

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

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
ANTIGÊNICAS PARA DIAGNÓSTICO DA
CRIPTOCOCOSE HUMANA**

Dissertação de Mestrado

MÁRCIA POLESE

Porto Alegre, junho de 2009.

MÁRCIA POLESE

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
ANTIGÊNICAS PARA DIAGNÓSTICO DA
CRIPTOCOCOSE HUMANA**

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

Orientadora

Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein

Co-Orientador

Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, junho de 2009.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto recebeu apoio financeiro da FAPERGS Edital PROCOREDES III, do CNPq e da FINEP.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Marilene Henning Vainstein pela acolhida e orientação.

Ao professor Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira pela co-orientação, apoio e compreensão e principalmente pela abertura das portas da UFRGS para mim.

À comissão de acompanhamento, professor Augusto Schrank e em especial ao professor Carlos Alexandre, sempre quando necessário estava disposto a me auxiliar.

À professora Patrícia Valente por aceitar em fazer parte da banca.

À professora Sandra Farias, pela atenção despendida em vários momentos deste trabalho.

À professora Maria Lúcia Scroferneker, muito obrigada pela permissão da realização do meu estágio docente em sua disciplina, mas especialmente pelas longas conversas de apoio e amizade.

Agradeço em especial ao meu companheiro Jonathan, pelo amor, carinho, apoio e compreensão durante o desenvolvimento do meu mestrado e pela sua paciência comigo nesta etapa final.

Aos meus pais Ignácio e Nadir, que entenderam que a minha ausência fazia parte da realização de um sonho maior, um sonho do qual eles são peças fundamentais para esta conquista.

Aos meus avôs, Francisco e Teresa, ao meu irmão Marcelo, a minha cunhada Suzana e a minha amada sobrinha Brenda, obrigada pelo carinho.

À minha “maninha” Eveline, pelo sentimento de cumplicidade, obrigada.

À minha iniciação científica, Juliana Ferraz “Jujuba”, agradeço pelo companherismo no trabalho e mais ainda pela tua amizade.

À minha eterna amiga Luciane Dall’Agnol, amigona do peito desde a graduação.

Aos funcionários Sílvinha, Luciano, Milton e Paulo, pela presteza e carinho.

Às minhas eternas amigas do laboratório Simone Soares e Roberta Bussamara, pela amizade e incentivo.

Ao querido casal de amigos Ana e Jean pela amizade e convívio, pelos domingos de desabafo seguido de um belo truço.

Às minhas amigas Lusia, Josiane e Cristine pelo apoio.

Aos meus amigos Paulo M. Pinto e Felipe Zambelli, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos colegas de laboratório que me ajudaram com muito carinho: Lívia, Charley, Broetto, Juliano, Lucélia, Walter, Cláudia, Juli Crestani, Bianca, Luisa, Eder, Fernanda, Luciana, Melissa e Vanessa.

À equipe FK Biotec pelo companherismo recebido nestes últimos meses e principalmente pelo apoio nos momentos em que a ansiedade não exitava em aparecer. Em especial as minhas amigonas do coração Alessandra, Bibiana, Karen e Vanessa.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| LISTA DE TABELAS..... | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES | ix |
| RESUMO..... | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Características gerais de <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 |
| 1.1.1 Cápsula polissacarídica | 2 |
| 1.1.2 Melanina | 4 |
| 1.1.3 Crescimento a 37°C | 6 |
| 1.2 Ciclo de infecção de <i>C. neoformans</i> | 6 |
| 1.3 Determinação do sorotipo..... | 8 |
| 1.4 <i>Mating-type</i> | 10 |
| 1.5 Antígenos protéicos de <i>C. neoformans</i> | 10 |
| 1.6 Resposta do sistema imunológico humano a <i>C. neoformans</i> | 11 |
| 1.6.1 Sistema de complemento | 12 |
| 1.6.2 Imunidade celular | 13 |
| 1.6.3 Imunidade humoral..... | 14 |
| 1.7 Epidemiologia..... | 15 |
| 1.7.1 Epidemiologia molecular..... | 16 |
| 1.8 Diagnóstico | 18 |
| 1.9 Tratamento..... | 20 |
| 1.10 Prevenção | 22 |
| 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 JUSTIFICATIVA | 23 |
| 2.2 OBJETIVO GERAL..... | 23 |
| 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 3. MATERIAS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 Linhagem de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6 | 24 |
| 3.2 Cultivo de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6 | 24 |
| 3.3 Extração de DNA de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6..... | 24 |
| 3.4 PCR espécie-específico de <i>C. neoformans</i> | 25 |
| 3.5 Extração de proteínas de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6..... | 26 |
| 3.6 Quantificação da extração de proteína total de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6..... | 26 |
| 3.7 Preparação das amostras de extrato protéico total de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6 para eletroforese | 26 |
| 3.8 SDS-PAGE de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6 | 27 |
| 3.9 Soros de pacientes com criptococose, candidose, aspergilose, paracoccidiodomicose, histoplasmosose e de indivíduos hígidos. | 27 |
| 3.10 ELISA | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 3.11 <i>Western blotting</i> de gel unidimensional | 29 |
| 3.12 Eletroforese bidimensional de extrato protéico total de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6..... | 30 |
| 3.12.1 Isoeletrofocalização | 30 |
| 3.12.2 SDS-PAGE | 30 |
| 3.13 <i>Western Blotting</i> de gel bidimensional de extrato protéico total de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6..... | 31 |
| 3.14 Imunização de camundongos com extrato protéico total de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> HC6..... | 31 |
| 3.15 Preparação de amostras de proteínas resolvidas por eletroforese bidimensional para identificação por espectrometria de massa..... | 32 |
| 3.16 Espectrometria de massas | 33 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 4.1 Cultivo das leveduras e quantificação protéica | 34 |
| 4.2 Análise do antígeno protéico total | 34 |
| 4.3 Organização de um banco de soros de pacientes com criptococose ou com outras enfermidades de potencial reatividade cruzada | 35 |
| 4.4 Confirmação da espécie de <i>C. neoformans</i> HC6 por PCR espécie-específico..... | 43 |
| 4.5 Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos séricos contra <i>C. neoformans</i> | 44 |
| 4.6 Teste de ELISA | 46 |
| 4.7 Identificação de proteínas antigênicas de <i>C. neoformans</i> HC6 por <i>Western blot</i> de gel unidimensional..... | 55 |
| 4.8 Gel bidimensional para identificação de proteínas antigênicas de <i>C. neoformans</i> HC6 frente a soro de pacientes com criptococose..... | 58 |
| 4.10 Imunização de camundongos para a produção de soro policlonal contra proteínas antigênicas de <i>C. neoformans</i> HC6. | 62 |
| 4.11 Identificações das proteínas de <i>C. neoformans</i> HC6 por MALDI-TOF..... | 65 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 69 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |
| 7. CURRICULUM VITAE | 84 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Características que permitem diferenciar <i>Cryptococcus neoformans</i> de outros fungos..... | 5 |
| Figura 2: Ciclo de infecção do <i>Cryptococcus</i> spp..... | 7 |
| Figura 3: Evolução do complexo da espécie de <i>C. neoformans</i> | 9 |
| Figura 4: SDS PAGE 12% para verificação do perfil protéico de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> (HC6)..... | 35 |
| Figura 5: PCR espécie-específico de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> (HC6)..... | 43 |
| Figura 6: Teste para padronização da concentração de antígenos de extrato total de HC6 para o experimento de ELISA..... | 45 |
| Figura 7: Teste para padronização da diluição das amostras de soros de pacientes para o experimento de ELISA..... | 45 |
| Figura 8: Média de OD ₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 40 amostras de soro de pacientes com criptococose..... | 46 |
| Figura 9: Média de OD ₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 10 amostras de soro de pacientes com histoplasmose..... | 47 |
| Figura 10: Média de OD ₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 7 amostras de soro de pacientes com aspergilose..... | 47 |
| Figura 11: Média de OD ₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 15 amostras de soro de pacientes com candidose..... | 48 |
| Figura 12: Média de OD ₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 9 amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose..... | 48 |
| Figura 13: Média de OD ₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 35 amostras de soro de indivíduos hígidos (UFRGS)..... | 49 |
| Figura 14: Média de OD ₄₉₂ por ELISA, observada em cada amostra de soro de indivíduos hígidos, funcionários de um hospital de Porto Alegre..... | 49 |
| Figura 15: Curva ROC determinada por SPSS 10.0..... | 51 |
| Figura 16: Teste de sensibilidade e especificidade por ELISA..... | 52 |
| Figura 17: Teste de reatividade cruzada por ELISA..... | 52 |
| Figura 18: Padrão de reconhecimento dos antígenos de <i>C. neoformans</i> HC6 pelo <i>pool</i> de soros de pacientes com criptococose, paracoccidiodomicose, histoplasmose e aspergilose previamente testados pela técnica de ELISA..... | 57 |
| Figura 19: 2D-PAGE..... | 58 |
| Figura 20: Análise por <i>Western Blot</i> de 2D-PAGE revelado com fosfatase alcalina..... | 60 |
| Figura 21: Padronização da concentração de antígeno de extrato total de <i>C. neoformans</i> HC6 para ELISA de soros de camundongos imunizados..... | 63 |
| Figura 22: Titulação das amostras de soro dos camundongos por ELISA..... | 63 |
| Figura 23: <i>Western blot</i> de soros policlonais de camundongos imunizados com extrato total de proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> (HC6)..... | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Soro de pacientes acometidos por criptococose..... | 38 |
| Tabela 2: Soros de pacientes com paracoccidiodomicose..... | 39 |
| Tabela 3: Soros de pacientes com aspergilose..... | 39 |
| Tabela 4: Soro de pacientes com histoplasmose..... | 40 |
| Tabela 5: Soro de pacientes com candidose | 40 |
| Tabela 6: Soros de voluntários (alunos e funcionários) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul..... | 41 |
| Tabela 7: Soros de funcionários de um hospital de Porto Alegre..... | 42 |
| Tabela 8: Massa e pI dos <i>spots</i> selecionados..... | 61 |
| Tabela 9: Identificação de proteínas por MS..... | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

- 5 FC – fluocitosina
- 5 FU – 5-fluorouracil
- 2D-PAGE - eletroforese bidimensional
- ABPA- aspergilose broncopulmonar alérgica
- AI - aspergilose invasiva
- AFLP - polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado
- AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)
- Arg - arginina
- BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
- BLOTTO – *bovine lacto transfer technique optimizer*
- BSA – albumina sérica bovina
- CIPA - colonização intracavitária pulmonar aspergilar
- CGB- canavanina-glicina-azul de bromotimol
- cm – centímetros
- CNRE-1 – elementos repetitivos de *C. neoformans*
- DAB – 3,3- diaminobenzidina
- DHT - hipersensibilidade tardia
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DTT- 1,4- ditiotreitól
- EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA – ensaio imunoenzimático
- EUA – Estados Unidos da América
- °C – graus Celsius
- GlcCer- glicosilceramida
- GM-CSF - fator estimulador de crescimento de colônia de macrófagos
- GXM - glicuronoxilomanana
- HAART - terapias antiretrovirais
- h – horas
- HE – hematoxilina/eosina
- HIV - vírus da imunodeficiência humana
- His - histidina
- Hz – hertz

ID – imunodifusão dupla

IgA- imunoglobulina A

IgD – imunoglobulina D

IgE – imunoglobulina E

IgG – imunoglobulina G

IgM –imunoglobulina M

IL - interleucina

INF – interferon

(IFN- γ) - interferon gama

kDa – quilodalton

kg - quilograma

LA - aglutinação por látex

LCR – líquido cefalorraquidiano

Lys - lisina

LPS - lipopolissacarídeo

mA- miliampere

MAPK – proteíno quinase

M – molar

MALDI-TOF - *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*

MLST – tipagem de seqüência multilocus

MS – espectrometria de massas

μ g – microgramas

mg - miligramas

mL – mililitros

mM - milimolares

μ L - microlitros

μ g/mL – microgramas por mililitro

N – normal

NBT - nitro blue tetrazólio

ng - nanograma

nm - nanômetros

NK – células *natural killer*

OD – densidade óptica

OPD - ortofenilenodiamina
PCR - reação em cadeia da polimerase
PAS – coloração ácido periódico-Schiff
pb – pares de bases
PBS – solução salina tamponada por fosfato
pH - potencial hidrogeniônico
Phe - fenilalanina
PMF - *peptide mass fingerprinting*
pmol - picomol
p/v – peso por volume
PVDF – polifluoreto de vinilideno
Q-TOF - espectrômetro de massa de alta resolução
RAPD – amplificação randômica de DNA polimórfico
RFLP – polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
ROC - *receiver operator characteristic curve*
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS
TNF – fator de necrose tumoral
TNF α – fator de necrose tumoral alfa
Th – linfócitos T *helper*
TCA - ácido tricloroacético
TFA – ácido trifluoroacético
Trp - triptofano
Tyr - tirosina
UV - ultravioleta
V – volts
VH – volts horas
v/v - volume por volume

RESUMO

Palavras-chave: *C. neoformans*, diagnóstico, ELISA, MALDI-TOF.

A criptococose é uma doença invasiva capaz de apresentar-se de forma fatal podendo acometer pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos. Os agentes etiológicos *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* apresentam distribuição cosmopolita, sendo as excretas de pombos o seu principal reservatório. Com o advento de terapias imunossupressoras e a pandemia de HIV, observou-se o aumento significativo de casos de pacientes com criptococose. Atualmente, o diagnóstico é baseado na apresentação clínica, na observação microscópica de líquido corado com tinta da Índia e/ou no isolamento em cultura. Neste trabalho desenvolveu-se um ELISA para detecção de anticorpos contra *C. neoformans* var. *grubii* em soro de pacientes utilizando como antígeno um extrato protéico total de uma linhagem clínica isolada de um paciente com criptococose (HC6). Foram testados através de ELISA 40 amostras de soros de pacientes com criptococose, sendo 67,5% positivos e 32,5% falsos negativos. Como controles negativos foram testados 82 amostras de soros de indivíduos hígidos, dos quais 26,82% apresentaram resultados positivos para os testes realizados. Para testar a reatividade cruzada, foram utilizadas 10 amostras de pacientes com histoplasmose (20% de reatividade cruzada), 9 amostras de pacientes com paracoccidiodomicose (66,6% de reatividade cruzada), 9 amostras de pacientes com candidose (13,3% de reatividade cruzada) e 7 amostras de pacientes com aspergilose (14,28% de reatividade cruzada). Visando solucionar o problema da reatividade cruzada, identificamos proteínas antigênicas de *C. neoformans* var. *grubii* por eletroforese bidimensional seguida por *western blot* e espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Das 75 amostras analisadas, quatro foram identificadas: uma proteína hipotética, 2 isoformas de HSPs 70 e uma catalase-2. As proteínas identificadas apresentaram baixa similaridade com ortólogas de outros fungos patogênicos, sendo, dessa forma, possíveis alvos para a padronização do ELISA e diagnóstico da criptococose.

ABSTRACT

Key words: *Cryptococcus neoformans*, diagnosis, ELISA, MALDI-TOF.

Cryptococcosis is an invasive and potentially fatal disease. *Cryptococcus neoformans* is the etiological agent, which can affect both immunocompromised and immunocompetent individuals. *C. neoformans* var. *grubii* and *C. neoformans* var. *neoformans* are cosmopolitan and their major natural reservoir is the excrement from pigeons. With the advent of immunosuppressor therapies and the pandemic HIV infection, a significant augmentation of cryptococcosis cases in humans was observed. Nowadays cryptococcosis diagnosis is based on the clinical presentation, India ink sample preparation methods and/or *in vitro* culture isolation. In this work we had developed an ELISA to detect antibodies against *C. neoformans* var. *grubii* in serum from patients with cryptococcosis using as antigens a whole cell protein extract from a clinical cell line isolate (HC6). Sera from 40 patients with cryptococcosis were tested by ELISA. From these, 67.5% were positives and 32.5% were false-negatives. As a negative control 82 samples from health subjects were also tested, from these 26.82% were positives. To test cross-reactivity, samples from 10 patients with histoplasmosis (20% cross-reactivity), 9 from patients with paracoccidioidomycosis (66.6% cross-reactivity), 9 from patients with candidosis (13.3% cross-reactivity) and 7 from patients with aspergilosis (14.28% cross-reactivity) were tested. To solve the cross-reactivity problem, we searched immunogenic proteins which were specific to *C. neoformans* var. *grubii* applying two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE-PAGE) followed by western blot and mass spectrometry (MALDI-TOF MS). From the 75 sample analyzed, four were identified: one as a hypothetical protein, two HSPs 70 isoforms and the protein catalase 2. These proteins showed low similarity with orthologues from other pathogenic fungi, and are potential targets to further of the standardizing cryptococcosis diagnosis by ELISA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans foi identificado pela primeira vez como patógeno humano em 1894 e, por muitos anos, despertou interesse apenas em micologistas. Raramente eram observados casos clínicos de micoses causadas por este fungo. O aumento da incidência de criptococose humana ocorreu com o advento da pandemia do HIV e com o aumento da população de pacientes imunocomprometidos (IDNURM *et al.*, 2005).

C. neoformans é o agente responsável pela meningite fúngica em indivíduos imunocomprometidos. São reconhecidos cinco sorotipos (A, B, C, D e AD), baseados na antigenicidade de sua cápsula polissacarídica. A maioria dos isolados clínicos é do sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*), os quais apresentam uma distribuição mundial associada com excreta de aves e solos contaminados e geralmente causam doença em pacientes imunocomprometidos (BICANIC & HARRISON, 2004). Vários fatores de virulência foram identificados para este fungo, incluindo a sua cápsula polissacarídica, a produção de melanina pela enzima lacase, a capacidade de crescimento a 37°C e a sobrevivência no interior de macrófagos (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

As patologias causadas pelo complexo de *C. neoformans* podem acometer o sistema nervoso central, pulmões e pele de seres humanos e animais, podendo em alguns casos ser fatais. *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* têm sido isolados mundialmente e tipicamente causam doenças em pacientes imunocomprometidos (KWON-CHUNG *et al.*, 2002).

Para a outra espécie do complexo *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* a literatura descreveu a infecção causada em indivíduos imunocompetentes e a restringiu a áreas subtropicais e tropicais (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984; SORREL, 2001). Após o surto de criptococose causada por *C. gattii* na Ilha de Vancouver, a qual apresenta um clima temperado, estudos epidemiológicos têm sido realizados (KIDD *et al.*, 2004).

1.1.1 Cápsula polissacarídica

As cápsulas polissacarídicas são fatores extracelulares essenciais na virulência de bactérias e fungos. As cápsulas dos microrganismos apresentam muitas propriedades biológicas que servem como proteção contra ataques por bacteriófagos e contra a dessecação, fonte de reserva de energia de carbono e também para adesão da célula a vários substratos (WILKINSON, 1958). A cápsula de *C. neoformans* é composta de dois polissacarídeos, glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) (McFADDEM *et al.*, 2006).

Segundo Lupo e colaboradores (2008) a cápsula inibe a maturação das células dendríticas e a expressão de moléculas envolvidas na resposta imunológica, como receptores de superfície, citocinas, IL-2, IL 12, IL1 α , IL 1 β , IL 6, IL 10, TNF α , proteínas de membrana, genes envolvidos no processamento e apresentação de antígenos, bem como no ciclo celular e apoptose. A cápsula polissacarídica de *C. neoformans* apresenta função semelhante às cápsulas observadas em bactérias. Vecchiarelli *et al.* (1996) também verificaram a inibição da maturação de células dendríticas por *C. neoformans* capsulada, quando comparado com as formas acapsuladas.

Nos fungos patogênicos, a principal função desempenhada pela cápsula está na proteção contra a fagocitose, no entanto, o organismo tem um gasto de energia para a construção e manutenção da mesma. Entretanto, pouco se sabe sobre a arquitetura molecular da cápsula (GATES *et al.*, 2004).

Sabe-se que a susceptibilidade à fagocitose é influenciada pelo tamanho da cápsula. *Cryptococcus* spp. cultivado em meios que propiciam a produção de cápsula são mais resistentes à fagocitose do que os cultivados em meios que não propiciam a formação da mesma (GRANGER *et al.*, 1985; NETSKI & KOSEL, 2002; ZAROGOZA *et al.*, 2003) sendo a cápsula essencial para a virulência. Mutantes acapsulados demonstraram-se avirulentos (BULMER *e. al.*, 1967; KOZEL & CAZIN, 1971; KWONG-CHUNG & RHODES, 1986), e também foram facilmente digeridos por neutrófilos e macrófagos, enquanto os capsulares foram resistentes à fagocitose. *C. neoformans* encapsulados demonstraram-se capazes de modular a expressão de moléculas como TGF- β 3 (inibidor de proliferação celular) e Ifn α 2 (subunidade do IFN α/β) (LUPO *et al.*, 2008).

A Figura 1A apresenta *Cryptococcus* corado com tinta da Índia. A cápsula não permite a penetração da tinta para o interior da célula fúngica, assim observa-se o contraste entre o meio externo que se encontra impregnado de tinta da Índia e a delimitação realizada pela cápsula polissacarídica. A célula apresenta-se com densidades distintas em sua estrutura, a qual nos permite diferenciar a cápsula polissacarídica do restante da célula.

A GXM é um polissacarídeo constituinte primário da cápsula de *Cryptococcus* spp., a qual apresenta alta massa molecular (BHATTACHARJEE *et al.*, 1984; CHERNIAK *et al.*, 1998). A cápsula é composta por 88% de GXM e 10% GalXM. Dados analisados de isolados ambientais demonstram a função de proteção contra a desidratação da célula fúngica no meio ambiente (VARTIVARIAN *et al.*, 1993; GRANGER *et al.*, 1985; McFADDEN *et al.*, 2006). A GXM é composta de uma hexose, ácido glucurônico, um grupo 0-acetil e açúcar manose, porém a síntese da cápsula interfere na antigenicidade e na patogenicidade de *C. neoformans*, alterando assim a expressão de epítomos imunologicamente relevantes (McFADDEN *et al.*, 2007).

A família de genes CAP (CAP10, CAP59 e CAP64) e CAS (CAS1 e CAS2) controlam a biossíntese da cápsula e apresentam a capacidade de elaborar uma complexa e variável cápsula para *C. neoformans* (BOSE *et al.*, 2003). Já foram identificados mais de 70 genes envolvidos na biossíntese da cápsula polissacarídica. A deleção destes genes e a análise dos fenótipos têm remetido para a correlação da cápsula com a virulência (MOYRAND *et al.*, 2007). Os fatores que induzem a síntese são: soro sanguíneo, limitações de ferro, níveis de CO₂ e contato com macrófagos (BOSE *et al.*, 2003, McFADDEN & CASADEVALL, 2001). A célula fúngica pode permanecer por um longo período em latência no interior de um macrófago. Isso é possível devido à viabilidade proporcionada pela cápsula (IDNURM *et al.*, 2005).

Em trabalhos que avaliam a composição das vesículas extracelulares secretadas por *C. neoformans*, verificou-se a presença de GXM, juntamente com outras moléculas como lacase, urease, fosfatase, HSPs, várias proteínas antioxidantes, sugerindo que estas vesículas auxiliam na virulência (RODRIGUES *et al.*, 2008).

1.1.2 Melanina

A melanina é um pigmento de cor marrom, a qual desempenha a função de proteção contra raios ultravioletas e outras agressões do meio ambiente (NOSANCHUK *et al.*, 1999). Durante o desenvolvimento da criptococose, a melanina pode ser formada pela oxidação das catecolaminas, encontradas no cérebro, protegendo o fungo de radicais livres que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro (NOSANCHUK *et al.*, 2000; CASADEVALL *et al.*, 2000; ZHU & WILLIAMSON, 2004). A figura 1B apresenta diferenças fenotípicas entre colônias de *Candida*, as quais não produzem a melanina na presença de substâncias difenólicas e por este motivo apresentam-se na coloração branca, enquanto que as colônias de *C. neoformans* apresentam-se na coloração em tons marrons pela formação da melanina na presença destas substâncias. Dessa forma a produção de melanina é amplamente utilizada para a identificação de *Cryptococcus* spp.

No trabalho realizado por Pedroso e colaboradores (2007), foram testadas quatro espécies de *Cryptococcus* com o objetivo de verificar a melanização. As espécies testadas foram: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus uniguttulatus*, como controle positivo foi utilizado *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 e como controle negativo *Candida albicans* ATCC 64548, em quatro diferentes meios: ágar batata e cenoura, ágar alpiste, ágar semente de girassol e ágar L-dopa. Cinquenta por cento das linhagens de *C. neoformans* testadas apresentaram coloração 24 horas após incubação e após 5 dias foi possível verificar coloração das demais. Nas linhagens de *C. albidus* e *C. laurentii* a coloração foi observada somente após 8 dias de incubação e com menor intensidade que a observada em *C. neoformans*. *Cryptococcus uniguttulatus* apresentou coloração de cor ocre apenas no meio ágar batata e cenoura.

Acreditava-se que *C. neoformans* apresentasse apenas uma única enzima lacase, Lac1, a qual é necessária para a produção da melanina, dessa forma contribuindo para a virulência. Estudos de microarranjos têm confirmado a presença de um segundo gene no genoma para lacase (Lac2) (ZHU & WILLIAMSON, 2004). O gene LAC2 é adjacente a LAC1, Lac2 contribui para a polimerização das moléculas difenólicas para a formação da melanina, mas em menor extensão que a Lac1 (ZHU & WILLIAMSON, 2004). MANDAL *et al.* (2005) isolaram *C. neoformans* albinos e melanizados (co-infecção) de pacientes com meningite fúngica. Os isolados foram inoculados em camundongos

A/Jcr, e a linhagem de *C. neoformans* que produzia melaniana, apresentou-se mais virulenta que a linhagem albina. Estes dados fortaleceram estudos prévios, que demonstravam a produção de melanina como um fator de proteção de *C. neoformans* durante a infecção.

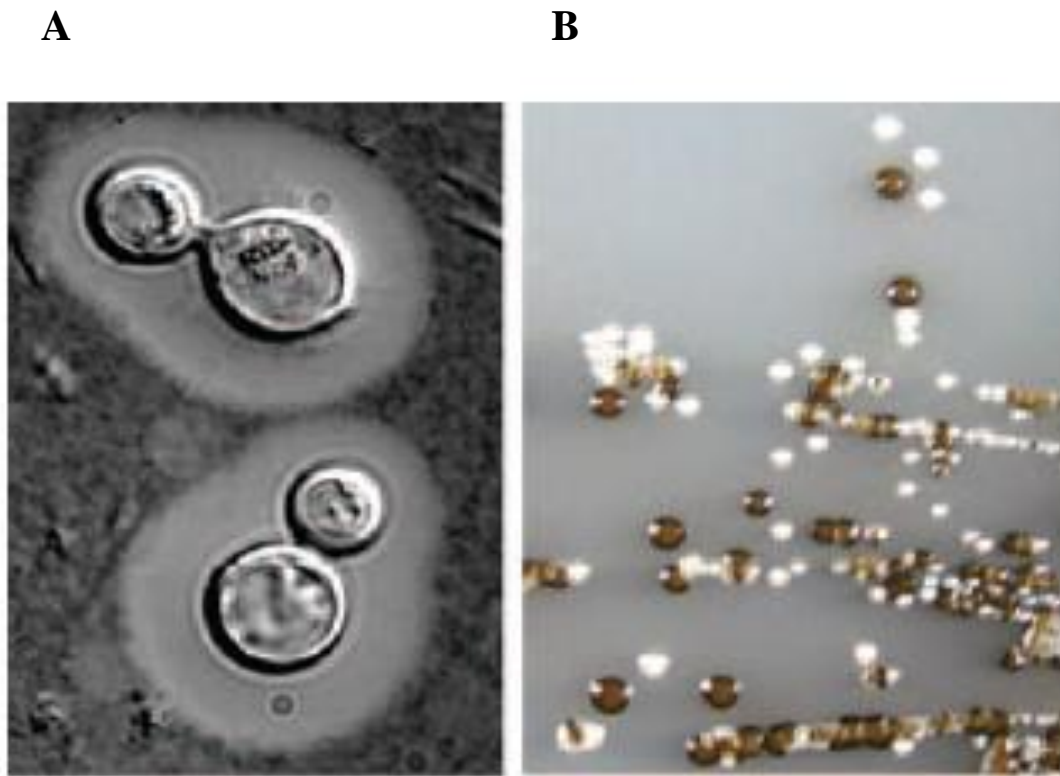


Figura 1: Características que permitem diferenciar *Cryptococcus neoformans* de outros fungos. (A) A cápsula polissacarídica impede a internalização da tinta da Índia, permitindo identificar as células fúngicas. Devido às diferenças de densidades nas estruturas celulares de *Cryptococcus* spp. é possível distinguir a cápsula do restante da célula. (B) Os fungos produzem melanina na presença de moléculas difenólicas (L-DOPA, por exemplo), produzindo colônias marrons. É observada a diferença de colônias do complexo *Cryptococcus* em contraste com as colônias de *Candida albicans* que se apresentam brancas (IDNURM *et al.*, 2005).

1.1.3 Crescimento a 37°C

O crescimento de *C. neoformans* é observado em temperaturas entre 25 a 37°C e devido a esta característica, este torna-se capaz de causar infecções em seres humanos (ALSPAUGH *et al.*, 2000).

1.2 Ciclo de infecção de *C. neoformans*

A infecção por *C. neoformans* (Figura 2) ocorre pela inalação de pequenas leveduras ou basidiósporos. A infecção primária pulmonar frequentemente é assintomática, podendo ser erradicada ou levar ao desenvolvimento de granuloma. O desenvolvimento da doença dependerá de fatores do hospedeiro, grau de infecção e da virulência do microrganismo. O fungo pode disseminar-se em seguida à infecção ou após o período de latência, com capacidade de atingir outros sítios extrapulmonares e apresentando um tropismo positivo para o sistema nervoso central (BICANIC & HARRISON, 2005). A meningite é a manifestação mais freqüente da criptococose. Os principais sinais clínicos são: dor de cabeça, febre e alterações mentais (BICANIC & HARRISON, 2005).

C. neoformans é um patógeno intra e extracelular, o qual, dependendo das condições celulares, apresenta capacidade de sobrevivência e/ou multiplicação no interior de macrófagos (LEVITZ *et al.*, 1999).

GARCIA-HERMOSO *et al.* (1999), sugerem a possível infecção latente ocasionada por *Cryptococcus* sp. Este trabalho dá suporte à hipótese de que o fungo pode manifestar-se somente no momento em que o organismo do hospedeiro encontra-se imunocomprometido. Estes dados tornam-se importantes para o desenvolvimento de atividades profiláticas, principalmente em grupos de alto risco.

Animais responsáveis pela dispersão

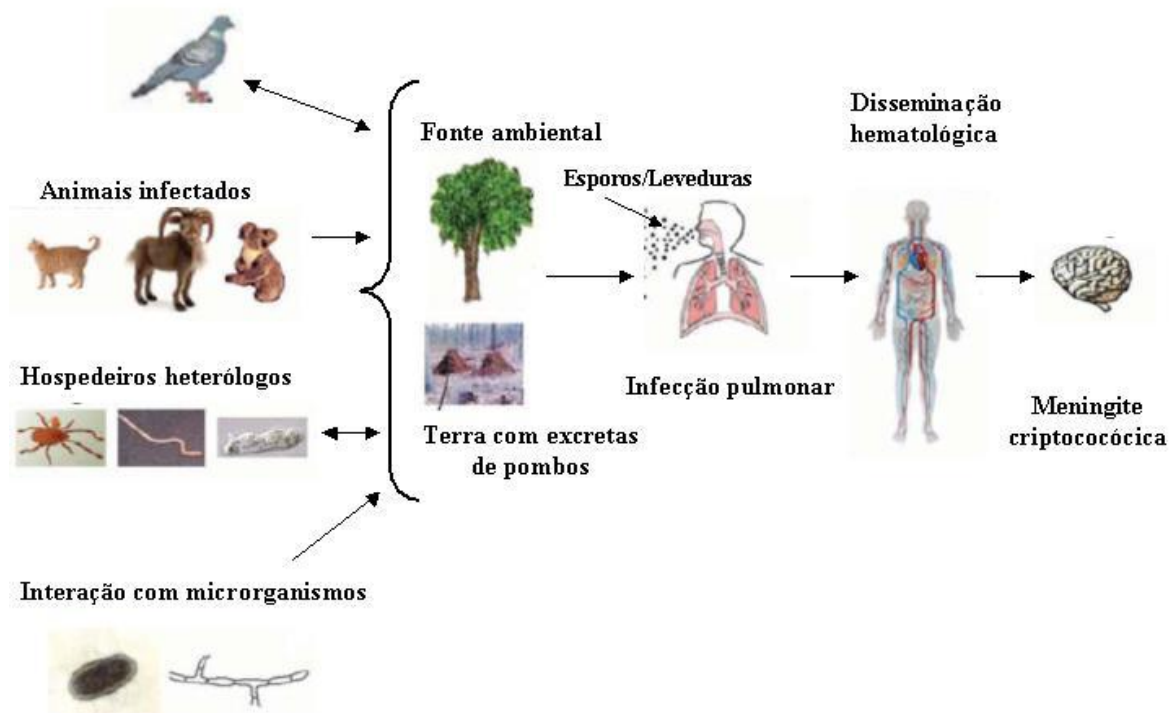


Figura 2: Ciclo de infecção do *Cryptococcus* spp. O fungo sobrevive no ambiente, no solo e em árvores. Os pássaros, em especial os pombos, podem ser os responsáveis pela distribuição global do fungo. O fungo infecta vários animais: gatos, cachorros, coalas, cabras entre outros. Este fungo também pode coexistir no meio ambiente com predadores, assim como aranhas, vermes, amebas e pode ainda estabelecer relação com outros microrganismos, como bactérias e outros fungos. Em humanos, o fungo se estabelece nos pulmões por meio da inalação de esporos ou células leveduriformes dessecadas, presentes no meio ambiente. Quando o indivíduo torna-se imunocomprometido, o fungo pode sair da forma latente ou dormente (o qual este pode se encontrar) e invadir o sistema nervoso central (SNC). A infecção do SNC representa a forma mais severa de criptococose humana (Adaptado de LIN & HEITMAN, 2006).

1.3 Determinação do sorotipo

Baseado na reação de aglutinação, o complexo *Cryptococcus neoformans* está dividido em 5 sorotipos: A, B, C, D e híbrido AD. A partir de testes bioquímicos onde o fungo foi avaliado quanto à sua capacidade de crescimento em fontes de carbono, nitrogênio e glicose, à resistência a canavanina, à produção de urease e também foi avaliado quanto a sua morfologia, *C. neoformans* foi primeiramente descrito como duas variedades: var. *neoformans* (sorotipos A, D e híbrido AD) e var. *gattii* (sorotipo B e C) (LEVITZ, 1991). Recentemente a var. *gattii* foi designada como uma espécie, denominando-se *C. gattii* (KWON-CHUNG *et al.*, 2002). Com análises fenotípicas, foram observadas diferenças morfológicas e posteriormente moleculares entre os sorotipos A e D, sendo então proposta a divisão de *C. neoformans* em variedades (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A e *C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo D) (Figura 3) (FRANZOT *et al.*, 1999).

Através da identificação de seqüências polimórficas utilizando técnicas como PCR-*fingerprinting*, polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), restrição de fragmentos polimórficos (RFLP) e tipagem de seqüência multilocus (MLST) foi feita a subdivisão do complexo *Cryptococcus neoformans* em padrões moleculares (LITVINTSEVA *et al.*, 2006, MEYER *et al.*, 2003 e SORRELL *et al.*, 1996). O sorotipo A produz os seguintes padrões: VNI, VNII e VNB (VNB, somente em um isolado de Botsswana) (LITVINTSEVA *et al.*, 2006) e o híbrido AD produz padrão VNIII; sorotipo D produz padrão VNIV. Sorotipo B produz padrões: VGI, VGII e VGIII e o sorotipo D, VGIII e VGIV (MEYER *et al.*, 1999). Para *C. gattii* é impossível fazer, em alguns casos, a diferenciação entre sorotipo e a tipagem molecular (Figura 3).

Cherniak *et al.* (1998) buscaram, através de características químicas, realizar a diferenciação entre os sorotipos do complexo *Cryptococcus neoformans*. A compreensão a partir da tipagem química auxiliaria: no entendimento da relação do antígeno polissacarídico com a resposta das células T auxiliares (Th) tipo 1 e tipo 2; da relação entre a infecção oportunista aumentada e pacientes HIV-positivo; a preparação de haptenos para auxiliar o desenvolvimento de vacinas neoglicoconjugadas; a relação entre a virulência e a estrutura molecular do fungo; o monitoramento do *switching* e o desenvolvimento de novas metodologias para monitoramento epidemiológico e testes diagnósticos da criptococose.

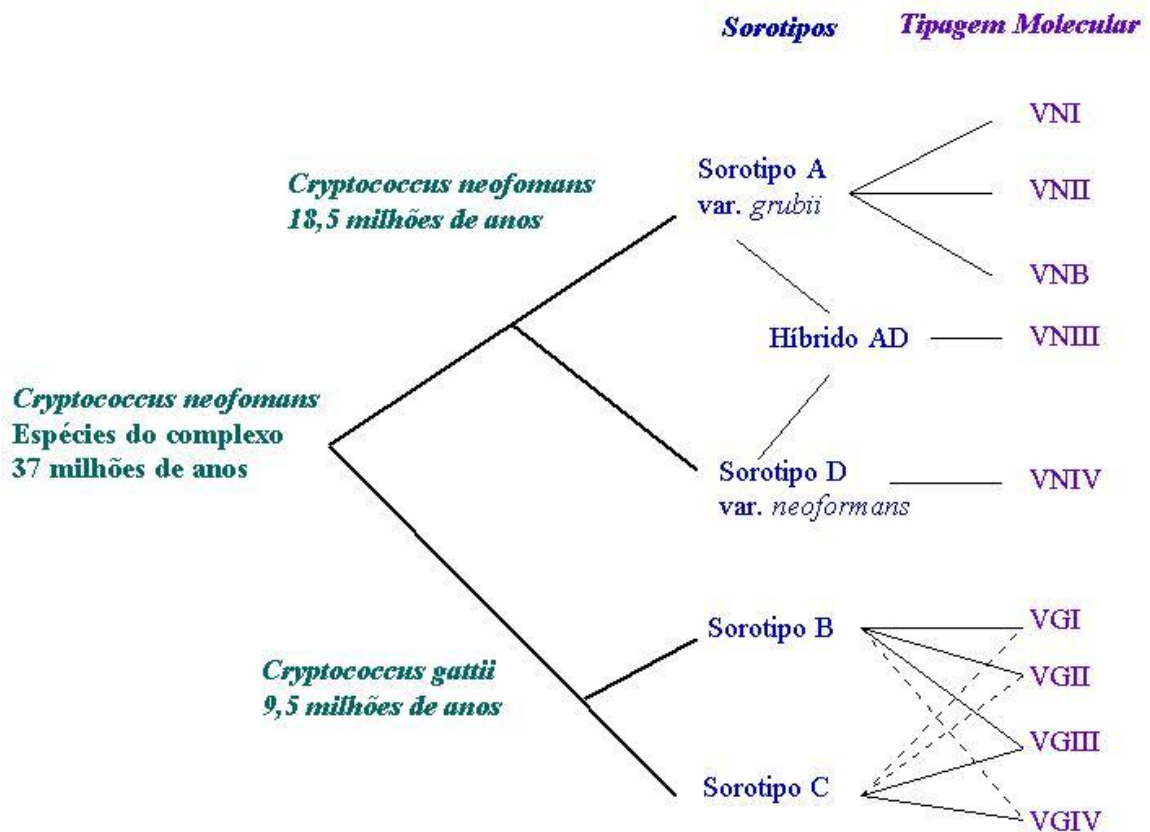


Figura 3: Evolução do complexo da espécie de *C. neoformans*. O complexo de espécies de *Cryptococcus* é composto por *C. neoformans* e *C. gattii*, que divergiram de um ancestral comum há mais de 37 e 18,5 milhões de anos, respectivamente. As duas espécies são divididas em 4 sorotipos e 9 tipos moleculares. (Adaptada de LIN & HEITMAN, 2006).

1.4 Mating-type

O locus do *mating-type* é designado como *MAT*. No genoma de *Cryptococcus* spp. este locus apresenta um tamanho aproximado de 100 kb e contém menos de 20 genes, entre os quais estão os que codificam feromônios, receptores de feromônios, fatores de transcrição e MAPKs, as quais também são encontradas nas cascatas de sinalização (IDNURM *et al.*, 2005).

Cryptococcus spp. apresentam somente um locus de *MAT*, ocorrendo em duas formas idiomórficas, correspondendo a dois *mating-type* opostos (**a** e **α**). O *mating-type* pode ser analisado por testes moleculares. O PCR de *mating-type* é utilizado para confirmação de auto-filamentação, de linhagens estéreis e de isolados diplóides ou aneuplóides (LIN & HEITMAN, 2006).

1.5 Antígenos protéicos de *C. neoformans*

A literatura apresenta poucos dados sobre antígenos protéicos de *C. neoformans*. Os principais biomarcadores atualmente utilizados são as manoproteínas e o polissacarídeo GXM presentes na cápsula do fungo.

Chai & Tay (2009) investigaram potenciais biomarcadores protéicos de *C. neoformans* utilizando soro de pacientes com criptococose e de indivíduos hígidos. Várias proteínas antigênicas foram reconhecidas por anticorpos presentes nas amostras. A proteína de 53 kDa foi verificada nas duas populações estudadas, bem como o reconhecimento por IgG e IgM. Neste estudo também foram identificados 21 proteínas antigênicas de *C. neoformans*, as quais apresentavam massa molecular entre 27,5 kDa e 94 kDa. Goldman e colaboradores (2001) identificaram em soro de indivíduos com idade superior a dois anos bem como em pacientes com criptococose HIV positivo e HIV negativo anticorpos contra proteínas de 98, 106, 111, 116 e 139 kDa . Em amostras de soros de crianças com idade inferior a dois anos, foi observada ausência de marcação. Para estas proteínas, estes dados indicam que a marcação ocorre somente após a exposição ao fungo, ou seja, estes podem vir a ser utilizados como biomarcadores para *C. neoformans*. No trabalho de Hamilton e colaboradores (1997), foram identificados por *Western blot* nas amostras de soros de pacientes infectados por *C. neoformans* anticorpos para proteínas de 26, 52, 74 e 110 kDa.

Trabalhos como os citados anteriormente vêm sendo realizados com foco na identificação de proteínas imunogênicas na infecção por *C. neoformans*. As proteínas observadas em cada um dos trabalhos são semelhantes, o que podemos inferir que se trata das mesmas proteínas, porém interpretados de formas diferentes, pois devemos considerar os seguintes fatores: diferenças nas técnicas, a diferença do sistema imune de cada indivíduo (isso pode ser observado em indivíduos infectados com o mesmo pool protéico), diferentes formas de exposição ao microrganismo e as diferenças entre os próprios *C. neoformans* de cada região. Outro dado interessante é a presença de anticorpos em amostras de pessoas sem manifestações clínicas. Esse dado nos remete à hipótese de uma prévia sensibilização dos indivíduos.

Uma proteína de 77 kDa (KAKEIA *et al.*, 1997), pertencente à família das HSP70, apresentou-se como uma proteína imunodominante em camundongos infectados por *C. neoformans*. Estudos têm demonstrado que as proteínas pertencentes à família das HSPs (*heat shock proteins*) incluindo as HSP70 apresentam-se como proteínas antigênicas em muitos microrganismos, e estas são alvos do sistema imune celular bem como do humoral (KAKEIA *et al.*, 1999). Os anticorpos que reconhecem as HSPs têm demonstrado uma importante função contra a infecção causada pelos microrganismos.

1.6 Resposta do sistema imunológico humano a *C. neoformans*

Experimentos com modelos animais têm permitido um melhor entendimento da resposta do sistema imune de seres humanos às infecções por *Cryptococcus* spp. Assim como nas infecções causadas por bactérias e outros fungos, a proteção está associada com processos inflamatórios granulomatosos, células CD4 e CD8 e padrões de reconhecimento de linfócitos Th1. Pesquisas com os receptores *Toll-like* das células de camundongos estão sendo realizadas para uma melhor compreensão em relação à resposta do sistema imune inato (YAUCH *et al.*, 2004).

Vários trabalhos têm sugerido o contato da população humana com *Cryptococcus* spp. durante a vida, podendo iniciar na infância (SCHOP, 2007). Devido a poucos relatos de casos de infecções de pessoas imunocompetentes, podemos inferir que o sistema imune pode eliminar, não por completo, mas prevenir com êxito o aparecimento da doença. Infecções em humanos em estágios mais avançados da vida podem ser devido à reativação de infecções latentes ou re-infecções pelo fungo, os quais levam ao desenvolvimento crônico da doença.

As manoproteínas, localizadas na cápsula polissacarídica são altamente imunogênicas e provocam uma reação de hipersensibilidade tardia (DHT), levando ao desenvolvimento de uma imunidade protetora em camundongos (MANDEL *et al.*, 2000; PIETRELLA *et al.*, 2002; MANSOUR *et al.*, 2002). O envolvimento de linfócitos T e o aumento da secreção de citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-2 (MANSOUR *et al.*, 2004) e IL-12 (PITZURRA *et al.*, 2000) estão associados com alguns determinantes antigênicos das manoproteínas, como MP98, MP88, MP84 e MP115 (LEVITZ *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2002; BIONDO *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a cápsula polissacarídica de *C. neoformans* promove a secreção de IL-10 e outras citocinas de tipo Th2, levando à diminuição da secreção de citocinas de tipo Th1 (VECCHIARELLI *et al.*, 1996). Desta forma, as manoproteínas apresentam-se como candidatas para o desenvolvimento de vacinas para o tratamento ou prevenção da criptococose (SCHOP, 2007).

1.6.1 Sistema de complemento

O sistema de complemento consiste de uma série de proteínas que estão envolvidas na resposta imune não-específica do hospedeiro. As proteínas do complemento podem ser rapidamente ativadas visando à proteção do hospedeiro via múltiplos mecanismos, incluindo a opsonização, a qual promove a fagocitose do antígeno, a lise de células infectadas e a ativação da resposta inflamatória. A ativação do sistema de complemento pode se dar por três rotas. A via clássica, ativada pela formação do complexo antígeno-anticorpo, que requer anticorpos específicos. A via alternativa, a qual inclui a ligação de proteínas do complemento como C3b na superfície das células infectadas para promover a lise e não requer anticorpos específicos. A via das lectinas, a qual requer a ligação das lectinas (proteínas que se ligam especificamente a carboidratos) nos resíduos de manose das células estranhas, assim como a via alternativa, esta não requer anticorpos específicos (SCHOP, 2007).

O nível de ativação da cascata de complemento depende da integridade dos antígenos de superfície do fungo e também dos anticorpos presentes no soro do hospedeiro (KOZEL, 1993). A cápsula bloqueia o acesso dos anticorpos às glicanas presentes em *C. neoformans* (KELLER *et al.*, 1994). Estudos recentes têm demonstrado que o componente 3 do complemento (C3), quando depositado no interior da cápsula

polissacarídica, dificulta a fagocitose, já quando o mesmo é depositado na parte externa, o processo é auxiliado (ZARAGOZA *et al.*, 2003).

1.6.2 Imunidade celular

Na infecção por *C. neoformans* a fagocitose parece ser a primeira alternativa de defesa do hospedeiro (MILLER & MITCHELL, 1991). Várias células contribuem para esse processo. Leucócitos polimorfonucleares, também conhecidos como neutrófilos, são efetivos na fagocitose do fungo nos estágios iniciais das infecções e também nas infecções crônicas.

Na ação contra a criptococose em seres humanos e camundongos foi possível verificar as similaridades e diferenças nos mecanismos de ação entre células NK (*natural killer*) (MARR *et al.*, 2006). Durante a infecção por *Cryptococcus* spp., as células NK desempenham funções diferenciadas entre seres humanos e camundongos, podendo variar a sua distribuição no corpo, a interação com citocinas e ainda a expressão de receptores que interagem com uma variedade de outras moléculas efetoras (MARR *et al.*, 2006; SALKOWISKI *et al.*, 1991). Porém, os macrófagos são as principais células responsáveis pela fagocitose durante a infecção por *C. neoformans*. Os macrófagos são capazes de realizar a fagocitose pelo reconhecimento da região Fc dos anticorpos e/ou ainda proteínas do complemento como a C3 (KOZEL *et al.*, 1989).

Durante a resposta imune, macrófagos e neutrófilos produzem uma variedade de substâncias não-oxidativas e oxidativas intermediárias que são capazes de levar à morte de *C. neoformans* (GANZ *et al.*, 1985; DIAMOND *et al.*, 1972; HIEMSTRA *et al.*, 1993). Os neutrófilos humanos produzem peróxido de hidrogênio, o qual, em uma quantidade adequada, é letal para *C. neoformans* (DIAMOND *et al.*, 1972). Embora sejam produzidas muitas moléculas antifúngicas no momento da fagocitose, muitos estudos têm demonstrado que, dependendo do estímulo, somente a ação do macrófago é suficiente para a fagocitose do fungo (BRUMMER *et al.*, 1994). Também tem sido demonstrado que as citocinas GM-CSF, neutrófilos e TNF- α , aumentam a fagocitose mediada por complemento em camundongos (COLLINS & BANCROFT, 1992). Na ausência de citocinas, uma ou duas células de *C. neoformans* são ingeridas por macrófago. Quando o macrófago é estimulado por citocinas, esse número aumenta para seis a oito células fúngicas (COLLINS & BANCROFT, 1992). Além do amplo repertório de moléculas expressas durante a infecção, outra característica importante é a

capacidade de sobrevivência do fungo no interior de macrófagos (DIAMOND *et al.*, 1972; FELDMESSER *et al.*, 2000; FELDMESSER *et al.*, 2001).

1.6.3 Imunidade humoral

A resposta imune inata por meio da fagocitose realizada pelos macrófagos é a primeira resposta e leva à morte uma parcela de células de *C. neoformans*. Porém, inicia-se também uma resposta humoral a partir da estimulação de linfócitos B e T. Muitos estudos vêm demonstrando a produção de anticorpos contra os antígenos polissacarídicos da cápsula de *C. neoformans*. Nem todos os antígenos levam ao desenvolvimento de anticorpos protetores. A eficiência da resposta mediada por anticorpos tem sido determinada por meio de análise utilizando anticorpos monoclonais (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD), e a utilização de epítomos específicos tem demonstrado a afinidade por diferentes linhagens de *C. neoformans*. A imunidade celular e a imunidade humoral estão relacionadas com o polissacarídeo capsular GXM e as manoproteínas, sobre as quais atualmente tem-se maior conhecimento (SCHOP, 2007).

As evidências sugerem que para uma resposta imune humoral eficiente é necessário uma resposta apropriada da imunidade celular e da resposta imune por citocinas. Nas pesquisas envolvendo a criptococose, tem-se aceitado que a cápsula polissacarídica, independente de anticorpos, induz a ativação dos linfócitos T. A inativação de células T e a falta de citocinas Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-12) podem interferir na produção de anticorpos “protetores” (SCHOP, 2007). Também é possível observar a “paralisia imunológica” ou ainda a presença de anticorpos não responsivos (KOZEL *et al.*, 1977; WILLIAMSON *et al.*, 1993). Camundongos que receberam entre 100-400 μ g de GXM demonstraram uma redução na produção de anticorpos. Esse fenômeno recebe o nome de imunomodulação. Isso ocorre quando a concentração de antígenos é grande, fazendo com que o sistema imune interprete como “antígeno próprio” (KOZEL *et al.*, 1977).

1.7 Epidemiologia

A incidência da criptococose nos EUA antes da epidemia por HIV era menor que um caso a cada milhão de indivíduos/ano. A partir da década de 80, esta tornou-se uma doença emergente como uma infecção oportunista em pacientes infectados pelo HIV, ocorrendo entre 5-10% dos pacientes com AIDS nos EUA, Europa e Austrália (MIRZA *et al.*, 2003).

No trabalho de Mirza e colaboradores (2003) verificou-se que o uso de fluconazol e o advento de terapias antiretrovirais (HAART), em meados da década de 90, possibilitaram um decréscimo significativo da criptococose. Em 1993, em Atlanta (EUA), foram registrados 66 casos de criptococose em 1.000 portadores do HIV. Já em 2000, foram registrados apenas 7 casos de criptococose para cada 1.000 portadores do HIV. Neste estudo foram detectados 1.491 casos de criptococose, sendo que 1.322 (89%) eram HIV positivo.

A criptococose parece ser mais comum em pacientes infectados pelo HIV no sul da Ásia e da África do que em indivíduos europeus e norte-americanos. Dezenove por cento dos indivíduos HIV positivos da Tailândia apresentaram a doença entre 1994 e 1998 (CHARIYALERTSAK *et al.*, 2001). Em Uganda, essa estimativa foi de aproximadamente 10,3% dos pacientes imunocomprometidos (FRENCH *et al.*, 2002). Na África do Sul, a associação entre meningite causada por *Cryptococcus* spp. e pacientes infectados por HIV chega a 20-45%, ficando na frente de doenças como tuberculose e meningite bacteriana (GORDON *et al.*, 2000).

Lindenberg *et al.* (2008) verificaram o perfil clínico-epidemiológico de 123 casos de criptococose diagnosticados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, no período de janeiro de 1995 até dezembro de 2005. Destes, 84,5% apresentaram associação com HIV, 4,9% tinham outras condições predisponentes e 10,6% eram imunocompetentes. Predominou a ocorrência no sexo masculino (68,3%) e a média de idade foi de 35,9 anos. O envolvimento do sistema nervoso central ocorreu em 83,7% dos pacientes e os sintomas mais frequentes foram cefaléia e vômito. Em 77 casos foi possível identificar a espécie do agente, sendo 89,6% *C. neoformans* e 10,4% *C. gattii*. Os dados deste trabalho chamam a atenção à taxa desta micose observada em imunocompetentes e aos cinco casos de pacientes HIV positivos infectados por *C. gattii* (6,5% dos 10,4% casos).

O trabalho realizado pelo nosso grupo apresenta dados epidemiológicos de casos de criptococose no Rio Grande do Sul (LEAL, *et. al.*, 2008a). Foram 126 casos de pacientes relatados entre 2000 e 2005 no Laboratório Central de Saúde Pública (IPB-LACEN/RS). A maioria dos pacientes era do sexo masculino (77,12%), caucasianos (83,5%) e 95% dos pacientes eram HIV positivo. A prevalência de *C. neoformans* var. *grubii* (Sorotipo A) foi de 95,42%, enquanto *C. gattii* (Sorotipo B) foi representado em 4,58% dos casos. *C. neoformans* var. *neoformans* não foi encontrado nesta pesquisa.

1.7.1 Epidemiologia molecular

Estudos epidemiológicos são essenciais para o entendimento da biologia deste fungo, auxiliando assim no desenvolvimento de terapias contra esta infecção. Vários métodos moleculares, como cariótipo, PCR *fingerprinting*, RAPD e AFLP, estão sendo utilizados para a análise epidemiológica de isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans*.

Isolados de Botswana e Maláui foram sorotipados com *Crypto Check kit* (Iatron, Japão), confirmados por PCR específico para cada sorotipo e analisados por AFLP (LITVINTSEVA *et al.*, 2005). Das 161 amostras de Botswana, 86,3% eram do sorotipo A e 13,7% do sorotipo C. Das 15 amostras analisadas de Maláui, 80% foram referentes ao sorotipo A, 13,3% sorotipo C e 6,7% sorotipo híbrido AD. Nenhuma amostra apresentou-se como sorotipo B ou D. Dos 24 isolados como sorotipo C (*C. gattii*), 23 amostras confirmaram o resultado em meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol agar), modificando a cor do meio, de verde-amarelado para azul-escuro. Estes dados foram considerados como um fenômeno, pois todas as amostras analisadas eram provenientes de pacientes com AIDS (a literatura de forma geral, relata *C. gattii* a indivíduos imunocompetentes) e também demonstra que *C. gattii* sorotipo C é claramente mais abundante na África. No meio ambiente, *C. gattii* sorotipo B está associado com uma grande variedade de árvores, particularmente com espécies de *Eucalyptus* e outras espécies, incluindo *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. sideroxylon*, as quais são encontradas em Botswana (LITVINTSEVA *et. al.*, 2005).

Quarenta e sete isolados clínicos de *C. neoformans* de várias regiões do Estado de São Paulo foram analisados quanto aos sorotipos, *mating-type* por PCR, RAPD e AFLP (MATSUMOTO *et. al.*, 2007). Todos os isolados foram obtidos de pacientes HIV positivos e identificados como sorotipo A e MAT α . Quarenta e cinco amostras

pertenciam ao tipo molecular VNI e apenas dois foram VNII quando analisados por PCR-*fingerprint* e PCR-RFLP (PLB1 e URA-5). Estes dados forneceram novas informações sobre a epidemiologia molecular de *C. neoformans* na região sudeste do Brasil.

Franzot *et al.* (1997) analisaram 51 isolados de *C. neoformans* (das cidades do Rio de Janeiro e Belo Horizonte - Brasil) para verificar os padrões dos mesmos. Foram utilizadas técnicas de assimilação de carbono, cariótipo por eletroforese em campo pulsado, RFLPs e CNRE-1. Foram comparados os resultados obtidos utilizando as mesmas técnicas moleculares dos isolados da cidade de Nova Iorque (EUA). Os resultados demonstraram que a epidemiologia molecular de *C. neoformans* devido às diferenças geográficas pode resultar em seleção natural devido ao ambiente e as condições climáticas de cada local. Os resultados também sugerem que pode haver a distribuição global de algumas linhagens de *C. neoformans*, as quais são freqüentemente encontradas em todos os continentes e estão associadas com excretas de pombos, sugerindo que estes podem ser os responsáveis pela dispersão global do fungo.

Barreto de Oliveira *et al.* (2004) avaliaram 58 isolados (31 isolados clínicos e 27 isolados ambientais) brasileiros dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Piauí e Rio Grande do Norte, por sorotipagem (Crypto Check Kit, Iatron, Tokyo, Japan), PCR espécie-específico e *mating-type*. Observou-se uma diversidade genotípica nas linhagens brasileiras de *C. neoformans*. A maioria das amostras foi α A (65%), seguida por α B (17,5%), α D (9%), híbrido α AD (5%) e α C (3,5%).

Em trabalho realizado pelo nosso grupo (CASALI *et al.*, 2003) foram analisados 105 isolados clínicos e 19 ambientais (de excreta de pombos e de *Eucalyptus* spp.) de *C. neoformans* provenientes do nosso estado. Os isolados foram caracterizados conforme as análises bioquímicas, sorológicas, morfológicas e moleculares. Foram identificados 89,5% dos isolados clínicos e 52,6% dos isolados ambientais como *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A e padrão molecular VNI. O *Mating-type* α foi identificado em 98,1% dos isolados clínicos e 94,7% dos isolados ambientais. O teste de fosfolipase foi positivo em 94,3% e 73,7%, respectivamente. Estes dados permitiram ampliar o conhecimento sobre a ecologia, biologia molecular e epidemiologia de *C. neoformans* no sul do Brasil.

A linhagem utilizada para a realização desta dissertação de mestrado foi isolada e descrita por CASALI *et al.* (2003). *C. neoformans* var. *grubii* HC6 é um isolado clínico

proveniente do Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN). Esta linhagem foi isolada do líquido cefalorraquidiano de um paciente HIV positivo e pertence ao sorotipo A, *mating-type* α e tipagem molecular VNI.

O estudo realizado por Soares *et al.* (2005), na cidade de Santos (São Paulo-Brasil), apresentou a análise de 116 amostras ambientais, sendo 79 amostras de fezes de pombos e 37 amostras do ar atmosférico de regiões com acúmulo de fezes. Foram isoladas as seguintes espécies das excretas: *C. neoformans* var. *grubii* 13,9%, *C. laurentii* (8,9%) e *C. albidus* (12,6%). Todas as amostras isoladas de *C. neoformans* foram sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*).

Os dados evidenciados nesta seção referenciam que mesmo com vários estudos sobre a epidemiologia de *Cryptococcus* spp, ainda não há um embasamento único sobre o habitat e os hospedeiros definitivos desse fungo. A identificação deste microrganismo no âmbito clínico é uma peça fundamental para o tratamento correto da infecção.

1.8 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da criptococose está baseado em três fundamentos: a demonstração do fungo no material clínico com isolamento em cultura, por meio de cortes histológicos que permitem a visualização do fungo por microscopia e a detecção sorológica através da pesquisa de antígenos circulantes (LA) (BICANIC *et. al.*, 2005).

Após uma colheita adequada do material clínico (líquor, escarro, lavado brônquico-alveolar, biópsia, etc.), este deve ser processado de imediato para demonstração de estruturas fúngicas características de *C. neoformans*. Várias podem ser as técnicas utilizadas para pesquisa da estrutura fúngica, tais como lâmina-lamínula com nigrosina (tinta da Índia ou nanquim), esfregaços, *imprints* ou ainda cortes histopatológicos corados com corantes inespecíficos como a coloração ácido de periódico-Schiff (PAS), hematoxilina-eosina (HE), Gomori-Grocott, ou ainda, corado pelo mucicarmim, o qual cora a cápsula de *Cryptococcus* spp., facilitando assim sua diferenciação de outras leveduras não capsuladas (SIDRIM & MOREIRA, 1999). O meio contendo componentes difenólicos permite diferenciar *C. neoformans* dos demais fungos, já o meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) permite diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii* (BICANIC *et. al.*, 2005). Como a grande maioria do material que chega ao laboratório de micologia para pesquisa de *Cryptococcus* spp. é de fluído (líquor, escarro, etc), o processamento mais utilizado é a homogeneização de uma gota

do material com uma gota de nigrosina e preparado para a microscopia, entre lâmina e lamínula, onde serão observadas estruturas blastoconidiadas, com 4-8 µm de diâmetro, capsuladas, redondas ou ovaladas, sugerindo tratar-se, respectivamente de *C. neoformans* ou *C. gattii* (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Atualmente é utilizada para diagnóstico da criptococose a aglutinação por látex (WHEAT, 2006). É um método rápido e apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 90%. O antígeno pode ser detectado no soro, em lavado brônquico, líquido cefalorraquidiano e outros fluídos corporais. A maioria dos estudos demonstrou uma especificidade de 95%, apresentando em alguns casos falso-positivo (reatividade cruzada) causado por fator reumatóide, anticorpos idiopáticos, defeitos dos kits ou infecções por outros organismos como *Trichosporon asahii* e *Capnocytophaga canimorsus*.

Os testes sorológicos podem auxiliar num diagnóstico rápido da infecção fúngica causada por *Cryptococcus*. Essa ferramenta permitiria com maior rapidez o início do tratamento (REPENTIGNI, 1989). Nos últimos anos, têm se observado o aperfeiçoamento de métodos para o sorodiagnóstico da criptococose, sendo a identificação de antígenos um passo importante para este fim (DIAMOND & BENNETT, 1973; GORDON & VEDDER, 1996).

Para o monitoramento do curso da doença e resposta ao tratamento, atualmente utiliza-se o teste de LA, o qual permite a titulação de antígenos circulantes no paciente (DUPONT *et al.*, 1992, TEMSTET *et al.*, 1992). A técnica de ELISA tem sido descrita para a detecção de anticorpos (CASADEVALL *et al.*, 1992, MUKJERJEE & CASADEVALL, 1995), pois apresenta como vantagem ao látex, o seu poder discriminatório entre os resultados positivos e negativos e a sua alta sensibilidade (DUPONT *et al.*, 1992).

Devido à relativa complexidade de obtenção de anticorpos monoclonais, o *Crypto Check kit* (Iatron, Japão) não é o melhor método disponível para a diferenciação entre as espécies de *Cryptococcus* (ENACHE-ANGOULVANT *et al.*, 2007). Por esse motivo, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam a diferenciação quanto ao sorotipo de *C. neoformans*.

1.9 Tratamento

A droga tradicionalmente utilizada no tratamento da neurocriptococose e da forma disseminada é anfotericina B, administrada isolada, em altas ou em baixas doses (0,3 mg/kg/dia) ou ainda podendo estar associada a fluocitosina (150-200 mg/kg/dia). Estas drogas são administradas divididas em quatro doses diárias, que devem ser ajustadas na dependência da função renal, a qual deve ser avaliada a cada três dias. A associação visa a minimizar os efeitos colaterais da anfotericina B. O tratamento pode apresentar uma duração por um período de quatro a seis semanas, na dependência de cada caso (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Outras drogas antifúngicas têm sido utilizadas nos quadros de criptococose (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Todavia, parece que as drogas têm apresentado resultados de bons a regulares, por alcançarem altos níveis no líquido cefalorraquidiano, são: fluconazol (400 mg/dia durante nove semanas) e itraconazol (200 mg/dia durante cinco semanas). Contudo, alguns autores demonstraram estatisticamente que a associação da anfotericina B com a fluocitosina, em pacientes severamente imunocomprometidos, ainda é a terapêutica mais eficiente no tratamento da criptococose, quando comparado com o uso isolado de derivados imidazólicos.

Apesar da anfotericina B ser um dos antifúngicos mais antigos e seu emprego restringir-se quase que exclusivamente à administração sistêmica, ela ainda é considerada a droga de referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas (GROHMANN *et al.*, 1993). As variáveis que atuam na mediação do mecanismo de resistência à anfotericina B ainda não estão completamente elucidadas. Sabe-se que o alvo principal da função antimicótica da anfotericina B é o ergosterol, componente da membrana celular da levedura (AMIR & PAKULA, 1991). Nos processos *in vivo*, no entanto, é importante lembrar que a ação da anfotericina B também provoca alterações na membrana das células humanas ricas em colesterol, podendo provocar desequilíbrios na homeostase (GROHMANN *et al.*, 1993; MACDONALD, 1995).

A fluocitosina (5FC) trata-se de uma droga desenvolvida contra o câncer introduzida na década de 70 (BICANIC & HARRISON, 2005). Dentro da célula criptococócica, a fluocitosina é convertida em 5-fluorouracil (5-FU) pela citosina-desaminase (enzima presente somente em células bacterianas e fúngicas), um análogo da pirimidina que inibe a síntese de ácido nucléico.

DAMMERT *et al.* (2008) analisaram os resultados micológicos e clínicos após tratamento com anfotericina B e fluconazol em pacientes HIV positivos associados com criptococose. O trabalho demonstrou que os pacientes apresentaram elevada pressão intracranial na combinação entre os dois antifúngicos. Os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes aos resultados de outros trabalhos que também utilizaram como estudo, pacientes HIV positivo associado com criptococose.

Outra pesquisa foi realizada com 208 pacientes que apresentaram cultura positiva para *C. neoformans* (DROMER *et al.*, 2008). Os pacientes foram separados em grupos, conforme os critérios de inclusão. Foram analisados pacientes HIV-positivo e HIV-negativo, conforme os tratamentos recebidos: tratamento com anfotericina B e fluocitosina, anfotericina B e fluconazol, fluconazol e fluocitosina, somente fluconazol e somente anfotericina B. Várias análises entre os diversos grupos foram realizadas e concluiu-se que ainda o melhor tratamento para a criptococose é a administração conjunta de anfotericina B e fluocitosina.

A conduta a ser adotada no paciente infectado por *C. neoformans* e *C. gattii* deve ser diferenciada (CHEN *et al.*, 2000). O conhecimento da espécie é um fator importante para o sucesso do tratamento. Os pacientes infectados pelo fungo sorotipo B (*C. gattii*) devem receber um tratamento mais prolongado, pois este deixa maiores seqüelas e apresenta um índice maior de mortalidade.

Devido aos danos causados por medicamentos como a anfotericina B e demais antimicóticos, por provocarem desequilíbrio e alterações da homeostase nas células que apresentam ergosterol, tem-se buscado novos métodos de tratamento. A imunização passiva utilizando anticorpos monoclonais contra antígenos de *Cryptococcus* spp. pode ser outra alternativa terapêutica para a criptococose (ROSAS *et al.*, 2001).

Os anticorpos apresentam a função de auxiliares dos macrófagos no momento da fagocitose de *C. neoformans* e *C. gattii* (ALVAREZ *et al.*, 2008). Anticorpos monoclonais para a glicosilceramida (GlcCer, a qual está envolvida na regulação da virulência de *C. neoformans*) demonstraram por imunização passiva a sobrevivência de camundongos infectados por *C. neoformans* (RODRIGUES *et al.*, 2007). O anti-GlcCer demonstrou-se como uma estratégia eficiente para o controle da criptococose. A eficiência da imunidade mediada por anticorpos ainda não está bem estabelecida para *Cryptococcus*, porém nos últimos anos tem-se avançado no conhecimento sobre este tema (SCHOP, 2007).

1.10 Prevenção

Para a prevenção da criptococose têm-se buscado moléculas que apresentem características importantes para o desenvolvimento de vacinas. Com esse objetivo o peptídeo denominado P-13, o qual mimetiza a GXM, um polissacarídeo da cápsula de *C. neoformans*, foi testado como uma ferramenta para a imunização. Camundongos de duas linhagens (Balb/c e C57BL/6) foram imunizados e após verificou-se os níveis de expressão gênica de citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-6), as quais variaram dependendo da linhagem do camundongo e da proteína carreadora do P-13. Os dados sugerem que o P-13 pode ser adequado para a produção de uma vacina eficaz para a criptococose. Porém, a eficácia da vacina pode depender de outros fatores, como imunomodulação e a resposta natural imune do hospedeiro (DATTA *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA

Com o avanço dos conhecimentos biotecnológicos, nos últimos anos vem ocorrendo uma “explosão” no desenvolvimento de técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico de várias doenças. Assim, têm-se fornecido ferramentas para o desenvolvimento de testes sensíveis, específicos e que colaboram com a minimização do tempo para o diagnóstico, como um fator de extrema importância.

Devido a estas características, se faz necessário a identificação de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico da criptococose humana com maior precisão e em menor tempo.

2.2 OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas antigênicas específicas de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* para a padronização de um ELISA como ferramenta para o diagnóstico da criptococose humana.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Montar uma soroteca de amostras de pacientes com criptococose, histoplasmose, aspergilose, candidose, paracoccidiodomicose e indivíduos hígidos;
- b) Padronizar um ELISA para detecção da criptococose humana utilizando como antígeno, um extrato total de *C. neoformans* var. *grubii* (HC6);
- c) Produzir e caracterizar soros hiperimunes de camundongo contra antígenos de *C. neoformans* var. *grubii*;
- d) Identificar proteínas antigênicas de *C. neoformans* var. *grubii* utilizando soros de pacientes com criptococose.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Linhagem de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

No estudo, foi utilizada a linhagem HC6, identificada como *C. neoformans* var. *grubii*. Essa linhagem foi obtida do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2 Cultivo de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

C. neoformans var. *grubii* HC6 foi cultivado por 20 h, em um volume de 500 mL de caldo Sabouraud-dextrose a 30°C em rotação contínua a 150 rpm. As taxas de crescimento foram determinadas por espectrofotometria (OD₆₀₀), em espectrofotômetro Ultrospec-2000. As leveduras foram recuperadas por centrifugação a 5.000 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi lavado com 10 mL de água Milli-Q gelada, em seguida centrifugada 5.000 g por 10 min, repetindo-se este procedimento 3 vezes. Após a lavagem, as leveduras foram congeladas a -20°C e em seguida liofilizadas.

3.3 Extração de DNA de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

O DNA total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6 foi utilizado para confirmação de espécie por PCR com *primers* espécie-específicos.

O método utilizado para isolamento do DNA total destas amostras foi um método mecânico adaptado a partir de um protocolo de extração com lise por maceração com adição de nitrogênio líquido (ZHANG *et al.*, 1996).

As células de *C. neoformans* var. *grubii* HC6 foram inoculadas em ágar Sabouraud e incubadas em estufa a 30°C por três dias. As colônias foram recolhidas e maceradas em presença de nitrogênio líquido, em gral e pistilo, ressuspendidas em 0,2 mL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM, EDTA5 mM, pH 7,5) e transferidas para microtubos. Foram adicionados 0,2 mL de fenol-clorofórmio (1:1) ao microtubo e a

amostra foi agitada em vórtex por 6 min. Em seqüência, foram adicionados 0,3 mL de fenol-clorofórmio (1:1) e 0,3 mL de tampão de extração e a amostra foi agitada mais 4 min em vórtex. O extrato foi centrifugado por 5 min a 10.400 g e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. O DNA foi re-extraído com 0,3 mL de fenol-clorofórmio (1:1) e centrifugado por mais 5 min. O sobrenadante foi transferido a outro microtubo, onde foram adicionados dois volumes de etanol absoluto gelado. Os ácidos nucléicos foram precipitados por incubação a -20°C por 14 a 16 h. Após uma centrifugação por 15 min a 10.400 g, o sedimento foi lavado com etanol 70% gelado, seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em 50 µL de água MilliQ. RNase na concentração de 50 µg/mL foi adicionada e após incubação por 30 min a 37°C, a qualidade do DNA obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em Tris-borato EDTA corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, migrado por 40 min a 100 V, e visualizado sob luz UV. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

3.4 PCR espécie-específico de *C. neoformans*

O método de PCR utilizado para a identificação e confirmação das espécies de *Cryptococcus* utilizadas neste trabalho foi adaptado a partir do protocolo citado por LEAL *et al.* (2008 b). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 10 a 20 ng de DNA, Tris HCl 10 mM pH 8,3/ KCl 50 mM, MgCl₂ 2,3 mM, 200 µM de desoxirribonucleotídeos, 25 pmol de cada *primer* e 1 U de *Taq*-DNA-polimerase (Cenbiot Enzimas).

As condições desta PCR foram as descritas a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 8 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 65°C por 1 min, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 8 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1%, e visualizados sob luz UV.

Os *primers* utilizados foram projetados com base nas seqüências do genoma completo de *C. neoformans* (linhagem JEC21) disponível no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) os quais correspondem uma região do cromossomo 3 referente a um gene putativo de uma aminotransferase: CNA-70S (5'-ATT GCG TCC ACC AAG GAG CTC-3'), CNA-70A (5'- ATT GCG TCC ATG TTA CGT GGC-3') *C.neoformans*, CNB-49S (5'- ATT GCG TCC AAG GTG TTG TTG-3') e CNB-49A (5'- ATT GCG TCC ATC CAA CCG TTA TC-3') *C. gattii*. Tamanhos

observados na amplificação dos fragmentos de DNA na PCR multiplex: 695 pb e 448 pb, correspondentes a *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente.

3.5 Extração de proteínas de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

Sobre o *pellet* (descrito no item 3.1) foi adicionado nitrogênio líquido para auxiliar na lise celular, para o processo de maceração e obtenção do extrato protéico das células fúngicas *C. neoformans* var. *grubii* HC6. O produto obtido (pó branco) foi transferido para um tubo de centrífuga previamente pesado e, após a transferência do material para o tubo, verificou-se o peso final para a obtenção do produto (peso final do tubo - peso inicial = produto da maceração). O extrato foi ressuscitado em 1: 7 p/v de tampão de ressuspensão (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M), agitando em vortex por 5 min (com intervalos de 1 min. entre vórtex e gelo). Foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, e em seguida estes foram centrifugados em microcentrifuga por 10 min a 10.400 g. Como resultado desta extração, o sobrenadante foi considerado o conteúdo protéico citoplasmático e de parede celular.

3.6 Quantificação da extração de proteína total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

Para a determinação da concentração protéica das amostras utilizou-se o método de BRADFORD (1976). A curva padrão foi feita com BSA (Sigma), em uma concentração que variou de 4 a 28 µg/mL. A leitura de OD foi realizada a 595 nm, 5 min após a mistura da amostra com o reagente.

3.7 Preparação das amostras de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6 para eletroforese

O extrato total de proteínas de *C. neoformans* var. *grubii* HC6 foi precipitado com ácido tricloroacético (TCA) 20%. Para cada volume de amostra, correspondente a determinada quantidade de proteína requerida, foram adicionados TCA 20% numa proporção de 1:1 (v/v), seguido de incubação a 4°C, por 14 a 16 h. As amostras foram centrifugadas a 10.400 g por 15 min, lavadas com acetona 100% e novamente centrifugadas na mesma rotação por 3 min, repetindo-se este processo por 3 vezes. Após o descarte da acetona e a evaporação total da mesma, o sedimento protéico foi

ressuspendido no volume de 20 µL de tampão de amostra desnaturante (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol 10% (v/v), (p/v) azul de bromofenol 0,01%, 2-mercaptoetanol 4% (v/v), SDS 2%), exposto a temperatura de 100°C por 3 min e aplicado no gel.

3.8 SDS-PAGE de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

O extrato total de proteínas de *C. neoformans* var. *grubii* HC6 foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em condições desnaturantes, conforme descrito por LAEMMLI (1970), utilizando o sistema “*Mini Protean II Electrophoresis Cell*” (BioRad). A solução do gel separador com concentração final de acrilamida de 12% continha: Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, acrilamida-bisacrilamida 12% (p/v), SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05% (v/v) e TEMED 0,05% (v/v). A solução do gel de empilhamento com concentração final de acrilamida de 4% continha: Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, acrilamida-bisacrilamida 4% (p/v), SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05% (v/v) e TEMED 0,05% (v/v).

O sistema foi montado em cuba apropriada e preenchido com tampão de corrida (Tris 0,3%, glicina 1,44% e SDS 0,1% (p/v)). As amostras ressuspendidas em tampão de amostra desnaturante, preparadas como mencionado anteriormente, foram aplicadas no gel. Após a eletroforese (150 V por aproximadamente 1 h) os géis foram colocados em solução de coloração de Coomassie G (sulfato de amônio 10% (p/v), ácido fosfórico 2% (v/v), metanol 20%, Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05% (p/v)) por 14 a 16h e descorados em água destilada, ou submetidos à transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose.

3.9 Soros de pacientes com criptococose, candidose, aspergilose, paracoccidioidomicose, histoplasmose e de indivíduos hígidos.

Para a obtenção dos soros contou-se com a colaboração do setor de micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, LACEN/RS, Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre e Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foi disponibilizada uma alíquota (aproximadamente 1 mL/amostra excedente) dos soros de pacientes que apresentaram positividade a partir das metodologias “ouro” para diagnóstico das seguintes micoses: criptococose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, candidose e aspergilose.

Os setores de micologia, além do fornecimento dos soros dos pacientes, forneceram dados como idade e sexo dos pacientes, bem como a identificação do agente etiológico. Os laboratórios também nos disponibilizaram o número dos prontuários para buscas de informações dos pacientes para projetos futuros.

Como controle para os ensaios de ELISA e *western blotting* foram utilizados 35 soros de indivíduos hígidos coletados de alunos e funcionários do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e também foram coletadas 47 amostras de funcionários de um hospital de Porto Alegre, no qual está sendo realizado em paralelo um trabalho de isolamento de *Cryptococcus* no ambiente hospitalar. Para realização desta coleta, os voluntários assinaram um termo de compromisso livre e esclarecido.

Os soros foram colocados em glicerol tamponado 1:1 (v/v). O glicerol tamponado foi preparado da seguinte forma: 9 partes de glicerol em 1 parte de tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 (32 partes de NaH_2PO_4 1M e 68 partes de Na_2HPO_4 1M (SAMBROOK & RUSSEL, 2001)

3.10 ELISA

A padronização do teste de ELISA para soro humano foram testadas as seguintes concentrações de antígenos protéicos totais de *C. neoformans* var. *grubii* HC6: 100 ng/poço, 250 ng/poço, 500 ng/poço e as diluições de amostras de soros testadas foram: 1:1000, 1:200 e 1: 4000. Para a padronização dos ELISA para soro de comundongos imunizados, foram testadas as seguintes concentrações de antígenos protéicos totais de *C. neoformans* var. *grubii* HC6: 500 ng/poço, 250 ng/poço, 125 ng/poço, 62,5 ng/poço, 31,2 ng/poço e 15,6 ng/poço e os soros foram testados nas seguintes diluições: 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400.

As microplacas (BD Falcon 3912, Biosciences) foram sensibilizadas por adsorção física com os antígenos protéicos totais produzidos e diluídos em solução tampão carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 0,02 M; NaHCO_3 0,03 M; pH 9,6) no volume de 100 μL /poço. A concentração dos antígenos protéicos totais foi de 500 ng/poço (para soro humano) e 30 ng/poço (para soro de camundongo imunizado) e incubadas *overnight* a 4°C. As microplacas sensibilizadas foram lavadas 3 vezes com blotto 5%. Ligações não-específicas foram bloqueadas pela incubação da placa com 200 μL de blotto 5%

durante 2 h a 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween (PBS pH 7,4; Tween 20 0,05%). A cada poço sensibilizado foram adicionados 100 µL das amostras de soro diluídas (1:1000 soro humano e 1:3200 soro camundongo) em blotto 5%, incubando durante 1 h 30 min a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-Tween, foram adicionados 100 µL de blotto 5% contendo o anticorpo secundário (anti-IgG humana conjugada com peroxidase (GE Healthcare)/ anti-IgG mouse conjugada com peroxidase (ZyMax™Grade) na diluição 1:2000 por 1h. Após um novo ciclo de lavagens (3 lavagens com PBS-Tween), foi adicionado em cada poço 100 µL de solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD) 0,35 % (p/v), em tampão citrato-fosfato 0,01 M, pH 5,5 (Na₂HPO₄ 0,2 M, ácido cítrico 0,1 M) e peróxido de hidrogênio 0,005% (v/v), como substrato para a enzima. Nesta etapa, a incubação foi de 15 min, à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Transcorrido o tempo, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1 N. Os controles negativos foram, PBS, poços que receberam apenas o anticorpo secundário (para verificar a não reatividade do anticorpo secundário com outros antígenos que não as IgGs de interesse) e poços não sensibilizados (para verificar ligações inespecíficas de anticorpos na placa). A reatividade foi avaliada espectrofotometricamente através das leituras de OD em comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplaca Bio-Tek®. Para as construções dos gráficos de ELISA considerando a média dos soros e o desvio padrão, foi utilizado programa GraphPad Prism 4.

3.11 Western blotting de gel unidimensional

Após o término da migração das amostras no gel de poliacrilamida, descrito no item 3.8, o mesmo foi colocado em contato direto com uma membrana de nitrocelulose de mesmo tamanho, sendo ambos envolvidos por papéis-filtro. Tanto os papéis-filtro como a nitrocelulose foram previamente umedecidos em tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, pH 8,3). Este “sanduíche” foi submetido, em tampão de transferência, a uma voltagem de 400 mA por 2 h ou 30 V por 16 h. Após a transferência das proteínas, a nitrocelulose foi submetida à coloração *Ponceau* (1:200), e em seguida descorada com PBS-T (NaCl 137mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO 1,5 mM, KCl 2,7 mM, Tween 20 0,05% pH 7,6). A seguir foi bloqueada por 2 h ou 16h com solução blotto 5%. A membrana foi incubada por mais 1 h à temperatura ambiente a 4°C com agitação constante, com os diferentes soros, os quais foram diluídos (1:500)

para um volume final de 5 mL em blotto 5%. A membrana foi posteriormente lavada 3 vezes com PBS-T, por 10 min, e incubada por 1 h com o conjugado anti-IgG humana (GE Healthcare) diluído (1:2000) em blotto 5% (volume final de 5 mL). Por fim, a membrana foi lavada novamente com PBS-T, com 3 lavagens de 10 min. A revelação foi realizada com a adição da solução de revelação, a qual segue a seguinte proporção: 5 mg de DAB (3,3- diaminobenzidina, Sigma); 30 mL de PBS-T; 150 µL de água oxigenada 100 volumes (30%). A interrupção da reação ocorreu com a adição de água destilada. Todas as lavagens e incubações foram realizadas à temperatura ambiente com agitação constante.

3.12 Eletroforese bidimensional de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

3.12.1 Isoeletrofocalização

Foram utilizadas tiras de 17 cm e faixa de pH 4-7 (ReadyStrip™ IPG Strip, Bio-Rad). A concentração de proteínas foi de 1,2 mg para cada tira. A precipitação das amostras ocorreu em TCA 20% por 16h. Para a obtenção do *pellet*, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 10.400 g em microcentrífuga, seguida por 3 lavagens de 3 min a 10.400 g com acetona gelada. Após a secagem em temperatura ambiente foram adicionados 300 µl de tampão de solubilização (uréia 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 1%, anfólitos 0,2%) deixado 1 h em temperatura ambiente seguido de centrifugação por 45 min a 11.200 g a 20°C. A hidratação ocorreu de forma passiva, *por* 16h a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C). Após a reidratação, as amostras foram isofocalizadas (PROTEAN IEF - Bio-Rad) até alcançar um total acumulado de 70.000 V/H. As tiras foram retiradas e congeladas a -20°C até o seu uso.

3.12.2 SDS-PAGE

Antes da migração da segunda dimensão, as tiras foram incubadas 15 min sob leve agitação em tampão de equilíbrio (uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, Tris 0,375 M pH 8,8, 0,0008% azul de bromofenol) primeiramente contendo DTT 1% (1,4-ditiotreitol) o mesmo foi desprezado e o procedimento repetido com iodoacetamida 4% em um volume final de 5 mL por tira. As tiras foram submetidas à SDS-PAGE (LAEMMLI,

1970) utilizando o sistema “*Protean XL II System*” (BioRaD). Os géis foram preparados em uma concentração final de acrilamida de 12%. Ao fim da migração, foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 por 16h e descorados com água destilada ou submetidos à transferência das proteínas para membrana de PVDF para posterior técnica de *western blotting*.

3.13 Western Blotting de gel bidimensional de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

Após o término da migração da segunda dimensão, o gel de poliacrilamida foi colocado em contato direto com uma membrana de PVDF de mesmo tamanho, sendo ambos envolvidos por papéis-filtro. Previamente a membrana foi tratada com metanol 100% por 30 segundos e em seguida permaneceu umedecida em tampão de transferência. Este “sanduíche” foi submetido, em tampão de transferência, a uma voltagem de 30 V por 16h. Após a transferência das proteínas, a membrana foi submetida à coloração com vermelho de Ponceau (1:200) e descorada com PBS-T e bloqueada por 3 h com solução blotto 5%. A membrana foi incubada com anticorpo primário (*pool* de soros de pacientes com criptococose que apresentaram alto título no teste de ELISA) por 16h a 4 °C com agitação constante, diluição de 1:10 em um volume final de 30 mL em blotto 5%. A membrana foi posteriormente lavada 3x por 10 min com PBS-T e incubada por 3 h com o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina (ZyMax™Grade) diluído (1:2000) em blotto 5% (volume final de 50 mL), seguida de 3 lavagens de 10 min cada, com PBS-T, 1 lavagem de 10 min com PBS e 1 lavagem com tampão de revelação da fosfatase alcalina (NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM, Tris 100mM pH 9,5) por 15 min. A revelação foi realizada com a adição da solução de revelação (BCIP 0,33%, NBT 0,66% em tampão de revelação da fosfatase alcalina). Em seguida foi utilizada a solução de parada (EDTA 2 mM em PBS).

3.14 Imunização de camundongos com extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6

Foram imunizados 5 camundongos fêmeas BALB/c com seis semanas de idade e com peso aproximado de 20g. A primeira imunização foi realizada com 20 µg de

extrato total protéico de *C. neoformans* var. *grubii* HC6 e adjuvante completo de Freund (Sigma) e PBS em um volume final de 100 μL /animal/dose. Foram injetadas mais duas doses, com 20 μg de extrato total protéico de *C. neoformans* var. *grubii* HC6 e 2 doses de reforço com 50 μg do extrato protéico total e adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os intervalos entre as imunizações foram de 14 dias. Para acompanhamento das imunizações, foram realizadas as sangrias da veia caudal dos camundongos sete dias após a 3ª e 5ª dose. Os soros foram avaliados por ELISA indireto, contra o extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii*.

A sangria final dos camundongos se deu por punção cardíaca. Os animais foram anestesiados com 10% de xilazina e 10% de quetamina em solução fisiológica 0,9 %. Foram administrados, via intraperitoneal, 100 μL de anestésico para cada 10 g de animal.

3.15 Preparação de amostras de proteínas resolvidas por eletroforese bidimensional para identificação por espectrometria de massa

Para a identificação de proteínas antigênicas, os *spots* correspondentes aos fragmentos protéicos visualizados na técnica de *western blotting* foram recortados do gel que foi migrado juntamente com o gel que foi transferido.

Após recortados, os *spots* foram transferidos para microtubos. Adicionou-se 400 μL da seguinte solução: acetonitrila 50% e de bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0, permanecendo em contato por 15 min. O excesso foi retirado e repetiu-se mais 2 vezes o mesmo procedimento. Em seguida acrescentou-se 30 μL de acetonitrila 100% por 5 min. Os *spots* foram secados por aproximadamente 30 min no Centrivap (Centrivap Concentrator - LABCONCO).

Os géis foram reidratados com 15 μL da solução de bicarbonato de amônio 5 mM, pH 8,0 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) e incubados a 37°C por 16h.

Para a extração dos peptídeos, foram adicionados 35 μL da solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 5% (TFA) e incubados por 40 min. A solução foi transferida para outro microtubo previamente tratado com metanol e água Milli-Q. Este passo foi repetido mais uma vez.

O produto obtido da extração dos peptídeos foi seco em Centrivap e ressuspenso em 10 µL de TFA 0,1% para posterior purificação. As amostras processadas foram purificadas utilizando uma coluna de cromatografia de fase reversa (Zip Tip C₁₈ - MILLIPORE) com o objetivo de concentrar e purificar os peptídeos para posterior análise por MS.

A coluna foi equilibrada com 10 µL de acetonitrila 100% e 10 µL de TFA 0,1% em água Milli-Q. Esta solução foi passada pela coluna duas vezes.

A ligação dos peptídeos na coluna se deu pela passagem (aspiração/desprezo) das amostras aproximadamente 10 vezes. Após a lavagem com o mesmo tampão de equilíbrio para a liberação dos peptídeos não retidos foi feita a eluição com TFA 0,1% em acetonitrila 50%.

3.16 Espectrometria de massas

Para análise por MALDI-TOF MS foram utilizadas as amostras tripsinizadas e purificadas em ZipTip C₁₈. Um microlitro das amostras foi aplicado sobre a placa do espectrômetro (MALDI micro MX™). Esperou-se o tempo necessário para a secagem e em seguida foi aplicado mais 1 µL de matriz (ácido alfa-cianico) sobre a amostra. Para a secagem total da matriz, as placas foram deixadas por 16h a temperatura ambiente. No dia seguinte as amostras foram analisadas por espectrometria de massas. As amostras receberam um pulso que variou entre 130 e 150 Hz. Os dados de PMF obtidos dos *spots* foram analisados comparativamente com o banco de dados do Broad Institute (www.broad.mit.edu/annotation/fungi/cryptococcus_neoformans/) utilizando as anotações do genoma de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo das leveduras e quantificação protéica

Foram realizados três cultivos independentes de *C. neoformans* var. *grubii* HC6 apresentando em média uma OD₆₀₀ de 1,617, correspondente a aproximadamente $5,5 \times 10^7$ células/mL, resultando em um rendimento protéico médio de 1,55 mg/mL.

A técnica de Bradford foi utilizada para a quantificação de proteínas totais das amostras devido a esta ser rápida, apresentar uma estabilidade de 2 min a 1 h e uma sensibilidade quatro vezes maior do que a técnica de Lowry (BRADFORD, 1976). Os resultados obtidos na técnica de Bradford corroboraram com os resultados visualizados em SDS-PAGE (Figura 4).

O método de Bradford está baseado na interação entre o corante BG-250 e proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas, as interações ocorrem principalmente com Arg, His, Lys, Trp, Tyr e Phe (COMPOTON & JONES, 1985). No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998).

4.2 Análise do antígeno protéico total

Após a produção dos antígenos, estes foram analisados por SDS-PAGE. Esta análise permitiu a visualização do perfil protéico de *C. neoformans* HC6 (Figura 4). Analisando 75 µg de proteína total, foram evidenciadas mais de 45 bandas, correspondendo a polipeptídeos com massas moleculares entre 10 a 220 kDa. No trabalho de Chai & Tay (2009), também utilizando um extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii*, foram evidenciados aproximadamente 34 polipeptídeos, com massas entre 26,5-130 kDa. A diferença no número de bandas observada entre o nosso extrato e o extrato do trabalho relatado pode ser devido às linhagens, quantidade de extrato aplicado no gel (utilizamos em nosso trabalho 75 µg enquanto Chai & Tay (2009) utilizaram 50 µg) e/ou também a diferenças na obtenção dos extratos (no trabalho os autores lisaram as células com o auxílio de pérolas de vidro).

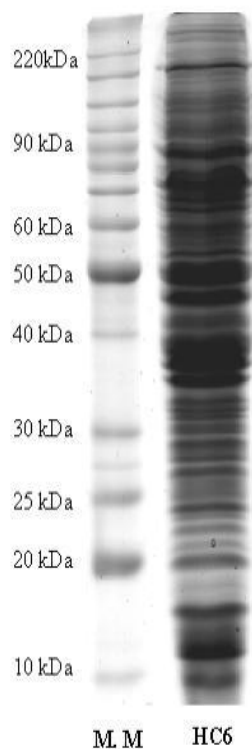


Figura 4: SDS PAGE 12% para verificação do perfil protéico de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (HC6). Foram migrados 3 μ L de marcador de massa molecular BenchMark™Protein Ladder (M.M) e 75 μ g de extrato protéico total de *C. neoformans* HC6 (HC6). O gel foi corado por 16h com *Coomassie Brilliant Blue G* e descorado com água destilada.

4.3 Organização de um banco de soros de pacientes com criptococose ou com outras enfermidades de potencial reatividade cruzada

Foram obtidas 40 amostras de soros de pacientes com criptococose (Tabela 1), 9 amostras de soros de pacientes com paracoccidioidomicose (Tabela 2), 8 amostras de soros de pacientes com aspergilose (Tabela 3), 10 amostras de soros de pacientes com histoplasmose (Tabela 4) e 15 amostras de soros de pacientes com candidose (Tabela 5). Estes soros eram amostras excedentes. Por esse motivo não se fez necessário o termo de consentimento livre e esclarecido dos mesmos.

As amostras de soro de pessoas hígdas, utilizadas como controle negativo para criptococose, foram coletadas de voluntários (estudantes e funcionários) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tabela 6) e voluntários

(funcionários) de um hospital de Porto Alegre (Tabela 7), os quais concordaram participar da pesquisa.

O diagnóstico padrão utilizado pelo laboratório de micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre para histoplasmosose e paracoccidioidomicose é imunodifusão dupla (ID). O diagnóstico da histoplasmosose é qualitativo, sendo, portanto reconhecido como positivo ou negativo. Exames histológicos também auxiliam no diagnóstico da histoplasmosose (SEVERO *et al.*, 2001).

A aspergilose inclui as doenças, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), colonização intracavitária pulmonar aspergilar (CIPA), bola fúngica, “aspergiloma”, aspergilose invasiva (AI). Em 70% dos pacientes com ABPA e AI, a ID é positiva, porém apresentam reações fracas (dado obtido do laboratório de micologia da Santa Casa). No laboratório é verificado ID fortemente marcada em pacientes com CIPA, a qual persiste e com altos níveis de anticorpos. Paciente com aspergilose invasiva raramente contém níveis altos de precipitinas, apresentando reações fracas. Quando o laboratório de micologia suspeita desta condição faz-se ELISA, radioimunoensaio e teste de antigenemia, os quais auxiliam nestes casos.

Testes ID positivos para *Candida* spp. ou *Aspergillus* spp. simplesmente indicam que o paciente foi exposto aos respectivos fungos e como resposta apresentou a produção de anticorpos. Para estas duas infecções, a positividade destes resultados deve ser interpretada juntamente com a clínica e com os dados laboratoriais (WHEAT, 2006).

Na paracoccidioidomicose, no teste de ID positivo é possível verificar a formação de uma linha de precipitação. A sensibilidade do método é de 98% quando realizado com proteína nativa purificada, utilizando isoformas da proteína gp43r recombinantes a sensibilidade pode variar de 98 a 100%. É considerado positivo todo soro suspeito que dê uma linha de precipitação com identidade total à linha de precipitação do controle (CARVALHO *et al.*, 2008).

Para a criptococose, utiliza-se a aglutinação em látex, o qual é um método qualitativo e semiquantitativo (titulação). O mesmo apresenta alta sensibilidade para líquido cefalorraquidiano (LCR), porém para outras amostras, como, soro, urina e demais secreções, pode apresentar falso positivo. Os antígenos polissacarídeos de *C. neoformans* estão frequentemente presentes no soro de pacientes com criptococose pulmonar e normalmente presentes no LCR de pacientes com envolvimento do sistema nervoso central (WHEAT, 2006). Resultados falsos positivos podem ser observados em

pacientes infectados por outros microrganismos como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Trichosporon* spp. e *Geotrichum* spp. (SAHA *et al.*, 2008).

Em pacientes com meningite criptocócica o teste do látex para *C. neoformans* pode ser positivo em até 99% dos LCRs. O *cutoff* de detecção do polissacarídeo capsular do *C. neoformans* é de aproximadamente 5ng/ml ou mais. A detecção deste antígeno era algumas vezes dificultada pela presença de fator reumatóide e por anticorpos circulantes ligados ao polissacarídeo em complexos imunes os quais dificultavam a reatividade do teste. Com a inclusão da pronase, a qual apresenta a propriedade de retirar anticorpos em complexos imunes (não afetando o antígeno) e também apresenta a capacidade de destruição do fator reumatóide, auxiliou o aumento da sensibilidade do teste, permitindo que os antígenos capsulares antes mascarados, agora sejam expostos e detectados pelo teste.

O teste de látex está baseado no princípio de que partículas de látex, sensibilizadas com altos títulos de globulina purificada na presença de antígenos polissacarídeos criptocócicos, irão aglutinar com amostras contendo antígenos capsulares criptocócicos. Para a detecção de antígenos em LCR de pacientes com meningite criptocócica, o látex é eficiente, porém pode-se considerar que o soro destes pacientes, também pode não conter níveis detectáveis dos antígenos (BICANIC & HARRISON, 2005; WHEAT, 2006). As amostras que apresentam aglutinação em diluições maiores que 1:64 são consideradas positivas para criptococose no *kit YA Crypto Antibody Test*.

Tabela 1: Soro de pacientes acometidos por criptococose. Na tabela são apresentados os seguintes dados: identificação alfanumérica das amostras em nosso banco de dados, registro do local de origem, identificação da origem das amostras, iniciais, cor, idade e sexo dos pacientes.

| AMOSTRA | REG. LOCAL | ORIGEM | INICIAIS | COR | IDADE (anos) | SEXO |
|---------|---------------|------------|----------|-----|-----------------|------|
| PC1 | 843-2 | LACEN | J.A.C | P | 38 | M |
| PC2 | 1092 | LACEN | J.R.B.S | ** | 38 | M |
| PC3 | 1121 | LACEN | C.A.P.S | ** | 39 | M |
| PC4 | 905-2 | LACEN | J.B | B | 35 | M |
| PC5 | 890-2 | LACEN | P.S.S.A | B | 32 | M |
| PC6 | 1095-2 | LACEN | A.A | ** | 36 | M |
| PC7 | ** | HPS | L.C.R | ** | ** | M |
| PC8 | 116 | SANTA CASA | A. | P | 23 | M |
| PC9 | 118 | SANTA CASA | J.A.L | ** | ** | M |
| PC10 | 129 | SANTA CASA | R | B | 24 | B |
| PC11 | 139 | SANTA CASA | D.M | ** | 28 | ** |
| PC12 | 140 | SANTA CASA | M. | ** | ** | F |
| PC13 | 151 | SANTA CASA | I.D | P | 27 | F |
| PC14 | 160 | SANTA CASA | A.M | ** | 28 | M |
| PC15 | 169 | SANTA CASA | J.A.E | ** | ** | M |
| PC16 | 172 | SANTA CASA | A.H | ** | ** | M |
| PC17 | 174 | SANTA CASA | N.L | B | 52 | M |
| PC18 | 175 | SANTA CASA | M.S | ** | 56 | F |
| PC19 | 176 | SANTA CASA | V | B | 27 | F |
| PC20 | 182 | SANTA CASA | P.R | ** | ** | M |
| PC21 | 183 | SANTA CASA | R.C | B | 23 | F |
| PC22 | 184 | SANTA CASA | A.M | ** | ** | M |
| PC23 | 190 | SANTA CASA | J.A | B | 40 | M |
| PC24 | 191 | SANTA CASA | L.A | B | 18 | M |
| PC25 | 198 | SANTA CASA | J.C | | 33 | M |
| PC26 | 200 | SANTA CASA | G.S | B | 30 | M |
| PC27 | 206 | SANTA CASA | M.I | B | 48 | F |
| PC28 | 214 | SANTA CASA | J.C | ** | 55 | M |
| PC29 | 216 | SANTA CASA | C. | ** | 27 | M |
| PC30 | 220 | SANTA CASA | R.R | B | 24 | F |
| PC31 | 221 | SANTA CASA | S.M | P | 28 | F |
| PC32 | 226 | SANTA CASA | R | P | 29 | M |
| PC33 | 233 | SANTA CASA | J.N | ** | ** | M |
| PC34 | 301 | SANTA CASA | P.G | B | 19 | F |
| PC35 | 82 | SANTA CASA | ** | ** | ** | ** |
| PC36 | 69 | SANTA CASA | ** | ** | ** | ** |
| PC37 | CN776 | SANTA CASA | ** | ** | 33 | M |
| PC38 | CN825 | SANTA CASA | ** | ** | 24 | F |
| PC39 | CN824 | SANTA CASA | ** | ** | ** | M |
| PC40 | CN813 | SANTA CASA | ** | ** | 80 | M |

** Dados não disponibilizados.

B: cor da pele branca, P: cor da pele negra, F: Feminino, M: Masculino

Tabela 2: Soros de pacientes com paracoccidiodomicose. Na tabela são apresentados os seguintes dados: identificação alfanumérica das amostras em nosso banco de dados, registro do local de origem, identificação da origem das amostras, iniciais, cor, idade e sexo dos pacientes.

| AMOSTRA | REG. LOCAL | ORIGEM | INICIAIS | COR | IDADE (anos) | SEXO |
|---------|------------|------------|----------|-----|-----------------|------|
| M1 | 328 | SANTA CASA | S.R.K | B | 44 | F |
| M2 | 499 | SANTA CASA | J.E.K | B | 30 | M |
| M3 | 498 | SANTA CASA | E. S | ** | 57 | M |
| M4 | 501 | SANTA CASA | M. M | B | 34 | M |
| M5 | 514 | SANTA CASA | N. M | ** | ** | M |
| M6 | 516 | SANTA CASA | S.S | ** | 50 | F |
| M7 | 524 | SANTA CASA | O A | ** | 63 | M |
| M8 | 527 | SANTA CASA | L. A | B | 72 | M |
| M9 | 526 | SANTA CASA | L. M | B | 61 | M |

** Dados não disponibilizados.

B: cor da pele branca, P: cor da pele negra, F: Feminino, M: Masculino

Tabela 3: Soros de pacientes com aspergilose. Na tabela são apresentados os seguintes dados: identificação alfanumérica das amostras em nosso banco de dados, registro do local de origem, identificação da origem das amostras, iniciais, cor, idade e sexo dos pacientes.

| AMOSTRA | REG. LOCAL | ORIGEM | INICIAIS | COR | IDADE (anos) | SEXO |
|---------|---------------|------------|------------|-----|-----------------|------|
| A1 | 473 | SANTA CASA | J.S | B | 64 | M |
| A2 | 491 | SANTA CASA | S.M.R | ** | 30 | F |
| A3 | 508 | SANTA CASA | J. A C. O | P | 55 | M |
| A4 | 514 | SANTA CASA | E. A S | ** | 64 | F |
| A5 | 519 | SANTA CASA | L. E. R. F | B | 10 meses | F |
| A6 | 522 | SANTA CASA | G. S. S | P | 34 | M |
| A7 | 527 | SANTA CASA | A B | B | 63 | M |
| A8 | 533 | SANTA CASA | J. I. C | P | 33 | M |

** Dados não disponibilizados.

B: cor da pele branca, P: cor da pele negra, F:Feminino, M: Masculino

Tabela 4: Soro de pacientes com histoplasmose. Na tabela são apresentados os seguintes dados: identificação alfanumérica das amostras em nosso banco de dados, registro do local de origem, identificação da origem das amostras, iniciais, cor, idade e sexo dos pacientes.

| AMOSTRA | REG. LOCAL | ORIGEM | INICIAIS | COR | IDADE (anos) | SEXO |
|---------|------------|------------|------------|-----|--------------|------|
| H1 | 078 | SANTA CASA | A B. | B | 35 | F |
| H2 | 091 | SANTA CASA | C. A B | B | 34 | M |
| H3 | 061 | SANTA CASA | E. L | B | 15 | M |
| H4 | 071 | SANTA CASA | P. R. S. V | B | 23 | M |
| H5 | 098 | SANTA CASA | D. A. E. M | B | 25 | M |
| H6 | 101 | SANTA CASA | L. W | B | 63 | M |
| H7 | 104 | SANTA CASA | M. A M. B | P | 29 | M |
| H8 | 109 | SANTA CASA | A R P | B | 15 | F |
| H9 | 116 | SANTA CASA | T A B | B | 57 | M |
| H10 | 118 | SANTA CASA | J. F. S. A | B | 31 | F |

B: cor da pele branca, P: cor da pele preta, F:Feminino, M: Masculino

Tabela 5: Soro de pacientes com candidose. Na tabela são apresentados os seguintes dados: identificação alfanumérica das amostras em nosso banco de dados, registro do local de origem, identificação da origem das amostras e idade dos pacientes.

| AMOSTRA | REG. LOCAL | ORIGEM | IDADE (anos) |
|---------|------------|----------------------|--------------|
| C1 | 10283703 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 0 |
| C2 | 7925670 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 43 |
| C3 | 10283505 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 65 |
| C4 | 10241972 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 59 |
| C5 | ** | HOSPITAL DE CLÍNICAS | ** |
| C6 | 8252736 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 37 |
| C7 | 10305688 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 66 |
| C8 | 4529459 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 37 |
| C12 | 10333094 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 16 |
| C13 | 10257996 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 7 meses |
| C14 | 10340099 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | 31 |
| C20 | 10333094 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | ** |
| C23 | 10528412 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | ** |
| C24 | 10541811 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | ** |
| C25 | 3619830 | HOSPITAL DE CLÍNICAS | ** |

**Dados não disponibilizados.

Tabela 6: Soros de voluntários (alunos e funcionários) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Na tabela são apresentados os seguintes dados: identificação alfanumérica das amostras em nosso banco de dados, local de trabalho, cidade de origem, cor, idade e sexo dos voluntários.

| AMOSTRA | LOCAL | CIDADE DE ORIGEM | COR | IDADE | SEXO |
|---------|-------|--------------------------|-----|-------|------|
| L1 | CBIOT | S. Miguel do Oeste - SC | B | 24 | F |
| L2 | CBIOT | Jundiá - SP | B | 31 | F |
| L3 | CBIOT | Giruá - RS | B | 26 | F |
| L4 | CBIOT | Passo Fundo - RS | B | 23 | F |
| L5 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 25 | M |
| L6 | CBIOT | Concórdia - SC | B | 27 | F |
| L7 | CBIOT | Canoas -RS | B | 18 | M |
| L8 | CBIOT | Rio Grande - RS | B | 28 | M |
| L9 | CBIOT | Santa Maria -RS | B | 28 | F |
| L10 | CBIOT | Curitiba - PR | B | 24 | F |
| L11 | CBIOT | Canela -RS | B | 25 | M |
| L12 | CBIOT | Muruarama - PR | B | 22 | F |
| L13 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 25 | F |
| L14 | CBIOT | S. Miguel do Oeste - SC | B | 27 | M |
| L15 | CBIOT | Triunfo - RS | B | 47 | M |
| L16 | CBIOT | Prto Alegre | B | 20 | F |
| L17 | CBIOT | Santa Maria -RS | B | 44 | M |
| L18 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 30 | F |
| L19 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 26 | M |
| L20 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 27 | M |
| L21 | CBIOT | Bento Gonçalves - RS | B | 28 | F |
| L22 | CBIOT | Caxias do Sul - RS | B | 19 | F |
| L23 | CBIOT | Paraná | B | 28 | F |
| L24 | CBIOT | Santa Cruz - RS | B | 25 | M |
| L25 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 25 | M |
| L26 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 18 | F |
| L27 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 26 | M |
| L28 | CBIOT | Igrejinha - RS | B | 28 | F |
| L29 | CBIOT | Cachoeira do Sul -RS | B | 24 | F |
| L30 | CBIOT | Palmeira das Missões -RS | B | 21 | F |
| L31 | CBIOT | Viamão -RS | B | 20 | F |
| L32 | CBIOT | Santa Maria -RS | B | 25 | M |
| L33 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 40 | F |
| L34 | CBIOT | Porto Alegre - RS | B | 27 | F |
| L35 | CBIOT | Canoas -RS | B | 33 | F |

B: cor da pele branca, F: Feminino, M: Masculino

Tabela 7: Soros de funcionários de um hospital de Porto Alegre. Na tabela são apresentados os seguintes dados: identificação alfanumérica das amostras em nosso banco de dados, local de trabalho dentro do hospital, se tem contato com pombos, iniciais, idade e sexo dos voluntários.

| AMOSTRA | LOCAL NO HOSPITAL | CONTATO COM POMBOS | INICIAIS | IDADE | SEXO |
|---------|-------------------|--------------------|---------------|-------|------|
| F1 | TOMOGRAFIA | Sim | J. A. C | 50 | M |
| F2 | BANCO DE SANGUE | + / - | M. S. C | 55 | F |
| F3 | BANCO DE SANGUE | + / - | M. L. R. S | 56 | F |
| F4 | UTI PEDIATRICA | não | A S. A | 32 | F |
| F5 | UTI PEDIATRICA | ** | M. C. B | 48 | F |
| F6 | UTI PDIÁTRICA | ** | S.L.S | 39 | M |
| F7 | RX | Sim | A. P | 61 | F |
| F8 | RX | Sim | M.C | 42 | F |
| F9 | RX | Sim | C. A. S | 48 | M |
| F10 | RX | Sim | G. M. S | 36 | F |
| F11 | RX | Sim | T.P | 29 | M |
| F12 | TRAUMATOLOGIA | Não | M..S.G | 51 | F |
| F13 | TRAUMATOLOGIA | Sim | V. R. M | 55 | F |
| F14 | ** | Sim | A L. R | 47 | F |
| F15 | TRAUMATOLOGIA | Sim | R.S | 38 | F |
| F16 | TRAUMATOLOGIA | Sim | R.C | 45 | F |
| F17 | TRAUMATOLOGIA | Sim | C. M | 52 | F |
| F18 | TRAUMATOLOGIA | Sim | V. P | 34 | F |
| F19 | ** | ** | ** | ** | ** |
| F20 | TRAUMATOLOGIA | Sim | D. A. P | 43 | F |
| F21 | LABORATÓRIO | Sim | N. M. I. P | 48 | F |
| F22 | LABORATÓRIO | Sim | T. C | 31 | F |
| F23 | LABORATÓRIO | Sim | E.M | 56 | F |
| F24 | ** | Sim | I. M | 46 | F |
| F25 | U.C.C | Sim | C. R. C. L | 45 | F |
| F26 | ** | Sim | S. P. R | 41 | F |
| F27 | U.C.C | Sim | B. C. D. M. C | 37 | F |
| F28 | ** | ** | ** | ** | ** |
| F29 | UTI - TR | Sim | I.P | 42 | F |
| F30 | ** | Sim | E. M. S | 52 | M |
| F31 | UTI - TR | Sim | L. S | 52 | F |
| F32 | UTI - TR | Sim | M. O. R | 50 | F |
| F33 | UTI - TR | Sim | V. R. B. S | 53 | F |
| F34 | UTI - TR | Sim | E. F. D | 53 | F |
| F35 | UTI - TR | Sim | C. P. S | 51 | F |
| F36 | UTI - TR | Sim | V. F | 36 | M |
| F37 | UTI - TR | Sim | P. V. R | 38 | M |
| F38 | UTI - TR | Sim | J. L. R. O | 53 | M |
| F39 | UTI - TR | Sim | C. C | 43 | F |
| F40 | ENFERMARIA 8 | Sim | G. D | 50 | F |
| F41 | ENFERMARIA 8 | Sim | F. L. C. A | 44 | M |
| F42 | ** | ** | ** | ** | ** |
| F43 | ** | ** | ** | ** | ** |
| F44 | RX | Sim | P.R.F | 38 | M |
| F45 | U.C.C | Sim | D. P. S. | 43 | F |
| F46 | ** | Sim | J. C. R. T | 51 | M |
| F47 | U.C.C | Sim | A C. L. I | 51 | F |

** Dados não disponibilizados. F: Feminino, M: Masculino

4.4 Confirmação da espécie de *C. neoformans* HC6 por PCR espécie-específico

Após o inóculo de *C. neoformans* HC6 em meio líquido Sabouraud, as colônias restantes na placa de Petri foram utilizadas para extração de DNA genômico, seguido de PCR espécie-específico. Essa técnica foi utilizada como um controle do cultivo, dessa forma permitindo inferir que o fungo que estava em crescimento em meio Sabouraud líquido era realmente *C. neoformans*. Como esperado, observou-se um amplicom de 695 pb (Figura 5).

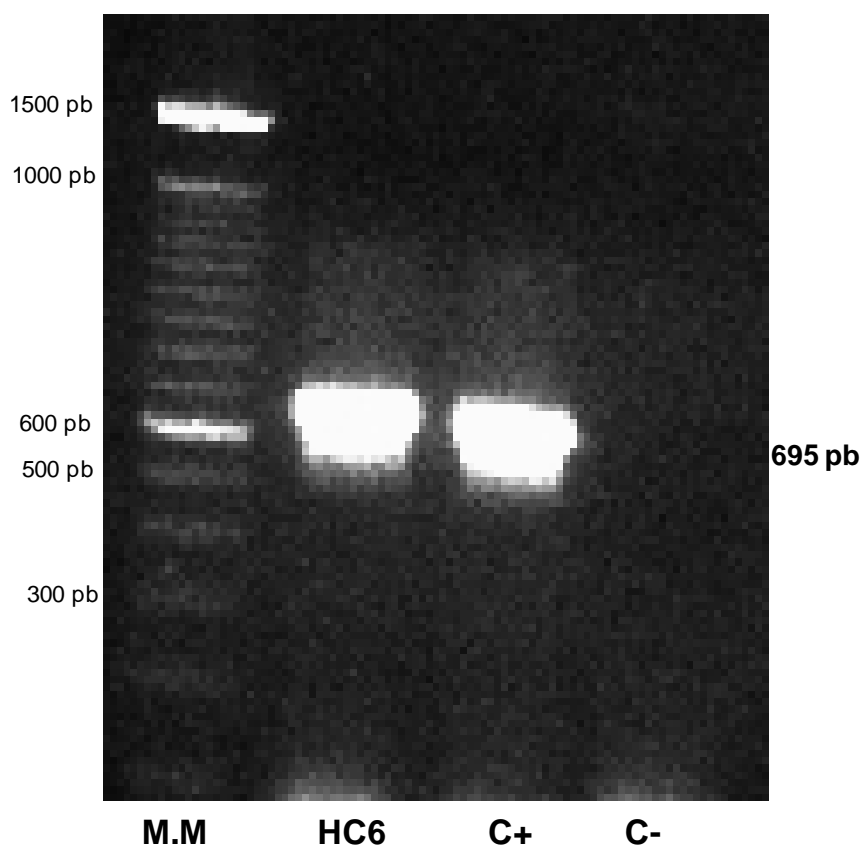


Figura 5: PCR espécie-específico de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (HC6). Após a extração de DNA genômico de *C. neoformans* HC6, foi realizada o PCR espécie-específico, o qual foi utilizado como controle de qualidade na produção de extrato protéico total. Utilizou-se a técnica de multiplex, a qual utiliza dois pares de primers que permite a diferenciação entre *C. neoformans* (695 pb) *C. gattii* (448 pb).

4.5 Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos séricos contra *C. neoformans*

Para padronização de ELISA para detecção de anticorpos séricos contra *C. neoformans*, foi utilizado como antígeno o extrato protéico total de *C. neoformans* HC6. O ELISA detecta anticorpos específicos com alto grau de sensibilidade e especificidade, sendo de execução relativamente fácil e rápida (SANTÚRIO *et al.*, 2006). Um dos pontos críticos para o sucesso de um ELISA indireto está na preparação do antígeno (PAREDES *et al.*, 1999). Para encontrar as concentrações ideais extrato total e a diluição do soro, foram realizados diversos testes com diferentes concentrações de extrato protéico total e diferentes diluições dos soros. As concentrações dos antígenos testadas foram de 100 ng, 250 ng e 500 ng (Figura 6). Já as diluições para os soros testados foram de 1:1000, 1:2000 e 1:4000 (Figura 7).

Após a realização do experimento anterior, concluiu-se que a concentração ideal de extrato protéico total para o experimento de ELISA era de 500 ng/poço e a diluição do soro 1:1000. Posteriormente a esta padronização, as amostras de soro foram armazenadas em glicerol 1:1 (v/v).

O desenvolvimento de técnicas para a detecção de anticorpos em pacientes infectados por micoses tradicionalmente tem utilizado como antígenos o extrato total das células fúngicas, os quais são compostos por um grande número de antígenos (ELGUEZABAL *et al.*, 2005). O extrato total de forma geral é de fácil obtenção, mas a desvantagem do seu uso é o aumento da reatividade cruzada verificada entre os pacientes infectados com diferentes fungos e bactérias.

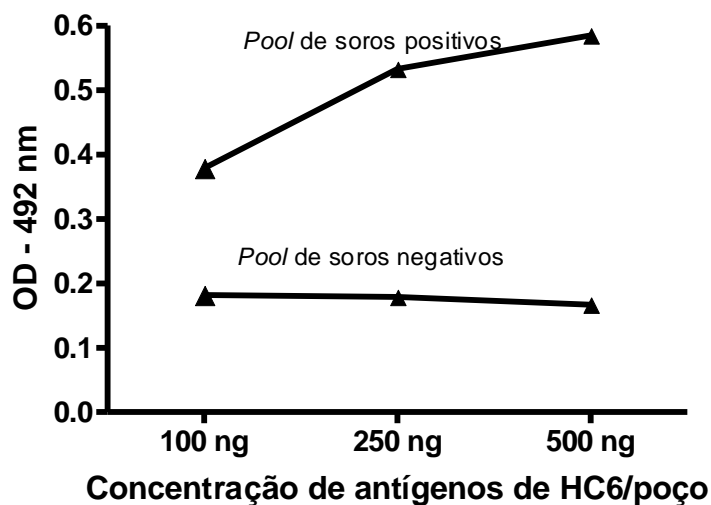


Figura 6: Teste para padronização da concentração de antígenos de extrato total de HC6 para o experimento de ELISA. Foram testadas três diferentes concentrações de extrato total de HC6, sendo as concentrações de 100 ng/poço, 250 ng/poço e 500 ng/poço. A diluição do *pool* dos soros de pacientes com criptococose (*pool* de soros positivos) bem como o *pool* de soro de indivíduos hígidos (*pool* de soros negativos) foi de 1:300. A diluição do anticorpo secundário anti-IgG humano marcado com peroxidase foi de 1:2000. Foram utilizadas 10 amostras (10 positivas para a criptococose e 10 negativas para criptococose) para cada *pool*.

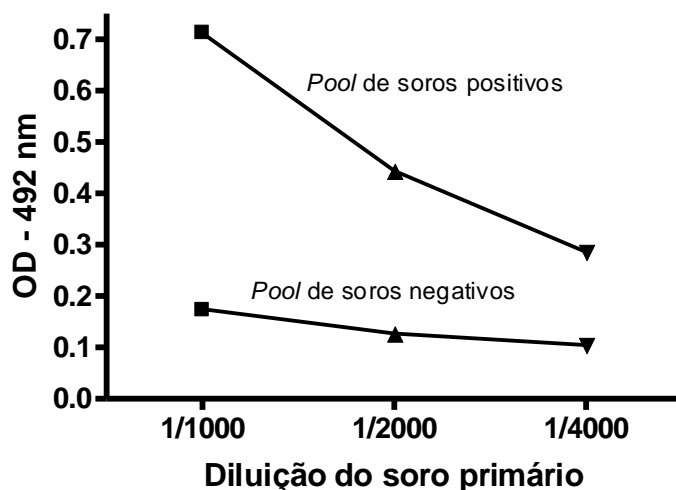


Figura 7: Teste para padronização da diluição das amostras de soros de pacientes para o experimento de ELISA. Foram testadas três diferentes diluições, 1:1000, 1:2000 e 1:4000 do *pool* dos soros de pacientes com criptococose (*pool* de soros positivos) bem como o *pool* de soro de indivíduos hígidos (*pool* de soros negativos). A concentração de antígeno de *C. neoformans* HC6 por poço foi de 500 ng. A diluição do anticorpo secundário anti-IgG humano marcado com peroxidase foi de 1:2000. Foram utilizadas 10 amostras (10 positivas para a criptococose e 10 negativas para criptococose) para cada *pool*.

4.6 Teste de ELISA

Utilizando os parâmetros de concentração de antígeno e de diluição dos soros definidos com base nos experimentos de padronização descritos na seção 4.5, foram então testados soros de pacientes com criptococose, aspergilose, paracoccidioidomicose, histoplasmose, candidose e de indivíduos hígidos, separadamente. As amostras foram testadas em triplicata, em dois experimentos independentes realizados em dias distintos. Da Figura 8 a Figura 14 pode ser analisados os histogramas com a média obtida na OD de 492 nm de cada soro e seu desvio padrão (considerando valores máximos e mínimos).

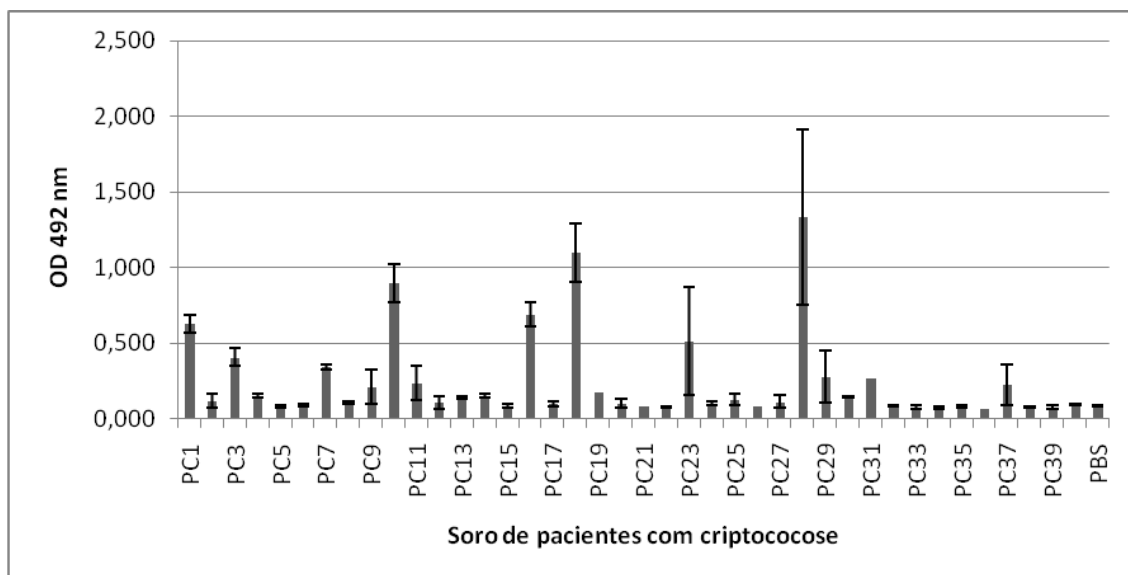


Figura 8: Média de OD₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 40 amostras de soro de pacientes com criptococose. As amostras foram testadas em triplicatas e em dois experimentos distintos. Estão identificadas conforme nomenclatura alfa-númerica recebida no laboratório (maiores detalhes de cada amostra podem ser obtidos nas tabelas anteriores). É apresentado a média obtida de cada amostra, bem como o seu desvio padrão com máximo e mínimo. As placas foram sensibilizadas com 500 ng de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6, a diluição do soro foi 1:1000 e a diluição do anticorpo secundário marcado com peroxidase foi de 1:2000. PBS foi utilizado como controle negativo.

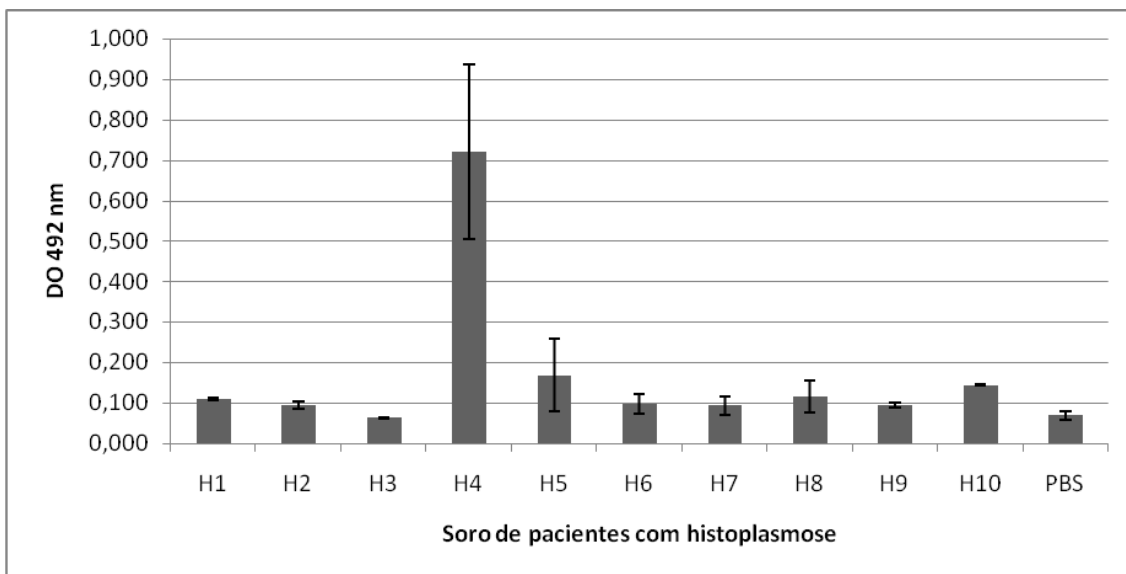


Figura 9: Média de OD₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 10 amostras de soro de pacientes com histoplasmose. As amostras foram testadas em triplicatas e em dois experimentos distintos. Estão identificadas conforme nomenclatura alfa-númerica recebida no laboratório (maiores detalhes de cada amostra podem ser obtidos nas tabelas anteriores). É apresentado a média obtida de cada amostra, bem como o seu desvio padrão com máximo e mínimo. As placas foram sensibilizadas com 500 ng de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6, a diluição do soro foi 1:1000 e a diluição do anticorpo secundário marcado com peroxidase foi de 1:2000. PBS foi utilizado como controle negativo.

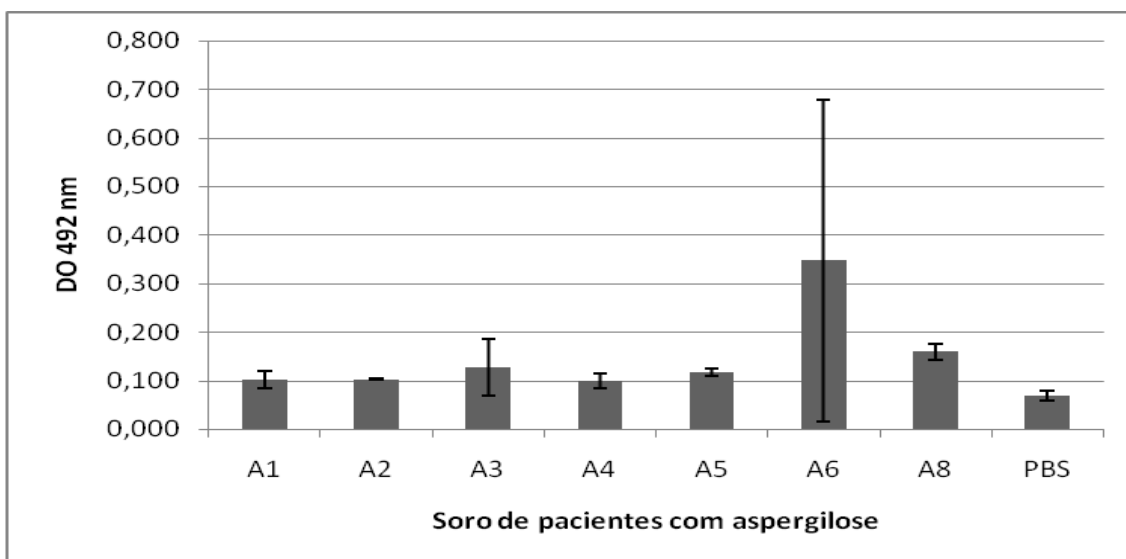


Figura 10: Média de OD₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 7 amostras de soro de pacientes com aspergilose. As amostras foram testadas em triplicatas e em dois experimentos distintos. Estão identificadas conforme nomenclatura alfa-númerica recebida no laboratório (maiores detalhes de cada amostra podem ser obtidos nas tabelas anteriores). É apresentado a média obtida de cada amostra, bem como o seu desvio padrão com máximo e mínimo. As placas foram sensibilizadas com 500 ng de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6, a diluição do soro foi 1:1000 e a diluição do anticorpo secundário marcado com peroxidase foi de 1:2000. PBS foi utilizado como controle negativo.

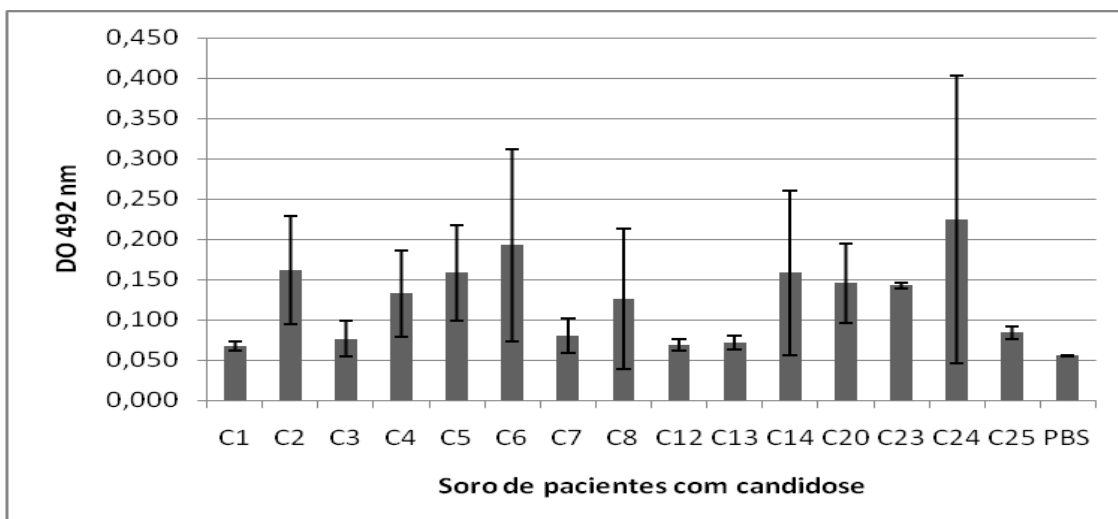


Figura 11: Média de OD₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 15 amostras de soro de pacientes com candidose. As amostras foram testadas em triplicatas e em dois experimentos distintos. Estão identificadas conforme nomenclatura alfa-númerica recebida no laboratório (maiores detalhes de cada amostra podem ser obtidos nas tabelas anteriores). É apresentado a média obtida de cada amostra, bem como o seu desvio padrão com máximo e mínimo. As placas foram sensibilizadas com 500 ng de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6, a diluição do soro foi 1:1000 e a diluição do anticorpo secundário marcado com peroxidase foi de 1:2000. PBS foi utilizado como controle negativo.

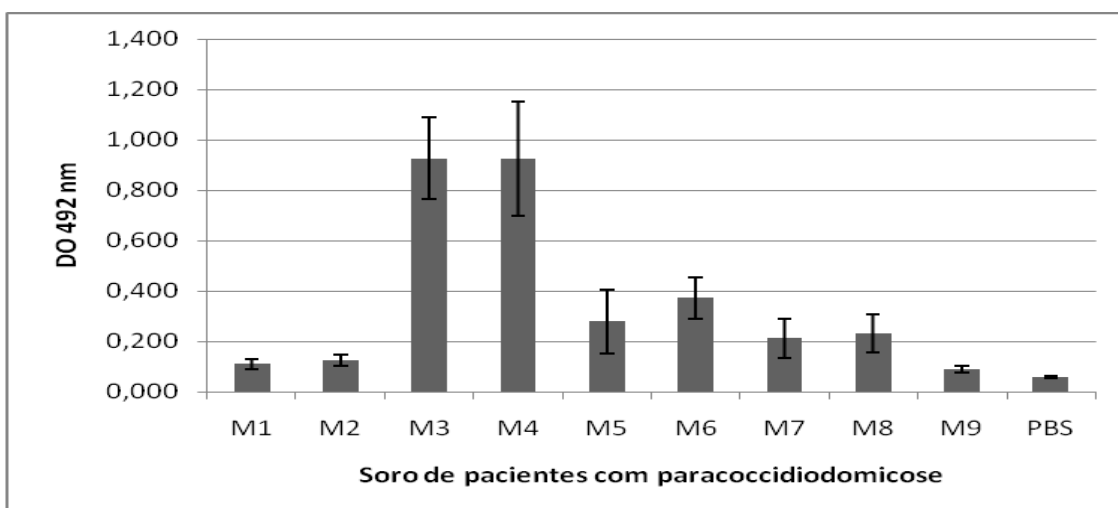


Figura 12: Média de OD₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 9 amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomycose. As amostras foram testadas em triplicatas e em dois experimentos distintos. Estão identificadas conforme nomenclatura alfa-númerica recebida no laboratório (maiores detalhes de cada amostra podem ser obtidos nas tabelas anteriores). É apresentado a média obtida de cada amostra, bem como o seu desvio padrão com máximo e mínimo. As placas foram sensibilizadas com 500 ng de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6, a diluição do soro foi 1:1000 e a diluição do anticorpo secundário marcado com peroxidase foi de 1:2000. PBS foi utilizado como controle negativo.

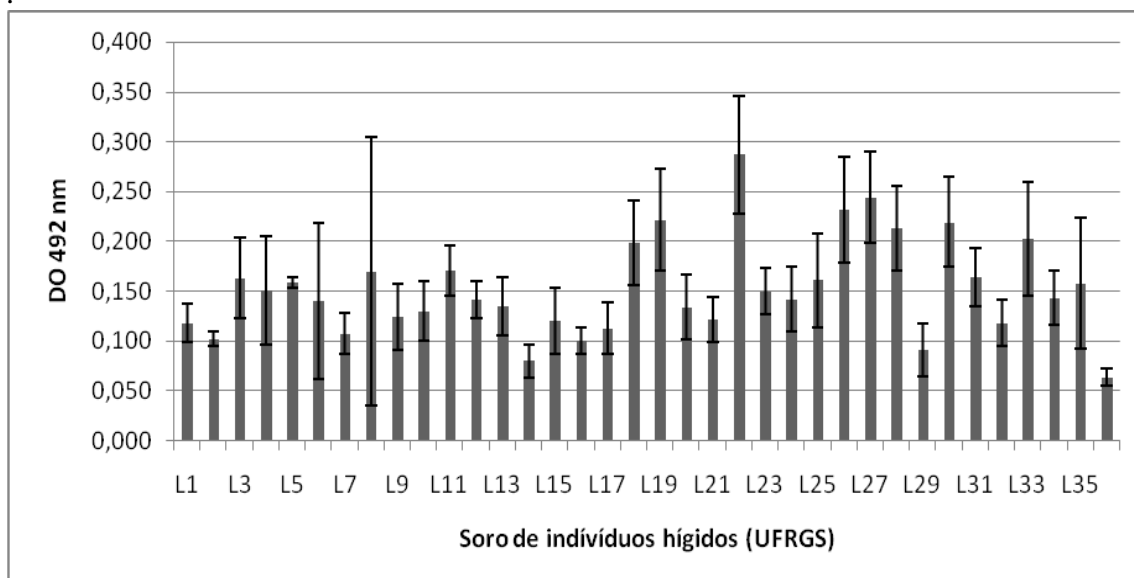


Figura 13: Média de OD₄₉₂ por ELISA, observada em cada uma das 35 amostras de soro de indivíduos hígidos (UFRGS). As amostras foram testadas em triplicatas e em dois experimentos distintos. Estão identificadas conforme nomenclatura alfa-númerica recebida no laboratório (maiores detalhes de cada amostra podem ser obtidos nas tabelas anteriores). É apresentado a média obtida de cada amostra, bem como o seu desvio padrão com máximo e mínimo. As placas foram sensibilizadas com 500 ng de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6, a diluição do soro foi 1:1000 e a diluição do anticorpo secundário marcado com peroxidase foi de 1:2000. PBS foi utilizado como controle negativo.

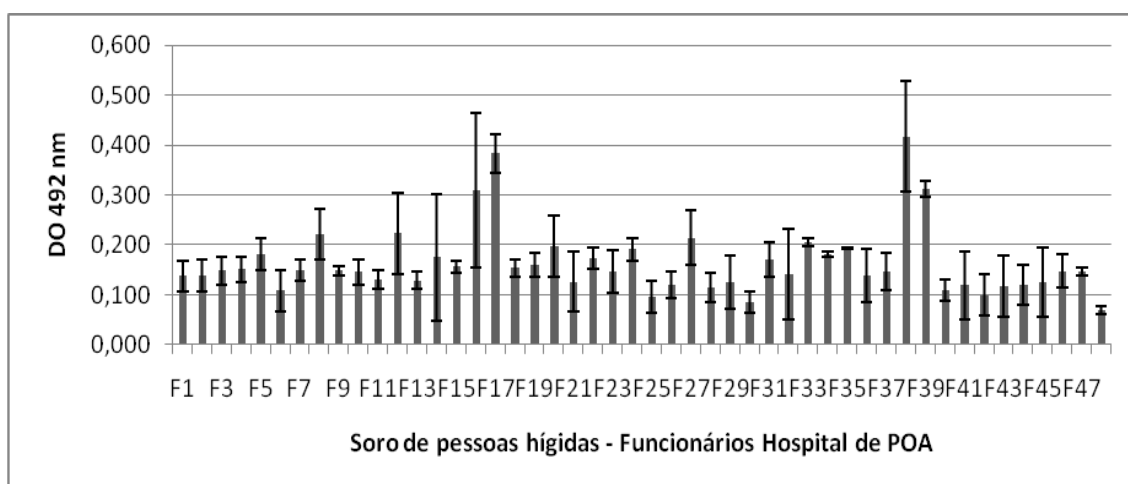


Figura 14: Média de OD₄₉₂ por ELISA, observada em cada amostra de soro de indivíduos hígidos, funcionários de um hospital de Porto Alegre. As amostras estão apresentadas conforme nomenclatura alfa-númerica recebida no laboratório (maiores detalhes de cada amostra podem ser obtidos nas tabelas anteriores). É apresentado a média obtida de cada amostra, bem como o seu desvio padrão com máximo e mínimo. As placas foram sensibilizadas com 500 ng de extrato protéico total de *C. neoformans* var. *grubii* HC6, a diluição do soro foi 1:1000 e a diluição do anticorpo secundário marcado com peroxidase foi de 1:2000. PBS foi utilizado como controle negativo.

Após o experimento de ELISA, as médias de cada soro foram plotadas no programa SPSS 10.0 para análise e obtenção da curva ROC (*receiver operator characteristic curve*)(ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007). A curva ROC é a melhor maneira de estabelecer o *cut-off*, otimizando a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico. Para isso, deve-se utilizar a média das amostras para determinar a sensibilidade e especificidade em cada ponto. Então, é gerado um gráfico de sensibilidade em função da proporção dos resultados falso-positivos. O teste ideal é aquele que alcança a extremidade mais superior e a esquerda do gráfico. Quanto melhor o teste, mais perto estará a linha do canto superior do gráfico, dessa forma gerando uma área sob a curva. Por esse motivo, quanto maior o valor de área sob a curva, melhor foi o teste, ou seja, maior sensibilidade e especificidade do experimento. O programa fornecerá um valor de sensibilidade e especificidade de cada amostra. Assim, utiliza-se a seguinte fórmula: Sensibilidade + (1- Especificidade). O valor encontrado será a soma das duas variáveis. Como *Cut-Off* escolhe-se o maior valor, pois esse foi o ponto o qual apresentou maior sensibilidade e especificidade. O *cut-off* encontrado para o experimento foi de 0,175 e a área sob a curva foi de 0,72 (Figura 15).

A determinação do *cut-off* pode ser feita a partir de uma fórmula simplificada. As amostras sabidamente negativas podem ser utilizadas para a obtenção desse dado. Deve-se obter a média das amostras negativas, em seguida o desvio padrão. Deverá ser acrescido na média 1, 2 ou ainda 3 desvios padrões para a determinação do *cut-off*. Porém esta fórmula leva à perda de sensibilidade ou especificidade, assim não sendo utilizada neste trabalho.

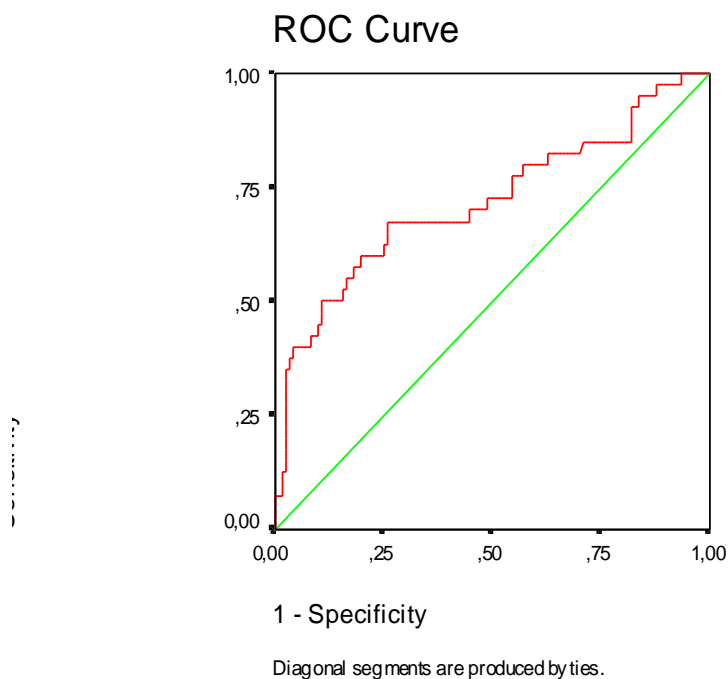


Figura 15: Curva ROC determinada por SPSS 10.0. A linha em vermelho delimita a área sobre a curva, ou seja, quanto maior essa área, maior sensibilidade e especificidade do experimento. No eixo x observa-se os valores referentes a especificidade e o eixo y apresenta os valores relacionados a sensibilidade do teste. Este gráfico nos remete para a seguinte interpretação: quanto mais deslocada a linha vermelha para o eixo y, maior foi a sensibilidade e especificidade do teste.

Neste trabalho foram testadas 40 amostras de pacientes com criptococose. Observou-se que 32,5% das amostras apresentaram resultados falsos negativos. Dos 82 soros utilizados como controle negativo, 35 amostras de voluntários do centro de Biotecnologia e 47 amostras de voluntários de um hospital de Porto Alegre, 26,82% apresentaram resultados positivos (Figura 16). Para verificar a reatividade cruzada com outras micoses, foram testadas 10 amostras de soros de pacientes com histoplasmose (20% de reatividade cruzada), 7 amostras de pacientes com aspergilose (14,28% de reatividade cruzada), 9 amostras de pacientes com paracoccidiodomicose (66,6% de reatividade cruzada) e 15 amostras de pacientes com candidose (13,3% de reatividade cruzada) (Figura 17).

Uma hipótese para a reatividade cruzada observada com soros de pacientes com outras micoses pode ser devido a prévias sensibilizações (contato com *Cryptococcus* spp.) ou ainda coinfeções por este fungo (dado não disponibilizado pelos laboratórios que forneceram as amostras).

Vários parâmetros devem ser analisados para a validação de um teste sorológico (FERREIRA & ÁVILA, 2001). A validade intrínseca de um teste, que é o desempenho do teste quando comparado a um teste de referência, pode ser avaliada por parâmetros como sensibilidade, especificidade e eficiência. Estes são característicos do teste e não da população em que ele está sendo aplicado e, portanto, fornecem resultados consistentes independentemente da prevalência da doença. Já os valores preditivos dos resultados positivos e negativos dos testes são parâmetros que dependem da prevalência da doença na população em estudo. A validade extrínseca é a capacidade do teste em detectar a real situação da população em relação à doença que está sendo estudada e também o desempenho do teste em uma dada população e pode ser avaliada por parâmetros como reprodutibilidade e precisão. Vários parâmetros foram avaliados nos nossos experimentos, sendo eles a sensibilidade, especificidade, eficiência do teste sorológico, prevalência, valores preditivos positivos e valores preditivos negativos.

A sensibilidade observada neste experimento foi de 67,5%. No trabalho desenvolvido para o diagnóstico de pitiose, utilizando no teste de ELISA indireto como antígeno o extrato protéico total de *Pythium insidiosum*, a sensibilidade foi de 97,72% (SANTÚRIO *et al.*, 2006). A sensibilidade observada no trabalho de Illnait *et al.* (2001) para a quantificação de antígenos de *C. neoformans* utilizando anticorpos policlonais no ELISA sanduíche, foi de 100% para soros e LCR (deve-se lembrar que o ELISA sanduíche é mais sensível que o ELISA indireto). Com a utilização de exoantígenos de *Sporothrix schenckii* observou-se no teste de ELISA uma sensibilidade de 97% (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007). No trabalho de Laín *et al.* (2007) utilizando o kit diagnóstico comercial que utiliza como antígeno uma enolase recombinante para candidíase (*kit* Candida enolasa ELISA Immunoglobulin G (IgG) – Laboratorios Vircell, Granada, Spain), observou-se uma sensibilidade de 81%.

A especificidade deste experimento foi de 73,2%. Observou-se especificidade de 90,27% em Santúrio *et al.* (2006) para a detecção de pitiose, 97,9% em soros e 95,9% em LCR em Illnait *et al.* (2001) para a criptococose, 89% em Almeida-Paes *et al.* (2007) para esporotricose, 83,9% em Laín *et al.* (2007) para a candidíase.

Este trabalho apresentou eficiência de 33,1%. Na detecção da pitiose observou-se eficiência de 93,1% (SANTÚRIO *et al.*, 2006), para criptococose foi de 99% para soros e 97,1% para LCR (ILLNAIT *et al.*, 2001), e para esporotricose a eficiência foi de 92% (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007).

O valor preditivo de um resultado positivo (VPP) verificado neste experimento foi de 45%, 86% em Santúrio *et al.* (2006) para a detecção de pitiose, 84% em Almeida-Paes *et al.* (2007) para esporotricose e 79,1% em Laín *et al.* (2007) para a candidose.

O valor preditivo de um resultado negativo (VPN) deste trabalho foi de 87,4%, para a detecção de pitiose foi de 98,4% (SANTÚRIO *et al.*, 2006), para esporotricose foi de 98% (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007) e em candidose o VPN foi de 85,5% (LAÍN *et al.*, 2007).

A prevalência é definida como a porcentagem de indivíduos doentes em uma população e a prevalência sorológica é a porcentagem de casos positivos pelo teste em uma população (FERREIRA & ÁVILA, 2001). Os resultados encontrados neste trabalho foram de 24,5% e 36,8%, respectivamente.

Os resultados obtidos utilizando como antígenos o extrato total de *C. neoformans* HC6 não foram satisfatórios. Por este motivo, partiu-se para a identificação de antígenos de *C. neoformans*, visando o aumento do repertório de proteínas antigênicas disponíveis para caracterização imunológica. A caracterização destes alvos permitirá a purificação ou produção de antígenos recombinantes para padronização de testes sorológicos para o diagnóstico da criptococose.

Santangelo *et al.* (2004) buscaram identificar características imunológicas da fosfolipase B (PLB). Esta enzima apresenta uma importante função na sobrevivência do fungo no interior de macrófagos, facilitando a infecção dos pulmões e a disseminação do fungo para outros locais do corpo. Também foi verificado que a mesma é produzida *in vivo* (SANTANGELO *et al.*, 2005). Devido a estas características, Wu e colaboradores (2007) realizaram a padronização da técnica de ELISA sanduíche, utilizando como alvo a identificação da PLB em soro de pacientes com criptococose. Porém, os resultados não demonstraram-se promissores, pois não foi possível detectar a PLB em pacientes com criptococose. Isso pode ter ocorrido devido à remoção de epítomos antigênicos pela formação do complexo antígeno-anticorpo, a presença de substâncias inibitórias no sangue ou ainda a rápida degradação da PLB no sangue. Para o monitoramento do tratamento da criptococose são interessantes esforços para a exploração de antígenos que poderão ser utilizados na incorporação de testes rápidos para a detecção da doença.

4.7 Identificação de proteínas antigênicas de *C. neoformans* HC6 por *Western blot* de gel unidimensional

Western blot foi realizado para verificar o padrão de reconhecimento das amostras de soros de pacientes com criptococose e outras micoses frente ao extrato protéico total de *C. neoformans* HC6. Os soros foram agrupados em *pools* conforme os dados obtidos do ELISA: soros de pacientes com criptococose que se apresentaram como falsos negativos (-); soros de pacientes que se apresentaram como verdadeiros positivos (+); soros de pacientes com aspergilose, histoplasmose e paracoccidiodomicose que apresentaram reatividade cruzada (falsos positivos) (+) e os que se apresentaram como verdadeiros negativos (Figura 18).

O *pool* de proteínas de *C. neoformans* HC6 utilizado nesse experimento apresentou massa molecular de 10-220 kDa. Verificou-se reconhecimento das proteínas antigênicas com massa molecular entre 30 kDa e 220 kDa apresentaram maior intensidade de sinal as proteínas com massa molecular superior a 40kDa. Verificou-se um reconhecimento intenso entre 40 kDa e 220 kDa o qual não possibilitou a caracterização de nenhuma banda específica, devido às sobreposições. Neste trabalho, foi analisado o reconhecimento de anticorpos da classe IgG, utilizando como traçador anti-IgG humano. No trabalho de Chay & Tay (2009) foram identificadas proteínas com massas moleculares entre 27,5 kDa e 94 kDa, no trabalho de Hamiltons e colaboradores (1997) foram identificadas proteínas com massa molecular de 26, 52, 74 e 110 kDa, já no trabalho de Goldman *et. al.* (2001) foram observadas proteínas com massas moleculares maiores, entre 98 e 139 kDa.

Na reatividade cruzada dos soros de pacientes com aspergilose, verificou-se um sinal intenso nas bandas de aproximadamente 28 kDa, 34 kDa, 50 kDa, 60 kDa e 70 kDa. Os soros de pacientes com paracoccidiodomicose apresentaram reatividade cruzada com as proteínas de massa molecular de 80 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa e 18 kDa. Os soros de pacientes com histoplasmose apresentaram maior reatividade com as proteínas de 70 kDa, 80 kDa, 55 kDa, 35 kDa e 27 kDa. Foi possível observar que algumas proteínas como as de 80 kDa e 70 kDa são reconhecidas por várias micoses. Estas podem ser a mesma proteína antigênica presente em ambos os fungos ou ainda serem proteínas diferentes, porém com massas moleculares semelhantes.

A micose que apresentou maior reatividade cruzada com o extrato total de *C. neoformans* HC6 foi a paracoccidiodomicose. No *pool* de pacientes com

paracoccidiodomicose que se apresentaram verdadeiramente negativos para criptococose em ELISA quando realizada a técnica de *western blot*, verificou-se a presença de uma banda de aproximadamente 40 kDa. Com esse dado, observou-se uma relação imunológica entre *Cryptococcus* spp. e *Paracoccidioides* spp. Uma banda mais intensa de aproximadamente 15 kDa pode ser observada no *pool* de soros de pacientes com criptococose (+). Esta banda aparenta ser de interesse, por não aparecer reativa com outros soros.

O trabalho de Chai & Tay (2009) descreve o perfil de reconhecimento de anticorpos da classe das IgG e IgM dos pacientes com criptococose e de indivíduos hígidos. Eles analisaram, por gel de poliacrilamida unidimensional, o perfil de reconhecimento dos antígenos de um extrato total obtido a partir de uma linhagem de *C. neoformans* var. *grubii* isolado de um paciente HIV positivo. Eles analisaram por *western blot* diferentes soros e baseados na intensidade da imunoreatividade das proteínas, verificaram que os indivíduos hígidos apresentam uma reatividade maior de IgG quando comparado com IgM. Os polipeptídeos com forte imunoreatividade para IgG de indivíduos hígidos foram de aproximadamente 31, 78, 83, 87, 91,5 e 94 kDa. As amostras de pacientes com criptococose apresentaram uma forte imunoreatividade para IgG e também para IgM. As proteínas com maior reatividade para IgG apresentam massas moleculares de aproximadamente 31, 45, 63, 65,5, 71,5, 76, 83, 87, 91,5 e 94 kDa. Três amostras de pacientes foram coletadas em diferentes tempos (2, 3 e 9 meses após a primeira coleta), mas não foi observada diferença na titulação entre as amostras.

A análise dos antígenos apenas por gel unidimensional não é suficiente para a escolha de um antígeno como biomarcador, porém é o primeiro passo para a escolha das etapas seguintes. Atualmente, há disponível várias técnicas, as quais permitem realizar pesquisas refinadas para encontrar o candidato antigênico mais apropriado.

O primeiro passo na produção de um antígeno recombinante é a escolha do mesmo (ELGUEZABAL *et al.*, 2005). A procura deverá ser iniciada pelos antígenos que apresentem características imunogênicas, ou seja, aqueles que desencadeiam uma resposta imune, de preferência acentuada. Os antígenos fúngicos podem ser considerados desde as estruturas superficiais a antígenos intracelulares. A escolha de um antígeno que confira características imunogênicas específicas à determinada infecção é essencial para evitar a reatividade cruzada com outros microrganismos ou ainda com estruturas do próprio organismo humano. Os metabólitos secretados ou ainda antígenos

expressos em condições especiais de infecção geralmente são potenciais candidatos para e escolha do antígeno.

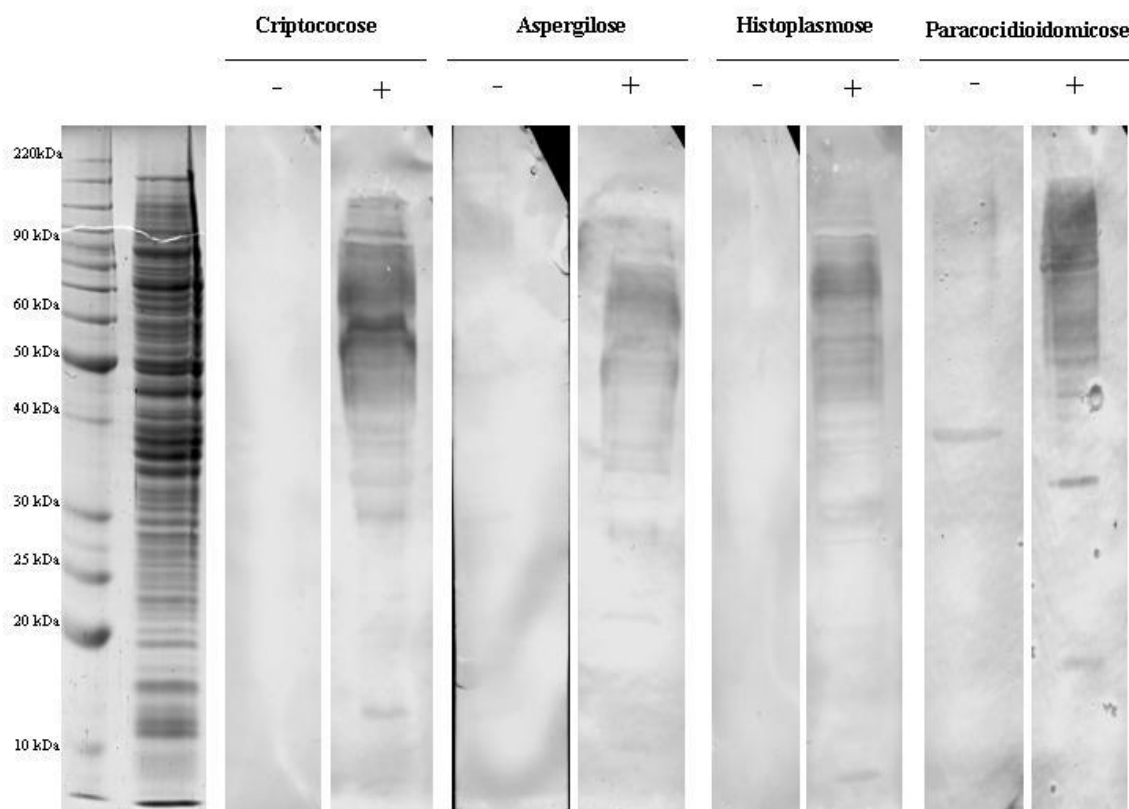


Figura 18: Padrão de reconhecimento dos antígenos de *C. neoformans* HC6 pelo *pool* de soros de pacientes com criptococose, paracoccidioidomicose, histoplasmose e aspergilose previamente testados pela técnica de ELISA. Western blot para verificação do padrão de reconhecimento das proteínas antigênicas de *C. neoformans* HC6 frente a soros de pacientes com criptococose, aspergilose, histoplasmose e paracoccidioidomicose. (+) aqueles que na técnica de ELISA apresentaram reatividade cruzada frente ao extrato protéico total de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e (-) aqueles que apresentaram-se como negativos frente ao mesmo extrato protéico. A diluição dos soros foi de 1:500 e o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com peroxidase foi diluído 1:2000.

4.8 Gel bidimensional para identificação de proteínas antigênicas de *C. neoformans* HC6 frente a soro de pacientes com criptococose.

O SDS-PAGE permitiu a caracterização das proteínas apenas pela sua massa molecular e com baixa resolução. Tratando-se de um extrato com maior complexidade, somente uma característica (massa molecular) não foi suficiente para individualização de proteínas antigênicas. Por esse motivo, foi feita a separação do extrato de *C. neoformans* HC6 por eletroforese bidimensional. A padronização do gel bidimensional foi realizada previamente no laboratório, onde se constatou que a faixa de pH 4-7 foi aquela na qual uma maior proporção de proteínas apresentava melhor resolução. No gel bidimensional (Figura 19) devido ao aumento da resolução, observou-se a presença de 659 spots entre a faixa de pH de 5-6,5 e a massa molecular dos mesmos entre 30- 160 kDa.

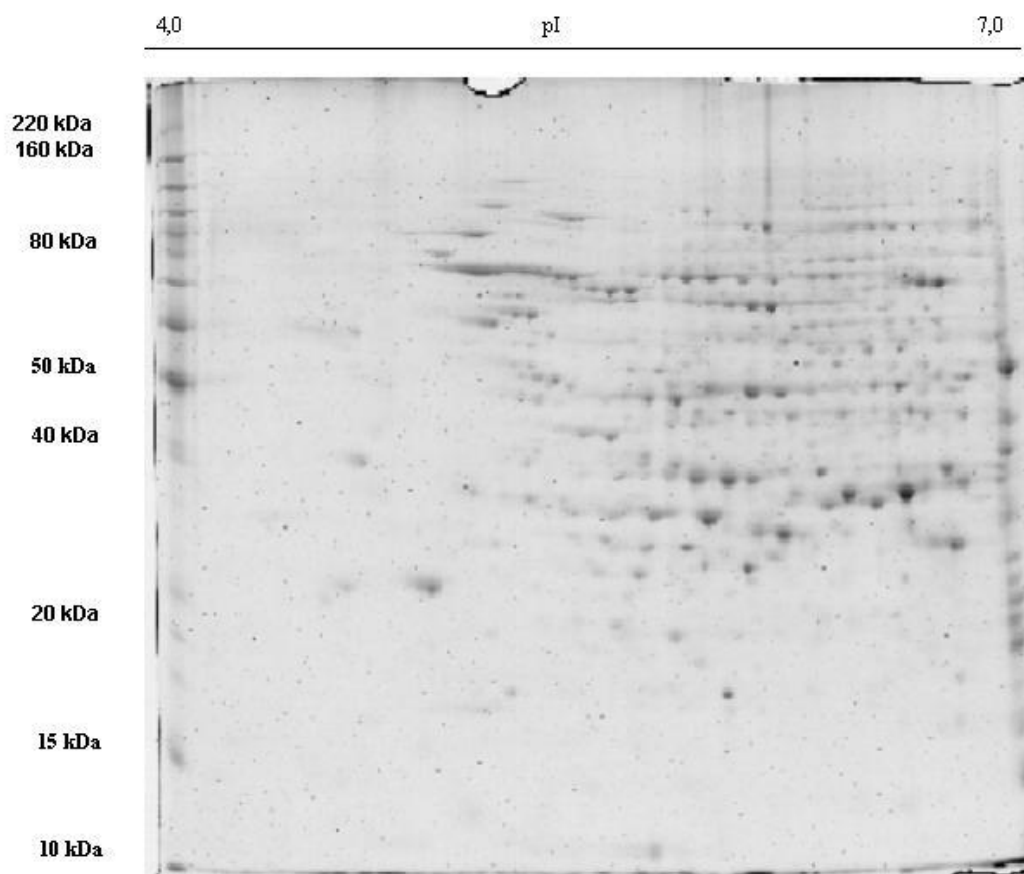
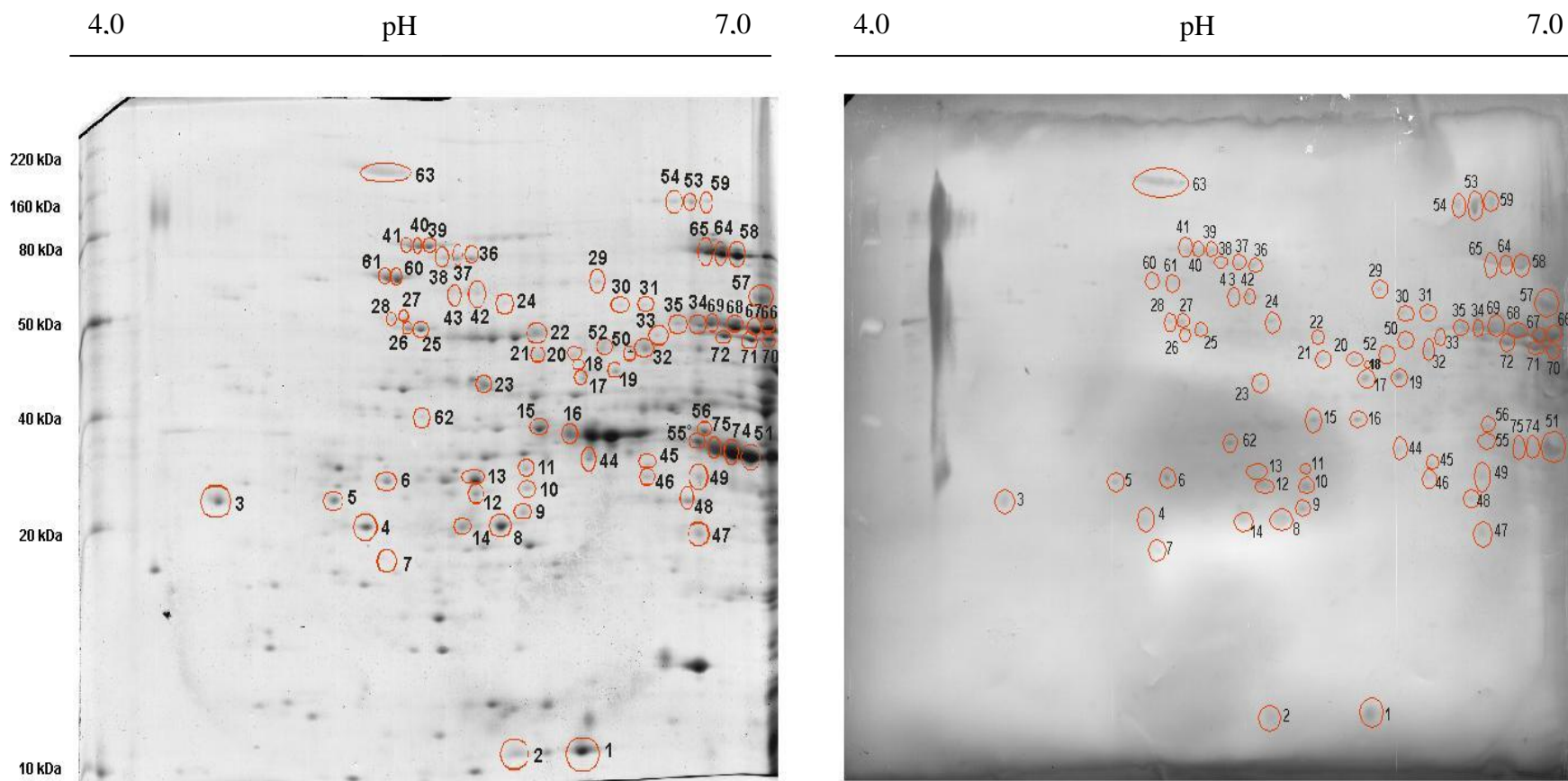


Figura 19: 2D-PAGE. Gel bidimensional com 1,2 mg de extrato total de proteína de *C. neoformans* HC6. Strip utilizado com pH 4-7, isofocalização de 70.000 V/H, migrado em gel de poliacrilamida 12% a 40 mA e corado com Coomassie Blue G.

4.9 Western blot de gel bidimensional para identificação de proteínas antigênicas de *C. neoformans* HC6 com soro de pacientes com criptococose.

Foi realizado *western blot* bidimensional com o objetivo de evidenciar as proteínas antigênicas do extrato total de *C. neoformans* HC6. Os resultados desejados foram obtidos na realização de gel bidimensional com 1,2 mg de extrato protéico total, diluição do soro primário (soro de pacientes com criptococose) 1:10 incubado *overnight* e diluição do anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina 1:2000.

Foram realizados dois géis em paralelo, um foi corado com Coomassie coloidal e o outro foi transferido para a membrana de PVDF. Foram recortados do gel os *spots* correspondentes aos visualizados na membrana, totalizando 75 *spots* (Figura 20). O pI e a massa correspondente a cada *spot* recortado estão listados na Tabela 8.



(A)

(B)

Figura 20: Análise por Western Blot de 2D-PAGE revelado com fosfatase alcalina. (A) 1,2 mg de extrato total de proteína de *C. neoformans* HC6. Strip utilizado com pH 4-7, isofocalização de 70.000 VH, migrado em gel de poliacrilamida 12% a 40 mA e corado com Coomassie Blue G. (B) As proteínas foram transferidas *overnight* para a membrana de PVDF, a mesma foi bloqueada e recebeu o *pool* de soro de pacientes com criptococose na diluição de 1:10. A diluição do anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina foi de 1:2000.

Tabela 8: Massa e pI dos spots selecionados.

| Amostra* | Massa (kDa) | pI | Amostra | Massa (kDa) | pI | Amostra | Massa (kDa) | pI |
|-----------------|------------------------|-----------|----------------|------------------------|-----------|----------------|------------------------|-----------|
| 1 | 10,9 | 6.1 | 26 | 48,6 | 5.4 | 51 | 30,9 | 6.9 |
| 2 | 10,8 | 5.8 | 27 | 50,1 | 5.3 | 52 | 45,5 | 6.2 |
| 3 | 26,4 | 4.5 | 28 | 50,3 | 5.3 | 53 | 75,9 | 6.6 |
| 4 | 24,1 | 5.2 | 29 | 57,3 | 6.2 | 54 | 76,2 | 6.5 |
| 5 | 26,5 | 5.0 | 30 | 52,9 | 6.3 | 55 | 32,5 | 6.6 |
| 6 | 28,3 | 5.3 | 31 | 52,9 | 6.4 | 56 | 33,7 | 6.7 |
| 7 | 20,9 | 5.4 | 32 | 45,5 | 6.4 | 57 | 58,8 | > 7,0 |
| 8 | 24,1 | 5.8 | 33 | 47,6 | 6.5 | 58 | 63,3 | 6.8 |
| 9 | 25,4 | 5.9 | 34 | 49,6 | 6.6 | 59 | 76,2 | 6.7 |
| 10 | 27,6 | 5.9 | 35 | 50,6 | 6.7 | 60 | 57,8 | 5.3 |
| 11 | 29,6 | 5.9 | 36 | 62,2 | 5.6 | 61 | 58,6 | 5.2 |
| 12 | 27,1 | 5.6 | 37 | 62,2 | 5.6 | 62 | 28,3 | 5.3 |
| 13 | 28,3 | 5.6 | 38 | 62,4 | 5.5 | 63 | 84,4 | 5.3 |
| 14 | 24,1 | 5.6 | 39 | 65,4 | 5.5 | 64 | 63,3 | 6.8 |
| 15 | 34,1 | 5.9 | 40 | 64,9 | 5.4 | 65 | 64,3 | 6.7 |
| 16 | 32,3 | 6.1 | 41 | 65,9 | 5.3 | 66 | 48,3 | 6.9 |
| 17 | 40,2 | 6.1 | 42 | 55,8 | 5.6 | 67 | 49,1 | 6.8 |
| 18 | 41,5 | 6.1 | 43 | 55,7 | 5.5 | 68 | 50,1 | 6.8 |
| 19 | 41,8 | 6.3 | 44 | 31,2 | 6.2 | 69 | 49,5 | 6.7 |
| 20 | 45,1 | 6.1 | 45 | 30,0 | 6.4 | 70 | 46,8 | > 7,0 |
| 21 | 47,1 | 6.1 | 46 | 28,7 | 6.4 | 71 | 46,7 | 6.9 |
| 22 | 48,0 | 5.9 | 47 | 22,9 | 6.7 | 72 | 47,4 | 6.8 |
| 23 | 39,7 | 5.7 | 48 | 26,4 | 6.6 | 73 | 30,9 | 6,9 |
| 24 | 55,2 | 5.7 | 49 | 28,2 | 6.7 | 74 | 31,4 | 6.8 |
| 25 | 48,2 | 5.4 | 50 | 45,0 | 6.4 | 75 | 32,0 | 6.7 |

*Os números correspondes aos spots marcados no gel da Figura 13

> refere-se que o ponto isoelétrico da amostra é maior que 7,0, portanto a mesma não pode ser analisada com a mesma precisão que as demais para esta variável.

4.10 Imunização de camundongos para a produção de soro policlonal contra proteínas antigênicas de *C. neoformans* HC6.

Os camundongos foram imunizados para a obtenção de soro policlonal contendo anticorpos contra o extrato protéico total de *C. neoformans* HC6. O soro foi produzido com a intenção de auxiliar na identificação de proteínas antigênicas do extrato total de *C. neoformans* HC6, caso o objetivo não fosse alcançado utilizando o *pool* de soros de pacientes com criptococose (possível baixa titulação). Estes soros foram testados por ELISA para verificar a titulação dos mesmos. Foram testadas as seguintes concentrações de extrato protéico total de *C. neoformans* HC6: 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng e 15,62 ng por poço (Figura 21). A concentração de 30 ng (0,3 µg/mL) de extrato total de *C. neoformans* HC6 por poço para a sensibilização foi suficiente para a titulação do soro hiperimune. Nesta concentração foi possível diferenciar entre o soro pré-imune (soro coletado dos camundongos antes do início da imunização) dos soros posteriores à imunização. Utilizando um soro hiperimune a concentração de antígenos utilizada para a sensibilização dos poços foi 17 vezes menor que a concentração necessária para a detecção de anticorpos em pacientes com criptococose.

Após encontrar a concentração ideal de antígeno, foram testadas seis diferentes diluições dos soros dos camundongos imunizados (1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400). A diluição de 1:3200 foi a que apresentou melhores resultados. Com esta diluição os resultados de OD não ultrapassaram 1, permitindo uma análise confiável (Figura 22).

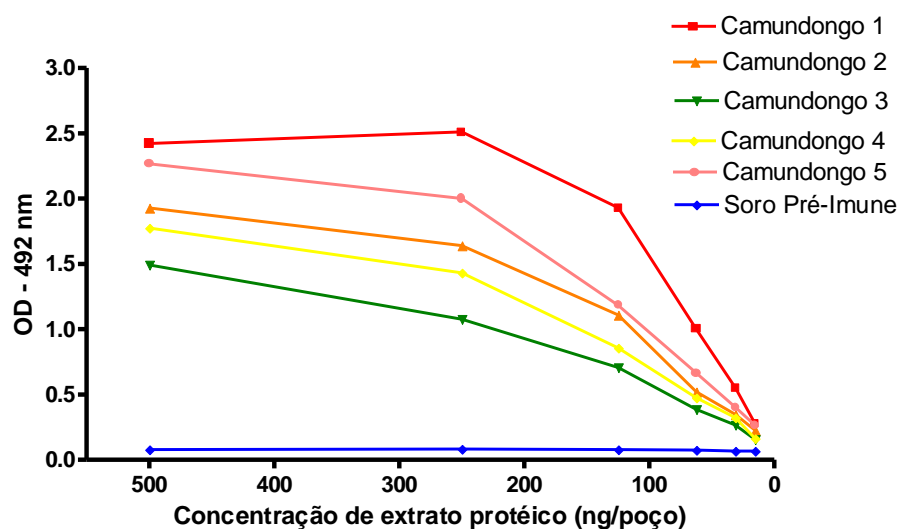


Figura 21: Padronização da concentração de antígeno de extrato total de *C. neoformans* HC6 para ELISA de soros de camundongos imunizados. Foram testadas seis diferentes concentrações de extrato total de extrato protéico de *C. neoformans* HC6, sendo as concentrações de 500 ng/poço, 250 ng/poço, 125 ng/poço, 62,5 ng/poço, 31,25 ng/poço e 15,62 ng/poço. A diluição do soro dos camundongos foi de 1:200 e do anti-gG mouse conjugado com peroxidase foi de 1:2000.

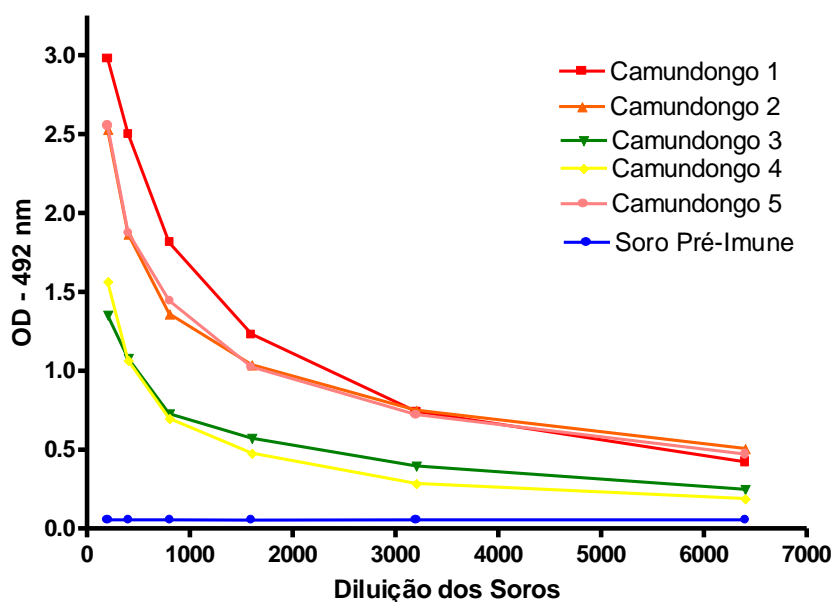


Figura 22: Titulação das amostras de soro dos camundongos por ELISA. Foram testadas seis diferentes diluições: 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400. A concentração de antígeno de *C. neoformans* HC6 por poço foi de 30 ng. A diluição do anti-IgG mouse conjugado com peroxidase foi de 1:2000.

Uma vez titulados os soros hiperimunes de camundongos contra extrato de *C. neoformans*, foi realizado um *western blot* para verificação do padrão de reconhecimento de cada soro. Verificou-se que cada um dos soros apresentou resposta diferenciada (Figura 23), mesmo tendo sido os animais imunizados com o mesmo extrato antigênico e seguindo o mesmo protocolo.

Essas diferenças podem ser devido ao sistema imunológico, a diferenças de quantidade de antígenos (foram preparadas soluções de forma uniforme entre os animais, porém no momento da imunização, por se tratar de uma solução viscosa, os animais podem ter recebido quantidades finais diferentes de antígenos), diferenças de manipulação no momento da injeção da solução ou ainda as diferenças de titulação de anticorpos de cada soro, como observado através do experimento de ELISA.

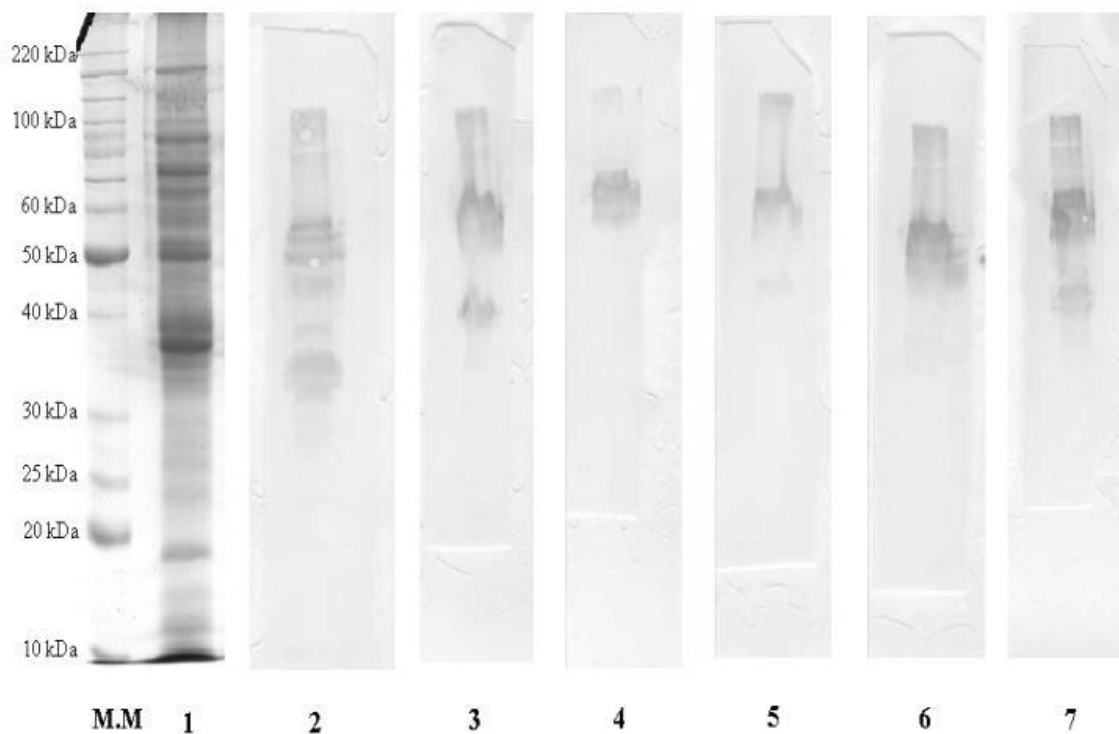


Figura 23: *Western blot* de soros policlonais de camundongos imunizados com extrato total de proteínas de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (HC6). M.M, marcador molecular, 1: extrato total de proteínas de *C. neoformans* HC6 em SDS-PAGE 12%; 2-6 Padrão de reconhecimento individual de cada camundongo, 2 camundongo 1; 3: camundongo 2; 4: camundongo 3; 5: camundongo 4; 6: camundongo 5; 7: padrão de reconhecimento do *pool* de soros policlonais dos camundongos. A diluição utilizada neste experimento do soro dos camundongos foi de 1:500. Anti-IgG mouse conjugado com peroxidase foi utilizada na diluição de 1:2000.

4.11 Identificações das proteínas de *C. neoformans* HC6 por MALDI-TOF

A utilização da técnica de 2D-PAGE para a separação do extrato protéico é um passo importante para a seleção do *spot* a ser tripsinizado e através da análise em MALDI-TOF a massa resultante das proteínas pode ser determinada. Uma vez identificada a seqüência codificadora correspondente, é possível desenhar *primers* para a clonagem e purificação do antígeno selecionado. Esta é uma das alternativas para a obtenção de antígeno recombinante (ELGUEZABAL *et al.*, 2005).

Nesta etapa do trabalho, buscou-se a relação entre as proteínas antigênicas verificadas na membrana de PVDF (característica de antigenicidade) e as proteínas do gel. As proteínas correspondentes às identificadas no *western blot* foram recortadas do gel de poliacrilamida, tripsinizadas, e analisadas em MALDI-TOF. Foram analisadas 75 proteínas, porém apenas 15 amostras apresentaram espectros de íons passíveis de identificação e quando confrontados com o banco de dados de proteínas de *C. neoformans* var. *grubii* foram identificadas apenas quatro amostras (três proteínas) (Tabela 9). Mesmo o MALDI/TOF sendo um equipamento mais sensível que o Q-Tof, pois este apresenta maior poder de ionização, a análise do mesmo não é tão robusta quanto a análise por MS/MS.

Tabela 9: Identificação de proteínas por MS. Pode ser observada nesta tabela os dados como o número de identificação do gel, o número de acesso ao NCBI, o nome da proteína, pI e massa molecular teórico e o observado, o score e a porcentagem de cobertura da seqüência.

| Nº do spot | Nome da proteína | Nº de acesso ^a | Valores teóricos de pI/MM(kDa) | pI/M.M Observados (kDa) ^b | Score de identificação | Cobertura da seqüência (%) |
|------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| 6 | Proteína hipotética | Q5KAY1 | 5.07 / 31049.13 | 5.3 / 28,4 | 96 | 72 |
| 39 | Proteína de choque térmico | Q5K8W5 | 5.57 / 71466.77 | 5.4 / 58,3 | 98 | 25 |
| 40 | Proteína de choque térmico | Q5K8W5 | 5.57 / 71466.77 | 5.3 / 58.6 | 98 | 25 |
| 57 | Catalase 2 | ABG26353 | 6.96 / 55448.56 | 7.0 / 54.3 | 90 | 27 |

^a Número do acesso de acordo com o NCBI. ^bValores experimentais de M.M e pI (cálculos utilizando o programa PDQuest-BioRad).

A análise proteômica tem se estabelecido como uma ferramenta indispensável para a interpretação das informações contidas no código genético (AEBERSOLD & MANN, 2003). A análise de proteínas por espectrometria de massas tem sido aplicada para

pequenos grupos de proteínas isoladas de um mesmo contexto funcional. MALDI-MS é normalmente utilizado para a análise de um pequeno conjunto de peptídeos (uma proteína).

O fungo patogênico *Aspergillus clavatus* é o que apresenta uma proteína com maior semelhança a proteína hipotética (300 aminoácidos) identificada no nosso experimento.

O espectro observado dos spots 39 e 40 identificou estas como sendo a mesma proteína (putativa de 667 aminoácidos), pertencente a família das HSP 70, porém apenas com pI diferentes (5,4 e 5,3, respectivamente), o que sugere modificações pós-traducionais. O fungo patogênico que se apresentou com proteína semelhante foi *Aspergillus nidulans*.

As proteínas HSPs são sintetizadas por todas as células em resposta a variação da temperatura bem como ao estresse ambiental, estas proteínas agem como chaperonas (KAKEIA *et al.*, 1999).

A. clavatus. foi o fungo patogênico que apresentou proteína com maior similaridade a catalase 2 (495 aminoácidos) identificada neste trabalho.

O número de proteínas identificadas em relação aos *spots* selecionados foi relativamente baixo, pois foram selecionados 75 *spots* e identificadas somente quatro amostras (três proteínas). Porém, estas proteínas são importantes já que a literatura apresenta a catalase e as HSPs de *C. neoformans* como possíveis antígenos para a padronização de técnicas imunológicas (ELGUEZABAL *et al.*, 2005). Os dados obtidos corroboram os trabalhos que referenciam proteínas da família das HSPs como potenciais biomarcadores para a criptococose (KAKEIA *et al.*, 1997, 1999). No trabalho de Young e colaboradores (2009) foram identificadas 24 proteínas, destas, três HSPs 70, uma HSP 90 e cinco hipotéticas.

No trabalho desenvolvido por JEAUVONS *et al.* (1998), foram selecionados antígenos candidatos para a padronização de técnicas para diagnóstico sorológico da peniciliose. Entre os candidatos, foi utilizada uma proteína a qual apresentava 87% de similaridade com a catalase de *Escherichia coli*. Este é um dos fatores de virulência de muitos fungos e induz a resposta imune. A presença da catalase em outros fungos como *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus fumigatus* indica as diferenças antigênicas desta enzima, pois os autores realizaram a técnica de *western blot* utilizando soros de pacientes com histoplasmose e aspergilose e não verificaram sinal de reatividade cruzada. Este dado fortalece esta pesquisa, pois os primeiros dados obtidos neste

trabalho indicam a catalase de *Cryptococcus* spp. como um possível marcador sorológico para a criptococose. Alguns experimentos devem ser repetidos para a confirmação deste dado.

Utilizando uma proteína de 27 kDa para diagnóstico da paracoccidioidomicose, foi verificada baixa especificidade e significativa reatividade cruzada com soro de pacientes com histoplasmose e aspergilose (ORTIZ *et al.*, 1998). A baixa especificidade do anticorpo pela proteína de 27 kDa, pode ser devido a presença de um único epítipo imunodominante. Um “coquetel” de antígenos poderia auxiliar no aumento da especificidade para o diagnóstico da paracoccidioidomicose. No trabalho de DIÉZ *et al.* (2003) foram utilizadas duas proteínas como biomarcadores, a proteína previamente testada de 27kDa e a outra de 87 kDa, sendo esta última uma proteína da família das HSPs (DIÉZ *et al.*, 2003). O uso conjunto de ambos os antígenos, apresentou uma sensibilidade de 92%. A sensibilidade observada somente com a 27 kDa foi de 49%, a proteína de 87 kDa apresentou sensibilidade de 81%. A combinação entre uma proteína hsp com outra proteína demonstrou-se eficiente para o diagnóstico desta infecção.

Para o diagnóstico da coccidioidomicose, utiliza-se assim como para criptococose a demonstração do fungo por meio do isolamento do *Coccidioides immitis* de tecido ou de cultura. É possível diagnosticar por meio de ensaios de fixação do complemento (CF) ou imunodifusão, o qual permite a detecção de anticorpos contra *C. immitis*. Para ambas as técnicas utilizam-se extrato total do fungo, o qual aumenta a reatividade cruzada com outros fungos. Foi produzido um antígeno recombinante para CF (rCF) para auxiliar no diagnóstico da coccidioidomicose, porém o rCF apresentou epítomos comuns para *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* e também foi observado que esta proteína apresenta seqüências de aminoácidos parcialmente homólogas com dois domínios conservados presentes em quitinases de alguns fungos e bactérias. A modificação molecular da rCF pode ser a solução para a reatividade cruzada observada (YANG *et al.*, 1997).

Existem vários antígenos de interesse para o diagnóstico da aspergilose causada por *A. fumigatus*, são eles Asp f1, f2, f3, f4, f5, f6, f12 e f16. No trabalho desenvolvido por Knusten *et al.* (2004) foram verificados altos níveis de IgE para os antígenos Asp f3 e f4 em pacientes com ABPA. Outro antígeno de interesse para o diagnóstico da aspergilose é uma galactomanoproteína da parede celular, denominada de Afmp1 (WOO, *et al.*, 2002). Utilizando este antígeno verificou-se sensibilidade de 100% para pacientes com aspergiloma e 33% para pacientes com aspergilose invasiva e não foi

verificado falso-positivo em soro de indivíduos hígidos bem como soros de pacientes com outras infecções.

Na verificação da antigenicidade de 15 proteínas recombinantes de *Candida spp.* verificou-se resposta para 4 destas, sendo elas, proteínas intracelulares (ENO1, HWP1, manana e CGTA) (CLANCY *et al.*, 2008). Outro antígeno de interesse para diagnóstico da candidose é um antígeno de parede celular do tubo germinativo da hifa, denominado de Hwp I. Comparando este antígeno com o antígeno do tubo germinativo de *C. albicans* (CGTA), verificaram-se resultados muito similares.

Faz-se necessário a caracterização de antígenos para serem eleitos como padrões para o diagnóstico das doenças fúngicas. Atualmente conhecemos alguns antígenos já bem caracterizados para outras infecções, assim como nas infecções virais que nos permite padronização dos testes imunológicos, HIV (p24, gp 36, gp41, gp 120), hepatite C (core, NS 3, NS 4, NS 5), sífilis (TpN 15, TpN 17, TpN 44.5, TpN47) entre outras.

A urgência no estabelecimento de rotinas diagnósticas das infecções fúngicas está na necessidade primária da implementação das terapias antifúngicas. Para isso, é de extrema importância o desenvolvimento de testes sensíveis, específicos, reprodutíveis e que apresentem a probabilidade de reatividade cruzada próxima à zero. O trabalho com antígeno recombinante é o que possibilita a reunião de todas estas características.

Após eleito o antígeno, o mesmo pode ser utilizado para diferentes técnicas imunológicas, sendo elas imunodifusão, ELISA, *western blot*, quimioluminescência, testes rápidos: imunocromatografia (fluxo lateral) ou imunocentralização (*flow-through*) entre outros.

5. CONCLUSÕES

O ELISA utilizando como antígeno o extrato protéico total de *C. neoformans* HC6 apresentou sensibilidade de 67,5% e especificidade de 73,2%.

Na imunização dos camundongos, foi verificada diferente resposta imunológica entre os animais, porém sendo possível a obtenção de um soro policlonal contra *C. neoformans* var. *grubii* HC6.

Foram detectados 659 *spots* no gel bidimensional e destes, 75 apresentaram-se antigênicos.

Embora a seleção dos 75 *spots* tenha levado a identificação de somente quatro amostras (três proteínas) neste trabalho, a catalase 2 e HSPs 70 demonstraram-se como fortes candidatas para o desenvolvimento de testes diagnósticos da criptococose humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R. & MANN, R. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422: 198-207, 2003.

ALMEIDA-PAES, R., PIMENTA, M. A., PIZZINI, C. V., MONTEIRO, P. C. F., PERALTA, M. J., NOSANCHUK, J. D., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Use of mycelial-Phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent Assay for Diagnosis of Sporotrichosis by Antibody Detection. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 244–249, 2007.

ALSPAUGH, J. A., CAVALLO, L. M., PERFECT, J. R., HEITMAN, J. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 36: 352-365, 2000.

ALVAREZ, M., SAYLOR, C., CASADEVALL, A. Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. *Cell. Microbiol.* 10: 1622-1633, 2008.

AMIR, L. H. & PAKULA, S. Nipple pain, mastalgia and candidiasis in the lactating breast. *Aus. NZ. J. Obstet. Gynaecol.* 31: 378-80, 1991.

BARRETO DE OLIVEIRA, M. T., BOEKHOUT, T., THEELEN, B., HAGEN, F., BARONI, F. A., LAZERA, M. S., LENGELER, K. B., HEITMAN, J., RIVERA, I. N. G., PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1356-1359, 2005.

BHATTACHARJEE, A. K., BENNET, J. E., GLAUDEMANS, C. P. J. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.* 6: 619-624, 1984.

BICANIC, T. & HARRISON, T.S. *Cryptococcal meningitis*. *Br. Med. Bull.* 72: 99-118, 2004.

BIONDO, C., MESSINA, L., BOMBACI, M., MANCUSO, G., MIDIRI, A., BENINATI, C., CUSUMANO, V., GERACE, E., PAPASERGI, S., TETI, G. Characterization of two novel cryptococcal mannoproteins recognized by immune sera. *Infect. Immun.* 73: 7348-7355, 2005.

BOSE, I., REESE, A. J., ORY, J. J., JANBON, G. DOERING, T. L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 2: 655-663, 2003.

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

BRUMMER, E., STEVENS, D. A. Anticryptococcal activity of macrophages: role of mouse strain, C5, contact, phagocytosis, and L-arginine. *Cell. Immunol.* 157: 1-10, 1994.

BULMER, G. S., SANS, M. D. *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. *J. Bacteriol.* 94: 1475-1479, 1967.

CARVALHO, K. C., VALLEJO, M. C., CAMARGO, Z. P., PUCCIA, R. Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 622-629, 2008.

CASADEVALL, A. MUKHERJEE, J., SCHARFF, D. Monoclonal antibody based ELISAs for *Cryptococcus* polysaccharide. *J. Immunol. Methods.* 154: 27-35, 1992.

CASADEVALL, A. & PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology, Washington, 1998.

CASADEVALL, A. ROSAS, A. L., NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 354-358, 2000.

CASALI, A. K., GOULART, L., ROSA E SILVA, L. K., RIBEIRO, A. M., AMARAL, A. A., ALVES, S. H., SCHRANK, A., MEYER, W., VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS.* 3: 405-415, 2003.

CHAI, H. C. & TAY, S. T. Detection of IgM and IgG antibodies to *Cryptococcus neoformans* proteins in blood donors and HIV patients with active cryptococcosis. *Mycoses*, 52: 166-170, 2009.

CHARIYALERTSAK, S. SIRISANTHANA, T. SAENGWONLOEY, O. NELSON, K. Clinical presentation and risk behavior of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994-1998: Regional variation and temporal trends. *Clin. Infect. Dis.* 32: 955-962, 2001.

CLANCY, C. J., NGUYEN, M. L., CHENG, S., HUANG, H., FAN, G., JABER, R. A., WINGARD, J. R., CLINE, C. NGUYEN, M. H. Immunoglobulin G responses to a panel of *Candida albicans* antigens as accurate and early markers for the presence of systemic candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1647-1654, 2008.

CHEN, Y. C., CHANG, S. C., SHIH, C. C., HUNG, C. C., LUHBD, K. T. PAN, Y. S. HSIEH, W. C. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 175-183, 2000.

CHERNIAK, R. VALAFAR, H. MORRIS, L. C. VALAFAR, F. *Cryptococcus neoformans* analysis of ¹H nuclear magnetic resonance spectra of glucuronoxylomannans with a computer-simulated artificial neural network. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 146-159, 1998.

COLLINS, H. L., BANCROFT, G. J. Cytokine enhancement of complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of tumor necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Immunol.* 22: 1447-1454, 1992.

COMPOTON, S. J., JONES C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 151: 369-374, 1985.

DAMMERT, P. BUSTAMANTE, B. TICONA, E. LLANOS-CUETANTAS, A. HUAROTO, L. CHÁVEZ, V. M. CAMPOS, P. E. Treatment of cryptococcal meningitis in Peruvian AIDS patients using amphotericin B and fluconazole. *J. Infect.* 57: 260-265, 2008.

DATTA, K, LEES, A. PIROFSKI, L. Therapeutic efficacy of a conjugated vaccine containing a peptide mimotope of the cryptococcal capsular polysaccharide glucuroxylomannan (GXM). *Clin. Vaccine. Immunol.* 15: 1176-1187, 2008.

DIAMOND, R. D, ROOT, R. K., BENNETT, J. E. Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes in vitro. *J. Infect. Dis.* 125: 367-376, 1972.

DIAMOND, R. D., BENNETT, J. E. Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages in vitro. *Infect. Immun.* 7: 231-237, 1973.

DIAMOND, R. D., BENNETT, J. E. Prognostic factors in cryptococcal meningitis. A study in 111 cases. *Ann. Intern. Med.* 80: 176-181, 1974.

DIÉZ, S., GOMEZ, B. L., McEWEN, J. G., RESTREPO, A., HAY, R. J. HAMILTON, A. J. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-Kilodalton and purified 87-Kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1536-1542, 2003.

DROMER, F. BERNED-BAUDUIN, C. GUILLEMOT, D. LORTHOLARY, O. Major role for Amphotericin-B-Fluocytosine combination in severe cryptococcosis. *PLOS ONE*. 3. 2008.

DUPONT, B., GRAYBILL, J. R., ARMSTRONG, G. LAROCHE, R., TOUZÉ, J. E., WHEAT, L. T. Fungal infections in AIDS patients. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 19-28, 1992.

ELGUEZABAL, N., LOPITZ-OTSOA, F., LAÍN, A., de LARRINOA, I. F., MORAGUES, M. D., PONTÓN, J. Serodiagnosis of mycoses using recombinant antigens. *Mycopathologia*. 160: 97-109, 2005.

ENACHE-ANGOULVANT, A. CHANDENIER, J. SYMOENS, F., LACUBE, P., BOLOGNINI, J., DOUCHET, C., POIROT, J. L., HENNEQUIN, C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1261-1265, 2007.

FELDMESSER, M., KRESS, Y., NOVIKOFF, P., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Immun.* 68: 4225-4237, 2000.

FELDMESSER, M., TUCKER, S., CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends. Microbiol.* 9: 273-278, 2001.

FERREIRA, W. A. ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

FLESCHE, I. E, SCHWAMBERGER, G., KAUFMANN, S.H. Fungicidal activity of IFN-gamma-activated macrophages. Extracellular killing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 142: 3219-3224, 1989.

FRANZOT, S. P., HAMDAN, J. S., CURIE, B. P. CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2243-2251, 1997.

FRANZOT, S. P., SALKIN, I. F., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37: 838-840, 1999.

FRENCH, N. GRAY, K. WATREA, C. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. *AIDS*. 16: 1031-1038, 2002.

GANZ, T., SELSTED, M. E., SZKLAREK, D., HARWIG, S. S., DAHER, K., BAINTON, D. F., LEHRER, R. I. Defensins natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76: 1427-1435, 1985.

GARCIA-HERMOSO, D. JANBON, G. DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3204-3209. 1999.

GATES, M. A., THORKILDSON, P. KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol. Microbiol.*, 52: 13-24, 2004.

GRANGER, D. L., PERFECT, J. R., DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J. Clin. Invest.* 76: 508-516, 1985.

GOLDMAN, L.D., KHINE, H., ABADI, J., LINDENBERG, D. J., PIROFSKI, L., NIANG, R., CASADEVALL, A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection early childhood. *Pediatrics*, 107: 1-6, 2001.

GORDON, M. A., VEDDER, D. K. Serologic test in diagnosis and prognosis of cryptococcosis. *JAMA.* 197: 961-965, 1996.

GORDON, S. B., WALSH, A. L., CHAPONDA, M. Bacterial meningitis in Malawia adults: pneumococcal disease is common, severe, and seasonal. *Clin. Infect. Dis.* 31: 53-57, 2000.

GROHMANN, P. H., FRAGA, C. F. A, ABE, A. T. Aids: uma revisão sobre aspectos epidêmicos, imunitários e profiláticos. *Folha Médica*, 95: 73-8, 1993.

HAMILTON, A. J., FIGUEROA, J. I., JEAUVONS, L., SEATON, R. A. Recognition of cytoplasmic yeast antigens of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by immune human sera. *Immunol. Med. Microbiol.* 17: 111-119, 1997.

HIEMSTRA, P. S., EISENHAUER, P. B., HARWIG, S. S., van den BARSELAAR, M. T., van FURTH R., LEHRER, R. I. Antimicrobial proteins of murine macrophages. *Infect. Immun.* 61: 3038-3046, 1993.

HUANG, C., NONG, S. H., MANSOUR, M. K., SPECHT, C. A., LEVITZ, S. M. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from

Cryptococcus neoformans that stimulates T-Cell responses. *Infect. Immun.* 70: 5485-5493, 2002.

IDNURM, A., BAHN, Y.S., NIELSEN, K., LIN, X., FRASER, J. A., HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 753-764, 2005.

ILLNAIT, M. T., VILASECA, J. C., FERNÁNDEZ, C. M., MARTÍNEZ, G. F. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of *Cryptococcus neoformans* antigen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 241-245, 2001.

JEAVONS, L., HAMILTON, A. J., VANITTANAKOM, N., UNGPAKORN, R., EVANS, E. G. V., SIRISANTHANA, T., HAY, R. J. Identification and purification of specific *Penicillium marneffeii* antigens and their recognition by human immune sera. *J. Clin. Microbiol.* 36: 949-954, 1998.

KAKEIA, H., UDONO, H., IKUNO, N., YAMAMOTO, Y., MITSUTAKE, K., MIYAZAKI, T., TOMONO, K., KOGA, H., TASHIRO, T., NAKAYAMA, E., KOHNO, S. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis. *Infect. Immun.* 65: 1653-1658, 1997.

KAKEYA, H., UDONO, H., MAESAKI, S., SASAKI, E., KAWAMURA, S., HOSSAIN, M. A., YAMAMOTO, Y., SAWAI, T., FUKUDA, M., MITSUTAKE, K., MIYAZAKI, Y., TOMONO, K., TASHIRO, T., NAKAYAMA, E. Heat shock protein 70 (hsp70) as a major target of the antibody response in patients with pulmonary cryptococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 115: 485-490, 1999.

KELLER, R. G., PFROMMER, G. S., KOZEL, T. R. Occurrences, specificities, and functions of ubiquitous antibodies in human serum that are reactive with the *Cryptococcus neoformans* cell wall. *Infect. Immun.* 62: 215-220, 1994.

KIDD, S. E., HAGEN, F., TSCHARKE, R. L., HUYNH, M., BARTLETT, K. H., FYFE, M., MACDOUGALL, L., BOEKHOUT, T. KWON-CHUNG, K. J., MEYER, W., A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 17258-17263, 2004.

KNUSTEN, A. P., HUTCHESON, P. S., SLAVIN, R. G. KURUP, V. P. IgE antibody to *Aspergillus fumigatus* recombinant allergens in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy.* 59: 198-203, 2004.

KOZEL, T. R. Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Arch. Med. Res.* 24: 211-218, 1993.

KOZEL, T. R. & CAZIN, J. Jr. Nonencapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. I. Virulence studies and characterization of soluble polysaccharide. *Infect. Immun.* 3: 287-294, 1971.

KOZEL, T. R., GULLEY, W. F., CAZIN, J. Jr. Immune response to *Cryptococcus neoformans* soluble polysaccharide: immunological unresponsiveness. *Infect. Immun.* 18: 701-707, 1977.

KOZEL, T. R., WILSON, M. A., PFROMMER, G. S., SCHLAGETER, A. M. Activation and binding of opsonic fragments of C3 on encapsulated *Cryptococcus neoformans* by using an alternative complement pathway reconstituted from six isolated proteins. *Infect. Immun.* 57: 1922-1927, 1989.

KWON-CHUNG, K. J., BOEKHOUT, T., FELL, J. W. DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (*Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremelloomycetidae*). *Taxonomy.* 51: 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K. J., RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 51: 218-223, 1986.

KWON-CHUNG, K. J., BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 120: 123-130, 1984.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-85, 1970.

LAÍN, A., MORAGUES, M. D., RUIZ, J. C. G., MENDOZA, J., CAMACHO, A., DEL PALACIO, A., PONTÓ, J. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect immunoglobulin G antibody to enolase for serodiagnosis of invasive candidiasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 318-319, 2007.

LEAL, A. L., FAGANELLO, J., BASSANESI, M. C., VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus* species identification by Multiplex PCR. *Med. Mycol.* 46: 377-383, 2008.

LEAL, A. L., FAGANELLO, J., FUENTEFRIA, A. M., BOLDO, J. T., BASSANESI, M. C., VAINSTEIN, M. H. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia.* 166: 71-75, 2008.

LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev. Infect. Dis.* 13: 1163-1167, 1991.

LEVITZ, S. M., NONG, S. H., SEETOO, K. F. HARRISON, T. S. SPEIZER, R. A. SIMONS, E. R. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect. Immun.* 67: 885-890, 1999.

LEVITZ, S. M., NONG, S., MANSOUR, M. K., HUANG, C., 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. U. S. A.* 98: 10422-10427, 2001.

LIN, X., HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 69-105, 2006

LINDENBERG, A. S. C., CHANG, M. R., PANIAGO, A. M. M., LAZÉRA, M. S., MONCADA, P. M. F., BONFIM, G. F., NOGUEIRA, S. A., WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2: 75-78, 2008.

LITVINTSEVA, A. P., THAKUR, R. RELLER, B., MITCHELL, T. G. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J. Infect. Dis.* 5: 888-891, 2005.

LITVINTSEVA, A. P., THAKUR, VILGALYS, R., MITCHELL, T. G. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Batswana. *Genetics.* 172: 2223-2238, 2006.

LUPO, P., CHANG, Y. C., KELSALL, B. L., FARBER, J. M., PIETRELLA, D., VECCHIARELLI, A., LEON, F., KWON-CHUNG, K. J. The presence of papsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infect. Immun.* 76: 1581-1589, 2008.

MACDONALD, H. Candida: the hidden deterrent to breastfeeding. *Can. Nurse* 91: 27-30, 1995.

MANDAL, P., BANERJEE, U., CASADEVALL, A., NOSANCHUK, J.D. Dual infections with pigmented and albino strains of *Cryptococcus neoformans* in patients with or without human immunodeficiency virus infection in India. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4766-4772, 2005.

MANDEL, M.A., GRACE, G. G., ORSBORN, K.I., SCHAFER, F., MURPHY, J. W., ORBACH, M.J., GALGIANI, J. N. The *Cryptococcus neoformans* gene DHA1 encodes an antigen that elicits a delayed-type hypersensitivity reaction in immune mice. *Infect. Immun.* 68: 6196-6201, 2000.

MANSOUR, M. K., SCHLESINGER, L. S., LEVITZ, S. M. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. *J. Immunol.* 168: 2872-2879, 2002.

MANSOUR, M. K., YAUCH, L. E., ROTTMAN, J. B., LEVITZ, S. M. Protective efficacy of antigenic fractions in mouse models of cryptococcosis. *J. Immunol.* 72: 1746-1754, 2004.

MARR, K. J., JONES, G. J., MODY, C. H. Contemplating the murine test tube: lessons from natural killer cells and *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 6: 543-557, 2006.

MATSUMOTO, M. T., FUSCO-ALMEIDA, A. M., BAEZA, L. C. MELHEM, M. S. C., MENDES-GIANNINI, M. J. S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 1: 41-47, 2007.

McFADDEN, D. C. & CASADEVALL, A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 39S1: 19-30, 2001.

McFADDEN, D., DE JESUS, M., 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., FRIES, B. C., WANG, F., CASADEVALL, A. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell.* 6: 1464-1473, 2007.

MEYER, W., MARSZEWSKA, K., AMIRMOSTOFIAN, M., IGREJA, R. P., HARDTKE, C., METHLING, K., VIVIANI, M. A., CHINDAMPORN, A., SUKROONGREUNG, S., JOHN, M. A., ELLIS, D.H., SORRELL, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, 20: 1790-1799, 1999.

MEYER, W., CASTANEDA, A., JACKSON, S., HUYNH, M., CASTANEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 189-195, 2003.

MILLER, M. F. & MITCHELL, T. G. Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by human neutrophils and monocytes. *Infect. Immun.* 59: 24-28, 1991.

MIRZA, S. A., PHELAN, M. RIMLAND, D. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin. Infect. Dis.* 36: 789-794, 2003.

MUKJERJEE, S. & CASADEVALL, A. Sensitivity of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Cryptococcus neoformans* polysaccharide antigen is dependent of the capture and detection antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 33: 765-768, 1995.

NETSKI, D. & KOZEL, T. R. Fc-dependent and Fc-independent opsonization of *Cryptococcus neoformans* by anticapsular monoclonal antibodies: importance of epitope specificity. *Infect. Immun.* 70: 2812-2819, 2002.

NOSANCHUK, J. D. RUDOLPH, J. ROSAS, A. L., CASADEVALL, A. Evidence that *Cryptococcus neoformans* is mobilized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. *Infect. Immun.* 67: 5477-5479, 1999.

NOSANCHUK, J. D. ROSAS, A. L., LEE, S. C., CASADEVALL, A. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet* 355: 2049-2050, 2000.

ORTIZ, B. L., DIÉZ, S., URÁN, M. E., RIVAS, J. M., ROMERO, M., CAICEDO, V., RESTREPO, A., McEWEN, J. G. Use of the 27-Kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 826-830, 1998.

PAREDES, J. C. M., OLIVEIRA, L. G., BRAGA, A. C., TREVISOL, I. M., ROCHE, P. M. Development and standardization of an indirect ELISA for the serological diagnosis of classical swine fever. *Pesqui. Vet. Bras.* 19: 123-127, 1999.

PIETRELLA, D., MAZZOLLA, R., LUPO, P., PITZURRA, L., GOMEZ, M. J., CHERNIAK, R., VECCHIARELLI, A. Mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* promotes T-helper type 1 anticandidal responses in mice. *Infect. Immun.* 70: 6621-6627, 2002.

PITZURRA, L., CHERNIAK, R., GIAMMARIOLI, M., PERITO, S., BISTONI, F., VECCHIARELLI, A. Early induction of interleukin-12 by human monocytes exposed to *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *Infect. Immun.* 68: 558-563, 2000.

REPENTIGNI, L. Sorological techniques for diagnosis of fungal infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 362-375, 1989.

RODRIGUES, L. M., SHI, L., BARRETO-BERGTER, E. NIMRICHTER, L., FARIAS, S. E., RODRIGUES, E. G., TRAVASSOS, L. R., NOSANCHUK, J. D. Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide protects mice against lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Clin. Vaccine. Immunol.* 14: 1372-1376, 2007.

RODRIGUES, M. L., NAKAYASU, E. S., OLIVEIRA, D. L., NIMRICHTER, L., NOSANCHUK, J. D., ALMEIDA, I. C., CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7: 58-67, 2008.

ROSAS, A. L., NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A. Passive immunization with melanin monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect. Immun.* 69: 3410-3412, 2001.

SAHA, D. C., XESS, I., JAIN, N. Evaluation of conventional & serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis. *Indian J. Med. Res.* 127: 83-488, 2008.

SALKOWSKI, C. A. & BALISH, E. Role of natural killer cells in resistance to systemic cryptococcosis. *J. Leukoc. Biol.* 50: 151-159, 1991.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 3 ed. New York, 2001.

SANTANGELO, R., ZOELLNER, H., SORREL, T., WILSON, C., DONALD, C., DJORDJEVIC, J., SHOUNAN, Y., WRIGHT, L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infect. Immun.* 72: 2229-2239, 2004.

SANTANGELO, R. T., CHEN, S. C., SORREL, T. C., WRIGHT, L. C. Detection of antibodies to phospholipase B in patines infected with *Cryptococcus neoformans* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med. Mycol.* 43: 335-341, 2005.

SANTÚRIO, J. M., LEAL, A. T., LEAL, A. B. M., ALVES, S. H., LÜBECK, I. GRIEBELER, J., COPETTI, M.V. Teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico da pitiose. *Pesqui. Vet. Bras.* 26: 47-50, 2006.

SCHOP, J. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. *Mcgill. J. Med.* 10: 35-43, 2007.

SEVERO, L. C., OLIVEIRA, F. M., IRION, K., PORTO, N. S., LONDERO, A. T. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21 year experience. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 43: 183-187, 2001.

SIDRIM, J. C. S. & MOREIRA, J. L. B. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

SOARES, M. C. B., PAULA, C. R., DIAS, A. L. T., CASEIRO, M. M., COSTA, S. O. P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 47: 31-36, 2005.

SORRELL, T. C., CHEN, S. C., RUMA, P., MEYER, W., PFEIFFER, T. J., ELLIS, D. H., BROWNLEE, A. G. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1253-1260, 1996.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.* 39: 155-168, 2001.

TEMSTET, A., ROUX, P., POIROT, J. L., RONIN, O., DROMER, F. Evolution of monoclonal antibody based latex agglutination test for diagnosis of cryptococcosis. Comparison with two tests using polyclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2544-2550, 1992.

VARTIVARIAN, S. E., ANAISSIE, E. J., COWART, R. E., SPRIGG, H. A., TINGLER, M. J., JACOBSON, E. S. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J. Infect. Dis.* 167: 186-190, 1993.

VECCHIARELLI, A., RETINI, C., MONARI, C., TASCINI, C., BISTONI, F., KOZEL, T.R. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. *Infect. Immun.* 64: 2846-2849, 1996.

WHEAT, L. J. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl. Infect. Dis.* 8: 128-139, 2006.

WILKINSON, J. F. The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriol. Rev.* 22: 46-73, 1958.

WILLIAMSON, P. R., BENNETT, J. E., POLIS, M. A. Immunogenicity and safety of a conjugate glucuronoxylomannan-tetanus conjugate vaccine in volunteers. *Clin. Infect. Dis.* 17: 540, 1993.

WOO, P. C., CHAN, C. M., LEUNG, A. S., LAU, S. K., CHE, X. Y., WONG, S. S., CAO, L., YUEN, K. Y. Detection of cell wall galactomannoprotein Afmp1p in culture supernatants of *Aspergillus fumigatus* and in sera of aspergillosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4382-4387, 2002

WU, Q. X., CHEN, S. C. A., SANTANGELO, R. T., MARTIN, P. MALIK, R. SORREL, T. C. Cryptococcal phospholipase B antigen is not detected in serum of patients infected with *Cryptococcus neoformans* using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *FEMS Yeast Res.* 7: 465-470, 2007.

YANG, M. C., MAGEE, M. D., KAUFMAN, L., ZHU, U., COX, R. A. Recombinant *Coccidioides immitis* complement-fixing antigen: detection of an epitope shared by *C. immitis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Blastomyces dermatitidis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4: 19-22, 1997.

YAUCH, L. E. MANSOUR, M. K., SHOHAM, S, ROTTMAN, J. B. LEVITZ, S. M. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* *in vivo*. *Infect. Immun.* 72: 5373-5382, 2004.

YOUNG, M., MACIAS, S., THOMAS, D., WORMLEY, F. L. A proteomic-based approach for the identification of immunodominant *Cryptococcus neoformans* proteins. *Proteomics*, 9: 1-9, 2009.

ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim. Nova.* 21: 787-793, 1998.

ZARAGOZA, O., TABORDA, C. P. CASADEVALL, A. The efficacy of complemented-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur. J. Immunol.* 33: 1957-1967, 2003.

ZHANG, D., YANG, Y., CASTLEBURY, L. A., CERNIGLIA, C. E. A. A method for the large scale isolation of high transformation. *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 261-265, 1996.

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

7. CURRICULUM VITAE

POLESE, M

Dados Pessoais

Nome: Márcia Polese

Nascimento e local: 18 de março de 1983 – Passo Fundo/RS – Brasil

Endereço Profissional: FK Biotecnologia S. A. – Av. Bento Gonçalves,
9500.Campus UFRGS, Prédio 43431, Bairro Agronomia – Porto Alegre, RS – Brasil.

Telefone: (51) 33526864.

E-mail para contato: marcia_polese@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/ Titulação

2007-2009 Mestrado (em andamento) em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Identificação de proteínas antigênicas para diagnóstico da criptococose humana.

Orientador: Marilene Henning Vainstein

Co-Orietador: Henrique Bunselmeyer Ferreira

2001-2005 Graduação em Ciências Biológicas LP/B

UPF – Universidade de Passo Fundo

Título: Doença de Fabry

Orietador: Ane Cláudia Fernandes Nunes

Formação Complementar

2008 - 26º Regem – Reunião de Genética de Microrganismos – Salvador/BA.

2008 - XII Encontro Gaúcho de Imunologia – PUCRS – Porto Alegre/RS.

2008 - Iº Simpósio de Hematologia e Hemoterapia – Uso Racional do Sangue/Hemocentro Regional de Passo Fundo/RS.

- 2007** - IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Porto Alegre/RS.
- 2007** - XIX Salão de Iniciação Científica/ XVI Feira de Iniciação Científica e II Salão UFRGS Jovem. Porto Alegre/RS.
- 2006** - Curso “Biologia Molecular de Fungos Patogênicos Humanos”. Porto Alegre/RS.
- 2006** - VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Porto Alegre/RS.
- 2006** - XVIII Salão de Iniciação Científica/ XV Feira de Iniciação Científica e I Salão UFRGS Jovem. Porto Alegre/RS.
- 2006** - I Simpósio de Bioética da FFFCMPA – Tema: O uso de animais no ensino e na pesquisa. Porto Alegre/RS.
- 2005** - Prêmio Jovem Cientista/CNPq – Sangue, Fluido da Vida -
- 2005** - Workshop de Medicina Transfusional. Passo Fundo/RS
- 2004** - II Encontro Gaúcho de Genética, Biologia Molecular e Saúde. Porto Alegre/RS.
- 2003** - I Encontro Gaúcho de Genética, Biologia Molecular e Saúde. Porto Alegre/RS.
- 2003** - 4th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (4 th ICEMHP) e 6º Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogenese e Teratogenese Ambiental. Florianópolis/SC.
- 2003** - VIII Semana Acadêmica da Biologia da UPF. Passo Fundo/RS.
- 2002** - Curso de Identificação de Insetos de Importância Agrícola. Embrapa. Passo Fundo/RS.
- 2002** - VII Semana Acadêmica da Biologia da UPF. Passo Fundo/RS.
- 2002** - Interpretação de Ecossistemas Costeiros. Florianópolis/SC.
- 2001** - II Encontro Municipal de Avaliação das Ações Ambientais de Passo Fundo. Passo Fundo/RS.
- 2001** - II Simpósio Gaúcho de Biologia Molecular e Câncer. Passo Fundo/RS.
- Workshop em Desenvolvimento Sustentável

Atuação Profissional

- 2008-2009-** Pesquisadora Associada I. F.K Biotecnologia S.A.
- 2008-2009-** Professora do Curso de Qualificação Profissional em Análises Clínicas e Coletador na Escola Técnica Cristo Redentor. Disciplinas ministradas: Introdução ao Laboratório Clínico, Imunologia Clínica e Bioquímica Clínica.
- 2007-2007-** Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Estágio docente. Disciplina Ministrada: Imunologia Médica, Curso de Medicina.
- 2006-2006-** Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Bolsista de Apoio Técnico (CNPq) do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica.
- 2005-2005** - Hemopasso – Hemocentro Regional de Passo Fundo - Estágio supervisionado – Laboratório de Imunohematologia, principais técnicas executadas: tipagem sanguínea e prova cruzada..
- 2003-2005** - Instituto de Patologia de Passo Fundo (IPPF) – Estágio extracurricular. Acompanhamentos nas atividades macro e microscópicas do laboratório.
- 2004-2004** - Escola Estadual de Ensino Fundamental Monte Castelo - Estágio Extra-Curricular – 7ª Série do Ensino Fundamental – Disciplina Ciências.
- 2004-2004** - Escola Estadual de Ensino Médio Anna Luísa Ferrão Teixeira - Estágio Curricular - 3º Ano do Ensino Médio – Disciplina de Biologia.
- 2004-2004** - Escola Estadual de Ensino Fundamental Ernesto Tocchetto - Estágio Curricular – EJA - Disciplina de Ciências.
- 2004-2004** - Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Estágio extracurricular. Práticas de técnicas de biologia molecular.
- 2002-2003-** Centro de Ciências e Tecnologia Ambientais da Universidade de Passo Fundo (CCTAM/UPF). Estágio extracurricular. Cuidados burocráticos envolvendo atividades ambientais da Universidade.
- 2002-2002** - Escola Municipal Arno Otto Kihel. Estágio extracurricular. Professora Substituta
- 2001-2001** - Escola Municipal Arlindo de Souza Mattos. Estágio extracurricular. Professora Titular de 5ª A 8ª Série do Ensino Fundamental - Disciplina de Ciências.

Produção Bibliográfica

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

POLESE, M; AZEVEDO, LG; CORREA, JF; STAATS, CC; LEAL, AL ; SCHRANK, A; FERREIRA, HB; VAINSTEIN, MH. Padronization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of human criptococosis: a laboratorial tool. In: 26° Reunião de Genética de Microrganismos.Salvador/BA. 2008.

LEAL, AL; STAATS, CC; ROSA E SILVA, LK; POLESE, M; SCHRANK, A; VAINSTEIN, MH. Evaluation of copper homeostasis in *Cryptococcus gattii* virulence. In: 26° Reunião de Genética de Microrganismos.Salvador/BA. 2008.

STAATS, CC; ROSA E SILVA, LK; POLESE, M; LEAL, AL; VAINSTEIN, MH; SCHRANK, A. Micronutrient homeostasis regulation gene screening in the human pathogen *Cryptococcus gattii*. In: 26° Reunião de Genética de Microrganismos.Salvador/BA. 2008.

ROSA E SILVA, LK; STAATS, CC; LEAL, AL; POLESE, M; BRESCIANI, F; SCHRANK, A; VAINSTEIN, MH. Evaluation of iron homeostasis regulation and its influence in virulence of *Cryptococcus gattii*. In: 26° Reunião de Genética de Microrganismos.Salvador/BA. 2008.

POLESE, M; CORREA, JF; COUTINHO, CE; FERREIRA, HB; VAINSTEIN, MH. Identificação de proteínas imunogênicas para padronização da técnica de ELISA para diagnóstico da criptococose humana. In: XII Encontro Gaúcho de Imunologia/PUCRS/Porto Alegre/RS.2008.

SELDENREICH,R; POLESE, M; SILVEIRA, A; ANTONINI, T; STOBBE, JC. Perfil dos Doadores de Sangue com Pesquisa de Anticorpos Irregulares Positiva (P. A. I. positiva) no Hemocentro Regional de Passo Fundo. In: I° Simpósio de Hematologia e Hemoterapia – Uso Racional do Sangue/Hemocentro Regional de Passo Fundo/RS. 2008.

POLESE, M; SELDENREICH,R. Prevalência de Antígenos Eritrocitários através da Fenotipagem de Doadores de Sangue do Grupo Sanguíneo O Negativo do Hemocentro Regional de Passo Fundo (Hemopasso)/Rs-Brasil. In: I° Simpósio de Hematologia e Hemoterapia – Uso Racional do Sangue/Hemocentro Regional de Passo Fundo/RS. 2008.

EGRES, C; POLESE, M; VAINSTEIN, M. Isolamento e identificação de leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* de fonte ambiental em serviço de saúde de Porto Alegre. In: 5° Congresso Brasileiro de Micologia. Recife/PE. 2007.

POLESE, M; CORREA, JF; FERREIRA, HB; VAINSTEIN, MH Padronization of na Enzime-linked Immunosorbent assay for Diagnosis of human Cryptococcosis: a laboratorial tool. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Porto Alegre/RS. 2007.

CRESTANI, J; GOULART, LS; POLESE, M; CUNHA, FB; VAINSTEIN, MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated in a work and living place of an immunocompetent male with cryptococcosis. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Porto Alegre/RS. 2007.

POLESE, M; CORREA, JF; LEAL, AL; FERREIRA, HB; VAINSTEIN, MH Padronization of na Enzime-linked Immunosorbent assay for Diagnosis of human Cryptococcosis: a laboratorial tool. In: XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba/Argentina. 2007.

CRESTANI, J; GOULART, LS; POLESE, M; CUNHA, FB; VAINSTEIN, MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated in a work and living place of an immunocompetent male with cryptococcosis. In: XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba/Argentina. 2007.

POLESE, M; CORREA, JF; FERREIRA, HB; VAINSTEIN, MH Padronização da Técnica Imuno-Enzimática (ELISA) para Criptococose Humana: Ferramenta de diferenciação específica e diagnóstico laboratorial. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Porto Alegre/RS. 2006.

GOEBEL, CS; POLESE, M; KORTMAN, GL; VAINSTEIN, MH. Padronização da técnica imuno-enzimática (ELISA) para diagnóstico laboratorial de candidemias. In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Porto Alegre/RS. 2006.

SILVEIRA, CP; SOUZA, T; CARVALHO, LRM; PALMA, L; CRESTANI, J; POLESE, M; STAATS, CC; LÜBCK, I; ZAMBELLI, FC; VAINSTEIN, MH; SCHRANK, A. Functional analysis of the Chiti gene 5'- Flanking region in *Metharizium anisoplie* using SGPF as reporter protein. In: XVIII Congresso Latino-americano de Microbiologia, XXVIII Congresso Chileno de Microbiología y III Congreso Chileno de Microbiologia e Higiene de los Alimentos. Pucón – Chile. 2006.

CORREA, J. F., POLESE, M., GOEBEL, C. S., VAINSTEIN, M. H. Padronização da técnica imuno-enzimática (ELISA) para criptococose humana: ferramenta de diagnóstico laboratorial In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, Porto Alegre.

KORTMANN, G.L., GOEBEL, C. S., POLESE, M., VAINSTEIN, M. H. Padronização de ensaio imuno-enzimático (ELISA) para diagnóstico laboratorial de candidemias In: XVIII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, Porto Alegre.

PORSCH, DB; MILANI, MATTOS, C; ROSSATO, L; POLESE, M; BARROS, E; GIUGLIANI, R. JARDIM, L; TSAO, M. NETTO, C. BURIN, M; NUNES, A. Doença de Fabry em pacientes submetidos à hemodiálise: dados preliminares de um screening. In: 25ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS. 2005.

PORSCH, DB; MILANI, MATTOS, C; ROSSATO, L; POLESE, M; BARROS, E; GIUGLIANI, R. JARDIM, L; TSAO, M. NETTO, C. BURIN, M; NUNES, A. Doença de Fabry : dados preliminares de um screening em pacientes submetidos à hemodiálise. In: X Jornada Gaúcha de Nefrologia e Enfermagem em Nefrologia. Passo Fundo/RS. 2005.

MILANI, V; PORSCH, D; BONATTO, J; POLESE, M; BARROS, E; NUNES, A; Genótipos ECAI/D, PAI 1 4g/5g e MTHFR C677T em Pacientes Submetidos a Hemodiálise no Sul do Brasil. In: XXI Congresso Brasileiro de Nefrologia e XII Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia. Salvador/BA. 2004.

