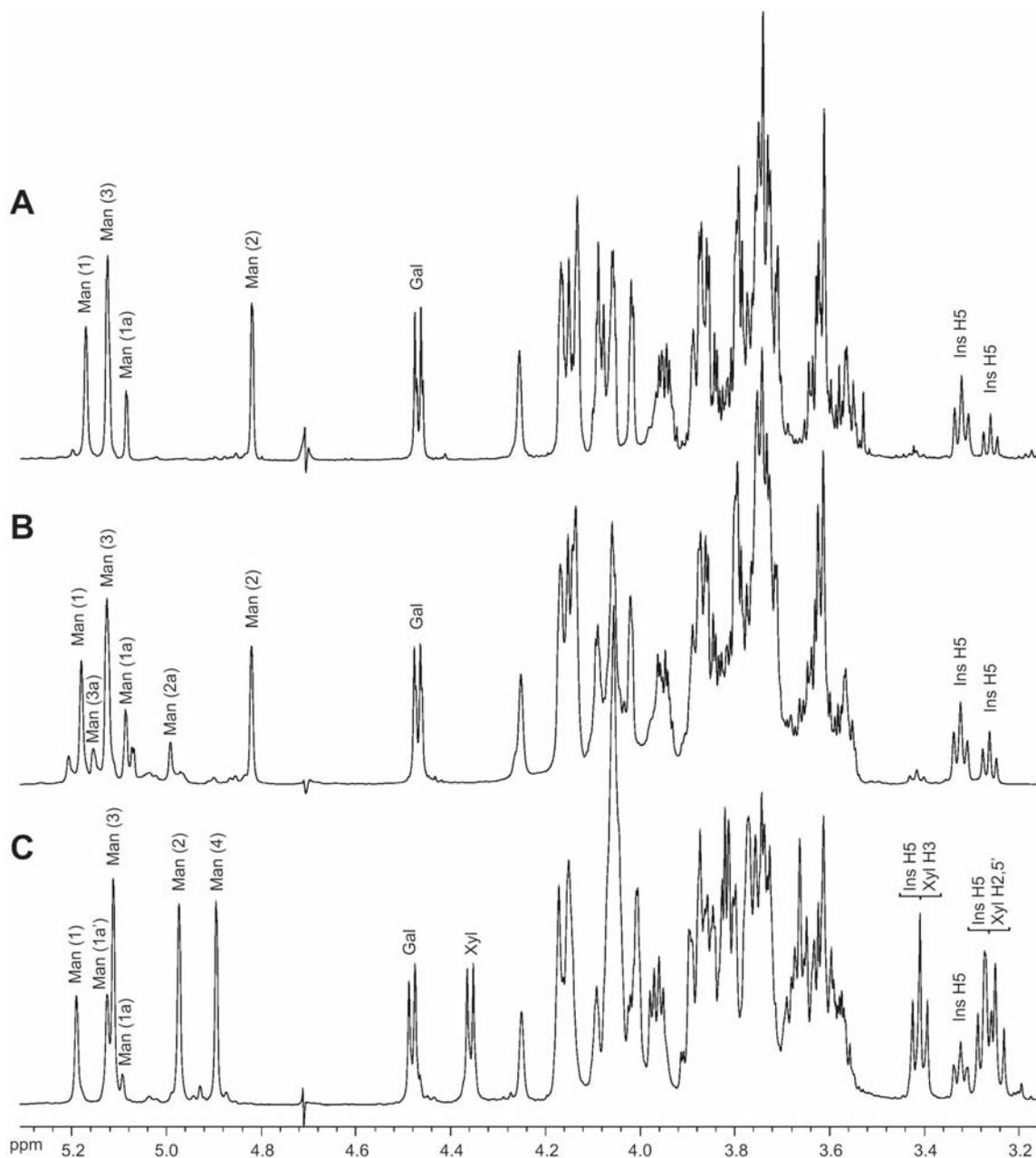


Figura 26: Espectro obtido por RMN  $^1\text{H}$  1D dos PI-oligosacarídeos obtidos dos GIPCs purificados das cepas NE178 (A), NE321 (B) e NE241 (C) de *C. neoformans*.

Tabela 3: Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos PI-oligosacarídeos obtidos por hidrólise alcalina dos GIPCs de *C. neoformans*. Resultados dos experimentos de TOCSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) e HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).

PI-oligosacarídeo	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6/H-5'	H-6'	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<b>NE178</b>													
Man (3)	5.129	4.051	3.856	3.742	4.071	3.734	3.876	104.97	72.76	73.01	69.26	75.86	63.83
Man (2)	4.820	4.173	3.957	3.793	4.069	3.807	3.795	104.33	72.37	81.04	68.49	75.86	63.18
Gal	4.468	3.566	3.716	4.023	3.736	3.735	3.735	106.13	73.66	74.70	80.26	75.10	63.18
Man (1)	5.172	4.130	3.856	3.742	4.150	4.142	3.871	104.32	72.76	73.02	69.26	74.44	71.34
Man (1a)	5.086	4.086	3.846	3.770	4.099	4.153	3.840	104.33	72.76	72.91	69.65	73.65	69.14
Ins (1)	3.963	4.257	3.611	3.744	3.325	3.874		77.80	82.21	72.89	76.09	77.16	72.92
Ins (1a)	3.611	4.094	3.556	3.256	3.622	3.856		72.89	83.10	75.21	77.55	74.18	72.91
<b>NE321</b>													
Man (3)	5.127	4.052	3.855	3.742	4.070	3.732	3.874	104.97	72.76	73.01	69.26	75.86	63.83
Man (3a)	5.164	4.058						104.35	72.75				
Man (2)	4.818	4.172	3.956	3.792	4.068	3.806	3.793	104.33	72.37	81.04	68.49	75.86	63.18
Man (2a)	4.993	4.140						101.25	77.88				
Gal	4.465	3.564	3.714	4.024	3.735	3.733	3.734	106.13	73.66	74.70	80.26	75.10	63.18
Man (1)	5.171	4.131	3.855	3.740	4.151	4.140	3.872	104.32	72.76	73.02	69.26	74.44	71.34
Man (1a)	5.084	4.086	3.846	3.774	4.010	4.151	3.842	104.33	72.76	72.91	69.65	73.65	69.14
Ins (1)	3.962	4.257	3.610	3.743	3.324	3.874		77.80	82.21	72.89	76.09	77.16	72.92
Ins (1a)	3.612	4.092	3.554	3.254	3.621	3.856		72.89	83.10	75.21	77.55	74.18	72.91
<b>NE241</b>													
Man (4)	4.893	4.004	3.852	3.665	3.650	3.876	3.742	102.39	72.63	73.36	69.45	75.35	63.69
Man (3)	5.103	4.056	3.819	3.820	3.889	3.859	3.651	105.77	72.79	73.42	68.68	72.96	68.79
Man (2)	4.972	4.047	4.010	3.867	4.058	3.833	3.804	102.02	80.83	80.00	68.80	74.17	62.81
Gal	4.479	3.574	3.732	4.067	3.738	3.725	3.760	106.23	73.57	74.78	79.84	75.20	63.20
Man (1)	5.188	4.147	3.846	3.740	4.154	4.154	3.875	104.24	72.79	72.97	69.31	74.49	71.47
Man (1a)	5.083	4.085	3.845	3.772	4.009	4.152	3.842	104.33	72.76	72.91	69.65	73.65	69.14
Man (1a')	5.122	4.169	3.896	3.744	4.169	4.155	3.876	104.35	72.82	72.96	69.31	74.51	71.48
Xyl	4.354	3.268	3.405	3.609	3.963	3.248		105.77	75.41	78.21	72.93	67.87	
Ins (1)	3.955	4.248	3.612	3.731	3.320	3.745		77.52	82.29	72.91	74.76	77.26	72.96
Ins (1a)	3.612	4.092	3.554	3.254	3.621	3.856		72.89	83.10	75.21	77.55	74.18	72.91
Ins (1a')	3.684	4.087	3.610	3.662	3.408	4.009		74.53	82.46	72.92	75.41	77.10	80.00



# **DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Estudos sobre a estrutura, biossíntese e funções de GIPCs expressos em fungos patogênicos têm dado ênfase ao *C. neoformans*, um fungo oportunista, capaz de se tornar patogênico, causando uma micose sistêmica, sendo a meningite a manifestação clínica mais comum. Os indivíduos mais suscetíveis à infecção são deficientes em linfócitos T, resultado de infecção pelo vírus HIV, doenças linfoproliferativas ou submetidos a terapias imunossupressoras. Como tem sido observado em *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, a biossíntese dos GIPCs possui um papel chave no crescimento, na viabilidade, no ciclo de vida e na virulência do *C. neoformans*.

As informações sobre a biossíntese de GIPC e suas funções em fungos foram obtidas a partir de estudos com cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Nesses estudos foram utilizados mutantes que não codificavam enzimas que foram consideradas essenciais à via biossintética dos GIPCs.

Análise molecular dos GIPCs de *C. neoformans* revelaram a expressão de uma variedade de estruturas na porção oligossacarídica com cadeias laterais contendo uma unidade de xilose que não haviam sido previamente descritos em outros fungos analisados até o momento (Heise *et al.*, 2002). Apesar das estruturas mais simples ou mais complexas (Heise *et al.*, 2002) dos GIPCs de *C. neoformans* sugerirem o envolvimento de diferentes glicosiltransferases em sua biossíntese, essas enzimas não foram, completamente, identificadas ou demonstradas estarem envolvidas, também, na biossíntese dos polissacarídeos capsulares.

Com o objetivo de auxiliar a esclarecer a via biossintética e compreender as possíveis funções dos GIPCs em *C. neoformans*, nesta dissertação foram caracterizadas as estruturas dos GIPCs de cepas mutantes nas enzimas UDP-glucose desidrogenase (amostra

NE321) e UDP-ácido glucurônico decarboxilase ou UDP-xilose sintase (amostra NE178) responsáveis, respectivamente, pela formação de UDP-ácido glucurônico e UDP-xilose. Esses mutantes de *C. neoformans* não sintetizam UDP-xilose, o substrato doador para a síntese de glicanas, contendo em sua estrutura unidades de xilose.

O mapeamento genético tem sido de grande valor para a identificação dos genes cujos produtos são necessários à síntese dos componentes da cápsula polissacarídica de *C. neoformans*, considerados como importantes determinantes de virulência neste fungo. Os estudos bioquímicos são necessários à complementação das informações genômicas, elucidando as funções possíveis do produto de cada gene. Continuando a discutir especificamente a síntese dos componentes dos polissacarídeos capsulares de *C. neoformans*, a primeira etapa a ser analisada é a produção de açúcares ativados, substratos doadores dos precursores dos componentes da cápsula (Figura 27). Para a síntese de GXM, os seguintes substratos são necessários, GDP-manose, UDP-xilose e UDP-ácido glucurônico. Para a síntese de GalXM além destes açúcares nucleotídeos, é necessário adicionalmente o UDP-galactose. A biossíntese de GDP-manose é uma etapa crítica na síntese de GXM, uma vez que esse polissacarídeo é composto por uma cadeia linear contendo  $\alpha$ -D-manose (manana). Essa etapa requer a atividade de três enzimas, altamente conservadas em fungos, fosfomanose isomerase, fosfomanomutase e GDP-manose pirofosforilase (ou GDP-manose sintase) (Figura 27A). O gene que codifica a fosfomanoisomerase em *C. neoformans* já foi identificado e clonado (Wills *et al.*, 2001). O mutante *man1* é deficiente na produção da cápsula e na secreção de GXM, possuindo anormalidades morfológicas, sendo considerado avirulento.

Os açúcares nucleotídeos UDP-ácido glucurônico e UDP-xilose são sintetizados a partir da UDP-glucose pela ação seqüencial de duas enzimas, UDP-glucose desidrogenase, responsável pela formação de UDP-ácido glucurônico (Figura 27B); e a UDP-glucurônico descarboxilase que forma a UDP-xilose (Figura 27C) (Jacobson, 1987; Jacobson e Payne, 1982).

Após a formação dos substratos ativados, que ocorre, normalmente, no citoplasma, a próxima etapa é o transporte desses precursores para o sítio (organelas) onde haverá a construção dos polissacarídeos. Esta etapa requer transportadores específicos, uma vez que os precursores polares são formados no citosol e a síntese dos componentes dos polissacarídeos capsulares em *C. neoformans* ocorre no Golgi (Figura 27D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Nesse compartimento de síntese da cápsula, os monossacarídeos são polimerizados. Foram descritas pelo menos 11 ligações presentes em várias configurações em GXM e GalXM (Buchanan e Murphy, 1998). Cada tipo de ligação requer a atividade de uma glicosiltransferase diferente, uma vez que essas enzimas são específicas para os seus substratos aceptores. Portanto, a síntese da GXM e da GalXM requer uma coleção de glicosiltransferases (Figura 27E, F e G) e acetiltransferase (Figura 27H).

Ainda em *C. neoformans*, a atividade de três manosiltransferases distintas foi caracterizada e estudos de inibição da expressão dessas manosiltransferases demonstraram que são enzimas necessárias para a síntese de uma cápsula morfologicamente normal (Doering, 1999; White e Jacobson, 1993). As atividades de xilosiltransferase (Figura 27G) e glucuroniltransferase (Figura 27F) foram detectadas em preparações de membranas de *C. neoformans* (White *et al.*, 1990). Os estudos sobre essas atividades propõem que, na cadeia principal de manana na GXM, a seqüência de formação do polímero é a seguinte: primeiramente a manose é acetilada; depois é adicionado o ácido glucurônico; e

posteriormente, ocorre a adição de xilose (White *et al.*, 1990). Entretanto, investigações mais recentes sobre a estrutura da GXM, utilizando cepas mutantes de *C. neoformans*, onde não ocorre a adição da xilose sugerem que a acetilação na manose ocorre independente da adição da xilose (Moyrand *et al.*, 2002).

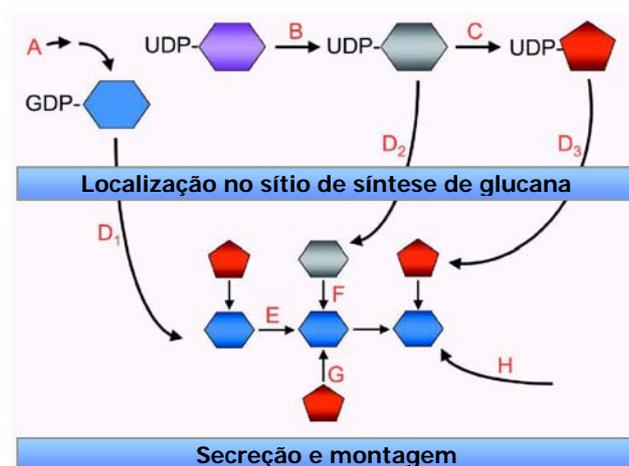


Figura 27: **Etapas da síntese de GXM.** Proteínas com papel na biossíntese estão indicadas por letras **vermelhas**. (A) Fosfomanose isomerase; (B) UDP-glicose desidrogenase; (C) UDP-ácido glucurônico descarboxilase; (D) transportadores de açúcar nucleotídeos específicos para GDP-manose (D<sub>1</sub>), UDP-ácido glucurônico (D<sub>2</sub>) e UDP-xilose (D<sub>3</sub>); (E) manosiltransferase; (F) xilosiltransferase; (G) glucuronosiltransferase e (H) acetiltransferase. Lilás, glicose; cinza, ácido glucurônico; vermelho, xilose; azul, manose. Adaptado de Bose *et al.*, 2003.

Cepas mutantes no gene *ugd1* que codificam a enzima UDP-glucose desidrogenase não expressam dois dos três (considerados) principais fatores de virulência do *C. neoformans*, a presença da cápsula polissacarídica e a habilidade de crescer a 37 °C (Moyrand e Janbon, 2004). Embora plantas sejam capazes de sintetizar UDP-ácido glucurônico, via a oxidação do inositol a ácido glucurônico, e subsequente ativação ao açúcar nucleotídeo correspondente (Seitz *et al.*, 2000), análises fenotípicas das cepas  $\Delta$ *ugd1* sugerem fortemente que em fungos o UDP-ácido glucurônico é sintetizado apenas pela

conversão de UDP-glucose. O resultado de análises por espectrometria de massas das cepas  $\Delta ugd1$  demonstraram que a presença de UDP-ácido glucurônico era abaixo dos níveis detectáveis (Griffith *et al.*, 2004).

Estudos sobre a localização celular da UDP-glucose desidrogenase (UGD) demonstraram sua aparente localização membranar. Porém, não existe na estrutura dessa proteína uma sequência peptídeo sinal, típica de associação ou ancoramento à membrana, sugerindo uma associação indireta à membrana via interação com outras proteínas (Griffith *et al.*, 2004). Uma localização similar foi observada para a UDP-xilose sintase (UXS), sugerindo que ambas enzimas possam estar associadas ao mesmo tipo de complexo ligado à membrana para promover uma eficiente síntese dos polímeros capsulares (Griffith *et al.*, 2004).

Foram demonstradas diferenças entre os fenótipos associados com a ausência de UDP-xilose e com a ausência de UDP-ácido glucurônico/UDP-xilose (Moyrand e Janbon, 2004; Griffith *et al.*, 2004). A ausência da cápsula e a sensibilidade à temperatura são fenótipos associados às cepas  $\Delta ugd1$ , uma vez que as cepas  $\Delta uxs1$  são encapsuladas e crescem a 37 °C. Diferenças no fenótipo da parede celular também foram descritas nos mutantes. A cepa mutante  $ugd1\Delta$  é incapaz de crescer em altas concentrações de NaCl (1,5 M), sorbitol (2,5 M) e em SDS 0,01%. Já a cepa mutante  $\Delta uxs1$  foi capaz de crescer em NaCl 1,5M, sorbitol 2,5 M, SDS 0,01%, mas foi sensível à concentração de SDS 0,1%.

Após muitos dias de incubação da cepa mutante  $\Delta ugd1$ , em meio sintético contendo dextrose (SD) (Sherman, 1992), algumas colônias cresceram nas placas, demonstrando a reversão da deficiência em crescer em meio SD. Este resultado demonstra a diversidade de vias metabólicas afetadas pela deleção do  $ugd1$ , conseqüentemente pela ausência de UDP-ácido glucurônico nas células de *C. neoformans*. Porém, a reversão deste fenótipo não está

correlacionada a outros fenótipos da cepa mutante  $\Delta ugd1$ , uma vez que análises destas células demonstraram que continuavam acapsulares e sensíveis ao sorbitol. Em contraste, estas células que reverteram, espontaneamente, a mutação em relação à habilidade de crescer em meio SD, foram capazes de crescer a 37 °C e na presença de SDS 0,01%, indicando uma correlação entre estes dois fenótipos.

Moyrand e Janbon (2004) sugerem hipóteses que justificam por que tantos fenótipos são afetados pela ausência de um açúcar nucleotídeo. Em uma das sugestões, foi observado que embora a parede celular de *C. neoformans* não contenha unidades de ácido glucurônico, já foi demonstrado glicoproteínas associadas à parede contendo esse monossacarídeo (James *et al.*, 1990; Turner e Cherniak, 1991). E que, esse tipo de modificação pós-tradução é, com frequência, necessária à atividade enzimática de proteínas correspondentes. Em *Candida albicans*, a deleção do gene *pmt1* que codifica uma manosiltransferase está correlacionada a múltiplos efeitos fenotípicos, afetando, inclusive, a virulência da cepa mutante (Timpel *et al.*, 1998). Em *C. neoformans*, é possível que as unidades de ácido glucurônico sejam necessárias para a funcionalidade de várias proteínas envolvidas na biossíntese da cápsula e da parede celular, bem como para a sua capacidade de crescer a 37 °C (Moyrand e Janbon, 2004). Alternativamente, estes autores sugerem que a adição de unidades de ácido glucurônico ao polissacarídeo nascente possa ser uma etapa biossintética que ocorre anteriormente à polimerização da GXM. Assim, a ausência desse monossacarídeo afetaria a síntese desse componente capsular. Esta hipótese foi sugerida por estudos que demonstraram que a deleção dos genes *cas1* ou *uxs1*, responsáveis, respectivamente, pela *O*-acetilação e xilosilação, não modifica a posição nem o número de unidades de ácido glucurônico adicionados a GXM, uma vez que essas duas modificações ocorrem após à adição do ácido glucurônico ao polímero nascente da GXM (Janbon *et al.*,

2001; Moyrand *et al.*, 2002). Em eucariotos superiores, a mutação no gene que codifica a UDP-glucose desidrogenase afeta a síntese dos glicosaminoglicanas sulfatados (Sugahara e Kitagawa, 2000).

Por outro lado, Griffith e colaboradores (2004) apresentam outras hipóteses sobre as essas alterações fenotípicas. Uma delas é que, para que não ocorra a síntese da cápsula, a ausência dos substratos doadores das cadeias laterais na GXM não permite o alongamento e o polímero ou não é completamente sintetizado ou não é estável. Uma segunda hipótese é que a manana é gerada dentro da célula, mas não é exportada para a superfície. E, a terceira possibilidade é que algumas formas abreviadas da molécula polissacarídica chegam à superfície celular, mas não reagem eficientemente com os anticorpos disponíveis ou não são liberadas para o meio ou não são recuperadas pelos métodos de precipitação utilizados (Griffith *et al.*, 2004).

Em *C. neoformans*, nosso grupo (Heise *et al.*, 2002) demonstrou a presença de estruturas de GIPCs do tipo  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\beta\text{Xyl}(1\rightarrow2)]\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsP}$  em uma cepa selvagem do sorotipo A, isolada de um paciente com AIDS. Já em uma cepa mutante acapsular (Cap67), os GIPCs continham estruturas mais complexas:  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\beta\text{Xyl}(1\rightarrow2)]\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsP}$ ;  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\beta\text{Xyl}(1\rightarrow2)]\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsP}$ ;  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\beta\text{Xyl}(1\rightarrow2)]\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsP}$ . O mutante acapsular Cap67 foi obtido através tratamento da amostra selvagem, sorotipo D, com um composto mutagênico, *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina e irradiação UV (Jacobson *et al.*, 1982). Esse tipo de tratamento gera mutantes

inespecíficos, não se sabendo, com certeza, qual ou quais os genes estão sendo mutados. Células mutantes Cap67 são ditas acapsulares pela ausência da GXM. Entretanto, ela possui GalXM e a estrutura deste componente (GalXM) da cápsula polissacarídica foi caracterizada utilizando o mutante Cap67 (James e Cherniak, 1992; Vaishnav *et al.*, 1998).

A estrutura do GIPC isolado da cepa selvagem NE241, descrita nesta dissertação corresponde a estrutura oligossacarídica  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\beta\text{Xyl}(1\rightarrow2)]\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsP}$ , semelhante à estrutura de um dos GIPCs descrita no mutante Cap67. No entanto, a cepa selvagem WT444 do sorotipo A não sintetizou este componente. Por outro lado, as estruturas dos GIPCs das cepas mutantes  $\Delta\text{uxs1}$  e  $\Delta\text{ugd1}$  descritas nesta dissertação demonstram a presença de cadeias oligossacarídicas lineares de  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins}$ . Na cepa mutante  $\Delta\text{ugd1}$  foi observado, ainda, a presença de estruturas minoritárias, contendo na porção oligossacarídica do GIPC  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins}$ . Mesmo em pequenas quantidades, a presença desta estrutura sugere que a ausência de UDP-ácido glucurônico pode, também, afetar a atividade de glicosiltransferases responsáveis pela síntese de outros glicoconjugados (Griffith *et al.*, 2004).

É possível que a mutação inespecífica que gerou o mutante Cap67 tenha afetado genes de glicosiltransferases responsáveis pela biossíntese de GIPCs, pelo fato deste mutante apresentar cadeias oligossacarídicas com até sete unidades de hexoses além da unidade de pentose. Nos GIPCs das cepas mutantes, além da ausência da unidade de xilose, a cadeia oligoglicana dos mutantes (NE178 e NE341) estudados nesta dissertação apresenta, no máximo, quatro unidades de hexose.

A porção lipídica de todas as cepas descritas previamente (Heise *et al.*, 2002) e nesta dissertação apresenta-se conservada, demonstrando que, apesar da variabilidade na porção oligossacarídica, as enzimas responsáveis pelas etapas de biossíntese da IPC não foram afetadas nos mutantes estudados.

O *C. neoformans* é um fungo que possui etapas complexas na biossíntese de seus polímeros contendo carboidratos, resultando em glicoconjugados e polissacarídeos, também heterogêneos e complexos. Nesta dissertação, demonstramos que semelhante aos componentes da cápsula polissacarídica, os mutantes incapazes de sintetizar UDP-xilose apresentam deficiência na xilosilação dos GIPCs. Assim, sugerimos que a ausência da xilose pode afetar a adição de  $\alpha$ Man(1→6) no final não redutor da cadeia oligoglicana, ou por um efeito pleiotrópico durante a mutação, atingindo a expressão de uma  $\alpha$ 1→6manosiltransferase que atua na síntese do GIPC, ou pela ausência de um substrato acceptor específico, contendo xilose, para esta enzima. Estudos estruturais com várias outras cepas mutantes são necessários para a caracterização da biossíntese de moléculas contendo carboidratos em *C. neoformans* e a possível função das glicosiltransferases na virulência do fungo ou em seu ciclo de vida.



# **CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÕES

As estruturas caracterizadas das cepas selvagem NE241 e mutantes NE178 e NE321 por análises espectrométricas e espectroscópicas foram determinadas nesta dissertação e suas estruturas estão descritas na Tabela 4. Ainda neste trabalho, discutimos a atividade de glicosiltransferases na biossíntese dos componentes do polissacarídeo capsular e dos GIPCs de *C. neoformans* e a especificidade de substratos aceptores para algumas dessas enzimas.

A porção lipídica dos GIPCs de todas as cepas descritas previamente (Heise *et al.*, 2002) e nesta dissertação apresenta-se conservada. Assim, apesar da variabilidade da porção oligossacarídica, as enzimas responsáveis pelas etapas de biossíntese do IPC não foram afetadas, independente do tipo de mutação.

Nesta dissertação, foram apresentadas evidências que demonstram a necessidade da cadeia lateral de monoxilosil para a síntese do GIPC no qual a manose é adicionado a cadeia aceptora  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\beta\text{Xyl}(1\rightarrow2)]\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsPC}$  para formar o GIPC:

$\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\beta\text{Xyl}(1\rightarrow2)]\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsPC}$ . Esta conclusão se baseia na comparação dos dados obtidos pelas análises de espectrometria de massas e espectroscopia de RMN dos GIPCs isolados das cepas selvagem NE241 e mutantes NE321 ( $\Delta\text{ugd1}$ ) e NE178 ( $\Delta\text{uxs1}$ ).

Na cepa selvagem NE241 o GIPC predominante foi o  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\beta\text{Xyl}(1\rightarrow2)]\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsPC}$ , enquanto que nos mutantes NE321 e NE178 a espécie mais abundante foi identificada como  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsPC}$ .

A observação que a ausência do doador da cadeia lateral, UDP-Xyl, modifica o alongamento após a Man ligada  $\alpha$  (1→3) sugere que a adição de xilose é necessária para o *C. neoformans* sintetizar GIPCs mais elaborados. A ausência de  $\alpha$ Man(1→6) terminal nos mutantes pode ser devido a incapacidade de uma enzima putativa  $\alpha$ (1→6)-manosiltransferase utilizar  $\alpha$ Man(1→3) $\alpha$ Man(1→4) $\beta$ Gal(1→6) $\alpha$ Man(1→2)InsPC como substrato aceptor.

O mutante NE321, que não codificam a UDP-glucose desidrogenase e é incapaz de produzir UDP-ácido glucurônico e UDP-xilose, foi capaz de sintetizar um GIPC minoritário identificado como  $\alpha$ Man(1→2) $\alpha$ Man(1→4) $\beta$ Gal(1→6) $\alpha$ Man(1→2)InsPC. A presença deste isômero minoritário somente na cepa mutante *Augd1* não é bem compreendida, uma vez que um precursor idêntico é encontrado na cepa encapsulada mutante *Auxs1*. Presumivelmente, essa espécie minoritária de GIPC pode ter sido sintetizada como um efeito compensatório pela ausência da cápsula polissacarídica no mutante *Augd1*. Efeitos pleiotrópicos compensatórios têm sido descritos em mutações que afetam a fosfolipomanana e a biossíntese da cápsula em *C. albicans* (Mille *et al.*, 2004) e *C. neoformans* (Heise *et al.*, 2002), respectivamente.

Os resultados descritos nesta dissertação demonstraram que o GIPC e a cadeia lateral do polissacarídeo capsular GalXM de *C. neoformans* possuem como característica estrutural semelhante a sequência  $\alpha$ Man(1→3) $\alpha$ Man(1→4) $\beta$ Gal(1→ . Entretanto, o GIPC difere da GalXM em relação a presença da xilose, uma vez que no polissacarídeo capsular unidades de  $\beta$ Xyl(1→2) encontram-se sempre presentes e unidades de  $\beta$ Xyl(1→3) não foram observadas nos GIPCs. Uma vez que genes putativos ou confirmados para  $\beta$ (1→2)-xilossiltransferase (Klutts *et al.*, 2006) e  $\alpha$ (1→3)-manosiltransferase (Sommer *et al.*, 2003)

já foram descritos, uma importante questão a ser respondida é se algumas etapas de glicosilação da via biossintética dos GIPCs são catalizadas por glicosiltransferases que também são utilizadas na biossíntese da GalXM. Outra questão a ser determinada na biossíntese dos GIPCs é se a adição da unidade de xilose ocorre antes ou depois do precursor  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{InsPC}$  ser substituído por  $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)$ .

Tabela 4: Estruturas moleculares dos GIPCS das cepas selvagem e mutantes de *C. neoformans*. As estruturas que não estão demarcadas pelos quadros coloridos são artefatos provenientes da migração ou perda do fósforo durante a hidrólise alcalina.

<i>C. neoformans</i> cepa	Estrutura da porção oligossacarídica dos GIPCS
NIE 241	$\beta\text{Xyl}$ $\downarrow$ $2$ $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-1-P}$ <p style="text-align: center;">4                      3                      2                      1</p>
	$\beta\text{Xyl}$ $\downarrow$ $2$ $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-6-P}$ <p style="text-align: center;">4                      3                      2                      1a'</p>
	$\beta\text{Xyl}$ $\downarrow$ $2$ $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins}$ <p style="text-align: center;">4                      3                      2                      1a</p>
NIE 178	$\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-1-P}$ <p style="text-align: center;">3                      2                      1</p>
	$\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins}$ <p style="text-align: center;">3                      2                      1a</p>
NIE 321	$\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(\beta 1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-1-P}$ <p style="text-align: center;">3                      2                      1</p>
	$\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(\beta 1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins}$ <p style="text-align: center;">3                      2                      1a</p>
	$\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(\beta 1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins-P}$ <p style="text-align: center;">3a                      2a                      1</p>
	$\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\alpha\text{Man}(1\rightarrow4)\beta\text{Gal}(\beta 1\rightarrow6)\alpha\text{Man}(1\rightarrow2)\text{Ins}$ <p style="text-align: center;">3a                      2a                      1a</p>



# **REFERÊNCIAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADI, J., NACHMAN, S., KRESSEL, A. B. e PIROFSKI, L.. Cryptococcosis in children with AIDS. *Clin Infect Dis.* **28**: 309-313, 1999.
- AKSENOV, S. I., BABYEVA, I. P. e GOLUBEV, V. I.. On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. *Life Sci. Space Res.* **11**: 55–61, 1973.
- ALSPAUGH, J. A., CAVALLO, L. M., PERFECT, J. R. e HEITMAN, J.. *RAS1* regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **36**: 352–365, 2000.
- ALVAREZ, M. e CASADEVALL, A.. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Current Biol.* **16**: 2161-2165, 2006.
- APIDIANAKIS, Y., RAHME, L. G., HEITMAN, J., AUSUBEL, F. M., CALDERWOOD, S. B. e MYLONAKIS, E.. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot. Cell* **3**: 413–419, 2004.
- BAILLY, M. P., BOIBIEUX, A., BIRON, F., DURIEU, I., PIENS, M. A., PEYRAMOND, D. e BERTRAND, J. L.. Persistence of *Cryptococcus neoformans* in the prostate: Failure of fluconazole despite high doses (letter). *J. Infect. Dis.* **164**: 435-436, 1991.
- BALDWIN, S., STAGNO, S., ODREZIN, G. T., KELLY, D. R. e WHITLEY, R. J.. Isolated *Cryptococcus neoformans* osteomyelitis in an immunocompetent child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**: 289-292, 1988.
- BARBER, B. A., CROTTY, J. M., WASHBURN, R. G. e PEGRAM, P. S.. *Cryptococcus neoformans* myositis in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **21**: 1510-1511, 1995.
- BARCHIESI, F., COGLIATI, M., ESPOSTO, M. C., SPREGHINI, E., SCHIMIZZI, A. M., WICKES, B. L., SCALISE, G. e VIVIANI, M. A.. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. *J Infect.* **51**:10-6, 2005.

- BAR-PELED, M., GRIFFITH, C. L., ORY, J. J. e DOERING, T.L.. Biosynthesis of UDP-GlcA, a key metabolite for capsular polysaccharide synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochem. J.* **381**: 131–136, 2004.
- BAR-PELED, M., GRIFFITH, C. L. e DOERING, T.L.. Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 12003–12008, 2001.
- BARO, T., TORRES-RODRIGUEZ, J. M., MORERA, Y., ALIA, C., LOPEZ, O. e MENDEZ, R.. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. *J Clin Microbiol.* **37**: 1170-1172, 1999.
- BARR, K. e LESTER, R. L.. Occurrence of novel antigenic phosphoinositol-containing sphingolipids in the pathogenic yeast *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* **23**: 5581-5588, 1984.
- BARR, K., LAINE, R. A. e LESTER, R. L.. Carbohydrate structures of three novel phosphoinositol-containing sphingolipids from the yeast *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* **23**: 5589-5596, 1984.
- BECK, A., HUTCHINGS, M. W., MAKEY, A. R. e TUCK, I. M.. Infection with *Cryptococcus neoformans* in man: Report of two cases. *Lancet* **265**: 535-538, 1955.
- BELAY, T., CHERNIAK, R., O'NEILL, E. B. e KOZEL, T. R.. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by dot enzyme assay. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 466-470, 1996.
- BENNETT, J. E., KWON-CHUNG, K. J. e THEODORE, T. S.. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* **16**: 167–174, 1978.
- BEVERLEY, S. M., OWENS, K. L., SHOWALTER, M., GRIFFITH, C. L., DOERING, T. L., JONES, V. C. e McNEIL, M. R.. Eukaryotic UDP-galactopyranose mutase (GLF gene) in microbial and metazoal pathogens. *Eukaryot. Cell* **4**: 1147–1154, 2005.
- BINARI, R. C., STAVELEY, B. E., JOHNSON, W. A., GODAVARTI, R., SASISEKHARAN, R. e MANOUKIAN, A. S.. Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in *wingless* signaling. *Development* **124**: 2623–2632, 1997.

- BIONDA, C., PORTOUKALIAN, J., SCHMITT, D., RODRIGUEZ-LAFRASSE, C. e ARDAIL, D.. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J.* **382**: 527-533, 2004.
- BIONDO, C., MESSINA, L., BOMBACI, M., MANCUSO, G., MIDIRI, A., BENINATI, C., CUSUMANO, V., GERACE, E., PAPASERGI, S. e TETI, G.. Characterization of two novel cryptococcal mannoproteins recognized by immune sera. *Infection and Immunity* **73(11)**: 7348-7355, 2005.
- BOEKHOUT, T., van BELKUM, A., LEENDERS, A. C., VERBRUGH, H. A., MUKAMURANGWA, P., SWINNE, D. e SCHEFFERS, W. A.. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Int. J. Syst.* **47**: 432-442, 1997.
- BORGES-WALMSLEY, M., CHEN, D., SHU, X. e WALMSLEY, A.. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* **10**: 80–87, 2002.
- BOSE, I., REESE, A. J., ORY, J. J., JANBON, G. e DOERING, T. L.. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* **2**: 655–663, 2003.
- BUCHANAN, K. L. e MURPHY, J. W.. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg. Infect. Dis.* **4**: 71-83, 1998.
- BULMER, G. S., SANS, M. D. e GUNN, C. M.. *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. *J. Bacteriol.* **94**: 1475–1479, 1967.
- BURCH, E. H., FINE, G., QUINN, E. L. e EISSES, J. F.. *Cryptococcus neoformans* as a cause of lytic bone lesions. *JAMA.* **231**: 1057-1059, 1975.
- CALLEJAS, A., ORDONEZ, N., RODRIGUEZ, M. C. e CASTANEDA, E.. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol.* **36**: 341-344, 1998.
- CAMPBELL, R. E., MOSIMANN, S. C., VAN DE RIJN, I., TANNER, M. E. e STRYNADKA, N. C. J.. The first structure of UDP-glucose dehydrogenase reveals the catalytic residues necessary for the two-fold oxidation. *Biochemistry* **39**: 7012-7023, 2000.

- CARTER, H. E. e GAVER, R. C.. Branched-chain sphingosines from *Tetrahymena pyriformes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**: 886-891, 1967.
- CASADEVALL, A., ROSAS, A. L. e NOSANCHUK, J. D.. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 354–358, 2000.
- CASADEVALL, A., STEENBERGEN, J. N. e NOSANCHUK, J. D.. ‘Ready made’ virulence and ‘dual use’ virulence factors in pathogenic environmental fungi — the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 332–337, 2003.
- CHAKRABARTI, A., JATANA, M., KUMAR, P., CHATHA, L., KAUSHAL, A. e PADHYE, A. A.. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3440-3442, 1997.
- CHANG, Y. C., STINS, M. F., McCAFFERY, M. J., MILLER, G. F., PARE, D. R., DAM, T., PAUL-SATYASEELA, M., KIM, K. S. e KWON-CHUNG, K. J.. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood–brain barrier. *Infect. Immun.* **72**: 4985–4995, 2004.
- CHANG, Y. C. e KWON-CHUNG, K. J.. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* **14**: 4912–4919, 1994.
- CHARLIER, C., CHRETIEN, F., BAUDRIMONT, M., MORDELET, E., LORTHOLARY, O. e DROMER, F.. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood–brain barrier. *Am. J. Pathol.* **166**: 421–432, 2005.
- CHEN, S. H., STINS, M. F., HUANG, S. H., CHEN, Y. H., KWON-CHUNG, K. J., CHANG, Y., KIM, K. S., SUZUKI, K. e JONG, A. Y.. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.* **52**: 961–970, 2003.
- CHERNIAK, R., VALAFAR, H., MORRIS, L. C. e VALAFAR, F.. *Cryptococcus neoformans* chemotyping by quantitative analysis of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectra of glucuronoxylomannans with a computer-simulated artificial neural network. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 146–159, 1998.

- CHERNIAK, R., MORRIS, L. C., BELAY, T., SPITZER, E. D. e CASADEVALL, A.. Variation in the structure of glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. *Infect. Immun.* **63**: 1899–1905, 1995.
- CHERNIAK, R. e SUNDSTROM, J. B.. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **62**: 1507-1512, 1994.
- CHERNIAK, R., JONES, R. G. e REISS, E.. Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by <sup>13</sup>C-N.M.R. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **172**: 113–138, 1988.
- CHERNIAK, R., REISS, E. e TURNER, S. H.. A galactoxylomannan antigen of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Carbohydr. Res.* **103**: 239-250, 1982.
- CHRÉTIEN, F., LORTHOLARY, O., KANSAU, I., NEUVILLE, S., GRAY, F. e DROMER, F.. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *J. Infect. Dis.* **186**: 522–530, 2002.
- CIUCANU, I. e KEREK, F.. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohy. Res.* **131**: 403-409, 1984.
- CLEARE, W., CHERNIAK, R. e CASADEVALL, A.. In vitro and in vivo stability of a *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan epitope that elicits protective antibodies. *Infect. Immun.* **67**: 3096–3107, 1999.
- COGLIATI, M., ESPOSTO, M. C., CLARKE, D.L., WICKES, B. L. e VIVIANI, A.. Origin of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* diploid strains. *J Clin Microbiol* **39**: 3889–3894, 2001.
- COLLIER, L., BALOWS, A. e SUSSMAN, M.. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed, vol. 4. Arnold, London, Sydney, Auckland, New York, 1998.
- DIAMOND, R. D. e BENNETT, J. E.. Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages in vitro. *Infect. Immun.* **7**: 231–236, 1973.

- DIAMOND, R. D., ROOT, R. K. e BENNETT, J. E.. Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes in vitro. *J. Infect. Dis.* **125**: 367–376, 1972.
- DICKSON, R. C.. Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 27-48, 1998.
- DICKSON, R.C. e LESTER, R.L.. Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1583**: 13-25, 2002.
- DICKSON, R. C. e LESTER, R.L.. Yeast sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 347-357, 1999.
- DOERING, T. L.. A unique  $\alpha$ -1,3 mannosyltransferase of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **181**:5482–5488, 1999.
- DOUGHERTY, B. A. e van de RIJN, I.. Molecular characterization of hasB from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* **268**: 7118-7124, 1993.
- DROMER, F., GUEHO, E., RONIN, O. e DUPONT, B.. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 359–363, 1993.
- DUFAIT, R., VELHO, R. e DeVROEY, C.. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen* **30**: 483, 1987.
- DURDEN, F. M. e ELEWSKI, B.. Cutaneous involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. *J. Amer. Acad. Dermatol.* **30**: 844-848, 1994.
- EDMAN, J. C. e KWON-CHUNG, K. J.. Isolation of the *URA5* gene from *Cryptococcus neoformans* and its use as a selectable marker for transformation. *Mol Cell Biol* **10**: 4538–4544, 1990.
- EIGENHEER, R. A., LEE, Y. J., BLUMWALD, E., PHINNEY, B. S. e GELLI, A.. Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* *in press*, 2007.

- ELLERBROEK, P. M., LEFEBER, D. J., van VEGHEL, R., SCHARRINGA, J., BROUWER, E., GERWIG, G. J., JANBON, G., HOEPELMAN, A. I. e COENJAERTS, F. E.. *O*-acetylation of cryptococcal capsular glucuronoxylomannan is essential for interference with neutrophil migration. *J. Immunol.* **173**: 7513–7520, 2004.
- ELLIS, D. H. e PFEIFFER, T. J.. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* **28**: 1642–1644, 1990.
- FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, H.A., GLASS, C.K., MERRILL, A.H., Jr., MURPHY, R.C., RAETZ, C.R., RUSSELL, D.W., SEYAMA, Y., SHAW, W., SHIMIZU, T., SPENER, F., Van MEER, G., Van NIEUWENHZE, M.S., WHITE, S.H., WITZTUM, J.L. e DENNIS, E.A.. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid. Res.* **46**: 839-862, 2005.
- FEINGOLD, D. S. e FRANZEN, J. S.. Pyridine nucleotide-linked four-electron transfer dehydrogenases. *Trends Biochem. Sci.* **6**: 103-105, 1981.
- FELDMESSER, M., TUCKER, S. e CASADEVALL, A.. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *TRENDS in Microbiol.* **9(6)**: 273-278, 2001.
- FELDMESSER, M., KRESS, Y., NOVIKOFF, P. e CASADEVALL, A.. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Immun.* **68**: 4225–4237, 2000.
- FELL, J. W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SCORZETTI, G. e STATZELL-TALLMAN, A.. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1351–1371, 2000.
- FRANZEN, J. S., MARCHETTI, P. S., LOCKHART, A. H. e FEINGOLD, D. S.. Special effects of UDP-sugar binding to bovine liver uridine diphosphoglucose dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **746**: 146–153, 1983.
- FRANZEN, J. S., ASHCOM, J., MARCHETTI, P., CARDAMONE, J. J. AND FEINGOLD, D. S.. Induced vs. preexisting asymmetry models for half-of-the-sites reactivity in bovine liver uridine diphosphoglucose dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **614**: 242–255, 1980.

- FRANZOT, S. P., SALKIN, I. F. e CASADEVALL, A.. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* **37**: 838–840, 1999.
- FRASER, J. A., SUBARAN, R. L., NICHOLS, C. B. e HEITMAN, J.. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryot. Cell* **2**: 1036–1045, 2003.
- FRENCH, N., GRAY, K., WATERA, C., NAKIYINGI, J., LUGADA, E., MOORE, M., LALLOO, D., WHITWORTH, J. A. e GILKS, C. F.. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. *AIDS* **16**: 1031–1038, 2002.
- FRIES, B. C., GOLDMAN, D. L., CHERNIAK, R., JU, R. e CASADEVALL, A.. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect. Immun.* **67**: 6076–6083, 1999.
- FROMTLING, R. A., SHADOMY, H. J. e JACOBSON, E. S.. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **79**: 23–29, 1982.
- FUTERMAN, A. H. e HANNUN, Y. A.. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**: 777-782, 2004.
- FUTERMAN, A. H. e RIEZMAN, H.. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends in Cell Biology* **15**: 312-318, 2005.
- GADEBUSCH, H. H., WARD, P. A. e FRENKEL, E. P.. Natural host resistance to infection with *Cryptococcus neoformans*. III. The effect of cryptococcal polysaccharide upon the physiology of the reticuloendothelial system of laboratory animals. *J. Infect. Dis.* **114**: 95–106, 1964.
- GAINEY, P. A., PESTELL, T. C. e PHELPS, C. F.. A study of the subunit structure and the thiol reactivity of bovine liver UDP glucose dehydrogenase. *Biochem. J.* **129**: 821–830, 1972.

- GARCIA-HERMOSO, D., DROMER, F. e JANBON, G.. *Cryptococcus neoformans* capsule structure evolution in vitro and during murine infection. *Infect. Immun.* **72**: 3359–3365, 2004.
- GARCIA-HERMOSO, D., JANBON, G. e DROMER, F.. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3204–3209, 1999.
- GATES, M. A., THORKILDSON, P. e KOZEL, T. R.. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol. Microbiol.* **52**: 13–24, 2004.
- GEROLD, P. e SCHWARZ, R. T.. Biosynthesis of glycosphingolipids *de novo* by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **112**: 29-37, 2001.
- GILLARD, B. K., CLEMENT, R. G. e MARCUS, D. M.. Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in *de novo* and recycling pathways. *Glycobiology* **8**: 885-890, 1998.
- GRANGER, D. L., PERFECT, J. R. e DURACK, D. T.. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J. Clin. Invest.* **76**: 508–516, 1985.
- GRAYBILL, J. R., SOBEL, J., SAAG, M., van der HORST, C., POWDERLY, W., CLOUD, G., RISER, L., HAMILL, R. e DISMUKES, W.. Diagnosis and management of increased intracranial pressure in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and AIDS Cooperative Treatment Groups. *Clin. Infect. Dis.* **30**: 47–54, 2000.
- GRIFFITH, C. L., KLUTTS, J. S., ZHANG, L., LEVERY, S. B. e DOERING, T. L.. UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J. Biol. Chem.* **279(49)**: 51669-51676, 2004.
- GUREVITZ, O., GOLDSCHMIED-REUVEN, A., BLOCK, C., KOPOLOVIC, J., FARFEL, Z. e HASSIN, D.. *Cryptococcus neoformans* vertebral osteomyelitis. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**: 315-318, 1994.

- HALLIDAY, C. L. e CARTER, D. A.. Clonal reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* isolates from Australia. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 703–711, 2003.
- HEISE, N., GUTIERREZ, A. L. S., MATTOS, K. A., JONES, C., WAIT, R., PREVIATO, J. O., MENDONÇA-PREVIATO, L.. Molecular analysis of a novel family of complex glycoinositolphosphoryl ceramides from *Cryptococcus neoformans*: structural differences between encapsulated and acapsular yeast forms. *Glycobiology* **12** (7): 409-420, 2002.
- HOGAN, L. H. e KLEIN, B. S.. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect Immun* **62**: 3543–3546, 1994.
- HORN, W. S., SMITH, J. L., BILLS, G. F., RAGHOOBAR, S. L., HELMS, G. H., KURTZ, M. B., MARRINAN, J. A., FROMMER, B. R., THORNTON, R. A. e MANDALA, S. M.. Sphingofungins E and F: novel serine palmitoyltransferase inhibitors from *Paecilomyces variotii*. *J. Antibiot.* **45**: 1692-1696, 1992.
- HOY, J. F., MURPHY, J. W. e MILLER, G. G.. T cell response to soluble cryptococcal antigens after recovery from cryptococcal infection. *J Infect Diseases* **159**: 116–119, 1989.
- HUANG, C., NONG, S., MANSOUR, M. K., SPECHT, C. A. e LEVITZ, S. M.. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. *Infection and Immunity* **70**(10): 5485–5493, 2002.
- HUFFNAGLE, G. B. e LIPSCOMB, M. F.. Cells and cytokines in pulmonary cryptococcosis. *Res. Immunol.* **149**: 387–396, 1998.
- HUMBEL, R. e COLLAK, M.. Oligosaccharides in urine of patients with glycoprotein storage disease. I. Rapid detection by thin-layer chromatography. *Clin. Chim. Act.* **60**: 143-145, 1975.
- JACOBSON, E. S.. Cryptococcal UDP-glucose dehydrogenase: enzymic control of capsular biosynthesis. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**:131–135, 1987.

- JACOBSON, E. S., AYERS, D. J., HARRELL, A. C. e NICHOLAS, C. C.. Genetic and phenotypic characterization of capsule mutants of *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **150**: 1292-1296, 1982.
- JACOBSON, E. S. e PAYNE, W. R.. UDP glucuronate decarboxylase and synthesis of capsular polysaccharide in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **152**: 932-934, 1982.
- JAENICKE, R. e RUDOLPH, R.. Dissociation and *in vitro* reconstitution of bovine liver uridine diphosphoglucose dehydrogenase. The paired subunit nature of the enzyme. *Biochemistry* **25**: 7283-7287, 1986.
- JAMES, P. G. e CHERNIAK, R.. Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **60**: 1084-1088, 1992.
- JAMES, P. G., CHERNIAK, R., JONES, R. G., STORTZ, C. A. e REISS, E.. Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans* CAP 67. *Carbohydrate Research* **198(1)**: 23-38, 1990.
- JANBON, G.. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res.* **4**: 765-771, 2004.
- JANBON, G., HIMMELREICH, U., MOYRAND, F., IMPROVISI, L., e DROMER, F.. Cas1p is a membrane protein necessary for the *O*-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol.* **42**: 453-469, 2001.
- KLIMPEL, K. R. e GOLDMAN, W. E.. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack alpha- (1,3)-glucan. *Infect Immun* **56**: 2997-3000, 1988.
- KLIS, F.M., De GROOT, P. e HELLINGWERF, K.. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39**: 1-8, 2001.
- KORFEL, A., MENSSEN, H. D., SCHWARTZ, S. e THIEL, E.. Cryptococcosis in Hodgkin's disease: description of two cases and review of the literature. *Ann. Hematol.* **76**: 283-6, 1998.

- KOZEL, T. R., LEVITZ, S. M., DROMER, F., GATES, M. A., THORKILDSON, P. e JANBON, G.. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular *O*-acetylation or xylosyl side chains. *Infect. Immun.* **71**: 2868–2875, 2003.
- KOZEL, T. R.. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* **3**: 295–298, 1995.
- KURTZMAN, C. P. e FELL, J. W... The Yeasts. A Taxonomic Study. *Elsevier Scientific B.V.*, Amsterdam, The Netherlands. (ed.). 2000.
- KWON-CHUNG, K. J. e VARMA, A.. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* **6**: 574–587, 2006.
- KWON-CHUNG, K. J., EDMAN, J. C. e WICKES, B. L.. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **60**: 602–605, 1992.
- KWON-CHUNG, K. J., WICKES, B. L., BOOTH, J. L., VISHNIAC, H. S. e BENNETT, J. E.. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **55**: 1751–1754, 1987.
- KWON-CHUNG, K. J. e RHODES, J. C.. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **51**: 218–223, 1986.
- KWON-CHUNG, K. J. e BENNETT, J. E.. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* **120**: 123–130, 1984.
- KWON-CHUNG, K. J., POLACHECK, I. e BENNETT, J. E.. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* **15**: 535–537, 1982.
- KWON-CHUNG, K. J., RHODES, J. E. e BENNETT, J. E.. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**: 25–38, 1982.

- KWON-CHUNG, K. J. e BENNETT, J. E.. Distribution of  $\alpha$  and **a** mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am. J. Epidemiol.* **108**: 337–340, 1978.
- KWON-CHUNG, K. J.. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **68**: 821–833, 1976.
- KWON-CHUNG, K. J.. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* **68**: 943–946, 1976.
- KWON-CHUNG, K. J.. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **67**: 1197–1200, 1975.
- LAFONT, A., WOLFF, M., MARCHE, C., CLAIR, B. e REGNIER B.. Overwhelming myocarditis due to *Cryptococcus neoformans* in an AIDS patient. *Lancet* **330**: 1145–1146, 1987.
- LAINE, R. A. e HSIEH, T. C. –Y.. Inositol-containing sphingolipids. *Methods Enzymol.* **138**: 186–195, 1987.
- LAUTER, C. J. e TRAMS, E. G.. A spectrophometric determination of sphingosine. *J. Lipid Res.* **3**: 136–138, 1962.
- LAZERA, M. S., CAVALCANTI, M. A. S., TRILLES, L., NISHIKAWA, M. M. e WANKE, B.. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med Mycol.* **36**: 119–122, 1998.
- LEDERKREMER, R. M., TANAKA, C. T., ALVES, M. J. M. e COLLI, W.. Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **74**: 263–267, 1977.
- LEE, S. C., KRESS, Y., ZHAO, M. L., DICKSON, D. W. e CASADEVALL, A.. *Cryptococcus neoformans* survive and replicate in human microglia. *Lab. Invest.* **73**: 871–879, 1995.

- LENGELER, K. B., COX, G. M. e HEITMAN, J.. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect Immun* **69**: 115–122, 2001.
- LESTER, R. L. e DICKSON, R. C.. Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Adv. Lipid Res.* **26**: 253-274, 1993.
- LESTER, R. L., WELLS, G. B., OXFORD, G. e DICKSON, R. C.. Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures. *J. Biol. Chem.* **268**: 845-856, 1993.
- LESTER, R. L., SMITH, S. H., WELLS, G. B., RESS, D. C. e ANGUS, W. W.. The isolation and partial characterization of two novel sphingolipids from *Neurospora crassa*: (inositol-P)<sub>2</sub> ceramide and [(Gal)<sub>3</sub>Glc] ceramide. *J. Biol. Chem.* **249**: 3388-3394, 1974.
- LESTER, S. J., KOWALEWICH, N. J., BARTLETT, K. H., KROCKENBERGER, M. B., FAIRFAX, T. M. e MALIK, R.. Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases (January to July 2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **225**: 1716–1722, 2004.
- LEVERY, S. B., TOLEDO, M. S., STRAUS, A. H. e TAKAHASHI, H. K.. Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *P. Brasiliensis*: an immunodominant β-galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. *Biochemistry* **37**: 8764-8775, 1998.
- LEVITZ, S. M. e SPECHT, C. A.. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *FEMS Yeast Res* **6**: 513-524, 2006.
- LEVITZ, S. M., NONG, S., MANSOUR, M. K., HUANG, C. e SPECHT, C. A.. Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T-cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10422-10427, 2001.
- LEVITZ, S. M., NONG, S. H., SEETOO, K. F., HARRISON, T. S., SPEIZER, R. A. e SIMONS, E. R.. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect. Immun.* **67**: 885–890, 1999.

- LEVITZ, S. M. e NORTH, E. A.. Lymphoproliferation and cytokines profiles in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* **35**: 229–236, 1997.
- LEVITZ, S. M. e DiBENEDETTO, D. J.. Paradoxical role of capsule in murine bronchoalveolar macrophage-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* **142**: 659–665, 1989.
- LHOMME, O., BRUNETEAU, M., COSTELLO, C. E., MAS, P., MOLOT, P., DELL, A., TILLER, P. R. e MICHEL, G.. Structural investigations and biological-activity of inositol sphingophospholipids from *Phytophthora capsici*. *Eur. J. Biochem.* **191**: 203-209, 1990.
- LIPKE, P. N. e OVALLE, R.. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735–3740, 1998.
- LIN, X., HULL, C. M. e HEITMAN, J.. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, **434**: 1017–1021, 2005.
- LITTMAN, M. L.. Cryptococcosis (torulosis). *Am. J. Med.* **27**: 976-988, 1959.
- LITVINTSEVA, A. P., MARRA, R. E., NIELSEN, K., HEITMAN, J., VILGALYS, R. e MITCHELL, T. G.. Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa. *Eukaryot. Cell* **2**: 1162–1168, 2003.
- LIU, H., COTTRELL, T. R., PIERINI, L. M., GOLDMAN, W. E. e DOERING, T. L.. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* **160**: 463–470, 2002.
- LUBERTO, C., MARTINEZ-MARINO, B., TARASKIEWICZ, D., BOLANOS, B., CHITANO, P., TOFFALETTI, D. L., COX, G. M., PERFECT, J. R., HANNUN, Y. A., BALISH, E. e Del POETA, M.. Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* **112**: 1080–1094, 2003.
- MAHMOUD, Y. A. G.. First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gatti* from the Gharbia Governorate, Egypt. *Mycopathologia.* **148**: 83-86, 1999.

- MALLIARIS, S. D., STEENBERGEN, J. N. e CASADEVALL, A.. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Med. Mycol.* **42**: 149–158, 2004.
- MANDALA, S. M., THORNTON, R. A., MILLIGAN, J., ROSENBAACH, M., GARCIA-CALVO, M., BULL, H. G., HARRIS, G. H., ABRUZZO, K., FLATERRY, A. M., GILL, G. J., BARTIZAL, K., DREIKORN, S. e KURTZ, M. B.. Rustimicin, a potent antifungal agent, inhibits sphingolipid synthesis at inositol phosphoceramide synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 14942-14949, 1998.
- MANDALA, S. M., THORNTON, R. A., ROSENBAACH, M., MILLIGAN, J., GARCIA-CALVO, M., BULL, H. G. e KURTZ, M. B.. Khafrefungin, a novel inhibitor of sphingolipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **272**: 32709-32714, 1997.
- MANDALA, S. M., THORNTON, R. A., FROMMER, B. R., CUROTTO, J. E., ROZDILSKY, W., KURTZ, M. B., GIACOBBE, R. A., BILLS, G. F., CABELLO, M. A., MARTIN, I., PELAEZ, F. e HARRIS, G. H.. The discovery of Australifungin, a novel inhibitor of sphinganine *N*-acyltransferase from *Sporormiella australis*. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activity. *J. Antibiot.* (Tokyo) **48**: 349-356, 1995.
- MANDALA, S. M., FROMMER, B. R., THORNTON, R. A., KURTZ, M. B., YOUNG, N. M., CABELLO, M. A., GENILLOU, O., LIESCH, J. M., SMITH, J. L. e HORN, W. S.. Inhibition of serine palmitoyltransferase activity by lipoxamycin. *J. Antibiot* (Tokyo) **47(3)**: 376-379, 1994.
- MARTINEZ, L. R. e CASADEVALL, A.. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect. Immun.* **73**: 6350–6362, 2005.
- McCLELLAND, E.E., BERNHARDT, P. e CASADEVALL, A.. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infect. Immun.* **74**: 1500–1504, 2006.
- McFADDEN, D., ZARAGOZA, O. e CASADEVALL, A.. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *TRENDS in Microbiology* **14(11)**: 497-505, 2006.

- McFADDEN, D.C., De JESUS, M. e CASADEVALL, A.. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J. Biol. Chem.* **281**: 1868–1875, 2006.
- McFADDEN, D. C. e CASADEVALL, A.. Unexpected diversity in the fine specificity of monoclonal antibodies that use the same V region gene to glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* **172**: 3670–3677, 2004.
- McFADDEN, D. C. e CASADEVALL, A.. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* **39S1**: 19–30, 2001.
- MERRILL, A.H., Jr.. De novo sphingolipid biosynthesis. A necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* **277**: 25843-25846, 2002.
- MERRILL, A. H., Jr., WANG, E., GILCHRIST, D. G. e RILEY, R. T.. Fumonisin and other inhibitors of *de novo* sphingolipid synthesis. *Adv. Lipid Res.* **26**: 215-234, 1993.
- MILLE, C., JANBON, G., DELPLACE, F., IBATA-OMBETTA, S., GAILLARDIN, C., STRECKER, G., JOUAULT, T., TRINEL, P. A. e POULAIN, D.. Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem.* **279(46)**: 47952-60, 2004.
- MIN, K. H. e KWON-CHUNG, K. J.. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **261**: 471–480, 1986.
- MITCHELL, T. G. e PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 515-548, 1995.
- MIYAKE, Y., KOZUTSUMI, Y., NAKAMURA, S., FUJITA, T e KAWASAKI, T.. Serine palmitoyltransferase is the primary target of sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**: 396-403, 1995.
- MIYOSHI, S. I. e SHINODA, S.. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* **2**: 91–98, 2000.

- MOYRAND, F. e JANBON, G.. *UGD1*, encoding the *Cryptococcus neoformans* UDP-glucose dehydrogenase, is essential for growth at 37° C and for capsule biosynthesis. *Eukariot. Cell* **3** (6): 1601-1608, 2004.
- MOYRAND, F., CHANG, Y. C., HIMMELREICH, U., KWON-CHUNG, K. J. e JANBON, G.. Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. *Eukaryot. Cell* **3**: 1513–1524, 2004.
- MOYRAND, F., KLAPROTH, B., HIMMELREICH, U., DROMER, F. e JANBON, G.. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiology* **45** (3): 837-849, 2002.
- MURPHY, J. W.. Protective cell-mediated immunity against *Cryptococcus neoformans*. *Res. Immunol.* **149**: 373–386, 1998.
- MURPHY, J. W.. Influence of cryptococcal antigens on cellmediated immunity. *Rev Infect Diseases* **10**: S432–S435, 1988.
- MURPHY, J. W., MOSLEY, R. L., CHERNIAK, R., REYES, G. H., KOZEL, T. R. e REISS, E.. Serological, electrophoretic, and biological properties of *Cryptococcus neoformans* antigens. *Infect Immun* **56**: 424–431, 1988.
- MYLONAKIS, E., AUSUBEL, F. M., PERFECT, J. R., HEITMAN, J. e CALDERWOOD, S. B.. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**: 15675–15680, 2002.
- NAGIEC, M. M., NAGIEC, E. E., BALTISBERGER, J. A., WELLS, G. B., LESTER, R. L. e DICKSON, R.C.. Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs: complementation of the IPC synthase defect in a mutant strain of *S. cerevisiae* by the *AURI* gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 9809-9817, 1997.
- NAKAMURA, Y., KANO, R., WATANABE, S. e HASEGAWA, A.. Molecular analysis of *CAP59* gene sequences from five serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* **38**: 992–995, 2000.
- NEWTON, J. A., ANDERSON Jr., M. D., KENNEDY, C. A. e OLDFIELD, E. C.. III. Septic arthritis due to *Cryptococcus neoformans* without associated osteomyelitis: Case report and review. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **3**: 295-297, 1994.

- NIELSEN, K., COX, G. M., LITVINTSEVA, A. P., MYLONAKIS, E., MALLIARIS, S. D., BENJAMIN, D. K. Jr, GILES, S. S., MITCHELL, T. G., CASADEVALL, A., PERFECT, J. R. e HEITMAN, J.. *Cryptococcus neoformans*  $\alpha$  strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect. Immun.* **73**: 4922–4933, 2005.
- NIELSEN, K. COX, G. M., WANG, P., TOFFALETTI, D. L., PERFECT, J. R. e HEITMAN, J.. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic  $\alpha$  and  $\alpha$  isolates. *Infect. Immun.* **71**: 4831–4841, 2003.
- NONAMI, H., TANAKA, K., FUKUYAMA, Y. e ERRA-BALSELLS, R..  $\beta$ -Carbonile alkaloids as matrices for UV-matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry in and negative ion modes. Analysis of proteins of high molecular mass, and of cyclic and acyclic oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**: 285-296, 1998.
- NOSANCHUK, J. D., MEDNICK, A., SHI, L. e CASADEVALL, A.. Experimental murine cryptococcal infection results in contamination of bedding with *Cryptococcus neoformans*. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* **42**: 9–12, 2003.
- NOSANCHUK, J. D., ROSAS, A. L., LEE, S. C. e CASADEVALL, A.. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet* **355**: 2049–2050, 2000.
- NOSANCHUK, J. D., RUDOLPH, J., ROSAS, A. L. e CASADEVALL, A.. Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. *Infect. Immun.* **67**: 5477–5479, 1999.
- NOVERR, M. C., WILLIAMSON, P. R., FAJARDO, R. S. e HUFFNAGLE, G. B.. *CNLAC1* is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. *Infect. Immun.* **72**: 1693–1699, 2004.
- O'BRIEN, C. R., KROCKENBERGER, M. B., WIGNEY, D. I., MARTIN, P. e MALIK, R.. Retrospective study of feline and canine cryptococcosis in Australia from 1981 to 2001: 195 cases. *Med. Mycol.* **42**: 449–460, 2004.

- OKABAYASHI, K., HASEGAWA, A. e WATANABE, T.. Microreview: capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **163**: 1-8, 2007.
- OLSZEWSKI, M. A., NOVERR, M. C., CHEN, G. H., TOEWS, G. B., COX, G. M., PERFECT, J. R. e HUFFNAGLE, G. B.. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am. J. Pathol.* **164**: 1761–1771, 2004.
- OSBORN, M. G.. Preparation of lipopolysaccharide from mutant strains of *Salmonella*. *Methods Enzymol.* **8**: 161-164, 1966.
- OTTESON, E. W., WELCH, W. H. e KOZEL, T.R.. Protein-polysaccharide interactions. A monoclonal antibody specific for the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*. *J. Biol. Chem.* **269**: 1858–1864, 1994.
- PENHA, C. V. L., TODESCHINI, A. R., LOPES-BEZERRA, L. M., WAIT, R., JONES, C., MATTOS, K. A., HEISE, N., MENDONÇA-PREVIATO, L. e PREVIATO, J. O.. Characterization of novel structures of mannosylphosphoryl ceramides from the yeast forms of *Sporothrix schenckii*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 4243-4250, 2001.
- PENHA, C. V. L., LOPES, L. M., WAIT, R., JONES, C., TODESCHINI, A. R., HEISE, N., MENDONÇA-PREVIATO, L. e PREVIATO, J. O.. A novel family of glycoposphosphingolipid expressed by yeast forms of *Sporothrix schenckii*: evidence for a unique Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Ins-phosphorylceramide substructure. *Glycobiology* **10**: 1125, 2000.
- POLACHECK, I. e KWON-CHUNG, K. J.. Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **29**: 468–473, 1986.
- POLACHECK, I. e KWON-CHUNG, K. J.. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. *J Bacteriol* **142**: 15–20, 1980.
- PREVIATO, J. O., GORIN, P. A. J., MAZUREK, M., XAVIER, M. T., FOURNET, B., WIERUSZESK, J. M. e MENDONÇA-PREVIATO, L.. Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **265(5)**: 2518-26, 1990.

- PREVIATO, J. O., GORIN, P. A. J. e TRAVASSOS, L. R.. Cell wall composition in different cell types of the dimorphic species *Sporothrix schenckii*. *Exp. Mycol.* **3**: 83-91, 1979 a.
- PREVIATO, J. O., GORIN, P. A. J., HASKINS, R. H. e TRAVASSOS, L. R.. Soluble and insoluble glucans from different cell types of human pathogens *Sporothrix schenckii*. *Exp. Mycol.* **3**: 92-105, 1979 b.
- REESE, A. J., YONEDA, A., BREGER, J. A., BEAUVAIS, A., LIU, H., GRIFFITH, C. L., BOSE, I., KIM, M. J., SKAU, C., YANG, S., SEFKO, J. A., OSUMI, M., LATGE, J. P., MYLONAKIS, E. e DOERING, T. L.. Loss of cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Molecular Microbiology* **50(4)**: 1401-1409, 2007.
- REESE, A. J. e DOERING, T. L.. Cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Molecular Microbiology* **50(4)**: 1401-1409, 2003.
- ROBERTS, I. A.. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 285–315, 1996.
- ROSA, I. A., EINICKER-LAMAS, M., BERNARDO R. R., MENDONÇA-PREVIATO, L., MOHANA-BORGES, R., MORGADO-DYAZ J. A. e BENCHIMOL, M.. Cardiolipin in Hydrogenosomes: Evidence of Symbiotic Origin. *Eukaryotic Cell* **5(4)**: 784–787, 2006
- SANTANGELO, R., ZOELLNER, H., SORRELL, T., WILSON, C., DONALD, C., DJORDJEVIC, J., SHOUNAN, Y. e WRIGHT, L.. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infect. Immun.* **72**: 2229–2239, 2004.
- SCHILLER, J. G., LAMY, F., FRAZIER, R. e FEINGOLD, D. S.. UDP-glucose dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and subunit structure. *Biochim. Biophys. Acta* **453**: 418–425, 1976.
- SEATON, R. A., VERMA, N., NARAQI, S., WEMBRI, J. P. e WARRELL, D. A.. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **91**: 44-49, 1997.

- SEITZ, B., KLOS, C., WURM, M. e TENHAKEN, R.. Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternative pathways with organ-specific expression patterns. *Plant J.* **21**: 537–546, 2000.
- SHERMAN, F.. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**: 3–21, 1992.
- SMITH, T. K., GEROLD, P., CROSSMAN, A., PATERSON, M. J., BORISSOW, C. N., BRIMACOMBE, J. S., FERGUSON, M. A. e SCHWARZ, R. T.. Substrate specificity of the *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway and inhibition by species-specific suicide substrates. *Biochemistry* **41**: 12395-12406, 2002.
- SMITH, S. W. e LESTER, R. L.. Inositol phosphorylceramide, a novel substance and chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. *J. Biol. Chem.* **249 (11)**: 3395-3405, 1974.
- SOBEL, J. D. e VAZQUEZ, J. A.. Fungal infections of the urinary tract. *World J Urol.* **17**: 410-414, 1999.
- SOMMER, U., LIU, H. e DOERING, T.L.. An alpha-1,3-mannosyltransferase of *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem.* **278(48)**: 47724-30, 2003.
- SPEED, B. e DUNT, D.. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis.* **21**: 28–36, 1995.
- STEENBERGEN, J. N., SHUMAN, H. A. e CASADEVALL, A.. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**: 15245–15250, 2001.
- SUGAHARA, K. e KITAGAWA, H.. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of the sulfated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 518–527, 2000.
- SUKROONGREUNG, S., KITINIYOM, K., NILAKUL, C. e TANTIMAVANICH, S.. Pathogenicity of basidiospores of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. *Med. Mycol.* **36**: 419–424, 1998.

- SWEELEY, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M. e WELLS, W. W.. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2497, 1963.
- TAKESAKO, K., KURODA, H., INQUE, T., HARUNA, F., YOSHIKAWA, Y. e KATO, I.. Biological properties of Aureobasidina A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. *J. Antibiotics* **46**: 1414-1420, 1993.
- TANAKA, R., NISHIMURA, K. e MIYAJI, M.. Ploidy of serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Med Mycol* **40**: 31–34, 1999.
- TIMPEL, C., STRAHL-BOLSINGER, S., ZIEGELBAUER, K. e ERNST, J.. Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**: 20837–20846, 1998.
- TOLEDO, M. S., LEVERY, S. B., GLUSHKA, J., STRAUS, A. H. e TAKAHASHI, H. K.. Structure elucidation of sphingolipids from the mycophatogen *Sporothrix schenckii*: identification of a novel glycoinositol phosphorylceramides with core Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Ins linkage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**: 19-24, 2001.
- TSCHARKE, R. L., LAZERA, M., CHANG, Y. C., WICKES, B. L. e KWON-CHUNG, K. J.. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type  $\alpha$ -specific. *Fungal Genet. Biol.* **39**: 230–237, 2003.
- TUCKER, S. C. e 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. USA* **99**: 3165–3170, 2002.
- TURNER, S. H. e CHERNIAK, R.. Multiplicity in the structure of the glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*, p. 123–142. In J. P. Latge' and D. Boucias (ed.), Fungal cell wall and immune response, vol. **H 53**. NATO ASI Series, Heidelberg, Germany, 1991.
- TURNER, S. H. e CHERNIAK, R.. Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* serotype B: structural analysis by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **211**: 103–116, 1991.

- URBINI, B., CASTELLINI, C., RONDELLI, R., PRETE, A., PIERINELLI, S. e PESSION, A... Cryptococcal meningitis during front-line chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. **85**:1103-1104, 2000.
- VAISHNAV, V. V., BACON, B. E., O'NEIL, M. e CHERNIAK, R.. Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. *Carbohydr. Res.* **306**, 315-330, 1998.
- van ECHTEN-DECKERT, G., GIANNIS, A., SCHWARZ, A., FUTERMAN, A. H. e SANDHOFF, K.. 1-Methylthiodihydroceramide, a novel analog of dihydroceramide, stimulates sphinganine degradation resulting in decreased *de novo* sphingolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**: 1184-1191, 1998.
- VARTIVARIAN, S. E., ANAISSIE, E. J., COWART, R. E., SPRIGG, H. A., TINGLER, M. J. e JACOBSON, E. S.. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J. Infect. Dis.* **167**: 186–190, 1993.
- VECCHIARELLI, A.. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* **38**: 407–417, 2000.
- VICENT, V. L. e KLIG, L.S.. Unusual effect of *myo*-inositol on phospholipid biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **141**: 1829-1837, 1995.
- WALENKAMP, A. M., CHAKA, W. S., VERHEUL, A. F., VAISHNAV, V. V., CHERNIAK, R., COENJAERTS, F. E. e HOEPELMAN, I. M.. *Cryptococcus neoformans* and its cell wall components induce similar cytokine profiles in human peripheral blood mononuclear cells despite differences in structure. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**: 309, 1999.
- WANG, C. Y., WU, H.D. e HSUEH, P. R.. Nosocomial transmission of cryptococcosis. *N. Engl. J. Med.* **352**: 1271–1272, 2005.
- WANG, E., NORRED, W. P., BACON, C. W., RILEY, R. T. e MERRILL, A. H., Jr.. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* **266**: 14486-14490, 1991.

- WATANABE, M., KITANO, T., KONDO, T., YABU, T., TAGUCHI, Y., TASHIMA, M., UMEHARA, H., DOMAE, N., UCHIYAMA, T. e OKAZAKI, T.. Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the "sphingomyelin cycle" in Fas-induced apoptosis. *Cancer Res.* **64**: 1000-1007, 2004.
- WELLS, G. B., DICKSON, R. C. e LESTER, R. L.. Isolation and composition of inositolphosphorylceramide-type sphingolipids of hyphal forms of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **178**: 6223-6226, 1996.
- WHITE, C. W. e JACOBSON, E. S.. Mannosyl transfer in *Cryptococcus neoformans*. *Can. J. Microbiol.* **39**:129–133, 1993.
- WHITE, C. W., CHERNIAK, R. e JACOBSON, E. S.. Side group addition by xylosyltransferase and glucuronyltransferase in biosynthesis of capsular polysaccharide in *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **28**: 289–301, 1990.
- WICKES, B. L., MAYORGA, M. E., EDMAN, U. e EDMAN, J. C.. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the  $\alpha$ -mating type. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**: 7327–7331, 1996.
- WICKES, B. L., MOORE, T. D. e KWON-CHUNG, K. J.. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol* **140**: 543–550, 1994.
- WIDER, G. e WUTHRICH, K.. A simple experimental scheme using pulsed-field gradients for coherence-pathway rejection and solvent suppression in phase-sensitive heteronuclear correlation spectra. *J. Magn. Reson., Ser B* **102**: 239-241, 1993.
- WILLIAMSON, P. R.. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* **176**: 656–664, 1994.
- WILLS, E. A., ROBERTS, I. S., Del POETA, M., RIVERA, J., CASADEVALL, A., COX, G. M. e PERFECT, J. R.. Identification and characterization of the *Cryptococcus neoformans* phosphomannose isomerase-encoding gene, *MANI*, and its impact on pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **40**:610–620, 2001.

XU, J., VILGALYS, R. e MITCHELL, T. G.. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Ecol* **9**: 1471–1481, 2000.

ZARAGOZA, O., FRIES, B. C. e CASADEVALL, A.. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO<sub>2</sub>. *Infect. Immun.* **71**: 6155–6164, 2003.

ZHU, X. e WILLIAMSON, P. R.. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* **5**: 1–10, 2004.

ZWEERINK, M. M., EDISON, A. M., WELLS, G. B., PINTO, W. e LESTER, R. L.. Characterization of a novel, potent and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 25032-25038, 1992.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)