

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

Camila Viana Silva

**ANÁLISE DA INIBIÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus* E FILOGENIA DE
GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MELANIZAÇÃO**

**SÃO CRISTÓVÃO - SE
SETEMBRO - 2024**

Camila Viana Silva

**ANÁLISE DA INIBIÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus* E FILOGENIA DE
GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MELANIZAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Barbosa Júnior

**SÃO CRISTÓVÃO - SE
SETEMBRO - 2024**

**ANÁLISE DA INIBIÇÃO DE MELANINA EM *Cryptococcus* E FILOGENIA DE
GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MELANIZAÇÃO**

Camila Viana Silva

Aprovado pela comissão examinadora em:
de setembro de 2024.

Prof. Dr. Antônio Márcio Barbosa Júnior
(Orientador – DMO/UFS)

Prof^a. Dr^a. Luciene Barbosa
(1º Avaliador – DMO/UFS)

Prof. Dr. Flávio Henrique Ferreira Barbosa
(2º Avaliador – DMO/UFS)

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho não seria possível sem o apoio dessas pessoas, gostaria de agradecer a todos vocês.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por me dar a oportunidade de chegar ao fim desta jornada.

Um agradecimento especial para minha mãe Elizabeth, pelo amor, carinho, suporte e confiança em minhas escolhas. Sem a senhora, nada disso seria possível, a senhora foi a base de tudo isso e o motivo pelo qual me mantive firme até o final.

Agradeço ao meu parceiro Alyson que sempre esteve ao meu lado e nunca me deixou desistir mesmo quando eu achava que não conseguiria. Você sempre me motivou.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Márcio Barbosa Júnior, por me dar a oportunidade de ingressar no PIBIC como bolsista e fazer parte do Laboratório de Microbiologia. Suas orientações e ensinamentos foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A todos os professores que compartilharam comigo seus conhecimentos e experiências ao longo do curso.

Aos meus amigos e colegas de curso, que ajudaram a deixar os dias mais leves e legais durante a graduação, Matheus, Victor, Alícia, Irla, Richard, Anthony, Jean, Karlinhos e Elvis, a amizade de todos vocês foi muito importante.

A todos, muito obrigada por fazerem parte da minha vida!

RESUMO

O *Cryptococcus spp.* é um patógeno causador da doença criptococose, é uma doença fúngica oportunista com maior manifestação clínica em pacientes imunocomprometidos. Os fungos patogênicos produzem fatores de virulência que auxiliam na sua patogenicidade, como por exemplo, a cápsula polisacarídica, proteína antifagocítica e melanina. O *Cryptococcus spp.* possui uma enzima fenoxidase, chamada lacase que participa da produção de melanina sendo elaborada a partir de um L-dopa. O objetivo deste trabalho foi analisar a inibição da melanina em cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* como fator de virulência frente a alguns fármacos. As linhagens foram isoladas em placas de Petri com ágar níger observando a intensidade da melanização até o 8^a dia e os dados foram analisados utilizando o software ImageJ. Para o teste de inibição da melanina foram utilizados os seguintes inibidores com o ágar níger em placas de Petri: Omeprazol, Nimesulida, Glifosato e Casca de cajueiro (*Anacardium occidentale*) nas seguintes concentrações: 125µg, 250µg e 500µg. Os Dados genômicos e proteômicos foram obtidos do NCBI e Uniprot e os perfis proteicos foram sequenciados e analisados para construção de árvores de similaridade utilizando plataformas como MEGA e Uniprot. As linhagens ambientais e clínicas obtiveram baixos índices de melanização no terceiro dia, sendo observado pela coloração das colônias, na cor branco ou marrom claro. Entretanto, no oitavo dia, as linhagens clínicas se mantiveram sem alta melanização visível, mas, as linhagens ambientais obtiveram alta melanização pela coloração marrom escuro presente nas colônias. Sendo possível observar essa coloração das colônias presentes em placas de petri contendo os seguintes inibidores e concentrações: nimesulida 125µg/mL, omeprazol 250µg/mL e 500µg/mL, casca de cajueiro 250µg/mL e 500µg/mL, glifosato 125µg/mL, 250µg/mL e 500µg/mL. Além disso, nas placas de petri com linhagens ambientais contendo outras concentrações dos inibidores utilizados neste estudo, a coloração das colônias se mantiveram em marrom claro. Sendo assim, os inibidores inicialmente possuem potenciais efeitos contra a melanização, inibindo enzimas importantes para o crescimento e colonização fúngica. Porém, o *Cryptococcus* foi relativamente resistente aos inibidores exigindo altas concentrações, além disso, as linhagens com maiores índices de melanização foram as ambientais e isso pode ser devido a uma maior patogenicidade presente nessas linhagens.

Palavras-chaves: *Cryptococcus*, melanina, virulência.

ABSTRACT

Cryptococcus spp. is a pathogen that causes cryptococcosis, an opportunistic fungal disease with greater clinical manifestation in immunocompromised patients. Pathogenic fungi produce virulence factors that aid in their pathogenicity, such as the polysaccharide capsule, antiphagocytic protein and melanin. *Cryptococcus spp.* A phenoloxidase enzyme, called laccase, which participates in the production of melanin, is elaborated from L-dopa. The objective of this study was to analyze the inhibition of melanin in strains of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as a virulence factor against some drugs. The strains were isolated in Petri dishes with Niger Agar, observing the intensity of melanization until the 8th day and the data were analyzed using ImageJ software. For the melanin inhibition test, the following inhibitors were used with niger agar in Petri dishes: Omeprazole, Nimesulide, Glyphosate and Cashew bark (*Anacardium occidentale*) at the following concentrations: 125 µg, 250 µg and 500 µg. Genomic and proteomic data were obtained from NCBI and Uniprot and the protein profiles were sequenced and detailed for construction of similarity trees using platforms such as MEGA and Uniprot. The environmental and clinical strains obtained low melanization rates on the third day, being present by the coloration of the colonies, in white or light brown. However, on the eighth day, the clinical strains remained without high visible melanization, but the environmental strains produced high melanization by the dark brown coloration present in the colonies. This coloration of the colonies present in petri dishes containing the following inhibitors and possible concentrations was observed: nimesulide 125 µg/mL, omeprazole 250 µg/mL and 500 µg/mL, cashew bark 250 µg/mL and 500 µg/mL, glyphosate 125 µg/mL, 250 µg/mL and 500 µg/mL. Furthermore, in petri dishes with environmental strains containing other concentrations of the inhibitors used in this study, the coloration of the colonies remained light brown. Therefore, the inhibitors initially have potential effects against melanization, inhibiting enzymes important for fungal growth and colonization. However, *Cryptococcus* was relatively resistant to inhibitors requiring high concentrations. Furthermore, the strains with the highest melanization rates were the environmental ones, and this may be due to a greater pathogenicity present in these strains.

Keywords: *Cryptococcus*, melanin, virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 (Padrão de todas as imagens = Lado direito cepas ambientais e no centro cepa padrão (ATCC 24067), lado esquerdo cepas clínicas e no centro cepa padrão (ATCC 32608) - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (125µg) 5º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (250µg) 5º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (500µg) 5º dia

Figura 2 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (125µg) 8º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (250µg) 8º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (500µg) 8º dia

Figura 3 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (125µg) 5º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (250µg) 5º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (500µg) 5º dia

Figura 4 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (125µg) 8º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (250µg) 8º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (500µg) 8º dia

Figura 5 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (125µg) 5º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (250µg) 5º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (500µg) 5º dia

Figura 6 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (125µg) 8º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (250µg) 8º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (500µg) 8º dia

Figura 7 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (125µg) 5º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (250µg) 5º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (500µg) 5º dia

Figura 8 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (125µg) 8º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (250µg) 8º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (500µg) 8º dia

- Figura 9A** - Filogenia de proteína (fenoxidase) para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*
- Figura 9B** - Box de matriz de similaridade para produção de fenoxidase para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*
- Figura 10A** - Filogenia de proteína (fenoxidase/laccase e proteínas próximas) para *Cryptococcus neoformans* utilizando análises de Neighbour-joining
- Figura 10B** - Cladograma de proteína (fenoxidase/laccase e proteínas próximas) para *Cryptococcus neoformans* utilizando análises de Neighbour-joining
- Figura 11** - Box de matriz de similaridade para produção de fenoxidase para *Cryptococcus neoformans*
- Figura 12A** - Filogenia de proteína (fenoxidase/laccase e suas proteínas próximas) para *Cryptococcus gattii* utilizando análises de Neighbour-joining
- Figura 12B** - Cladograma de proteína (fenoxidase/laccase e suas proteínas próximas) para *Cryptococcus gattii* utilizando análises de Neighbour-joining
- Figura 13** - Box de matriz de similaridade para produção de fenoxidase para *Cryptococcus neoformans*
- Figura 14** - Enzima fenoxidase (laccase LAC1) predicada de *Cryptococcus neoformans* via Uniprot (Q55P57 · LAC1_CRYNB)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* ATCC padrão, leitura do 8º dia
- Tabela 2** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas, leitura do 8º dia
- Tabela 3** – Melanização de *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas analisados pelo software ImageJ
- Tabela 4** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Omeprazol, leitura do 5º dia
- Tabela 5** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Omeprazol, leitura do 8º dia
- Tabela 6** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Nimesulida, leitura do 5º dia
- Tabela 7** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Nimesulida , leitura do 8º dia
- Tabela 8** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Glifosato, leitura do 5º dia
- Tabela 9** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Glifosato, leitura do 8º dia
- Tabela 10** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*), leitura do 5º dia
- Tabela 11** - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*), leitura do 8º dia
- Tabela 12** - Dados genômicos e proteômicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* com produção de enzima fenoloxidase/laccase e enzimas próximas, adotando p<0,01 de similaridade

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired immunodeficiency syndrome)
<i>C. gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina ou L-Dopamina
SNC	Sistema Nervoso Central
NCBI	National Center for Biotechnology Information
UNIPROT	Base de conhecimento universal de proteínas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESBL	Asbeta-lactamases de espectro estendido
Blast-p	Padrão de Proteína BLAST
Genbank	Banco de dados de sequências de nucleotídeos
AlphaFold	Modelagem de estruturas de proteínas
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
AINE's	Medicamento anti-inflamatório não esteroides
IBP	Inibidores da bomba de prótons

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROBLEMA	14
3 JUSTIFICATIVA	14
4 OBJETIVOS	14
4.1 OBJETIVO GERAL	14
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5 REFERENCIAL TEÓRICO	15
5.1 DESCOBERTA	15
5.2 DIAGNÓSTICO	15
5.3 FATOR DE VIRULÊNCIA (MELANINA)	16
5.4 PRODUÇÃO E SÍNTESE DA MELANINA	17
5.5 EPIDEMIOLOGIA	18
6 MATERIAL E MÉTODOS	19
6.1 AUTORIZAÇÕES LEGAIS E ÉTICAS EM PESQUISA.	19
6.2 MICRO-ORGANISMOS	19
6.2.1 Obtenção das linhagens	19
6.2.2 Preparo da suspensão microbiana	20
6.2.3 Preparo dos meios de cultivo	20
6.2.4 Base para ágar níger (1L)	20
6.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO DO SOFTWARE	20
6.4 TESTE DE INIBIÇÃO DE MELANINA	21
6.4.1 Inibidores utilizados	21
6.4.2 Preparo das soluções estoques dos inibidores	22
6.4.3 Preparo dos meios de cultura com inibidores	22
6.4.4 Preparo da suspensão microbiana	22
6.5 DADOS GENÔMICOS E PROTEÔMICOS	23
6.6 FILOGENIA MICROBIANA	23
6.7 ANÁLISE IN SILICO	23
6.8 ANÁLISE DOS DADOS	24
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7.1 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO DO SOFTWARE	24
7.2 TESTE DE INIBIÇÃO DE MELANINA	28
7.3 DADOS GENÔMICOS E PROTEÔMICOS	38
7.4 FILOGENIA MICROBIANA	40
7.5 ANÁLISE IN SILICO	45
8 CONCLUSÃO	47
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

Segundo Tortora (2017), os fungos fazem parte do reino *Fungi*, são seres quimio-heterotróficos (seres que utilizam de componentes orgânicos como fonte de energia e carbono), eucariotos e podem se reproduzir de forma sexuada ou assexuada. Existem fungos que são unicelulares como é o caso das leveduras, ou pluricelulares como os bolores. Além disso, alguns fungos são seres sapróbios, que se alimentam da decomposição de matéria orgânica morta, para isso, existem enzimas presentes em seu organismo que o ajudam a digerir esse material. Os fungos são importantes como decompositores, na indústria alimentícia, como os cogumelos que são consumidos pelos seres humanos, e na indústria farmacêutica com a produção de antibióticos que foi um avanço importante para a ciência. Existem mais de 100 mil espécies de fungos atualmente descritas, e, aproximadamente 200 espécies de fungos são patogênicas. Entretanto, o diagnóstico de doenças causadas por fungos ainda é precário e com o aumento de casos de infecções fúngicas, torna-se muito importante o estudo desses organismos.

Para Momin M. e Webb G. (2021), o fungo do gênero *Cryptococcus spp.* são patógenos causadores da doença criptococose, na qual, as espécies mais importantes são, o *Cryptococcus neoformans* e o *Cryptococcus gattii*, esses fungos causam uma doença fúngica oportunista com maior manifestação clínica em pacientes com HIV/AIDS e outros imunocomprometidos. Além disso, o *C. neoformans* pode ser encontrado em solos, árvores e em fezes de pombos, enquanto o *C. gattii* é encontrado principalmente na madeira em decomposição e solos contaminados. Os esporos presentes no ambiente ou células fúngicas mortas podem ser inalados pelo hospedeiro e se não forem totalmente eliminados, podem resultar em criptococose. Em um paciente imunocomprometido, por exemplo, que é incapaz de eliminar todo fungo do seu corpo, pode resultar em uma disseminação para o sistema nervoso central, resultando em meningite.

Conforme Rajasingham et al. (2017), a criptococose é uma doença distribuída globalmente, este organismo possui vários fatores de virulência que permitem a infecção e disseminação. Essa proliferação e tropismo do SNC é explicada pela produção de melanina de *Cryptococcus spp.*. Zhao et al. (2022), mostrou que, apesar dos muitos obstáculos no estudo e caracterização da melanina, devido à sua alta patogênese in vivo, este tema possui grande relevância científica. A meningite criptocócica é uma infecção oportunista responsável por mais de 181.000 mortes anualmente, tornando-se um problema de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos devido a sua virulência e resistência ao

tratamento. Borges et al. (2015), evidenciou que a mortalidade dessa doença mesmo com auxílio dos tratamentos antifúngicos (normalmente a Anfotericina B) é alta. A anfotericina B é um antifúngico forte, porém, é um medicamento tóxico e esse fato restringe o seu uso.

Para Nosanchuk et al. (2001), o *Cryptococcus spp.* produz fatores de virulência que auxiliam na sua patogenicidade, como por exemplo, a cápsula polisacarídica, proteína antifagocítica e a melanina. Esse fungo possui uma enzima fenoloxidase, chamada lacase, esta enzima participa da produção de melanina que é elaborada a partir de um L-dopa. Além disso, a melanina é sintetizada pelos fungos quando há uma falta de nutrientes e a partir de substratos exógenos de colamina, sendo assim, ela reveste a parede celular do fungo e ajuda na sobrevivência e resistência às drogas. Para Lee et al. (2019), a síntese da melanina ocorre dentro de vesículas intracelulares que contém a enzima lacase, estas vesículas com melanina são transportadas pela membrana plasmática para a parede celular do fungo. Byrnes et al. (2011), detalhou que, o ágar semente de níger (NSA), ágar L-dopa e ágar cafeico são muito importantes na identificação do *Cryptococcus*, porque, a presença dos compostos fenólicos nestes meios criam condições favoráveis para a produção de melanina a partir da enzima lacase.

Conforme citado por Da Silva BK (2012), por meio de estudos sorológicos, e com o uso de anticorpos contra a cápsula do fungo, foi possível encontrar sete sorotipos de *Cryptococcus*, mas, apenas cinco são os mais comuns, para o *C. neoformans* os sorotipos A, B, D e AD e para o *C. gattii* sorotipo C. O sorotipo A está associado a um nível maior de patogenicidade e tem sido encontrado na maioria das infecções. Esses sorotipos distinguem-se quanto à distribuição geográfica, epidemiologia, manifestação clínica e resistência aos antifúngicos. Abulreesh et al. (2019) evidenciou que, a identificação de leveduras com base no DNA ribossomal fúngico (rDNA) tornou-se comum como uma ferramenta molecular, isso tem facilitado e acelerado a identificação. Além disso, ferramentas de identificação molecular, como a PCR, multiplex PCR e RFLP PCR, tornaram-se boas opções para a detecção e identificação de várias espécies de leveduras. Os genes relacionados aos fatores de virulência são, os genes capsulares (CAP1 e CAP59) específicos para o *Cryptococcus spp.* e o gene da fosfolipase (PLB1). Para Edwards et al. (2021), os fungos sofrem mutações que os deixam resistentes às drogas que são utilizadas no tratamento de doenças, em alguns casos, acontecem mutações no gene que codifica proteínas de DNA. Além disso, segundo alguns estudos, o surgimento dos fungos resistentes está ligado ao uso de defensivos agrícolas, isso pode ser uma consequência da adaptação desses organismos a produtos químicos semelhantes a antifúngicos que estão presentes no ambiente ou exposição

a fungicidas usados na agricultura. Com isso, é de suma importância monitorar a resistência dos fungos no ambiente para que seja possível um tratamento clínico adequado da doença em toda população.

2 PROBLEMA

Como os fármacos ajudam na inibição da melanina em *Cryptococcus* e como a filogenia dos genes e proteínas envolvidas na melanização pode influenciar na patogenicidade destes fungos?

3 JUSTIFICATIVA

Esse projeto de pesquisa insere uma avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* já isolados de diversos nichos ecológicos no estado de Sergipe e pertencentes a Coleção de Cultura de Micro-organismos de Sergipe (CCMO/SE). A fim de se inserir dados sobre a análise ecológica, filogenética, epidemiológica e virulência, fornecendo esses dados para a Rede Nacional de Criptocócicas. Este projeto abrange a pesquisa de resistência fúngica frente a algumas drogas e os genes e proteínas associadas à produção de melanina. Ou seja, a produção de fatores de virulência por essas leveduras patogênicas, essa situação é essencial na patogenia da criptococose com abordagem laboratorial e sobretudo em inferência de filogenia in silico. Além disso, analisar os fatores de virulência como a melanina é importante para compreender a criptococose a fim de garantir uma menor patogenicidade da doença nos pacientes.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a inibição da melanina em cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* frente a alguns fármacos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização enzimática para produção de melanina.
- Analisar a inibição da melanina frente a alguns fármacos.
- Investigar as inferências genômicas e proteômicas envolvidas na melanização.
- Examinar a análise filogenética *in silico* dos dados obtidos.

5 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 DESCOBERTA

Segundo Deepa et al. (2014), o *Cryptococcus* foi isolado pela primeira vez por Francesco Sanfelice no século XIX em uma fermentação de suco de pêsego no qual ele denominou de *Saccharomyces neoformans*. Ele foi descrito em 1894 como um patógeno humano pelo patologista Otto Busse e o cirurgião Abraham Buschke.

Bernett (2010) evidenciou que, em 1894 o fungo era denominado de *Saccharomyces*, já que, nessa mesma época o patologista Otto Busse encontrou esse organismo presente em uma lesão na tíbia de uma paciente, sendo assim, ele nomeou a doença de *Saccharomycosis hominis*. Para Sanfelice, o *Cryptococcus* formava uma colônia única e era semelhante a levedura de *Saccharomyces*.

Barnett (2010) mostrou que, em 1901 Jean-Paul Vuillemin renomeou a levedura de Busse para *Cryptococcus hominis* e a levedura de Sanfelice foi nomeada de *Cryptococcus neoformans*, porque ele não produzia ascósporos, sendo essa característica indispensável para o gênero *Saccharomyces*.

Conforme Barnett (2010), em 1950 a pesquisadora Rhoda Benham descobriu que essas leveduras com nomes diferentes eram iguais e pertenciam à mesma espécie, sendo assim ela adotou a nomenclatura de '*Cryptococcus neoformans*'. A descoberta foi baseada em análises morfofisiológicas, patogênicas e sorológicas, concluindo que poderiam ser da mesma espécie apresentando duas variedades, *neoformans* e *grubii*.

5.2 DIAGNÓSTICO

Para Williamson et al. (2016), a meningite criptocócica é adquirida por meio da inalação, além disso, tem sido relatado envolvimento de quase todos os órgãos e tecidos. O

Cryptococcus atinge também o SNC, isso tem sido associado a uma série de fatores de virulência. O autor descreveu esses fatores como: metaloproteinases e ureases; enzimas que causam neuroimunomodulação, como a lacase que utiliza dopamina; e mecanismos que facilitam a sobrevivência no ambiente cerebral privado de nutrientes.

Segundo Williamson et al. (2016), o diagnóstico em pacientes com suspeita de criptococose podem ser feitos da seguinte maneira: por meio de lesões cutâneas com estudo de biópsia; amostra de sangue periférica para diagnóstico sorológico obtido por punção lombar. Além disso, amostras de urina e de escarro são recomendados, mas, em pacientes com HIV/AIDS e com pneumonia criptocócica, deve ser feito o exame do escarro e da cultura do lavado broncoalveolar.

No entanto, segundo Oliveira et al. (2022), o diagnóstico pode ser indistinguível em outras causas de pneumonia oportunista, como por exemplo, uma alta carga de tuberculose. Em pacientes com HIV/AIDS, pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PJP) é outro caso em que o diagnóstico necessita de testes apropriados.

Conforme os estudos de Galanis et al. (2009), quando existe a criptococose no SNC, é necessário uma tomografia computadorizada ou ressonância magnética do cérebro antes de realizar uma punção lombar, já que, o *Cryptococcus* presente no SNC pode resistir por muito tempo mesmo em casos com tratamentos bem-sucedida.

5.3 FATOR DE VIRULÊNCIA (MELANINA)

Alspaugh (2016) e Byrnes et al. (2011) mostraram que o *Cryptococcus* se adapta rapidamente a diferentes ambientes e isso favorece sua sobrevivência no hospedeiro. Muitos fatores de virulência colaboram para que o patógeno seja beneficiando, dentre eles, a produção de cápsula, a formação de melanina, a secreção de enzimas (protease, urease e fosfolipase), a termotolerância, a sobrevivência intracelular, a formação de biofilme, e, além disso ainda existe um fator muito importante a ser levado em consideração, a resistência aos antifúngicos

Segundo Cortesão et al. (2020), alguns estudos mostraram que a sobrevivência de espécies fúngicas melanizadas é maior do que as não melanizadas, isso também está associado ao aumento da sobrevivência após exposição a diferentes tipos de fatores de estresse físico e químico, incluindo radiação de partículas.

Para De Sousa et al. (2022), o *C.gattii* é melanizado de maneira mais lenta do que *C. neoformans*, a velocidade da melanização pode ser relacionada com a virulência do patógeno, sendo importante para investigar sobre as diferenças no fenótipo da doença entre as espécies.

Nosanchuk e Casadevall (2003), mostraram que, para realizar a análise e quantificação da melanina fúngica, é indispensável a extração das células melanizadas, sendo assim, na célula a melanina está presente no interior da parede celular. Mas, o *C. neoformans*, tem sua melanina detectada ao longo da membrana plasmática.

5.4 PRODUÇÃO E SÍNTESE DA MELANINA

Em seus estudo, Solano (2014) mostrou que, a formação da melanina é iniciada com a carboxilação do acetil-CoA em malonil-CoA, servindo de substrato para formação do pentaquetídeo-CoA que sofre ciclização pela enzima pentaquetídeo sintase, gerando o 1,3,6,8-THN. Posteriormente, é transformado por reações de hidratação e desidratação, em scitalone, vermelone e por fim em 1,8-DHN, dando origem à DHN-melanina.

Conforme Eisenman e Casadevall (2012), duas moléculas podem iniciar a via de síntese das DOPA-melaninas: a L-dihidroxifenilalanina (L-dopa) e a tirosina. Quando a L-dopa é usada, ela é oxidada pela enzima laccase em dopaquinona, mas, se a tirosina for usada, ela é transformada em L-dopa e depois se torna dopaquinona. Além disso, as duas reações são catalisadas pela enzima tirosinase.

Liu et al. (2021), evidenciou que, a síntese da melanina ocorre por oxidação enzimática nos melanócitos, nos fungos há duas vias para produção: a 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN) ou L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa). Em *C. neoformans*, a via da L-dopa precisa de catecolaminas exógenas, porque, nessa via não é possível produzir os precursores da melanina. Sendo assim, a lacase é a enzima que catalisa a síntese da melanina, sendo codificada principalmente pelo gene LAC1.

Para Nosanchuk e Casadevall (2006) e Kwon-Chung et al. (2014), às concentrações de glicose e ferro são importantes para a indução da síntese de melanina e sua regulação ocorre em resposta ao ambiente. Além disso, a levedura melanizada torna-se mais resistente à morte celular, já que, o sistema imune do hospedeiro utiliza agentes oxidantes para combater o patógeno.

5.5 EPIDEMIOLOGIA

Chen, et al., (2008) mostrou que, o *Cryptococcus neoformans* afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, mas, existem casos de pacientes sem essa condição. Já o *Cryptococcus gattii* afeta indivíduos imunocomprometidos em regiões endêmicas.

Conforme mostrado nos estudos de Park et al. (2009), os casos de infecções por esse patógeno estão ligados principalmente a regiões em desenvolvimento na qual os tratamentos são limitados, como por exemplo na África Subsariana. Além disso, muitos pacientes morrem dessa doença devido à falta de tratamento adequado.

Park et al. (2009) evidenciou que, menos de 300 casos de criptococose em todo o mundo foram relatados em 1950, mas, esses casos aumentaram nos anos seguintes devido ao aumento do número de pacientes com SIDA ou outros casos de pessoas imunocomprometidas. Estima-se que cerca de um milhão de indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana na fase de HIV/AIDS sejam acometidos por meningite criptocócica.

Rajasingham et al. (2020) mostrou que, em 2014, foi reduzido a estimativa da carga global de meningite criptocócica associada ao HIV, provavelmente devido à expansão de terapias. Além disso, a criptococose é responsável por 19% das mortes relacionadas à HIV/AIDS.

Conforme Rajasingham et al. (2020), a América Latina tem a terceira maior incidência de *Cryptococcus spp.* em pacientes com HIV/AIDS. Essa alta carga de contaminação mostra que a morte por infecção criptocócica é causada por algumas falhas nos cuidados do HIV.

Os estudo de Byrnes et al. (2009) e Dixit, et al. (2009), mostraram que, em 2001 houveram surtos de criptococose causado por *C. gattii* na Ilha de Vancouver, em regiões próximas dos Estados Unidos e no Canadá. Sendo assim, essa espécie também representa um problema de saúde pública, visto que, tem uma propagação em sua distribuição geográfica e é uma espécie menos estudada em relação ao *C. neoformans*.

Para Souto et al. (2016), no período de 2000 a 2007 a criptococose apresentou o maior número de internações no Brasil, como mostram os dados do Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SUS). Porém, essa doença não é muito notificada para o Ministério da Saúde no Brasil.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 AUTORIZAÇÕES LEGAIS E ÉTICAS EM PESQUISA.

As linhagens clínicas foram obtidas de pacientes com meningite no estado de Sergipe e aprovadas no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos via Plataforma Brasil com código CAAE 20536413.0.0000.5546.

Para autorização de acesso ao patrimônio genético tanto de isolados em substratos da União federal ou de localidades públicas foram necessárias autorizações via SISBIO/ICMBio e ADEMA/SE. Com os isolados microbianos obtidos foram catalogados em relação ao patrimônio genético na plataforma SISGEN/MCCTIC para legalização de uso de material genético da União com o código AD132D5 referente ao *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e para o uso do patrimônio genético relacionado à *Anacardium occidentale* (Cajueiro) o código A219893.

Para uso de dados públicos em bancos genômicos e proteômicos de livre acesso, também, foi cadastrado na plataforma SISGEN/MCCTIC como acesso a dados de outros pesquisadores, tanto nacionais quanto internacionais, tornando a análise de dados eticamente legal e autorizado nas inferências em bioinformáticas.

Por fim, todos os dados obtidos, linhagens microbianas e seus substratos quanto dados em bioinformáticos foram preservados e catalogados na Coleção de Cultura de Micro-organismos de Sergipe – CCMO/SE para formação de portfólio de insumos e manutenção legal de curadoria microbiana na Rede de Coleções Biológicas da UFS.

6.2 MICRO-ORGANISMOS

6.2.1 Obtenção das linhagens

Foram utilizadas neste projeto linhagens clínicas fornecidas gentilmente pela Fundação e Instituto Parreiras Horta (Lacen/SE) e linhagens ambientais de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isoladas em Sergipe estudadas em projetos anteriores e as linhagens foram preservadas na Coleção de Cultura de Micro-organismos de Sergipe (CCMO/SE), da Universidade Federal de Sergipe (LMA/UFS). Além disso, foram utilizadas linhagens padrão: *Candida albicans* ATCC 18804 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 56980 gentilmente cedidas pelo INCQS/Fiocruz-RJ e Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Minas Gerais (LabMicol/UFMG).

6.2.2 Preparo da suspensão microbiana

Todas as linhagens foram revitalizadas em ágar níger a partir da retirada do freezer a -80°C. Em seguida, as suspensões microbianas foram preparadas em solução salina, com turvação equivalente à escala 2 de Mcfarland.

6.2.3 Preparo dos meios de cultivo

Os meios de cultura que foram elaborados contêm fenol, que favorece a melanização. Foram preparados no LMA/UFS, esterilizados e distribuídos assepticamente de acordo com a sugestão do fabricante.

6.2.4 Base para ágar níger (1L)

- Extrato de níger = 50g
- Glicose = 1g
- Ágar = 15g
- Água destilada = 1000 ml

6.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO DO SOFTWARE

Foi realizado uma caracterização enzimática de *C.neoformans* e *C.gattii* de linhagens padrão, ambientais e clínicas, a fim de detectar a produção de melanina seguindo protocolo de pigmentação (score) e determinando a intensidade. Foram usados 15 linhagens ambientais e 11 linhagens clínicas. A leitura foi feita por 8 dias consecutivos, sendo que o crescimento teve início a partir do 3º dia.

Foram inoculadas 20 uL da suspensão microbiana no meio de cultivo específico para produção de fenoloxidase e as placas de Petri foram incubadas 35°C. A detecção da atividade de fenoloxidase com produção de melanina foi realizada seguindo protocolo de pigmentação (score), determinado pela intensidade de produção enzimática:

Alta atividade enzimática = Marrom escuro.

Média atividade enzimática = Marrom claro.

Regular atividade enzimática = Bege.

Sem atividade enzimática = Branco.

Para a determinação da melanina, foi utilizada uma metodologia quantitativa que já foi aplicada por CUNHA et al. (2010), sendo assim, a avaliação do crescimento fúngico foi feita utilizando o software ImageJ mediante referida escala.

a) Não cresceu.

b) Se cresceu, coloração da colônia:

0 – Branco.

1 – Cinza claro.

2 – Cinza escuro.

3 – Marrom claro.

4 – Marrom escuro.

5 – Preto.

Com fotografias que foram retiradas no 8º dia e convertidas em imagens em escala de cinza e analisadas pelo programa de computador ImageJ, versão 1.51g (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) A escala de cinza tem tons cinzentos (de branco até o preto), que é medido de 0 a 250, em que, 0 é o valor mais próximo de preto e 250 é o valor mais próximo de branco.

6.4 TESTE DE INIBIÇÃO DE MELANINA

6.4.1 Inibidores utilizados

Para as doses subinibitórias utilizadas no experimento de inibição da melanogênese, foi usado uma placa de Petri com cada inibidor e sua respectiva concentração no ágar niger utilizando linhagens ambientais e clínicas.

Inibidores:

- Produto A) Omeprazol, que já foi usado para fins parecidos nos estudos de BAEK, LEE, (2015) e MATSUI et al. (2015) que mostraram o efeito na inibição da melanogênese em células tratadas com IBPs. Além disso, eles descobriram que o omeprazol e fármacos similares inibiram a melanogênese em células de melanoma de camundongo B16.
- Produto B) Nimesulida, seguindo os estudos de Matos et al. (2016) “Nimesulida inibe fungos patogênicos: Mecanismos dependentes de PGE2” os dados do estudo

mostraram que a nimesulida apresentou alta atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, envolvendo a inibição de prostaglandinas e enzimas importantes para o crescimento fúngico.

- Produto C) Glifosato, como proposto nos estudos de Nosanchuk, J. D., (2001) “O glifosato inibe a melanização de *Cryptococcus neoformans* e prolonga a sobrevivência de ratos após infecção sistêmica”, o glifosato conseguiu inibir a autopolimerização da L-dopa e a oxidação da l-epinefrina pelas células criptocócicas.
- Produto D) Casca de cajueiro (*Anacardium occidentale*), usado também nos estudos de Almeida et al. (2023), que evidenciou uma potencial atividade contra as linhagens testadas de *Cryptococcus* e *Candida*.

A análise das placas foi feita diariamente e uma fotografia de cada placa foi realizada no terceiro e no oitavo dia de incubação. Os dias um e dois não foram analisados e fotografados porque o crescimento fúngico e a produção de melanina não foram suficientes.

6.4.2 Preparo das soluções estoques dos inibidores

Foi feito o tritramento dos inibidores com as seguintes concentrações:

- 125µg,
- 250µg
- 500µg

Posteriormente, foram diluídos em 1 mL de DMSO. Para obtenção da concentração µg/mL. A escolha das concentrações foi baseada nos estudos expostos acima sobre cada inibidor.

6.4.3 Preparo dos meios de cultura com inibidores

Foi preparado um ágar níger de 80ml com 10% da concentração de cada inibidor. O ágar níger foi esterilizado por 15 min a 121°C, após esse processo foi adicionado os inibidores no ágar e distribuído em placas de Petri.

6.4.4 Preparo da suspensão microbiana

Foi utilizado 3 alçadas cheias das leveduras purificadas anteriormente em 1mL de água destilada, a fim de obter a escala 3 de Macfarland. Após preparo da suspensão microbiana, foi inoculado com uma pipeta de 50µL cada levedura, em posições equidistantes nos quadrantes na placa de Petri. As placas foram incubadas por 10 dias em 25°C com leitura diária até o 10º dia.

6.5 DADOS GENÔMICOS E PROTEÔMICOS

Os dados de bioinformáticas disponíveis nos diversos bancos genômicos e proteômicos foram obtidos nas seguintes plataformas: NCBI, EMBL e Genome Japan. Assim como os dados proteicos via Uniprot e ESBL. Outros bancos de dados em bioinformática foram adicionados ao longo do projeto e foi registrado o seu devido catálogo, sempre de sistemas opensource.

Para obtenção desses dados, inferências de informação e conteúdo relativos a esses contextos foram armazenados nos bancos de dados em bioinformática da Coleção de Cultura de Micro-organismos de Sergipe – CCMO/SE;

6.6 FILOGENIA MICROBIANA

Os dados bioinformáticos e das linhagens microbianas obtidas foram analisados a filogenia de genes e proteínas utilizando plataformas como MEGA e Uniprot para similaridade e compartilhamento de bases nucleotídeos ou peptídeos entre os isolados microbianos. Para analisar a formação filogenética e clusters de tipos moleculares, foi empregada a produção dessas enzimas associadas a esses fatores de virulência. Em todas as análises, o Neighbour-joining tree foi usado para análise de similaridade com $p < 0,01$.

6.7 ANÁLISE IN SILICO

Os plots proteicos foram sequenciados em MALDITOOFF e estudados em bancos de linhagens de bandas e sequências proteicas públicas. Com a construção dos perfis proteicos lidos e sequenciados, os plots foram inferidos em análises in silico nos seguintes bancos de dados: Uniprot e Blast-p. Com essas informações de sequências peptídicas, os perfis (plots)

foram analisados em opensoftwares para construção de árvores de similaridade e distâncias de bandas e também para construção de aproximação de linhagens microbianas sequenciadas e pertencentes ao genbank. Esses 12 resultados foram equiparados às inferências em bioinformáticas realizadas em paralelo a experimentação, com o objetivo de confirmação ou detecção de achados em novos delineamentos proteicos.

6.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados tanto para diferenciação de dados quanto comparação de condições biológicas estatisticamente utilizando o software Graphic Pad Prism e R-Studio. Foi utilizado o teste t seguido de teste Turkey para comparação e diferenciação das médias e tratamentos utilizados. Adotando $p < 0,05$ e níveis de similaridade $\geq 60\%$ para estudos de micologia. Também foi utilizado o software NTSYS e PHYLIPP para comparação das bandas protéicas obtidas no SDS-PAGE e diferenciação de linhagens utilizando UPGMA. Como também foi realizada a análise in silico com abordagens em modelagem e delineamento de genes e proteínas relacionadas a regiões Orfs ou ilhas de patogenicidade relacionada a *C. neoformans* e *C. gattii* special complex utilizando o genbanks e opensoftwares.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO DO SOFTWARE

Estudos têm mostrado que a melanina produzida por *Cryptococcus spp.* tem a capacidade de: alterar as respostas das citocinas; reduzir a fagocitose, reduzir a toxicidade do peptídeo microbicida, espécies reativas de oxigênio e fungicidas; e tem papel fundamental na resistência mecânica de *Cryptococcus spp.* Essa melanina é muito importante na patogênese do *Cryptococcus*, onde cepas que interferem nos genes necessários para a produção de melanina em *C. neoformans* prejudicam o crescimento fúngico (NOSANCHUK et al., 2015 e OLSZEWSKI et al., 2004).

Neste estudo, foi evidenciado a caracterização enzimática de *C. neoformans* e *C. gattii* de linhagens padrão, ambientais e clínicas, como mostrado na tabela 1 e 2, as tabelas mostram as análises do 8º dia.

Tabela 1 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* ATCC padrão, leitura do 8º dia.

Código - Padrão	Intensidade enzimática
<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	Alta - Marrom escuro
<i>C. gattii</i> ATCC 32608	Média - Marrom claro

Fonte: Autor (2024)

Tabela 2 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas, leitura do 8º dia.

Código - Ambiental	Intensidade enzimática	Código - Clínico	Intensidade enzimática
cry19a	Sem atividade enzimática - Branco	16c	Sem atividade enzimática - Branco
99g1	Alta - Marrom escuro	14c	Sem atividade enzimática - Branco
2b	Alta - Marrom escuro	16a	Média - Marrom claro
6b	Alta - Marrom escuro	cry19b	Alta - Marrom escuro
99f3	Alta - Marrom escuro	20b2a	Sem atividade enzimática - Branco
99d2	Alta - Marrom escuro	a3100	Sem atividade enzimática - Branco
cry a3100	Sem atividade enzimática - Branco	cry18b	Alta - Marrom escuro
99h	Alta - Marrom escuro	c36	Sem atividade enzimática - Branco
13d	Sem atividade enzimática - Branco	1c	Sem atividade enzimática - Branco

	Sem atividade enzimática -		Sem atividade enzimática -
1a	Branco	cry25b	Branco
3a	Alta - Marrom escuro	cry20a	Alta - Marrom escuro
			Sem atividade enzimática -
99a1	Alta - Marrom escuro	8b	Branco
cry a6a3	Alta - Marrom escuro	-	-
cry a6g	Alta - Marrom escuro	-	-
	Sem atividade enzimática -		
cry a	Branco	-	-

Fonte: Autor (2024)

Observa-se nas Tabelas 1 e 2 que, as linhagens ambientais em sua maioria exibiram maior atividade enzimática em 10 cepas (66,67%) em comparação com as linhagens clínicas que foram 4 cepas (36,36%), evidenciando um maior grau de melanização e conseqüentemente maior patogenicidade. Além disso, a linhagem padrão de *C.neoformans* exibiu alta atividade enzimática enquanto o *C.gattii* obteve uma média atividade enzimática. Nesse caso, foi possível identificar que, as cepas ambientais eram mais resistentes e mais patogênicas.

Para BRILHANTE, et al. (2017), a melanina é um dos mais importantes fatores de virulência para *C.neoformans* e *C.gattii*, sendo que, já foi demonstrado em estudos que a presença de melanina na parede celular pode proteger as células contra a ação de drogas antifúngicas.

A intensidade da produção de melanina foi mensurada pelo software ImageJ avaliando o crescimento fúngico como usado nos estudos de Cunha et al. (2010) (Tabela 3).

Tabela 3 – Melanização de *C. neoformans* e *C. gattii* linhagens ambientais e clínicas analisados pelo software ImageJ.

Ambiental				Clínico			
Código	Valores*	Melanização	Intensidad e Enzimática	Código	Valores	Melanizaç ão	Intensidade Enzimática
19a	0	Sem	Branco	16c	0	Sem	Branco

99g1	0,55-0,67	Marrom Escuro	Forte	14c	0	Sem	Branco
2b	0,56-0,64	Marrom Escuro	Forte	16a	0,3-0,4	Marrom Claro	Média
6b	0,58-0,70	Marrom Escuro	Forte	cry 19b	0,5-0,6	Marrom Escuro	Forte
99f3	0,56-0,65	Marrom Escuro	Forte	20b2a	0	Sem	Branco
99d2	0,57-0,64	Marrom Escuro	Forte	a3100	0	Sem	Branco
cry a3100	0	Sem	Branco	cry 18b	0,52-0,6 3	Marrom Escuro	Forte
99h	0,52-0,58	Marrom Escuro	Forte	c36	0	Sem	Branco
13d	0	Sem	Branco	1c	0	Sem	Branco
1a	0	Sem	Branco	cry 25b	0	Sem	Branco
3a	0,56-0,61	Marrom Escuro	Forte	cry 20a	0,53-0,6 1	Marrom Escuro	Forte
99a1	0,58-0,64	Marrom Escuro	Forte	8b	0	Sem	Branco
cry a6a3	0,57-0,63	Marrom Escuro	Forte				
cry a6g	0,5-0,6	Marrom Escuro	Forte				
cry a	0	Sem	Branco				

* Valores de pixels teor cinza a preto mensurados utilizando ImageJ software

Fonte:Autor (2024)

Dentre os dados apresentados na Tabela 3, as linhagens ambientais que obtiveram maior melanização foram a cepa 6b (com valores de 0,58-0,70) e a cepa 99g1 (com valores de 0,55-0,67). Nas linhagens clínicas, as que obtiveram maior melanização foram as cepas 19b, 18b e 20a com valores variando de 0,5 a 0,6.

Sendo assim, na Tabela 3, os dados foram compatíveis com os da Tabela 2, em que as linhagens ambientais em sua maioria exibiram maior atividade enzimática 15 (66,67%) em comparação com as linhagens clínicas 11 (36,36%).

Além disso, é importante ressaltar que, as análises com o software ImageJ foram válidas, mas não houveram diferenças significativas entre as análises manual e com o software. Sendo assim, o uso do ImageJ exibiu resultados estatisticamente muito próximos e não facilitou a visualização manual da melanização do *Cryptococcus*.

Portanto, como citado nos estudos de Jensen (2013) o software é um sistema econômico e confiável, sendo uma alternativa para análise de imagens que desenvolvido por Wayne Rasband, o programa é um sistema de processamento e análise de imagens.

7.2 TESTE DE INIBIÇÃO DE MELANINA

Produto A: Omeprazol

Segundo Hoefler e Leite (2009), o omeprazol é considerado um medicamento pioneiro, que faz parte da categoria dos inibidores da bomba de prótons (IBP), atuando na redução da produção de ácido no estômago em até 95%. Esse fármaco está entre as classes de medicamentos mais usadas mundialmente para a redução da acidez gástrica. Além disso, segundo os estudos de Matsui et al. (2015) o omeprazol mostrou efeitos na inibição da melanogênese em concentrações micromolares em células de melanoma de camundongo B16.

O Omeprazol conseguiu inibir a produção de melanina principalmente na concentração de 125µg nas cepas ambientais, clínicas e padrão até o 5º dia, a partir desse dia, as cepas ambientais começaram a adquirir uma maior pigmentação, principalmente nas concentrações maiores que desde o início produziram uma melanização visível (Tabela 4).

Tabela 4 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Omeprazol, leitura do 5º dia.

Omeprazol (5º dia)				
Concentração	Cepa padrão (ATCC 24067)	Cepa padrão (ATCC 32608)	Cepas clínicas	Cepas ambientais
125 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom claro
250 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom escuro
500 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom escuro

Fonte: Autor (2024)

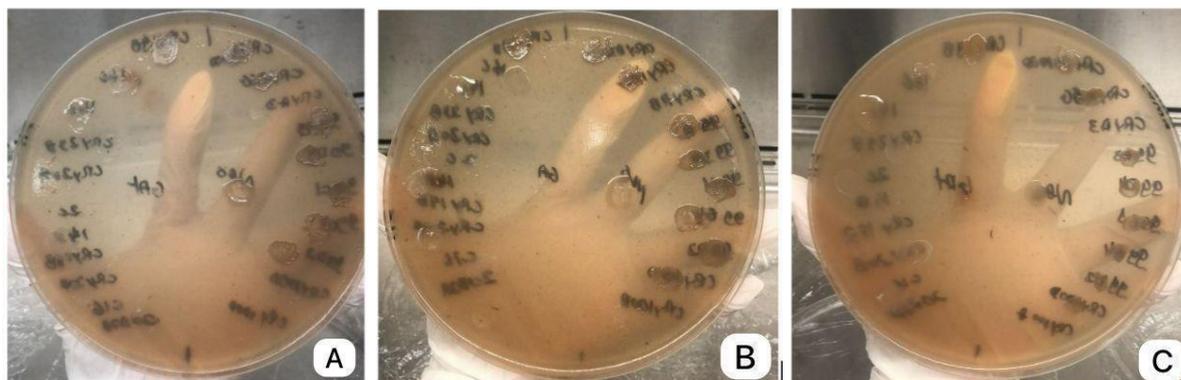


Figura 1 (Padrão de todas as imagens = Lado direito cepas ambientais e no centro cepa padrão (ATCC 24067), lado esquerdo cepas clínicas e no centro cepa padrão (ATCC 32608) - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (125µg) 5º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (250µg) 5º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (500µg) 5º dia.

No 8º dia foi possível observar uma alta melanização na cepa padrão de *C.neoformans* (ATCC 24067) e nas cepas ambientais, com isso, a partir do 8º dia não houve inibição da melanização. Nas cepas clínicas não houve melanização desde o início (Tabela 5).

Tabela 5 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Omeprazol, leitura do 8º dia.

Omeprazol (8º dia)				
Concentração	Cepa padrão (ATCC 24067)	Cepa padrão (ATCC 32608)	Cepas clínica	Cepas ambientais
125 µg	Marrom escuro	Branco	Branco	Marrom escuro
250 µg	Marrom escuro	Branco	Branco	Marrom escuro
500 µg	Marrom escuro	Branco	Branco	Marrom escuro

Fonte: Autor (2024)

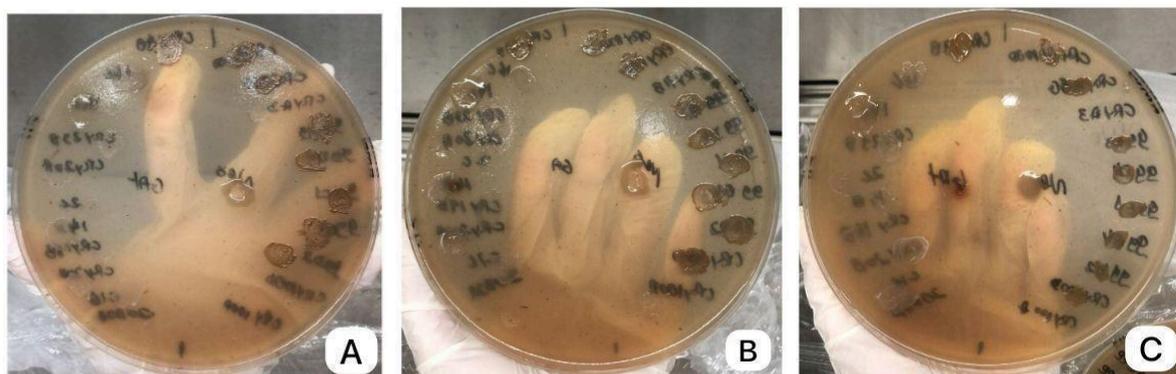


Figura 2 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (125µg) 8º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (250µg) 8º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Omeprazol (500µg) 8º dia.

Nos estudos de Espanha (2017) o omeprazol foi a melhor droga inibitória para o *Cryptococcus* após 72 horas em uma concentração de 125µg. Além disso, os estudos de Sterbini et al. (2016) evidenciaram que alguns pacientes que foram tratados com omeprazol têm diferenças na microbiota e os pacientes que não foram tratados com essa droga não possuem esse desequilíbrio.

O omeprazol tem um potencial inibitório visível da melanogênese, porém, é provável que, esta droga possa inibir a lacase de forma reversível, já que, no oitavo dia é possível observar uma alta melanização nas cepas. Essa hipótese sobre a da inibição da lacase é apresentada nos estudos de melanócitos de Baek e Lee (2015).

Os resultados iniciais mostram que, os IBPs poderiam ter um efeito inibitório na produção de melanina e isso poderia estar associado a uma inibição de lacase. Uma hipótese sustentada pelos estudos de Matsui et al. (2015), seria que, os IBPs inibem a capacidade da lacase de oxidar compostos fenólicos, impedindo a ligação de cobre com a lacase, já que, essa enzima é dependente de cobre.

Produto B: Nimesulida

Segundo Borges et al. (2015), a nimesulida é um medicamento anti-inflamatório não esteroide (AINE's) amplamente utilizado para alívio de dores agudas, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, sendo indicado por sua eficácia superior comparada a outros medicamentos similares.

Utilizando o fármaco Nimesulida, é possível observar que não houve inibição evidente da melanina nas placas de Petri em cepas ambientais no 5º dia. Do 5º dia em diante a maioria

das cepas possuíam uma coloração marrom que ao longo dos dias foram intensificadas. Além disso, a cepa padrão de *C.neoformans* (ATCC 24067) na concentração de 125µg produziu pouca melanização que se estendeu até o 8º dia (Tabela 6).

Tabela 6 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Nimesulida, leitura do 5º dia.

Nimesulida (5º dia)				
Concentração	Cepa padrão (ATCC 24067)	Cepa padrão (ATCC 32608)	Cepas clínicas	Cepas ambientais
125 µg	Marrom claro	Branco	Branco	Marrom escuro
250 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom claro
500 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom claro

Fonte: Autor (2024)



Figura 3 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (125µg) 5º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (250µg) 5º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (500µg) 5º dia.

Sendo assim, a melanização ficou mais intensa nas cepas ambientais no 8º dia, no qual, a concentração de 125µg obteve a coloração mais escura, indicando que não houve inibição da melanização nem nos primeiros dias com essa concentração. No entanto, nas concentrações de 250µg e 500µg em cepas ambientais, houve pouca inibição nos primeiros dias e no 8º dia não houve inibição da produção de melanina. Nas cepas clínicas e cepa padrão *C.Gattii* (ATCC 32608) não houve melanização evidente (Tabela 7).

Tabela 7 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Nimesulida , leitura do 8º dia.

Nimesulida (8º dia)				
Concentração	Cepa padrão (ATCC	Cepa padrão (ATCC	Cepas clínicas	Cepas ambientais
	24067)	32608)		
125 µg	Marrom claro	Branco	Branco	Marrom escuro
250 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom escuro
500 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom escuro

Fonte: Autor (2024)

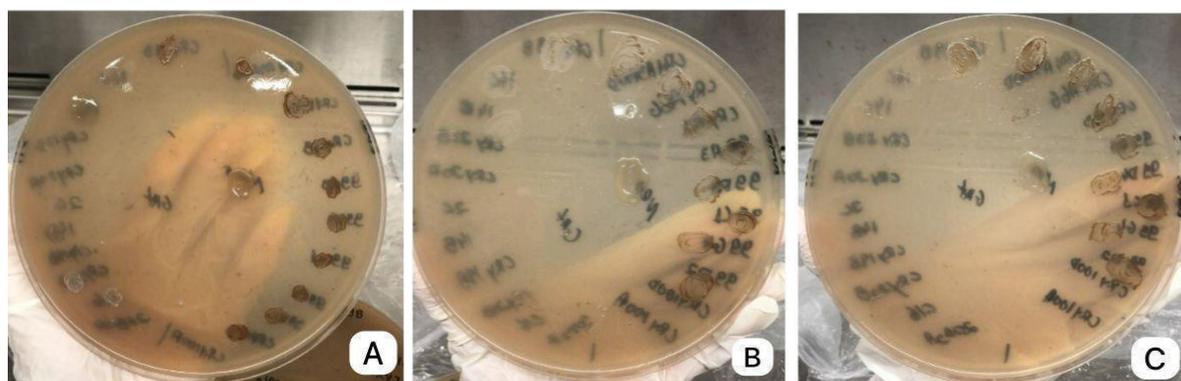


Figura 4 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (125µg) 8º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (250µg) 8º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Nimesulida (500µg) 8º dia.

Para Borges et al. (2015), o comportamento redox entre os grupos nitro e amino da nimesulida pode estar relacionado ao seu mecanismo anti-inflamatório e à toxicidade associada ao fármaco. Esse mecanismo pode influenciar outras atividades biológicas, como sua ação antifúngica contra fungos patogênicos e leveduras. Segundo Carlini e Ligabue-Braun (2016), o uso de AINEs, como a nimesulida, pode levar à inibição de enzimas importantes, a urease e a lacase, que desempenham papel crucial na virulência de patógenos. Além disso, os estudos de Matos et al. (2017), mostram que os AINEs têm a capacidade de inibir a atividade da urease, por inibição direta ao sítio ativo da enzima ou pela inibição da síntese da enzimática. Portanto, esses estudos sugerem que os AINEs podem atuar como

inibidores de proteínas essenciais fúngicas, interferindo nos mecanismos enzimáticos ou na regulação de fatores de virulência, como urease ou lacase.

De acordo com Matos et al. (2017), a nimesulida demonstrou forte atividade antifúngica ao inibir o crescimento de leveduras encapsuladas de *C.neoformans* e *C.gattii*, com concentrações inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) variando entre 62 e 124 µg/mL.

Produto C: Glifosato

O glifosato é um herbicida que inibe a síntese de aminoácidos aromáticos. Os estudos de Nosanchuk et al. (2001), o uso de glifosato em camundongos aumentou as taxas de sobrevivência e diminuiu as unidades formadoras de colônias. A melanização na presença de L-dopa foi inibida pelo glifosato e isso adiou a melanização, sugerindo que o glifosato é um fungistático, já que, ele interfere na oxidação da L-dopa bloqueando a polimerização da melanina e a reação da lacase.

O fármaco Glifosato produziu uma pequena inibição da melanina em cepas ambientais, clínicas e padrão na concentração de 125µg no 5º dia. Mas, nas concentrações de 250µg e 500µg em cepas ambientais houve pouca melanização. Nas cepas padrão em todas as concentrações não houve melanização evidente desde o início (Tabela 8).

Tabela 8 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Glifosato, leitura do 5º dia.

Glifosato (5º dia)				
Concentração	Cepa padrão (ATCC	Cepa padrão (ATCC	Cepas clínicas	Cepas ambientais
	24067)	32608)		
125 µg	Branco	Branco	Branco	Branco
250 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom claro
500 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom claro

Fonte: Autor (2024)

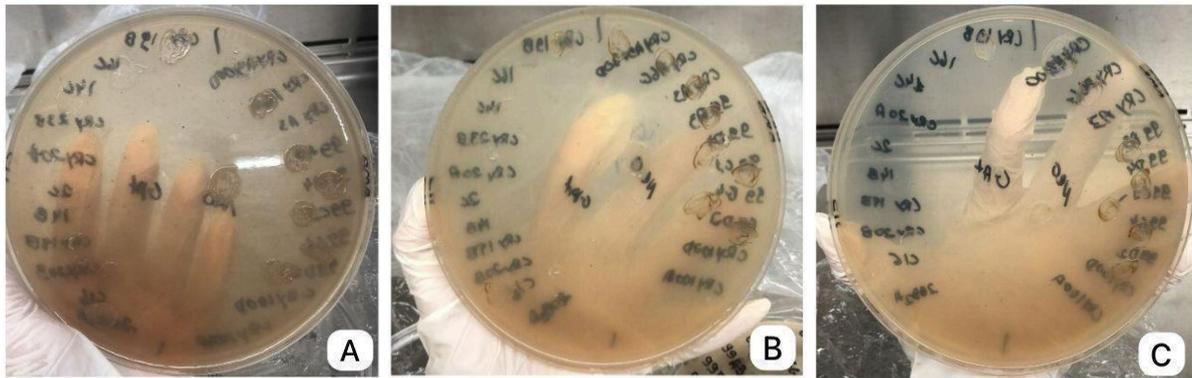


Figura 5 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (125µg) 5º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (250µg) 5º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (500µg) 5º dia.

A partir do 5º dia em diante, as cepas ambientais começaram a produzir melanina com colorações mais fortes, mas as cepas clínicas e padrões mantiveram sua coloração branca desde o início. É possível notar que, no 8º dia, algumas colônias das cepas ambientais não estavam mais sendo inibidas com o glifosato principalmente nas concentrações de 250µg e 500µg (Tabela 9).

Tabela 9 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Glifosato, leitura do 8º dia.

Glifosato (8º dia)				
Concentração	Cepa padrão (ATCC 24067)	Cepa padrão (ATCC 32608)	Cepas clínicas	Cepas ambientais
125 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom escuro
250 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom escuro
500 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom escuro

Fonte: Autor (2024)



Figura 6 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (125µg) 8º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (250µg) 8º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Glifosato (500µg) 8º dia.

Sendo assim, no 8º dia o fármaco parou de inibir a produção da melanina principalmente nas cepas ambientais. Nas concentrações de 250µg e 500µg utilizadas com o Glifosato em cepas ambientais foi obtido alta melanização pela coloração marrom escuro e nas cepas clínicas não houve melanização como mostrado na Figura 6.

O glifosato apresentou uma boa inibição na produção de melanina nos primeiros dias, da mesma forma que nos estudos de Nosanchuk et al. (2001), mas, a partir do 8º dia as cepas ambientais produziram uma melanização evidente como mostrado anteriormente. Apesar disso, o glifosato é um produto tóxico, então, não seria possível realizar aplicações clínicas, já que, segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), ele é visto como um "potencial carcinógeno humano".

Produto D: Casca de cajueiro (*Anacardium occidentale*)

Segundo Ma, J. et al. (2012) e Freitas et al. (2016), o cajueiro (*Anacardium occidentale*) é uma árvore conhecida e cultivada em quase todo o Brasil, possui um fruto conhecido pelo nome de castanha. O cajueiro possui propriedades antiinflamatória, antioxidantes, antimicrobiana e cicatrizante, sendo utilizado no tratamento de doenças. Com essas propriedades e o interesse da população no uso desses produtos, surge também o aumento de pesquisas em relação aos produtos medicinais e fitoterápicos no Brasil e no mundo.

Além disso, o cajueiro (*Anacardium occidentale*) tem sido usado também para fins semelhantes, mas, no tratamento de leishmaniose e com o uso das flores. Como exposto na patente de número PI 1105800-5 A2, com o título de “COMPOSIÇÕES E SEUS USOS A BASE DAS FLORES DE *Anacardium occidentale* NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO

POR *Leishmania amazonensis*”, essa patente, refere-se ao uso do extrato etanólico obtido das flores da *Anacardium occidentale*. Em seus resultados foi visto que, o extrato provoca uma diminuição da quantidade parasitária, induzindo o aumento de linfócitos e estimulando os macrófagos a produzirem citocinas que ajudam na destruição dos parasitos.

Com a utilização da Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*), no 5º dia as cepas padrões, ambientais e clínicas não obtiveram alta melanização em todas as concentrações. Apenas na concentração de 250µg em cepas ambientais houve pouca melanização (Tabela 10).

Tabela 10 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*), leitura do 5º dia.

Casca de Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i>) (5º dia)				
Concentração	Cepa padrão (ATCC	Cepa padrão (ATCC	Cepas clínicas	Cepas ambientais
	24067)	32608)		
125 µg	Branco	Branco	Branco	Branco
250 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom claro
500 µg	Branco	Branco	Branco	Branco

Fonte: Autor (2024)



Figura 7 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (125µg) 5º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (250µg) 5º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (500µg) 5º dia.

A partir do 8º dia, as cepas ambientais obtiveram uma alta melanização, além disso, a cepa padrão de *C.neoformans* (ATCC 24067) em concentrações de 250µg e 500µg também obteve melanização. No entanto, as cepas clínicas e cepa padrão *C.Gattii* (ATCC 32608) não obtiveram melanização evidente (Tabela 11).

Tabela 11 - Intensidade enzimática em *C.neoformans* e *C.gattii* linhagens ambientais e clínicas com Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*), leitura do 8º dia.

Casca de Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i>) (8º dia)				
Concentração	Cepa padrão (ATCC	Cepa padrão (ATCC	Cepas clínicas	Cepas ambientais
	24067)	32608)		
125 µg	Branco	Branco	Branco	Marrom claro
250 µg	Marrom escuro	Branco	Branco	Marrom escuro
500 µg	Marrom escuro	Branco	Branco	Marrom escuro

Fonte: Autor (2024)

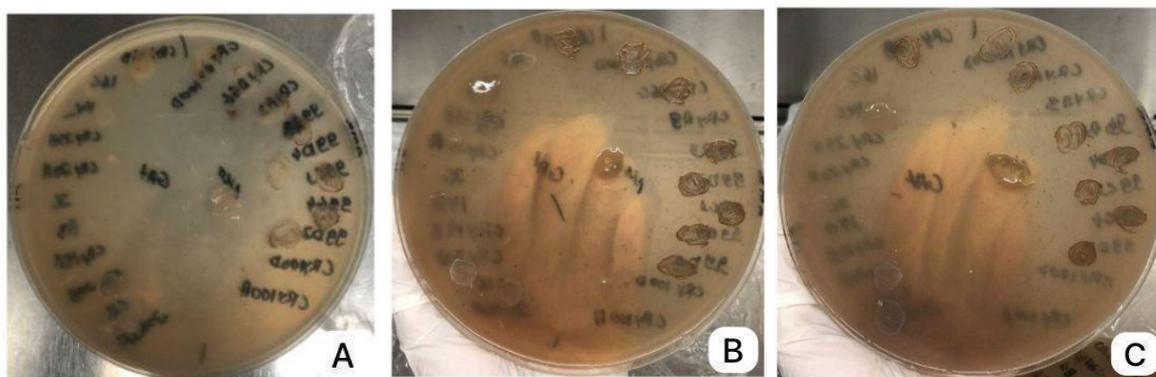


Figura 8 - **A)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (125µg) 8º dia; **B)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (250µg) 8º dia; **C)** Placa de Petri com ágar níger e Casca de Cajueiro (*Anacardium occidentale*) (500µg) 8º dia.

Como foi mostrado por Almeida et al. (2023), para o desenvolvimento de novos medicamentos contra os organismos eucariotos, como por exemplo o *Cryptococcus*, existem alguns desafios, já que, eles possuem uma relação evolutiva próxima aos seres humanos.

Sendo assim, a busca de fármacos sem toxicidade aos hospedeiros torna-se mais difícil. Porém, os extratos obtidos de plantas podem ser alternativas com menores danos ao paciente e poderiam ser utilizados no tratamento dessas doenças.

Em seu estudo, Almeida et al. (2023) mostrou que, os extratos de casca de cajueiro apresentaram uma concentração inibitória mínima de 12,5µg/mL, sendo que a menor concentração inibiu 100% do crescimento para todas as linhagens testadas.

Neste trabalho, nos primeiros dias a produção de melanina foi inibida com quase 100% nas linhagens testadas, mas, ao decorrer dos dias, como mostrado nos dados da Tabela 10 e na Figura 8, não houve bloqueio total da melanização em todas as linhagens.

7.3 DADOS GENÔMICOS E PROTEÔMICOS

Para analisar os genes de enzimas como lacase, fenoloxidase e enzimas com estruturas semelhantes como as polifenoloxidase para a síntese de melanina fúngica, foi realizado uma bioprospecção de dados por meio de do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e UNIPROT, referentes as informações relacionando o *C.neoformans* e *C.gattii* e fenoloxidase/lacase como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Dados genômicos e proteômicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* com produção de enzima fenoloxidase/laccase e enzimas próximas, adotando $p < 0,01$ de similaridade

Entry Name	Protein names	Gene Names	Organism	Length pb
CRZ1_CRYNH	Transcriptional regulator CRZ1	CRZ1 SP1 CNAG_001	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> serotype A (strain H99 / ATCC 208821 / CBS 10515)	1094
BIM1_CRYNH	Copper acquisition factor BIM1	BIM1 CNAG_02775	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> serotype A (strain H99 / ATCC 208821 / CBS 10515)	218
LAC1_CRYNB	Laccase-1, EC 1.10.3.2 (Diphenol oxidase 1)	LAC1 CNBG3550	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> serotype D (strain B-3501A)	624
HSP71_CRYNJ	Transcriptional coregulator SSA1	SSA1 CNC02320	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> serotype D (strain JEC21 / ATCC MYA-565)	640
CUF1_CRYNH	Copper-dependent transcription factor 1	CUF1 CNAG_07724	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> serotype A (strain H99 / ATCC 208821 / CBS 10515 /	1048
HSF_CRYNJ	Heat shock transcription factor	HSF1 CNB00120	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> serotype D (strain JEC21 / ATCC MYA-565)	783
HSP71_CRYNB	Transcriptional coregulator SSA1	SSA1 CNBC4920	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> serotype D (strain B-3501A)	640
LAC2_CRYNH	Laccase-2, EC 1.10.3.2 (Diphenol oxidase 2)	LAC2 CNAG_03464	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> serotype A (strain H99 / ATCC 208821 / CBS 10515 /	594
LAC1_CRYNH	Laccase-1, EC 1.10.3.2 (Diphenol oxidase 1)	LAC1 CNAG_03465	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> serotype A (strain H99 / ATCC 208821 / CBS 10515)	624
0A095CIC4_CRYG	Acidic laccase	CNBG_4942	<i>Cryptococcus gattii</i> serotype B (strain R265)	640
0A0D0TT17_9TRE	Acidic laccase	I313_05468	<i>Cryptococcus gattii</i> VGII Ram5	640
0A0D0U0R9_9TRE	Laccase	I313_01963	<i>Cryptococcus gattii</i> VGII Ram5	614
0A0D0Y7W1_9TRE	Acidic laccase	I306_04230	<i>Cryptococcus gattii</i> EJB2	640
0A225XFF4_CRYN	Acidic laccase	C356_06431	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> c45	640
B2C6F1_CRYGA	Diphenol oxidase (Laccase 1)	LAC1 CNLAC1	<i>Cryptococcus gattii</i>	614
B3ITU4_CRYNE	Diphenol oxidase (Laccase)	CNLAC1 LAC1	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	624
B3ITU5_CRYNE	Diphenol oxidase (Laccase)	CNLAC1 LAC1	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	624
B3ITV4_CRYNE	Diphenol oxidase (Laccase)	CNLAC1 LAC1	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	624
B3ITV6_CRYNE	Diphenol oxidase (Laccase, EC 1.10.3.2)	CNLAC1 LAC1	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	624
B3ITW2_CRYGA	Diphenol oxidase	CNLAC1	<i>Cryptococcus gattii</i> (<i>Filobasidiella gattii</i>) (<i>Cryptococcus bacillisporus</i>)	613
J9W0J5_CRYNH	Acidic laccase	CNAG_06241	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> serotype A (strain H99 / ATCC 208821)	640
Q09HV5_CRYNV	Diphenol oxidase (Laccase, EC 1.10.3.2)	LAC1 CNLAC1	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	624
Q5K7H5_CRYNJ	Acidic laccase, putative	CNM02420	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> serotype D (strain JEC21 / ATCC MYA-565)	640
Q874K8_CRYNV	Chloride channel protein	CLC-A	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	864
0A059XNI9_CRYN	Laccase		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	86
0A059XSJ9_CRYN	Laccase		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	86
0A059XSK3_CRYN	Laccase		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	86
0A059XSQ7_CRYN	Laccase		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	86
0A1S6LQA8_9TRE	Diphenol oxidase (Laccase) (Laccase diphenol oxidase)	LAC1 lac1	<i>Cryptococcus gattii</i> VGII	87
0A894Z224_9TRE	Laccase	LAC1	<i>Cryptococcus gattii</i> VGIV/VGIIIc	86
E0XG55_CRYGA	Diphenol oxidase (Laccase) (Laccase 1)	LAC1	<i>Cryptococcus gattii</i>	86
E0XG58_CRYGA	Diphenol oxidase (Laccase 1)	LAC1	<i>Cryptococcus gattii</i>	86
E0XG63_CRYGA	Diphenol oxidase (Laccase) (Laccase 1)	LAC1 lac1	<i>Cryptococcus gattii</i>	87
E0XG74_CRYNE	Laccase (Laccase 1)	LAC1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	86
E0XG75_CRYGA	Diphenol oxidase (Laccase) (Laccase 1)	LAC1 lac1	<i>Cryptococcus gattii</i>	87
E0XG77_CRYGA	Diphenol oxidase (Laccase) (Laccase 1)	LAC1	<i>Cryptococcus gattii</i>	86
G0WLS0_CRYGA	Diphenol laccase (Diphenol oxidase) (Laccase)	LAC1	<i>Cryptococcus gattii</i>	86
G0WND9_CRYGA	Diphenol oxidase (Laccase)	LAC1	<i>Cryptococcus gattii</i>	86
H9LYU6_CRYGA	Diphenol oxidase (Laccase)	LAC1	<i>Cryptococcus gattii</i>	86
Q2Q4Q0_CRYNE	Diphenol laccase	LAC1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	87
Q30H99_CRYGA	Diphenol laccase (Diphenol oxidase)	LAC1	<i>Cryptococcus gattii</i>	109
Q3B8W6_CRYGA	Laccase	LAC	<i>Cryptococcus gattii</i>	99
Q3B8W7_CRYGA	Laccase	LAC	<i>Cryptococcus gattii</i>	99
Q3B8W8_CRYGA	Laccase	LAC	<i>Cryptococcus gattii</i>	99
Q3B8Z6_CRYGA	Laccase	LAC	<i>Cryptococcus gattii</i>	99
Q3B8Z7_CRYGA	Laccase	LAC	<i>Cryptococcus gattii</i>	99
Q3B904_CRYGA	Laccase	LAC	<i>Cryptococcus gattii</i>	99
Q3B905_CRYGA	Laccase	LAC	<i>Cryptococcus gattii</i>	99
Q3B906_CRYGA	Laccase	LAC	<i>Cryptococcus gattii</i>	99

Os dados genômicos e proteômicos presentes na tabela 12 foram utilizados para a construção e análises da filogenia microbiana.

7.4 FILOGENIA MICROBIANA

Como mostrado por Latouche et al. (2003) e Meyer et al. (2003), nos últimos anos diversos métodos moleculares são usados nos isolados de *Cryptococcus* para estudo da sua epidemiologia, essa tecnologia tem sido aplicada na identificação e diagnóstico também. A maioria destas técnicas distinguem isolados individualmente mas têm algumas limitações em identificar sorotipos e variedades ao mesmo tempo.

Nas figuras abaixo, são descritas a filogenia de *Cryptococcus neoformans* para produção de fenoloxidase (Figura 9A) e box de matriz de similaridade (Figura 9B).

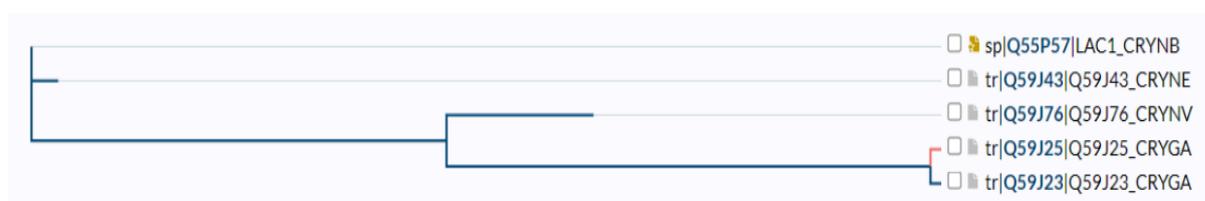


Figura 9A - Filogenia de proteína (fenoloxidase) para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Percent Identity Matrix

tr Q59J23 Q59J23_CRYGA	100.00%	100.00%	84.91%	78.62%	77.99%
tr Q59J25 Q59J25_CRYGA	100.00%	100.00%	85.44%	79.11%	78.48%
tr Q59J76 Q59J76_CRYNV	84.91%	85.44%	100.00%	86.79%	86.16%
sp Q55P57 LAC1_CRYNB	78.62%	79.11%	86.79%	100.00%	99.37%
tr Q59J43 Q59J43_CRYNE	77.99%	78.48%	86.16%	99.37%	100.00%

Figura 9B - Box de matriz de similaridade para produção de fenoloxidase para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Na Figura 9A, tem uma divisão de 3 clusters, com separação entre o *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, sendo assim, isso pode inferir similaridade na modelagem e estrutura das proteínas das respectivas linhagens Q59J23_CRYGA Phenoloxidase CNLAC1 *Cryptococcus gattii* e Q59J25_CRYGA Phenoloxidase CNLAC1 *Cryptococcus gattii*. Na análise de similaridade via box de matriz (Figura 9B), é possível confirmar que, essas linhagens apresentam 100% de similaridade mesmo exibindo diferenças genômicas.

Nas Figuras 10A (neighbour-joining) e 10B (cladograma) descritas abaixo, foi analisado a produção de fenoloxidase/laccase e enzimas próximas de *Cryptococcus neoformans* utilizando características estatísticas e filogenéticas similares às descritas acima.

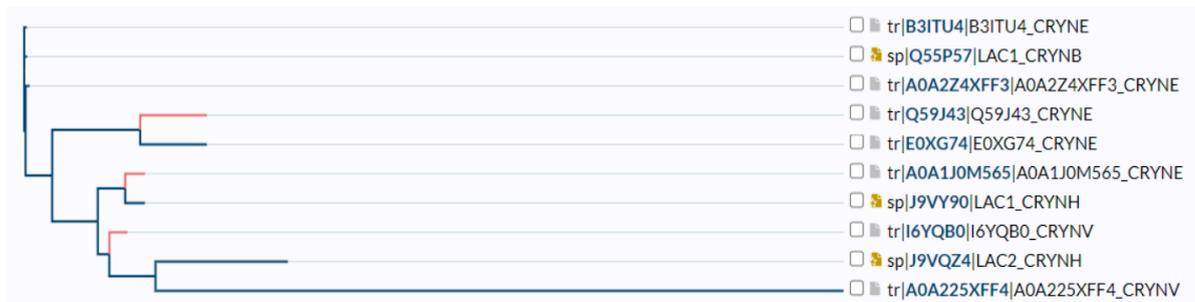


Figura 10A - Filogenia de proteína (fenoloxidase/laccase e proteínas próximas) para *Cryptococcus neoformans* utilizando análises de Neighbour-joining.

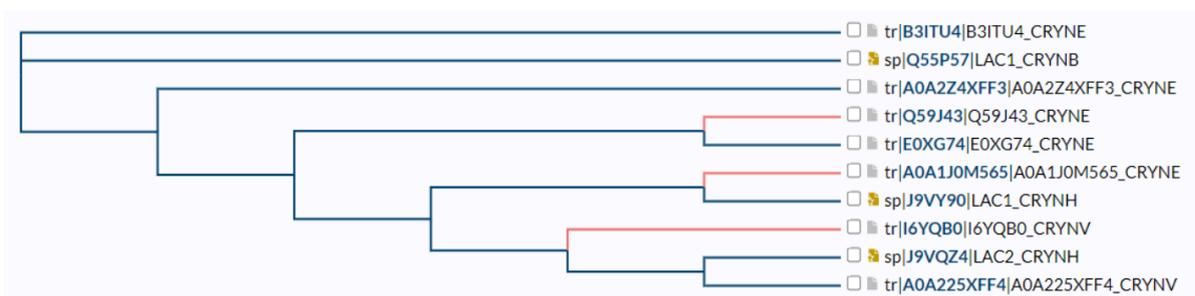


Figura 10B - Cladograma de proteína (fenoloxidase/laccase e proteínas próximas) para *Cryptococcus neoformans* utilizando análises de Neighbour-joining.

É possível observar 4 clusters destacados, cada cluster com a seguinte definição: fenoloxidase, laccase, difenil oxidase e difenil laccase. Porém, no cluster superior tem uma

distinção nítida entre as linhagens Q59J43_CRYNE Phenoloxidase CNLAC1 *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e E0XG74_CRYNE Laccase (Laccase 1) LAC1 *Cryptococcus neoformans*. Além disso, o cluster inferior entre as linhagens J9VQZ4 LAC2_CRYNH Laccase-2, EC 1.10.3.2 (Diphenol oxidase 2) LAC2 CNAG_03464 *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* serotype A (strain H99 / ATCC 208821 / CBS 10515 / e A0A225XFF4_CRYNV) Acidic laccaseC356_06431 *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* c45.

Essas informações podem ser confirmadas com base nas análises de box de matriz de similaridade entre as linhagens e suas enzimas que foram analisadas na Figura 11.

Percent Identity Matrix

tr A0A225XFF4 A0A225XFF4_CRYNV	100.00%	34.88%	27.02%	27.19%	27.02%	17.24%	26.80%	26.84%	32.74%	32.18%
tr E0XG74 E0XG74_CRYNE	34.88%	100.00%	79.07%	80.23%	79.07%	Not a Number	76.74%	75.58%	75.58%	75.58%
tr A0A2Z4XFF3 A0A2Z4XFF3_CRYNE	27.02%	79.07%	100.00%	99.20%	99.36%	99.37%	73.91%	89.90%	92.92%	94.25%
sp Q55P57 LAC1_CRYNB	27.19%	80.23%	99.20%	100.00%	99.52%	99.37%	73.91%	90.06%	92.04%	93.10%
tr B3ITU4 B3ITU4_CRYNE	27.02%	79.07%	99.36%	99.52%	100.00%	99.37%	74.07%	90.22%	92.04%	94.25%
tr Q59J43 Q59J43_CRYNE	17.24%	Not a Number	99.37%	99.37%	99.37%	100.00%	70.44%	86.16%	Not a Number	Not a Number
sp J9VQZ4 LAC2_CRYNH	26.80%	76.74%	73.91%	73.91%	74.07%	70.44%	100.00%	75.93%	84.96%	89.66%
sp J9VY90 LAC1_CRYNH	26.84%	75.58%	89.90%	90.06%	90.22%	86.16%	75.93%	100.00%	100.00%	98.85%
tr A0A1J0M565 A0A1J0M565_CRYNE	32.74%	75.58%	92.92%	92.04%	92.04%	Not a Number	84.96%	100.00%	100.00%	98.85%
tr I6YQB0 I6YQB0_CRYNV	32.18%	75.58%	94.25%	93.10%	94.25%	Not a Number	89.66%	98.85%	98.85%	100.00%

Figura 11 - Box de matriz de similaridade para produção de fenoloxidase para *Cryptococcus neoformans*.

A formação de 3 clusters foi confirmada com as cepas microbianas indicadas, com mais de 90% de similaridade para as bases de aminoácidos descritas no banco de dados utilizado. Isso provê estimativa filogenética e validação de dados sequenciados no banco de genoma. Na Figura 11, box de matriz de similaridade para produção de fenol oxidase para *Cryptococcus neoformans*, é importante notar que em ambos os casos a descrição genômica são diferentes

entre si, o que permite realizar novas análises filogenéticas genômicas além das inferências proteômicas relatadas neste trabalho. Isso acontece devido ao surgimento de regiões não codificantes intercaladas em fungos, causando espaços ou lacunas genômicas entre as regiões de codificação. Para analisar as inferências filograma de enzimas produtoras de melanina em fungos patogênicos, bem como em relação aos processos de infecção por *C.gattii*, foi executado análises filogenéticas de proteínas com cepas selecionadas e bioprospectadas no NCBI e Uniprot.

Nas Figuras 12A (Filograma) e 12B (Cladograma) foram analisadas linhagens de *Cryptococcus gattii* produtores de laccase/fenoloxidase e suas enzimas próximas utilizando Neighbour-joining e $p < 0,01$.

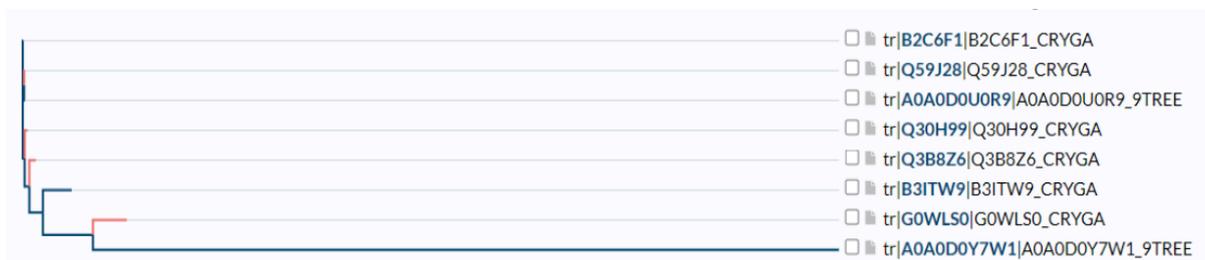


Figura 12A - Filogenia de proteína (fenoloxidase/laccase e suas proteínas próximas) para *Cryptococcus gattii* utilizando análises de Neighbour-joining.

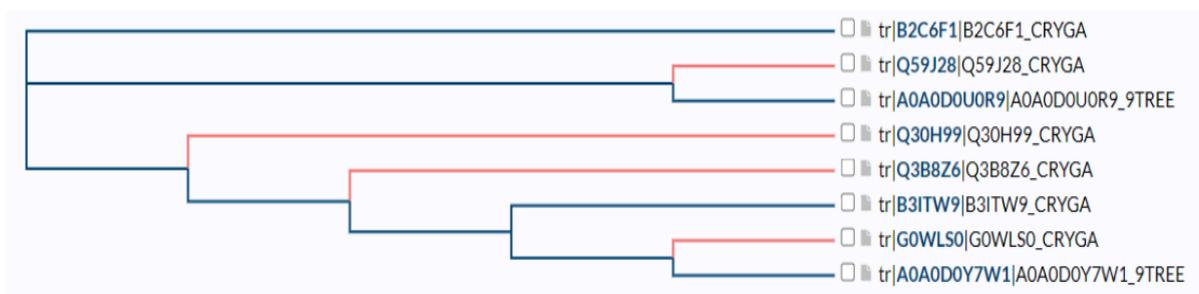


Figura 12B - Cladograma de proteína (fenoloxidase/laccase e suas proteínas próximas) para *Cryptococcus gattii* utilizando análises de Neighbour-joining.

No caso de *C.gattii*, dois clados com semelhança significativa foram distinguidos, clado que reúne as linhagens Q59J28_CRYGA Phenoloxidase CNLAC1 *Cryptococcus gattii* (*Filobasidiella gattii*) como mostrado na figura 12A.

Além disso, no cladograma abaixo (Figura 13) está outro clado com diferenças entre as linhagens de enzimas produtoras de melanina em fungos patogênicos. Com isso, é possível

notar que as enzimas fenoxidase, laccase, difenil oxidase e difenil laccase estão completamente separadas na filogenia da proteína e na análise de sequências genômicas. Então, com essas separações filogenéticas é possível concluir que existe uma diversidade ecológica e diferenças epidemiológicas que podem estar relacionadas a diferenças na patogenia da criptococose.

<input type="checkbox"/> tr A0A0D0Y7W1 A0A0D0Y7W1_9TREE	100.00%	37.21%	27.96%	18.75%	27.84%	27.84%	32.32%	33.94%
<input type="checkbox"/> tr G0WLS0 G0WLS0_CRYGA	37.21%	100.00%	95.35%	Not a Number	96.51%	96.51%	96.51%	96.51%
<input type="checkbox"/> tr B3ITW9 B3ITW9_CRYGA	27.96%	95.35%	100.00%	97.52%	95.93%	95.77%	95.96%	94.50%
<input type="checkbox"/> tr Q59J28 Q59J28_CRYGA	18.75%	Not a Number	97.52%	100.00%	100.00%	100.00%	Not a Number	Not a Number
<input type="checkbox"/> tr B2C6F1 B2C6F1_CRYGA	27.84%	96.51%	95.93%	100.00%	100.00%	99.67%	100.00%	100.00%
<input type="checkbox"/> tr A0A0D0U0R9 A0A0D0U0R9_9TREE	27.84%	96.51%	95.77%	100.00%	99.67%	100.00%	100.00%	100.00%
<input type="checkbox"/> tr Q3B8Z6 Q3B8Z6_CRYGA	32.32%	96.51%	95.96%	Not a Number	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
<input type="checkbox"/> tr Q30H99 Q30H99_CRYGA	33.94%	96.51%	94.50%	Not a Number	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Figura 13 - Box de matriz de similaridade para produção de fenoxidase para *Cryptococcus neoformans*

Sendo assim, com a análise de box de matriz de similaridade (Figura 13) mostra uma separação das linhagens mencionadas acima e o clados definidos (similaridade acima de 90%). Além disso, a epidemiologia molecular de fungos patogênicos como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* é caracterizada com objetivos e metas diferentes.

Diversos estudos como os de Meyer e Trilles (2010), foram realizados com a proposta de avaliar a influência do genótipo em características como patogenicidade, virulência e variantes morfológicas. Existe uma determinação de grupos moleculares geneticamente diversificados nas espécies de *Cryptococcus*, isso proporcionou estabelecer relações entre os genótipos e suas origens geográficas.

Neste estudo foram analisadas filogramas e cladogramas usamos a similaridade genética entre as linhagens fúngicas bioprospectadas a partir de bancos de dados genômicos focados

nas enzimas envolvidas na produção de melanina. As enzimas fenoloxidase, lacase, difenil lacase e difenil oxidase, permitem a distinção da análise filogenética e a distinção de clusters segmentados quando são analisadas linhagens de *C.gattii*.

7.5 ANÁLISE IN SILICO

Como exposto por Enguita et al. (2003) e Claus (2004), até pouco tempo atrás, a lacase era vista somente em eucariotos, mas já existem evidências de sua manifestação em procariontes. Em fungos, a lacase está envolvida na degradação de lignina, na esporulação e produção de pigmentos.

Mayer, A. (2002) e Pukkila-Worley et al. (2005), mostram que, as lacases são membros da família de proteínas multi-cobre, que incluem ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases, elas são codificadas por muitos genes. Em *C. neoformans* tem dois genes de lacase em seu genoma, LAC1 e LAC2, mas apenas LAC1 é expresso na maioria das condições.

A fenoloxidase apresenta 15 caracterizações proteômicas no banco de dados de proteínas, porém, somente uma enzima é modelada. Essa tem como características: Q55P57 reference code, nome proteína e código: LAC1_CRYNB Laccase-1, nos respectivos genes: LAC1 e CNBG3550 da espécie *Cryptococcus neoformans var. neoformans* serotype D (strain B3501A) (*Filobasidiella neoformans*) apresentando 624 Aminoácidos. A enzima fenoloxidase (laccase LAC1 ou nomenclatura alternativa difenol oxidase 1) predicada in silico apresenta 90% de confiabilidade (score confidence) segundo o AlphaFold (Q55P57) analisada via Uniprot.

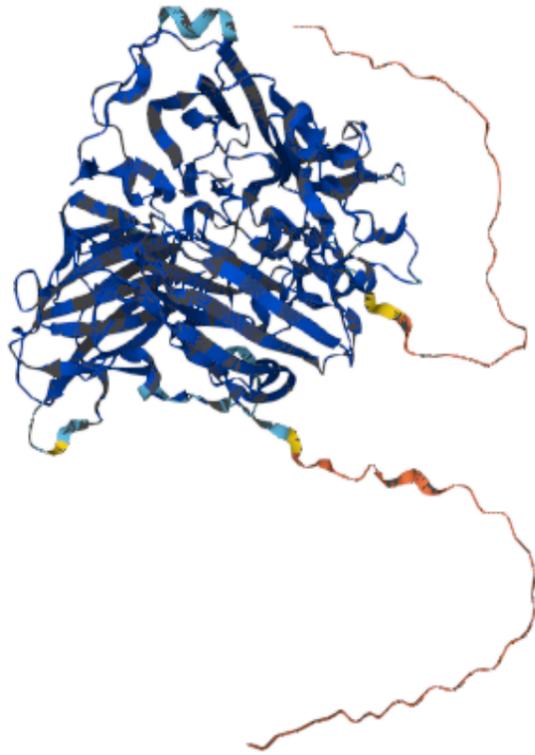


Figura 14 - Enzima fenoloxidase (laccase LAC1) predicada de *Cryptococcus neoformans* via Uniprot (Q55P57 · LAC1_CRYNB).

Na forma descrita acima, a enzima tem score confidence abaixo de 55% pelo AlphaFold em três alças morfológicas, mas, em 75% da molécula acima tem de 90% a 100% de score confidence. Essa enzima pertence à família das oxidases, que degradam a L-dopa e faz parte do processo de melanização fúngica, e também, é uma enzima extracelular que é secretada pela parede celular fúngica. Além disso, é capaz de oxidar grupos aromáticos de difenol e diamino, desempenhando um papel importante no fator de virulência fúngica e com função enzimática de oxidoreductase (Williamson, 1994 ; Zhu et al., 2001).

Para Gomez e Nosanchuk (2003), em *C. neoformans*, a lacase catalisa a formação de um polímero de melanina a partir de precursores polifenólicos 2,4- ou 3,5-di-hidroxi. A melanina, por sua vez, aumenta a capacidade do organismo de sobreviver à explosão oxidativa dentro de um macrófago.

A laccase predicada apresenta comprimento de 624 peptídeos e massa (Da) 68,270 e 1861 pb sendo localizada no cromossomo 7 do *Cryptococcus neoformans*. Com isso, a enzima apresenta 100% de similaridade com diversas outras enzimas que fazem parte de processos de bioprodução de melanina em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, como por

exemplo, uma laccase de *C.neoformans*, 2 fenoloxidasas de *C.neoformans* e 6 difenil oxidase de ambas espécies fúngicas. No entanto, todas essas apresentam baixa confiabilidade no AlphaFold e estão sob revisão do sistema Uniprot.

Segundo Piontek, et al. (2002), as lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato N-ligado e podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, compreendendo subunidades 45 a 80 kDa. Para Messner (1998), a lacase corresponde a uma oxidase que tem cobre, com um peso molecular entre 60 e 80 kDa.

Com os dados da caracterização enzimática e o teste de inibição de melanina foram observados resultados que permitem novos estudos mais aprofundados para entender os mecanismos de inibição e com outras concentrações que possam ser mais efetivas. Além disso, analisar os fatores de virulência como a melanina é importante para compreender a doença visando garantir uma menor patogenicidade e um tratamento com menor toxicidade para os pacientes.

Baseado nos resultados que foram obtidos, abre-se oportunidades para aprofundar a análise patogênica e de seus fatores de virulência em isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* para a saúde pública. Realizar também a filogenia de genes dessas linhagens fúngicas, comparando a estrutura e modelagem das proteínas. Fazer mais pesquisas na área sobre a patogenia do fungo a fim de diminuir a produção de melanina que é um dos fatores de virulência. Além disso, outra vertente de pesquisa é sobre o uso do glifosato ou outros herbicidas utilizados para fins agrícolas, já que, em contato com o solo esses produtos atingem também organismos de importância médica, sendo capaz de causar impactos ambientais e o aumento da resistência desses microrganismos frente aos tratamentos indicados.

É de suma importância a necessidade de pesquisas futuras e de aplicação de atividade antifúngica de fármacos ou extratos vegetais, como também, a realização de estudos com outras concentrações e a avaliação da sua eficácia clínica em inibir o crescimento fúngico e intensidade da melanização.

8 CONCLUSÃO

O uso do software ImageJ para avaliar a intensidade de melanina em cepas de *Cryptococcus* por meio da escala de cinza é válido, permitindo uma quantificação adequada. A produção de melanina nos primeiros dias deste estudo foi inibida de maneira favorável com

os fármacos utilizados. Os inibidores possuem potenciais efeitos contra a melanização até o 5º dia de incubação, inibindo enzimas importantes para a patogenicidade fúngica. Porém, as linhagens de *C. neoformans* ambientais, foram mais resistentes aos inibidores no endpoint, exigindo altas concentrações dos agentes bloqueadores de melanina e apresentando efeito fungistático.

Os inibidores no geral, bloquearam a melanização em cepas clínicas, mas, as cepas ambientais foram relativamente resistentes e não houve uma alta inibição. Porém, com as análises do 8º dia é possível observar que, todos os fármacos em todas as concentrações não inibiram a melanização, mostrando coloração de marrom escuro em cepas ambientais. As linhagens com maiores índices de melanização foram as ambientais obtidas de excretas de aves/morcegos e isso pode ser devido a uma maior patogenicidade presente nessas linhagens. Portanto, a utilização de bloqueadores de melanização em casos de criptococose devem ser avaliadas e podem ser utilizadas como coadjuvante no tratamento.

Além disso, é possível concluir as linhagens isoladas nesse estudo que apresentaram mais de 95% de similaridade genética com a fenoloxidase foram: Lacase ácida, Difenoloxidase (Lacase 1), Difenol oxidase, Lacase, Difenol lacase e Fenoloxidase. Porém, as enzimas fenoloxidase, lacase, difenil oxidado e difenil lacase apresentaram diferenças na filogenia e na sequência genômica, demonstrando diferenças ecológicas que podem implicar na patogenia da criptococose.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULREESH HH, ORGANJI SR, ELBANNA K, et al. Diversity, Virulence Factors, and Antifungal Susceptibility Patterns of Pathogenic and Opportunistic Yeast Species in Rock Pigeon (*Columba livia*) Fecal Droppings in Western Saudi Arabia. **Pol J Microbiol.** 2019;68(4):493-504. doi:10.33073/pjm-2019-049. Acesso em: 05 jul. 2024.

ALMEIDA, Mônica Maria de; FRÓIS, Henrique Almeida; LANG, Karen Luise; FERREIRA, Gabriella Freitas. Potencial Antifúngico De Extratos Etanólicos De Plantas Nativas Sobre Espécies De *Cryptococcus* E *Candida*. In: **Congresso Brasileiro De Química Dos Produtos Naturais**. Adron Science, 2023. p. 22-22. Disponível em: <https://agronscience.com/potencial-antifungico-de-extratos-etanolicos-de-plantas-nativas-sobre-especies-de-cryptococcus-e-candida/>. Acesso em: 05 jul. 2024.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal genetics and biology**, n. 919, p. 55–58, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4370805/>. Acesso em: 05 jul. 2024.

ARAÚJO, C. R. F. et al. Atividade Antifúngica In Vitro Da Casca De Anacardium Occidentale Linn. Sobre Leveduras Do Gênero Candida. **Arquivos em Odontologia**, Belo Horizonte, v.41, n.3, p.193-272. 2005. Disponível em: <https://www.odonto.ufmg.br/revista/wp-content/uploads/sites/10/2016/06/AEO-v41-n3-arch8-2005.pdf>. Acesso em: 20 mar 2024.

BAEK, S. H.; LEE, S.-H. Inibidores da bomba de prótons diminuem a melanogênese nos melanócitos. **Biomedical reports**, v. 3, n. 5, p. 726–730, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4535079/>. Acesso em: 05 jul. 2024.

BAKER, Rosanna P.; CHRISSIAN, Christine; STARK, Ruth E.; CASADEVALL, Arturo. A melanização do *Cryptococcus neoformans* incorpora múltiplas catecolaminas para produzir melanina politépica. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 298, n. 1, p. 101519, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34942148/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14:1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 875–904, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/45273104_A_history_of_research_on_yeasts_141_medical_yeasts_part_2_Cryptococcus_neoformans. Acesso em: 20 jul. 2024.

BORGES, R.S.; OLIVEIRA, J. P.; MATOS, R. F.; CHAVES NETO, A. M.; CARNEIRO, A. S.; MONTEIRO, M. C. (2015) Envolvimento das transferências de elétrons e hidrogênio através do metabolismo redox na atividade e toxicidade da nimesulida. **Journal of molecular modeling**, v. 21, n. 7, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26044360/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

BOULWARE, D. R. *Cryptococcus*: de patógeno humano a levedura modelo. **The Lancet doenças infecciosas**, v. 11, n. 6, p. 434, 2011

BRILHANTE, RSN et al. Um método alternativo para análise da produção de melanina em *Cryptococcus neoformans* sensu lato e *Cryptococcus gattii* sensu lato. **Mycoses**, v. 60, n. 10, p. 697–702, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28699287/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

BRUCE, A.; Palfreyman, J. **Forest products biotechnology**. 1st Edition ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1997.

BYRNES, E. J.; BILDFELL R.; FRANK S. A.; MITCHELL T. G.; MARR K.; HEITMAN J. Evidência molecular de que o alcance do surto de infecção por *Cryptococcus gattii* na Ilha de Vancouver se expandiu para o noroeste do Pacífico nos Estados Unidos. **J Infect Dis**. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715219/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

BYRNES, E. J.; BARTLETT, K. H.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. (2011). *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes and Infection**, 13(11), 895–907. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.05.009>. Acesso em: 20 jul. 2024.

CAMACHO, E. et al. A unidade estrutural da melanina na parede celular do fungo patógeno *Cryptococcus neoformans*. **The journal of biological chemistry**, v. 294, n. 27, p. 10471–10489, 2019. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)31840-8/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)31840-8/fulltext). Acesso em: 20 jul. 2024.

CARLINI C. R, LIGABUE-BRAUN R. Ureasas as multifunctional toxic proteins: a review. **Toxicon**. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26690979/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

CHEN J.; VARMA A.; DIAZ M. R.; LITVINTSEVA A. P.; WOLLENBERG K. K.; KWON-CHUNG K. J. Cepas de *Cryptococcus neoformans* e infecção em pacientes aparentemente imunocompetentes, China. **Doenças Infecciosas Emergentes**. 2008; 14 :755–62. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2600263/>. Acesso em: 22 jul. 2024.

CHRISIAN, Christine; CAMACHO, Emma; FU, Man Shun; PRADOS-ROSALES, Rafael; CHATTERJEE, Subhasish; CORDERO, Radames J.B.; LODGE, Jennifer K.; CASADEVALL, Arturo; STARK, Ruth E.. Melanin deposition in two *Cryptococcus* species depends on cell-wall composition and flexibility. **Journal Of Biological Chemistry**.v. 295, n. 7, p. 1815-1828, fev. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7029119/>. Acesso em: 22 jul. 2024.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron (Oxford, England)**, v. 35, n. 1–2, p. 93–96, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15036303/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

CORDEIRO, B. M. P. C.; CARVALHO JUNIOR, A. R.; SANTOS, J. R. A.; ARAÚJO, A. D.; SILVA, A. G.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G. Anticryptococcal activity of hexane extract from *Spondias tuberosa* Arruda and associated cellular events. **Journal de Mycologie Médicale**, 100965. doi:10.1016/j.mycmed.2020.100965. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32307255/>. Acesso em: 22 jul. 2024.

CORDERO R. J. B.; CAMACHO E.; CASADEVALL A. Melanização em *Cryptococcus neoformans* requer regulação complexa. **mBio**. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7002353/>. Acesso em: 22 jul. 2024.

CORTESÃO, M. et al. Esporos de *Aspergillus niger* são altamente resistentes à radiação espacial. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.00560/full>. Acesso em: 17 jul. 2024.

CUNHA, M. M. L. et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC microbiology**, v. 10, p. 80, 2010. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-10-80>. Acesso em: 22 jul. 2024.

DA SILVA BK, FREIRE AK, BENTES ADOS S, et al. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Rev Iberoam Micol**. 2012;29(1):40-43. doi:10.1016/j.riam.2011.05.003. Acesso em: 22 jul. 2024.

DA SILVA PEREIRA RODRIGUES, A. R. Potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatória e antifúngica da *Anacardium occidentale* (Linn): Revisão de literatura. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 52, n. 1, 2023. DOI:

10.15446/rcciquifa.v52n1.105316. Disponível em:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa/article/view/105316>. Acesso em: 22 jul. 2024.

DA SILVA, N. F.; SILVA, E. R. A.; DA SILVA, G. N. B.; DA SILVA, M. E. B.; ESPINDOLA, M. T. A.; CORREIA, S. D. O. S.; FALCÃO, R. É. A.; CASTANHA, E. R. E. R. Estudo etnofarmacológico e propriedade antifúngica de duas espécies medicinais: *Anacardium occidentale* (Linn) (Cajueiro, Anacardiaceae) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira, Anacardiaceae) / Estudo etnofarmacológico e propriedades antifúngicas de duas espécies medicinais: *Anacardium occidentale* (Linn) (Cajueiro), Anacardiaceae) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira, Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, [S. l.], v. 1, pág. 9791–9806, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n1-664. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/23756>. Acesso em: 17 jul. 2024.

DE SOUSA, H. R. et al. Melanização mais rápida do *Cryptococcus* aumenta a virulência na criptococose experimental e humana. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 4, p. 393, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9029458/>. Acesso em: 2 maio 2024.

DEEPA. SRIKANTA, FELIPE H. SANTIAGO-TIRADO, AND T. L. D. *Cryptococcus neoformans*: Curiosidade histórica sobre o patógeno moderno. **Yeast (Chichester, England)**, v. 31, n. 2, p. 47–60, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3938112/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

DIXIT A.; CARROLL S. F.; QURESHI S. T. *Cryptococcus gattii*: uma causa emergente de doenças fúngicas na América do Norte. **Perspectivas Interdisciplinares em Doenças Infecciosas**. 2009: 840452. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686104/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

EDWARDS, H. M.; COGLIATI, M.; KWENDA, G.; FISHER, M. C. A necessidade de vigilância ambiental para entender a ecologia, epidemiologia e impacto da infecção por *Cryptococcus* na África, **FEMS Microbiology Ecology**, Volume 97, Edição 7, julho de 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8536938/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

EISENMAN, H. C. et al. A lacase de *Cryptococcus neoformans* catalisa a síntese de melanina a partir de d- e l-DOPA. **Microbiology (Reading, Inglaterra)**, v. 153, n. 12, p. 3954–3962, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18048910/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Síntese e montagem de melanina fúngica. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318813/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

ENGUIA, F. J. et al. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. **The journal of biological chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19416–19425, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12637519/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ENSEN, E. C. Análise quantitativa de coloração histológica e fluorescência usando ImageJ. **Registro anatômico (Hoboken, NJ: 2007)**, v. 296, n. 3, p. 378–381, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ar.22641>. Acesso em: 17 jul. 2024.

ERB-DOWNWARD J. R.; NOGGLE R. M.; WILLIAMSON P. R.; HUVNAGLE G. B. O papel da lacase na produção de prostaglandina por *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3973538/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

ESPAÑA, J. D. A. Efeito dos inibidores da bomba de prótons na sensibilidade in vitro e inibição da produção de melanina em *Cryptococcus* spp. 2017. 95 f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica)** - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/26376>. Acesso em: 17 jul. 2024.

FRAZÃO, S. O. et. al. 2020. Lacase afeta a taxa de exocitose não lítica de *Cryptococcus neoformans* de macrófagos. **mBio** 11:10.1128/mbio.02085-20. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/handle/10482/39934>. Acesso em: 17 jul. 2024.

FREITAS, A. V. L. et al. Os raizeiros e a comercialização de plantas medicinais em São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n.2. 2016. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/1863/1114>. Acesso em: 17 jul. 2024.

FREITAS, GUSTAVO J. C.; SANTOS, DANIEL A. Cápsula polissacarídica de *Cryptococcus gattii*: uma visão sobre interações fungo-hospedeiro e estudos de vacinas. **European Journal Of Immunology**, v. 51, n. 9, p. 2206-2209, 15 ago. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202149349>. Acesso em: 17 jul. 2024.

GALANIS, E. et al. Apresentação clínica, diagnóstico e tratamento de casos de *Cryptococcus gattii* : lições aprendidas na Colúmbia Britânica. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology**, v. 20, n. 1, p. 23–8, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2690522/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

GOMEZ B. L.; NOSANCHUK J. D. Melanin and fungi. **Curr Opin Infect Dis**. 2003; 16:91–96. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12734441/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

HANSKON A.; NGAMSKULRUNGROJ P.; ANGKASEKWINAI P. Contribuição da expressão da lacase para a resposta imune contra a infecção por *Cryptococcus gattii*. **Infection and Immunity**. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7035932/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

HOEFLER, R.; LEITE, B. F. Segurança do uso contínuo de inibidores da bomba de prótons. **Boletim Farmacoterapêutica. Ano XIV**. Números 01 e 02. 2009. Disponível em: https://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/70/083a088_farmacoterapAutica.pdf. Acesso em: 17 jul. 2024.

HUANG, Yemei; ZANG, Xuelei; YANG, Chen; DENG, Hengyu; MA, Xidong; XIE, Mei; ZHOU, Meng; SONG, Jialin; XUE, Xinying. Gene, virulence and related regulatory mechanisms in *Cryptococcus gattii*. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 54, n. 5, p.

593-603. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9828318/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

IYER, KR, REVIE, NM, FU, C. et al. Estratégias de tratamento para infecção criptocócica: desafios, avanços e perspectivas futuras. **Nat Rev Microbiol**, 19, 454–466 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00511-0>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7868659/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

KAPLAN, J. E.; MASUR, H.; HOLMES, K. K. Diretrizes para prevenção de infecções oportunistas entre pessoas infectadas pelo HIV--2002. **Recomendações e relatórios: Relatório semanal de morbidade e mortalidade**, v. 51, n. RR-8, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12081007/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii, os agentes etiológicos da criptococose. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760–a019760, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066639/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

LATOUCHE, G.N., HUYNH, M., SORRELL, T.C. & MEYER, W. Análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição por PCR do gene da fosfolipase B (PLB1) para subtipagem de isolados de Cryptococcus neoformans. **Microbiologia aplicada e ambiental**, v. 69, n. 4, p. 2080–2086, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154774/>. Acesso em: 25 jul. 2024.

LIU, S. et al. Melanina fúngica e o sistema imunológico de mamíferos. **Journal of fungi (Basel, Suíça)**, v. 7, n. 4, p. 264, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8066723/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

MA, J. et al. O recrutamento da proteína da cadeia leve 3 desencadeado por dectina-1 para fagossomos facilita a apresentação do complexo de histocompatibilidade principal classe II de antígenos derivados de fungos. **The journal of biological chemistry**, v. 287, n. 41, p. 34149–34156, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464523/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

MATOS, Rafaelle Fonseca; MENDONÇA, Lúcia Carla Vasconcelos; DA SILVA SOUZA, Kaira Geiliane; FONSECA, Adriana Aparecida Durães; COSTA, Elaine Mirla Souza; DE LIMA, Marcus Vinicius Dias; VIEIRA, José Maria dos Santos; DE BRITO, Mioni Thielli Figueiredo Magalhães; MONTEIRO, Marta Chagas. Nimesulide inhibits pathogenic fungi: PGE2-dependent mechanisms. **Folia Microbiologica**, 62(2), 169–174. 2017. doi:10.1007/s12223-016-0483-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27866353/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

MATSUI, M. S. et al. Omeprazol, um inibidor da bomba de prótons gástrica, inibe a melanogênese ao bloquear o tráfego de ATP7A. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 10, p. 834–841, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25337692/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

MAYER, A. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551–565, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12126701/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

MCGINNIS, M. R. **Tópicos atuais em micologia médica**. 1988. ed. Nova York, NY: Springer, 1987. v. 2.

MEYER, W., CASTAÑEDA, A., JACKSON, S., HUYNH, M., CASTAÑEDA, E. Tipagem molecular de isolados ibero-americanos de *Cryptococcus neoformans*. **Doenças infecciosas emergentes**, v. 9, n. 2, p. 189–195, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901947/>. Acesso em: 25 jul. 2024.

MEYER, W.; TRILLES, L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. **Australian Biochemist**, vol. 41, n. 1, p. 12-15, apr. 2010. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/37357>. Acesso em: 25 jul. 2024.

MOMIN, M.; WEBB, G. Efeitos ambientais na virulência Fatores e Suscetibilidade Antifúngica de *Cryptococcus neoformans*. **Int. J. Mol.** 2021, 22, 6302. <https://doi.org/10.3390/ijms22126302>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8230809/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

NISHIKAWA, H. et al. In vitro and in vivo antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine, against *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1709–1713, 1 jun. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890668/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-DOPA. **Microbiology**, v. 149, n. 7, p. 1945–1951, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12855745/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3519-28, Nov 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1635213/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

NOSANCHUK, JOSHUA DANIEL N; OVALLE, RAFAEL; CASADEVALL, ARTURO. Glyphosate Inhibits Melanization of *Cryptococcus neoformans* and Prolongs Survival of Mice after Systemic Infection, **The Journal of Infectious Diseases**, Volume 183, Edição 7, 1º de abril de 2001, Páginas 1093–1099, <https://doi.org/10.1086/319272>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/183/7/1093/859665?login=false>. Acesso em: 17 jul. 2024.

NOSANCHUK J. D.; STARK R. E.; CASADEVALL A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure?. **Front Microbiol**. 2015. doi:10.3389/fmicb.2015.01463. Acesso em: 17 jul. 2024.

NOVAES, T. E. R.; NOVAES, A. S. R. Análise dos potenciais medicinais do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn): uma breve revisão. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, 2021, v. 10, n. 1, p. e41810111838, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i1.11838. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11838>. Acesso em: 17 jul. 2024.

OLIVEIRA, Ertênia P. et al. Tuberculose e neurocriptococose por *Cryptococcus neoformans* tipo molecular VNI em paciente não HIV: relato de caso de comorbidades. **Science direct, Revista de Micologia Médica**, v. 32, ed. 1, 2021. DOI 10.1016/j.mycmed.2021.101213. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1156523321001049?via%3Dihub>. Acesso em: 2 maio 2024.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Expressão de urease por *Cryptococcus neoformans* promove sequestro microvascular, aumentando assim a invasão do sistema nervoso central. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1615675/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

PARK B. J.; WANNEMUEHLER K. A.; MARSTON B. J.; GOVENDER N.; PAPPAS P. G.; CHILLER T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS (London, England)**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 2009. Disponível em: https://journals.lww.com/aidsonline/abstract/2009/02200/estimation_of_the_current_global_burden_of.12.aspx. Acesso em: 17 jul. 2024.

PARQUE , E; CHEN S. O; CAMACHO ,E; CASADEVALL, A; WILLIAMSON, P. R. Papel da via ESCRT no tráfico de lacase e virulência de *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity** , v. 88, n. 7, 2020. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.00954-19>. Acesso em: 17 jul. 2024.

PINHEIRO, S. B. et al. Meningite criptocócica em pacientes não HIV no Estado do Amazonas, Norte do Brasil. **Revista brasileira de microbiologia** , v. 52, n. 1, p. 279–288, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7966655/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37663–37669, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12163489/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

PONTES, M. M.; ARAÚJO, P. A. S.; OLIVEIRA, V. A.; LINS, N. A. E.; SILVA, G. N. B.; FALCÃO, R. E. A. Análise Do Perfil Biológico E Farmacológico Do Cajueiro (*Anacardium occidentale*). **Agron Science**, 2023. Disponível em: <https://agronscience.com/analise-do-perfil-biologico-e-farmacologico-do-cajueiro-anacardium-occidentale/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

PUKKILA-WORLEY, R., Q. D. GERRALD, P. R. KRAUS, M. J. BOILY, M. J. DAVIS, S. S. GILES, G. M. COX, J. HEITMAN, AND J. A. ALSPAUGH. 2005. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **The Lancet infected diseases**. Disponível em: <https://scholars.duke.edu/publication/733519>. Acesso em: 20 jun. 2024.

RAJASINGHAM R, GOVENDER NP, JORDAN A, LOYSE A, SHROUFI A, DENNING DW, MEYA DB, CHILLER TM, BOULWARE DR. A carga global da infecção criptocócica associada ao HIV em adultos em 2020: uma análise de modelagem. **The Lancet infected**

diseases , v. 22, n. 12, p. 1748–1755, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9701154/>. Acesso em: 25 jul. 2024.

RAJASINGHAM, R. et al. Carga global de doença de meningite criptocócica associada ao HIV: uma análise atualizada. **The Lancet infected diseases** , v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5818156/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

REUWSAAT, J. C. V.; DOERING, T. L.; KMETZSCH, L. Excesso de uma coisa boa: a superprodução de fatores de virulência prejudica a patogenicidade criptocócica. **Célula microbiana (Graz, Áustria)** , v. 8, n. 6, p. 108–110, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8080896/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

SALAS, S. D. et al. Efeito do gene da lacase CNLAC1, na virulência de *Cryptococcus neoformans*. **The journal of experimental medicine** , v. 184, n. 2, p. 377–386, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192698/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

SÁNCHEZ-FERRER, Á. et al. Tirosinase: uma revisão abrangente do seu mecanismo. **Biochimica et biophysica acta** , v. 1247, n. 1, pág. 1–11, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7873577/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

SOLANO, Francisco. Melanins: Skin Pigments and Much MoreTypes, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. **New Journal of Science**. 2014. 1-28. doi: 10.1155/2014/498276.

SOUTO, A. C. P. et al. Análise genética populacional revela alta diversidade genética na população brasileira de *Cryptococcus gattii* VGII e desloca a origem global da Floresta Amazônica para o deserto semiárido no nordeste do Brasil. **PLoS neglected tropical diseases** , v. 10, n. 8, p. e0004885, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986980/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

STERBINI, F. P. et al. Efeitos dos inibidores da bomba de prótons na microbiota associada à mucosa gástrica em pacientes dispépticos. **Applied and environmental microbiology** , v. 82, n. 22, p. 6633–6644, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27590821/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

WANG, Y. et al. O metabolismo do inositol regula a estrutura da cápsula e a virulência no patógeno humano *Cryptococcus neoformans*. **mBio** , v. 12, n. 6, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8561382/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

WILLIAMSON, P. R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **J Bacteriol** 176, 656–664. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205102/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

WILLIAMSON, P. R. et al. Meningite criptocócica: epidemiologia, imunologia, diagnóstico e terapia. **Nature reviews. Neurology** , v. 13, n. 1, p. 13–24, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27886201/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

ZARAGOZA, O. Princípios básicos da virulência de *Cryptococcus* . **Virulence** , v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6550552/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

ZHAO, Y.; YE, L.; ZHAO, F.; ZHANG, L.; LU, Z.; CHU, T.; WANG, S.; LIU, Z.; SUN, Y.; CHEN, M.; et al. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. **Infect. Dis. Poverty**, v. 12, n. 1, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10020775/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

ZHU, X., GIBBONS, J., GARCIA-RIVERA, J., CASADEVALL, A. & WILLIAMSON, P. R. (2001). Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall associated virulence factor. **Infect Immun**, 5589–5596. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98673/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ZHU, Xudong; WILLIAMSON, Peter R. Papel da lacase na biologia e virulência de *Cryptococcus neoformans* . **Yeast Research, FEMS**, v. 5, ed. 1, p. 1-10, 1 out. 2004. DOI 10.1016/j.femsyr.2004.04.004. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/5/1/1/498804?login=false>. Acesso em: 1 fev. 2024.