



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



IBCCF
INSTITUTO DE BIOFÍSICA
CARLOS CHAGAS FILHO

MESTRADO PROFISSIONAL
**formação
para a pesquisa
biomédica**
IBCCF | UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

JULIANA DE GODOY MIRANDA ORSINO

Dissertação de Mestrado Profissional

Protocolo para obtenção *in vitro* de células titãs de *Cryptococcus neoformans*

Orientadora:

Profa. Susana Frases Carvajal

Rio de Janeiro

2024

JULIANA DE GODOY MIRANDA ORSINO

Protocolo para obtenção *in vitro* de células titãs de *Cryptococcus neoformans*

DISSERTAÇÃO DE Mestrado APRESENTADA AO
Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica
DO INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
COMO REQUISITO A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM FORMAÇÃO DE PESQUISA BIOMÉDICA

ORIENTADORA: DR. SUSANA FRASES CARVAJAL

Rio de Janeiro

2024

CIP - Catalogação na Publicação

094p Orsino, Juliana de Godoy Miranda
Protocolo para obtenção in vitro de células
titãs de *Cryptococcus neoformans* / Juliana de Godoy
Miranda Orsino. -- Rio de Janeiro, 2024.
57 f.

Orientadora: Susana Frases Carvajal.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, Programa de Mestrado Profissional em Formação
para a Pesquisa Biomédica, 2024.

1. : *Cryptococcus neoformans*. 2. Células titãs.
3. Meios de Cultura. 4. Fatores de virulência. I.
Carvajal, Susana Frases, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

"DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO DE MEIO DE CULTIVO REFERÊNCIA PARA OBTENÇÃO
IN VITRO DE CÉLULAS TITÃS DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS"

JULIANA DE GODOY MIRANDA ORSINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 15 DE JULHO DE 2024.

DRA. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADORA DO MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA)

 Documento assinado digitalmente
SUSANA FRASES CARVAJAL
Data: 19/08/2024 12:08:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DRA. SUSANA FRASES CARVAJAL (ORIENTADORA - UFRJ)

 Documento assinado digitalmente
DIEGO ALLONSO RODRIGUES DOS SANTOS DA
Data: 18/08/2024 17:32:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DR. DIEGO ALLONSO RODRIGUES DOS SANTOS DA SILVA - (DOUTOR - UFRJ) - REVISOR

 Documento assinado digitalmente
MARCIA RIBEIRO PINTO DA SILVA
Data: 13/08/2024 16:48:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DRA. MARCIA RIBEIRO PINTO DA SILVA (DOUTOR - UFF)

 Documento assinado digitalmente
MARCOS DE ABREU ALMEIDA
Data: 13/08/2024 15:19:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DR. MARCOS DE ABREU ALMEIDA (DOUTOR - UFF)

 Documento assinado digitalmente
ROSSIANE CLAUDIA VOMMARO
Data: 14/08/2024 10:39:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DRA. ROSSIANE CLAUDIA VOMMARO (DOUTOR - UFRJ)

A minha mãe que nunca desistiu de lutar por mim

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, cuja dedicação incansável e apoio inabalável foram os pilares que sustentaram minha jornada até aqui. Seu amor e incentivo foram minha fonte de força em todos os momentos.

Agradeço a Deus, por ser minha força e guia em todos os momentos, proporcionando-me sabedoria e perseverança para enfrentar e superar os desafios ao longo desta jornada. Agradeço também a Santa Sara Kali, minha protetora e guia espiritual. Sua presença constante e proteção foram fundamentais para que eu pudesse manter a fé e a determinação durante todo o processo. Suas bênçãos e inspiração iluminaram meu caminho, permitindo-me concluir este trabalho com confiança e serenidade. À minha cigana, por todo o apoio espiritual e pelas mensagens de esperança e motivação que sempre me fizeram acreditar em mim mesma. Seu amor e proteção me acompanharam em cada etapa, oferecendo conforto nos momentos de dificuldade e alegria nas conquistas.

À minha querida amiga de laboratório, Iara, que esteve ao meu lado desde o início, oferecendo seu apoio incondicional, seus sábios conselhos e seu ânimo contagiante. Sua presença tornou cada dia no laboratório mais leve e produtivo.

Ao meu amigo de laboratório, Igor, que compartilhou comigo muitos desafios e conquistas. Sua colaboração e amizade foram inestimáveis durante toda a trajetória deste trabalho.

Ao Glauber, que generosamente compartilhou seu conhecimento e tempo para me ensinar e orientar, mesmo nos momentos mais corridos. Sua paciência e dedicação foram fundamentais para o meu aprendizado.

À minha orientadora, Susana, que, além de seu profundo conhecimento na área, ofereceu seu suporte constante e valiosos conselhos. Mesmo nas broncas, reconheci seu compromisso e dedicação em meu crescimento acadêmico e pessoal.

E à equipe toda do Laboratório de Biofísica de Fungos, que proporcionou um ambiente colaborativo e inspirador, onde pude crescer profissionalmente e fazer parte de projetos incríveis. Vocês são minha fonte de inspiração e gratidão.

RESUMO

Cryptococcus neoformans é um patógeno oportunista causador da criptococose, micose que pode causar quadros graves de meningoencefalites, quando coloniza o sistema nervoso central. *C. neoformans* apresenta diversos fatores de virulência que o permite infectar e causar dano ao hospedeiro, dentre eles, a cápsula polissacarídea que desempenha um papel imunomodulador. O ambiente tecidual do hospedeiro é capaz de modular as propriedades estruturais e morfológicas de *C. neoformans* gerando leveduras com distintos tamanhos celulares e capsulares. As células que atingem um tamanho celular superior a 15µm são chamadas de células gigantes ou titãs. Essas células foram descritas no pulmão e cérebro de animais durante a infecção, protegendo o fungo direta e indiretamente contra fagocitose, oxidação e estresse nitrosativo. As células titãs em divisão podem produzir células filhas de tamanho típico, sendo esse fator a maior dificuldade do cultivo *in vitro*. O presente estudo teve como objetivo desenvolver meios de cultura e protocolos para obter um alto percentual de células titãs *in vitro*. Os resultados revelaram que o meio de cultura neurobasal (NB) foi o mais eficaz na indução da formação de células titãs *in vitro*, apresentando tamanhos característicos de células titãs. A formulação otimizada e as condições de cultivo estabelecidas proporcionaram um ambiente propício para o crescimento celular e a diferenciação morfológica, resultando em um alto percentual de células titãs. Esses achados destacam a importância do meio neurobasal como uma ferramenta valiosa para estudos relacionados à virulência e resistência de *C. neoformans*. Assim, ao entendermos melhor os estímulos ambientais que favorecem a formação de células titãs, podemos potencialmente explorar estratégias terapêuticas direcionadas a interromper este fenômeno e, conseqüentemente, reduzir a virulência e patogenicidade deste agente infeccioso.

Palavras chaves: *C. neoformans*; células titãs; meios de cultura; fatores de virulência.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an opportunistic pathogen that causes cryptococcosis, a mycosis that can lead to severe cases of meningoencephalitis when it colonizes the central nervous system. *C. neoformans* exhibits various virulence factors that enable it to infect and damage the host, among them, the polysaccharide capsule which plays an immunomodulatory role. The host tissue environment can modulate the structural and morphological properties of *C. neoformans*, resulting in yeasts with different cellular and capsular sizes. Cells that reach a size greater than 15µm are called giant or titan cells. These cells have been described in the lungs and brains of animals during infection, directly and indirectly protecting the fungus against phagocytosis, oxidation, and nitrosative stress. Dividing titan cells can produce daughter cells of typical size, making their *in vitro* cultivation challenging. The present study aimed to develop culture media and protocols to obtain a high percentage of titan cells *in vitro*. The results revealed that the neurobasal (NB) culture medium was the most effective in inducing the formation of titan cells *in vitro*, presenting characteristic sizes of titan cells. The optimized formulation and established culture conditions provided a conducive environment for cellular growth and morphological differentiation, resulting in a high percentage of titan cells. These findings highlight the importance of neurobasal medium as a valuable tool for studies related to the virulence and resistance of *C. neoformans*. By better understanding the environmental stimuli that favor titan cell formation, we can potentially explore therapeutic strategies aimed at disrupting this phenomenon and consequently reducing the virulence and pathogenicity of this infectious agent.

Keywords: C. neoformans; titan cells; culture media; virulence factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo infeccioso de <i>Cryptococcus</i> spp.....	16
Figura 2- Cápsula Polissacarídea no meio que induz estresse nutricional (meio mínimo) de <i>C. neoformans</i>	18
Figura 3- Ilustração de diferentes populações celulares encontradas em pulmões de camundongos infectados com <i>C. neoformans</i>	19
Figura 4- Medição do comprimento celular (indicado em vermelho), tamanho da cápsula (indicado em amarelo) e comprimento total da célula (indicado em verde) de <i>Cryptococcus neoformans</i>	26
Figura 5- Análise morfológica das células de H99 <i>C. neoformans</i> em microscopia óptica nos diferentes meios utilizados (Escala de 10 µm).....	27
Figura 6- Efeito dos meios de cultura nas células de <i>C. neoformans</i> analisados em comparação ao meio padrão (MM).....	29
Figura 7- Análise morfológica das células de H99 <i>C. neoformans</i> em microscopia óptica no meio mínimo sem CO ₂ . Barra de escala: 10 µm.....	30
Figura 8- Efeito do meio mínimo no tamanho celular, capsular e total das células de H99 de <i>C. neoformans</i>	31
Figura 9- Análise morfológica das células de H99 <i>C. neoformans</i> em microscopia óptica nas diferentes concentrações de piruvato de sódio (obj 60x).....	31
Figura 10- Efeito das diferentes concentrações de piruvato de sódio nas células de <i>C. neoformans</i> analisados em comparação ao meio padrão (MM).....	33
Figura 11- Análise morfológica das células de H99 <i>C. neoformans</i> em microscopia óptica nas diferentes concentrações de L-dopa (obj 40x).....	34
Figura 12- Efeito das diferentes concentrações de L-dopa nas células de <i>C. neoformans</i> analisados em comparação ao meio padrão (MM).....	35
Figura 13- Análise morfológica das células de H99 <i>C. neoformans</i> em microscopia óptica nas diferentes concentrações de norepinefrina (obj 40x).....	37
Figura 14- Efeito das diferentes concentrações de norepinefrina nas células de <i>C. neoformans</i> analisados em comparação ao meio padrão (MM).....	38

Figura 15- Análise morfológica das células de H99 <i>C. neoformans</i> em microscopia óptica nas diferentes concentrações de epinefrina (obj 60x).....	40
Figura 16- Efeito das diferentes concentrações de epinefrina nas células de <i>C. neoformans</i> analisados em comparação ao meio padrão (MM).....	41
Figura 17- Análise morfológica das células de H99 <i>C. neoformans</i> em microscopia óptica nos diferentes meios (obj 60x).....	43
Figura 18- Efeito dos diferentes meios e componentes nas células de <i>C. neoformans</i> analisados em comparação ao meio neurobasal (NB).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Percentual de células titãs nos diferentes meios observados.....	29
Tabela 2- Percentual de células titãs nas diferentes concentrações de piruvato de sódio.....	33
Tabela 3- Percentual de células titãs nas diferentes concentrações de L-dopa.....	36
Tabela 4- Percentual de células titãs nas diferentes concentrações de norepinefrina.....	39
Tabela 5- Percentual de células titãs nas diferentes concentrações de epinefrina	42
Tabela 6- Percentual de células titãs nos meios NB e NB s/B27 e suplemento o B27.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's F-12

L-DOPA- L-3,4-dihydroxyphenylalanine

MM – Meio mínimo

NB- Meio Neurobasal

NS34- Promove diferenciação das células-tronco neuronais em neurônios e astrócitos

OLIGO- Meio de Oligodendrócitos

PBS - Salina tamponada com fosfato (Phosphate buffered saline)

Mg- miligramas

mM- milimolar

µm- micrometros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Cryptococcus</i> spp. e Criptococose.....	15
1.2 Fatores de virulência.....	16
1.3 Células gigantes	18
1.4 Obtenção de células titãs <i>in vitro</i>	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. Isolados fungicos.....	24
4.2. Pré inoculo.....	24
4.3. Meios de cultura e fatores testados.....	24
4.3.1 Meio mínimo.....	24
4.3.2 Meio neurobasal suplementado.....	24
4.3.3 Meio NS34.....	24
4.3.4 Meio de oligodendrócitos (oligo).....	25
4.3.5 Meios com suplementação de neurotransmissores.....	25
4.3.6 Meio suplementado com piruvato de sódio.....	26
4.3.7 Estimulando o crescimento de células titãs no suplemento B27.....	26
4.4 Condições de cultivo para a indução da formação de células titãs por diferentes meios e substratos.....	27
4.5 Parâmetros medidos para avaliar a formação de células titãs por microscopia óptica.....	26

5. RESULTADOS.....	27
5.1. Avaliação dos meios de diferenciação neuronal (meio neurobasal-NB), de células-tronco neuronais em neurônios e astrócitos (Meio-NS34) e de formação de oligodendrócitos (meio de Oligodendrócitos-OLIGO) para a formação de células titãs de C. <i>neoformans</i>	27
5.1.1 Incubação a 37°C com 5 % de CO ₂	27
5.1.2 Incubação a 37°C na ausência de CO ₂	30
5.2 Meio mínimo suplementado com piruvato de sódio.....	31
5.3 Meio mínimo suplementado com L-dopa.....	33
5.4 Meio mínimo suplementado com norepinefrina.....	36
5.5 Meio mínimo suplementado com epinefrina.....	39
5.6 Estimulando o crescimento de células titãs no suplemento B27.....	42
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO.....	48
8. ANEXOS.....	49
9. REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus* spp. e Criptococose

Fungos do gênero *Cryptococcus* são leveduras encapsuladas com morfologia esférica a ovoide, medindo aproximadamente de 5 a 7 µm de diâmetro (MUKAREMERA et al., 2018). Nos tempos atuais, existem cerca de 80 espécies de *Cryptococcus* spp. descritas, sendo *C. neoformans* e *C. gattii* as de maior relevância clínica (SERNA-ESPINOSA et al., 2021). *C. neoformans* é um fungo cosmopolita, podendo ser adquirido no ambiente pelo contato com solo contaminado com excretas de aves (especialmente de pombos), e afeta indivíduos imunocomprometidos em geral, dentre eles os acometidos por leucemia, câncer, transplantados, pacientes em tratamentos prolongados com imunossupressores e, principalmente, pessoas vivendo com HIV/aids (QURESHI et al., 2024). Já a espécie de *C. gattii* pode ser isolada dosocos de árvores e madeira em decomposição, essencialmente em algumas espécies de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis*) e em outras árvores nativas brasileiras como *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa*, *Sygygium jambolana*, *Theobroma cacao*, *Caesalpinia peltophorides*, nas regiões norte e nordeste da Amazônia (SANTOS E FIGUEIREDO, 2021). Além disso, ambas espécies podem sobreviver a predadores ambientais, tais como insetos, vermes e amebas, e interagir com outros microrganismos como bactérias ou outros fungos (LIN e HEITMAN, 2006).

Leveduras do gênero *Cryptococcus* são capazes de infectar o homem, assim como outros mamíferos domésticos (gatos, cachorros, coelhos, ratos e humanos, entre outros), onde podem causar a criptococose (LIN e HEITMAN, 2006). A criptococose é uma micose sistêmica, onde a infecção acontece a partir da inalação de esporos ou leveduras dessecadas (LAROCQUE-DE-FREITAS et al., 2018) (Figura 1). Após passar as barreiras físicas de proteção do organismo, como os movimentos ciliares das vias respiratórias, os propágulos alcançam os alvéolos pulmonares onde irão enfrentar a resposta imune inata e adquirida do hospedeiro (HEITMAN et al., 2011; VERONESI, 2009). Após burlar o sistema imunológico através de diferentes mecanismos, as leveduras conseguem se disseminar através da corrente sanguínea para o sistema nervoso central (LAROCQUE-DE-FREITAS et al., 2018). A meningite causada por *C. neoformans* consiste na forma grave da doença, cujos sintomas mais comuns são cefaleia e febre. Sinais meníngeos (cefaleia, prostração, letargia ou irritabilidade, febre, meningismo, náusea e vômito) são observados em menos da

metade dos casos. Alguns pacientes podem exibir: hipertensão intracraniana (HIC), vômitos, diplopia, confusão, coma, papiledema e envolvimento cutâneo, como o aparecimento de pápulas umbilicadas. Entretanto, sinais e sintomas de gravidade podem ser pouco expressivos e inespecíficos, dificultando a identificação dos casos e o diagnóstico precoce (FERREIRA, 2016).

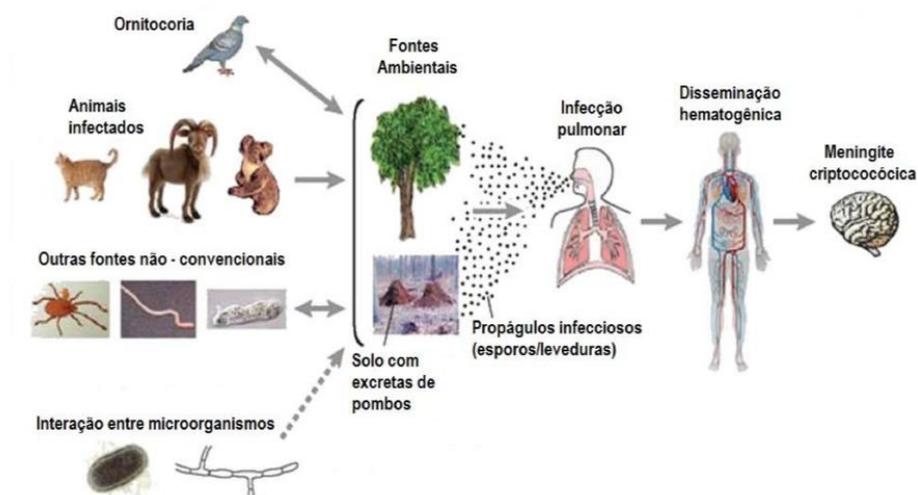


Figura 1. Ciclo infeccioso de *Cryptococcus* spp. As células fúngicas podem ser encontradas em ambientes como solo contaminado por fezes de pássaros e em distintas espécies de plantas. A partir desses habitats acontece a inalação das células fúngicas de *Cryptococcus* spp. por um hospedeiro suscetível, como o ser humano ou outro mamífero. Após a inalação, *Cryptococcus* spp. encontra um ambiente propício nos pulmões para se multiplicar e se disseminar. Conforme a infecção progride, as leveduras podem se disseminar para outros órgãos, como o cérebro, através da corrente sanguínea ou do sistema linfático. Isso pode resultar em infecções graves, como a meningite criptocócica. Adaptado de LIN e HEITMAN, 2006.

1.2 Fatores de virulência

C. neoformans apresenta vários fatores de virulência que permitem ao fungo infectar e causar dano ao hospedeiro. Entre eles destacam-se: a capacidade de crescer a 37°C, a produção de cápsula polissacarídica, síntese de melanina e a secreção de enzimas que permitem a colonização de diversos tecidos (MAY et al. 2016).

A melanina é um pigmento de coloração marrom escuro que protege contra estresse e radiação, sendo produzida na presença de substratos específicos como 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) ou outros compostos di-polifenólicos. A urease e a

fosfolipase B são enzimas que realizam degradação tecidual e desempenham um papel importante na patogenicidade de *Cryptococcus* spp., ajudando na sua sobrevivência intracelular e na migração do fungo do pulmão para o cérebro (KWON-CHUNG et al., 2014).

O principal fator de virulência de *Cryptococcus* spp. é a cápsula polissacarídea (Figura 2), que desempenha um papel fundamental na proteção da levedura contra desidratação e atua como barreira física contra fagocitose. Além disso, a cápsula é descrita como estrutura imunomoduladora no hospedeiro, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, inativando componentes do sistema complemento e reduzindo a migração de leucócitos no local da infecção (ZARAGOZA et al., 2009, BOSE et al., 2003). A cápsula pode mudar em densidade, tamanho e estrutura dependendo das condições ambientais (HEITMAN et al., 2011).

Na composição química da cápsula, as células são formadas por glucuronoxilomanana (GXM) representando 90% da estrutura, galactoxilomanana (GalXM) (7%) e manoproteínas (MP) (3%) (BOSE 2003 & ZARAGOZA, 2009, ZAGARROZA et al., 2010).

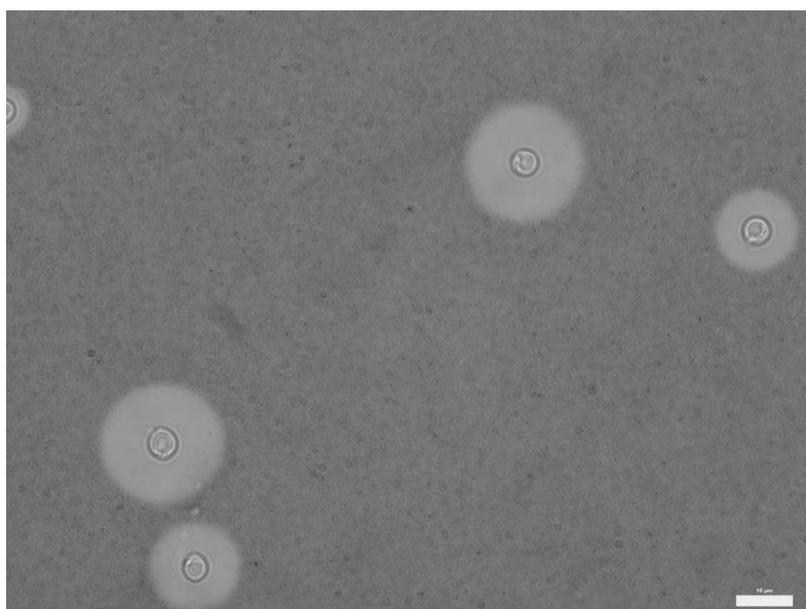


Figura 2. Cápsula polissacarídea de *C. neoformans* crescido em meio de indução de estresse nutricional (meio mínimo). Obj: 100x.. Fonte: Acervo pessoal.

1.3 Células gigantes

C. neoformans é capaz de sofrer alterações morfológicas celulares *in vitro* e *in vivo* (GOLDMAN et al.,1998). Foi observado que a morfologia das células leveduriformes varia durante a infecção, implicando na ocorrência de mudanças dinâmicas que podem contribuir para a capacidade desse organismo de persistir no tecido. O ambiente tecidual pulmonar e cerebral do hospedeiro gera células gigantes ou titãs que apresentam maior virulência e são mais resistentes a estresses oxidativos, fármacos, entre outros (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ et al., 2017).

Embora não haja na literatura um consenso sobre o tamanho exato que uma célula precisa ter para ser considerada titã, os critérios variam entre os pesquisadores. Zaragoza e Nielsen (2013) estabeleceram que as células titãs de *Cryptococcus neoformans* são caracterizadas por um diâmetro de corpo celular acima de 15 µm ou um tamanho total acima de 30 µm. Dambuza et al., 2018 definiram células titãs como tendo um diâmetro de celular total superior a 10 µm. No entanto, outros autores, como García-Rodas, Trevijano Contador e Zaragoza (2018), sugerem que um diâmetro do corpo celular acima de 10 µm já é suficiente para classificar as células como titãs.

Apesar da falta de consenso quanto ao tamanho exato das células gigantes, é importante ressaltar que elas são notavelmente maiores que as células fúngicas tradicionais de *C. neoformans* (figura 2). De fato, essas células podem ser até 100 vezes maiores que as células normais (ZARAGOZA e NIELSEN, 2013).

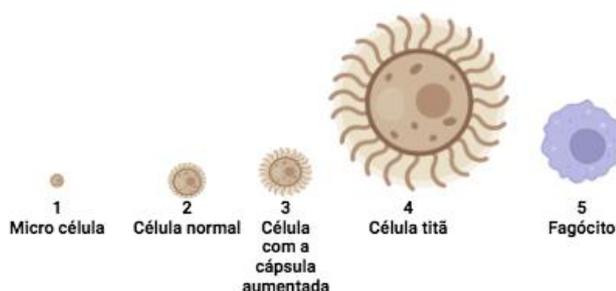


Figura 3. Ilustração de diferentes populações celulares encontradas em pulmões de camundongos infectados com *C. neoformans*. Leveduras com diferentes tamanhos de cápsulas, microformas, células de tamanho regular e células titãs, que são maiores que os fagócitos, estão presentes durante a infecção pulmonar em camundongos. Adaptado de HÉRNANDEZ CHAVES et al., 2017

Entretanto, além do tamanho, diversos trabalhos têm caracterizado essas células gigantes, descrevendo diversos parâmetros a serem considerados como características principais neste morfotipo. Entre eles destacam:

- Capacidade de sobrevivência: As células titãs exibem maior resistência a condições estressantes, como tratamentos antifúngicos, estresse oxidativo e fagocitose pelo sistema imunológico do hospedeiro (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2017);
- Presença de parede celular anormalmente espessa. Enquanto a parede celular em células típicas tem cerca de 150–200 nm de espessura, células titãs podem atingir até 2–3 μm (ZAGAROZA e NIELSEN, 2013);
- Células titãs produzem células filhas de tamanho normal (ZAGAROZA e NIELSEN, 2013);
- As leveduras criptocócicas típicas são frequentemente haploides, porém as células gigantes são frequentemente tetraploides ou octoplóides (com um único núcleo) e sua progênie é haploide. Essa característica pode contribuir para seu grande tamanho e resistência (ZAGAROZA e NIELSEN, 2013);
- Células titãs não são fagocitadas devido ao seu tamanho e a presença destas reduz a fagocitose de células criptocócicas de tamanho típico. Além disso, são incapazes de se disseminarem para o cérebro devido ao seu grande tamanho, porém ajudam na disseminação das células fúngicas de tamanho normal dos pulmões para outros tecidos, aumentando a disseminação de *C. neoformans* para o sistema nervoso central (OKAGAKI e NIELSEN, 2012).

1.4 Obtenção de células titãs *in vitro*

Alguns estudos têm sido realizados por diversos autores na tentativa de obter células titãs *in vitro*. ZAGAROZA *et al.*, 2010 estudaram a formação de leveduras gigantes utilizando meio mínimo (15 mM de glicose, 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 29 mM de KH_2PO_4 , 13 mM em água MilliQ, com o pH ajustado para 5,5) que gera estresse nutricional. Nessa situação, somente cerca de 4 a 5% das células mostraram um aumento no tamanho (25–30 μm de diâmetro) após 4 dias de cultivo a 37°C.

Para obter células titãs *in vitro* foi visto por TREVIJANO-CONTADOR *et al.*, 2018 e DAMBUZA *et al.*, 2018 que soro de mamíferos é um fator indutor essencial. A adição de 5 e 10% de soro fetal bovino (SFB) levou a um aumento expressivo no tamanho da célula, porém a junção do soro com meio que contém um elevado grau

de nutrientes limita o crescimento das células titãs (TREVIJANO-CONTADOR et al., 2018).

Também foi visto, que componentes séricos e lipídios polares isolados do soro são capazes de induzir a formação de células titãs *in vitro*. A fosfatidilcolina, induziu um aumento no tamanho da célula *in vitro*, porém menos que o soro, indicando que outros componentes também são importantes nesse processo *in vitro* (TREVIJANO-CONTADOR et al., 2018). A fosfolipase B tem um papel importante para formar células titãs, pois as mesmas induzem a formação de células titãs dentro de células fagocíticas (EVANS et al., 2015).

A pouca ou nenhuma quantidade de oxigênio também levou a um aumento do tamanho das células de *C. neoformans in vitro* (TREVIJANO-CONTADOR et al., 2018), corroborando com o fato de que o CO₂ induz o crescimento da cápsula em *C. neoformans* (GRANGER et al. 1985) assim como o aumento do corpo celular (DAMBUZA et al. 2018; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2018). Adicionalmente, foi observado que o crescimento em meios ricos em nutrientes, como o meio Sabouraud, inibe a produção de cápsulas com tamanho atípico, implicando uma relação entre a disponibilidade de nutrientes e a expressão de fatores de virulência em *Cryptococcus spp.* (ZAGAROZA, FRIES, & CASADEVALL, 2003). Esses estudos destacam a complexidade dos mecanismos subjacentes à formação de células titãs em *Cryptococcus spp.* e ressaltam a importância de futuras pesquisas para elucidar completamente esses processos e seu impacto na patogênese fúngica.

2 JUSTIFICATIVA

A patogênese da infecção por *C. neoformans* tem sido amplamente estudada em relação às suas alterações inflamatórias e patológicas, mas há uma lacuna significativa de informações sobre a morfologia das leveduras durante o curso da infecção, especialmente no que diz respeito às células titãs. Essa escassez de conhecimento é agravada pela dificuldade em obter culturas de 100% de células gigantes *in vitro*, o que limita a análise estrutural, fenotípica e genotípica completa dessas células (ZAGAROZA e NIELSEN, 2013). As células filhas geradas por brotamento a partir de uma célula mãe titã tendem a apresentar tamanhos normais, dificultando sua separação e manutenção em culturas puras. Mesmo quando obtidas, as células titãs geralmente aparecem misturadas com células de tamanhos normais, dificultando ainda mais sua análise e caracterização (ZAGAROZA e NIELSEN, 2013). Diante desses desafios, surge a necessidade premente de desenvolver protocolos e meios de cultura padronizados que possibilitem a obtenção e manutenção de células titãs *in vitro* em estado puro. Isso não apenas permitiria uma análise mais detalhada da morfologia e do comportamento dessas células durante a infecção, mas também abriria novas perspectivas para investigar seus mecanismos de formação, virulência e resposta a tratamentos.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estabelecer um protocolo e meio de cultura padrão para obtenção de um alto valor percentual de células titãs de *C. neoformans in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar diferentes meios de cultivos para obtenção de cultura pura de células titãs.

Para isso, existe as seguintes metas:

1. Avaliar a produção de células titãs em diferentes meios de cultivos

- Crescimento de células titãs de *C. neoformans* utilizando o meio que induz estresse nutricional (meio mínimo- MM);
- Crescimento de células titãs de *C. neoformans* incubando as células em meio de diferenciação neural (meio neurobasal-NB);
- Crescimento de células titãs *C. neoformans* , em meio que faz diferenciação neural para promover o crescimento e a expressão de neurônios pos-mitóticos
- Crescimento de células titãs *C. neoformans* , em meio que faz diferenciação neural para caracterizar oligodendrócitos (meio de Oligodendrócitos-OLIGO);
- Crescimento de células titãs *C. neoformans* em meio mínimo suplementado com neurotransmissores como dopamina, epinefrina, e norepinefrina.
- Crescimento de células titãs em meio mínimo suplementado com piruvato de sódio
- Crescimento de células titãs em meio mínimo suplementado com B27

2. Determinar um protocolo experimental com o meio ou o composto com o maior percentual de obtenção de células titãs

4 METODOLOGIA

4.1 Isolados fúngicos

Foi utilizada a cepa padrão *Cryptococcus neoformans var. grubii* H99 (isolado clínico cedido pelo Prof. Dr. Arturo Casadevall – Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, EUA). H99 é uma cepa do tipo selvagem, disponível na American Type Culture Collection (ATCC) com o número de catálogo 20882. A manutenção da cepa foi realizada em meio Sabouraud Dextrose Agar – SAB (Merck, Alemanha) crescido por 2 dias a 37°C e armazenado a 4°C.

4.2 Pré-inóculo

Em todos os experimentos foi realizado um pré-inóculo de *C. neoformans* H99 em 10mL de meio líquido Sabouraud a 37°C com agitação contínua a 150 rpm por 24h (GARCÍA-RODAS et al., 2015).

4.3 Preparo de meios de cultura e fatores testados

4.3.1 Meio mínimo

O MM foi preparado com 15 mM de glicose, 10 mM de MgSO₄.7.H₂O, 29 mM de KH₂PO₄, 13 mM em água MilliQ, com o pH ajustado para 5,5 (ZAGAROZA et al., 2010) e esterilizado através de autoclavação a 121°C por 15 minutos.

4.3.2 Meio neurobasal suplementado

O Meio Neurobasal (NB) é um meio estéril comercializado, composto por 25 mM de glicose, 0,22 mM de piruvato de sódio, aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, entre outros componentes, todos provenientes da Invitrogen/Thermo Fisher (Carlsbad, CA, EUA). Para sua preparação, foi complementada com 2% de B27 (uma mistura definida de enzimas antioxidantes, proteínas, vitaminas e ácidos graxos otimizados para suportar a sobrevivência neuronal em cultura), 1% de glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina. (KIKUCHI et al., 2018 e SOARES et al., 2020).

4.3.3 Meio NS34

Este meio é composto por meio Dulbecco's Modified Eagle's F-12 (DMEM, Empresa, Cidade, País), contendo 0,6% de glicose. Adicionalmente, é acrescido de

1% de N2 (um suplemento quimicamente definido e sem soro, utilizado para o crescimento e expressão de neuroblastomas, bem como para culturas primárias de neurônios pós-mitóticos tanto do sistema nervoso periférico quanto do sistema nervoso central). Além disso, contém 1% de G5, um suplemento quimicamente definido, sem soro, que inclui FGF e EGF (Thermo Fisher Scientific, 2006- 2022). Este meio pode ser empregado com meio eagle modificado de dulbecco (DMEM), e meio eagle modificado de dulbecco com Ham's F12 (DMEM/F-12) (que serve para suportar o crescimento de células de mamíferos em cultura) ou outros meios basais. Completam a formulação 1% de B27, 1% de L-glutamina, 0,5% de HEPES, 0,11% de NaHCO₃, e 1% de penicilina/estreptomicina, todos fornecidos pela Invitrogen/Thermo Fisher (Carlsbad, CA, EUA) (SOARES et al., 2020) e 7,5% de água miliQ esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

4.3.4 Meio de oligodendrócitos (oligo)

É composto de DMEM-F12 suplementado com 1% de L-glutamina, 0,5% de soro fetal bovino, 2% de B27, 0,1% de Tri-iodotironina (T3, hormônio tireoideano), 0,5% de insulina, transferrina, 5 ng/mL de selenito de sódio e 1% de penicilina/estreptomicina, todos comercialmente esterilizados (todos da Invitrogen/Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA) (SOARES et al., 2020).

4.3.5 Meios com suplementação de neurotransmissores

O meio mínimo foi suplementado com os neurotransmissores: dopamina (concentrações: 10mM; 5mM; 2,5mM e 1,25mM), epinefrina (10mM, 5mM, 2,5mM, 1,25mM) e norepinefrina (0,04mg/ml, 0,02mg/ml, 0,004mg/ml, 0,002mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a serem testados. O pH foi ajustado para 5,5 e esterilizado por filtração.

4.3.6 Meio suplementado com piruvato de sódio

O meio mínimo foi suplementado com distintas concentrações (1 mM, 0,5 mM, 0,25mM, 0,125mM) de piruvato de sódio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), um dos componentes do meio Nb. O pH foi ajustado para 5,5 e esterilizado por filtração.

4.4 Condições de cultivo para a indução da formação de células titãs por diferentes meios e substratos.

Primeiramente, foi realizado um pré-inóculo, como descrito anteriormente. Após 24hrs, as células foram recuperadas por centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, as células foram quantificadas em camera de Neubauer nos quatro quadrantes, realizando o cálculo para que a concentração final seja de 10^6 cels/ml. Em uma placa de 6 poços, foram adicionados 2 ml de cada meio de cultura testado, inoculado com 5×10^3 cél/mL, além do controle de crescimento fúngico e de esterilidade do meio para identificar microorganismos indesejados, prevenir contaminações em experimentos científicos e ambientes, além de garantir a qualidade e segurança. A placa foi incubada em uma estufa a 37 °C na presença e ausencia de 5% de CO₂ por 5 dias.

4.5 Parâmetros medidos para avaliar a formação de células titãs por microscopia óptica.

Para visualização das células das leveduras em estudo, 1 mL de suspensão de cada meio foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos e posteriormente ressuspendida em 1mL PBS. A montagem das lâminas foi realizada com 10^4 das células de *C. neoformans* ressuspandidas e 5 µL de tinta nanquim. A visualização foi feita no microscópio Axio Observer (Zeiss, Jena, Alemanha). Em nosso grupo, decidimos que uma célula será considerada titã a partir de 15µm .

Para a caracterização do tamanho celular e capsular (**Figura 3**), imagens aleatórias de no mínimo 100 células foram capturadas e mensuradas utilizando o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>. National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD) . Todas as medidas foram analisadas estatisticamente no software Graph Pad Prism 9 (La Jolla, CA, EUA).

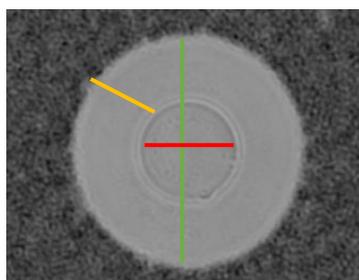


Figura 4. Medição do comprimento celular (indicado em vermelho), tamanho da cápsula (indicado em amarelo) e comprimento total da célula (indicado em verde) de *Cryptococcus neoformans*. A imagem

ilustra a análise morfológica detalhada das células deste patógeno fúngico. A medida do comprimento celular e capsular é essencial para compreender a morfologia e a virulência deste organismo. Fonte: Acervo pessoal.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos meios de diferenciação neuronal (meio neurobasal-NB), de células-tronco neuronais em neurônios e astrócitos (Meio-NS34) e de formação de oligodendrócitos (meio de Oligodendrócitos-OLIGO) para a formação de células titãs de *C. neoformans*

5.1.1 Incubação a 37°C com 5 % de CO₂

Inicialmente foi avaliado a influência do meio neurobasal (NB) para diferenciação neural, NS34 que promove o crescimento e a expressão de neurônios pós-mitóticos (AFONSO, 2011), e meio oligo para diferenciação neural visando caracterizar oligodendrócitos (KIKUCHI et al., 2018 e SOARES et al., 2020). O protocolo de 5 dias de cultivo a 37°C com 5% CO₂ foi utilizado em todas as condições testadas. Após a contrastação com nanquim, foi observado que as células de *C. neoformans* apresentaram várias alterações morfológicas dependendo do ambiente nutricional encontrado (Figura 5).

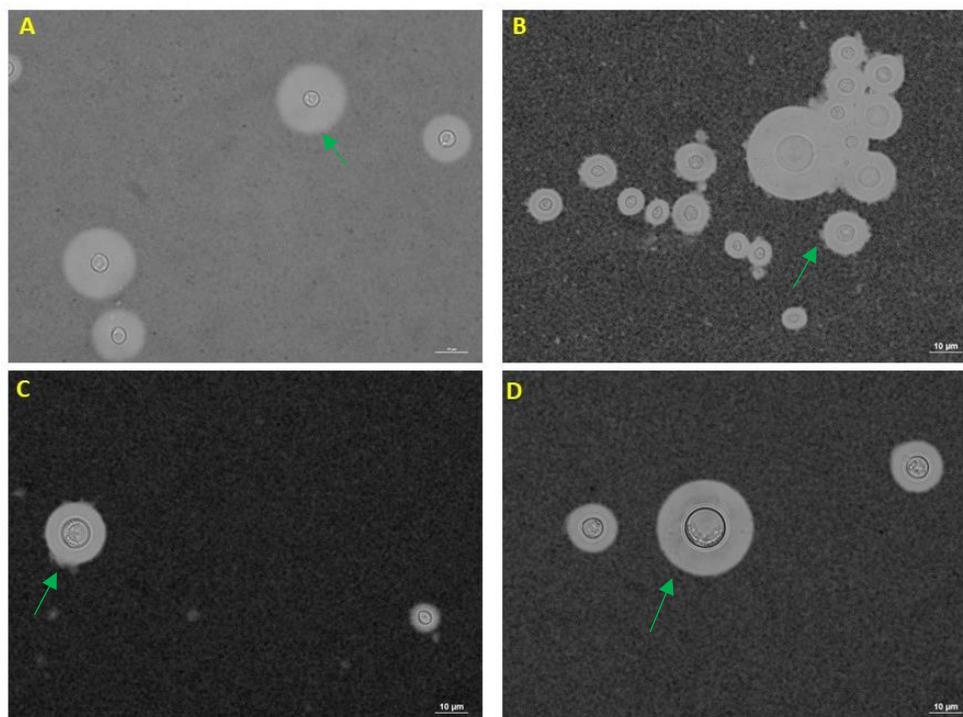


Figura 5. Análise morfológica das células de *C. neoformans* H99 em microscopia óptica nos diferentes meios utilizados (Escala de 10 µm). Painel A: MM; Painel B: oligo; Painel C: NS34 e Painel D: NB. A seta verde sinaliza as projeções de polissacarídeos capsulares.

No MM, as células possuem a cápsula mais dispersa e menos compacta quando comparada as células crescidas nos meios NB, oligo e NS34 (Figura 5A). No meio Oligo, a cápsula exibiu-se compacta, porém os polissacarídeos apresentaram-se dispersos em suas extremidades gerando projeções ao longo da estrutura (Figura 5B). No meio NS34, a cápsula também se manteve de maneira compacta, porém com uma leve dispersão nas extremidades, mostrando fibras de polissacarídeos mais individualizadas (Figura 5C). Por último, as células crescidas em meio NB apresentaram cápsulas compactas e visualmente maiores do que nos outros meios observados (Figura 5D), indicando ser um meio em potencial para o estudo a ser realizado.

Para avaliar a formação das células titãs, medições do diâmetro do corpo celular, do tamanho capsular e da célula completa foram realizadas como indicado na Figura 3 (Metodologia). Como pode ser observado na Figura 6, em todos os meios testados (oligo, NS34 e NB), as células de *C. neoformans* apresentaram tamanho capsular superior as células crescidas em meio mínimo (Figura 6A). Entretanto, quando comparamos o tamanho capsular entre os meios testados, os meios NB e NS34 e NB e oligo possuem diferença estatística, com o p-valor <0.0001 em comparação ao meio mínimo, utilizado como controle.

O tamanho do corpo celular das células crescidas nos meios estudados foi avaliado e comparado ao meio mínimo padrão (Figura 6B). O meio NB teve um pequeno aumento do corpo celular, estatisticamente significativo, em comparação ao MM (Figura 6B). Entretanto, as leveduras crescidas em meio NS34 e oligo não apresentaram diferenças significativas relacionadas ao tamanho do corpo celular quando comparado ao MM (Figura 6B). Os meios NB e NS34 e NB e Oligo não possuem diferença estatística significativa.

Outro parâmetro avaliado foi o tamanho da célula completa das leveduras em estudo (Figura 6C). A medida do tamanho celular completo apresentou um aumento estatisticamente significativo nas condições do meio NB e Oligo quando comparado ao meio mínimo (Figura 6C). Para as leveduras crescidas em meio NS34, o tamanho

não variou quando comparados a meio padrão. Os meios NB, possui diferenças estatística p-valor <0.0001 e o meio Oligo 0,0004 em comparação ao controle.

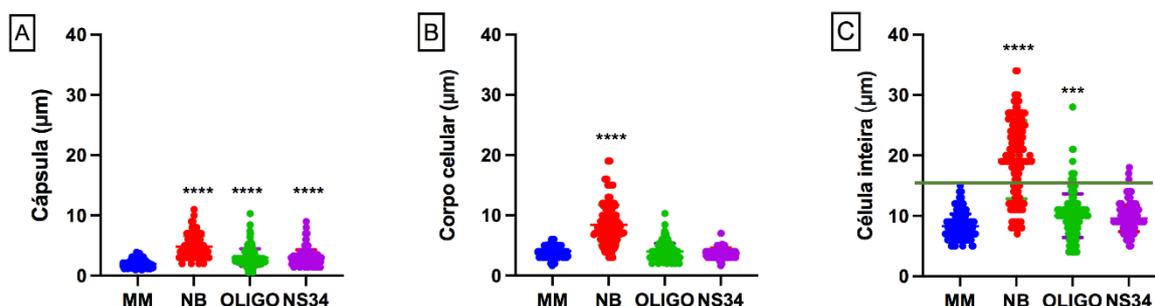


Figura 6. Efeito dos meios de cultura nas células de *C. neoformans*: Neurobasal- NB (vermelho), oligodendrócitos- OLIGO (verde) e NS34 (lilás) analisados em comparação ao meio mínimo (controle)-MM (azul). A: Gráfico de tamanho da capsula polissacarídea, B: Gráfico de tamanho do corpo celular, C: Gráfico do tamanho celular completo. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada utilizando ANOVA. Os asterísticos (****) indicam o p-valor <0.0001, (***) equivale a p-valor de 0,0004. A linha verde delimita o tamanho para ser considerada titã.

Além da caracterização morfológica das células, um fator importante é estimar o percentual de células gigantes produzidas em cada condição testada. Para isso, após a visualização por microscopia óptica, foi realizado uma estimativa do percentual de células que podem ser classificadas como células titãs nos diversos meios utilizados. O padrão de tamanho a partir do qual as células serão consideradas titãs será tamanho celular total maior ou igual a 15 µm.

Como visto na tabela 1, o maior percentual de células titãs foi encontrado no meio NB onde 72,66% das leveduras presentes tinham tamanhos característicos de células titãs.

Tabela 1. Percentual de células titãs nos diferentes meios observados (n=150).

Meio de cultura	Percentual de células titãs (> 15 µm)
MM	0,66% ± 2,037
NB	72,66% ± 6.364
Oligo	10,6% ± 3.608
NS34	2% ± 2.193

5.1.2 Incubação a 37°C na ausência de CO₂

Após o crescimento por 5 dias em estufa a 37°C sem CO₂, as células foram contrastadas com tinta nanquim a fim de estudar sua morfologia por microscopia óptica e analisar o efeito contrário de reação das células quando há ausência de CO₂. O MM foi o único meio entre os estudados no qual houve crescimento celular, porém de tamanho típico e nenhuma célula titã. Os meios NS34, NB e Oligo só conseguem fazer crescimento celular de *C. neoformans* na presença de CO₂. Isso ocorre devido à adequação do pH dos meios NB, Oligo e NS34, nos quais o crescimento celular só é observado na presença de CO₂

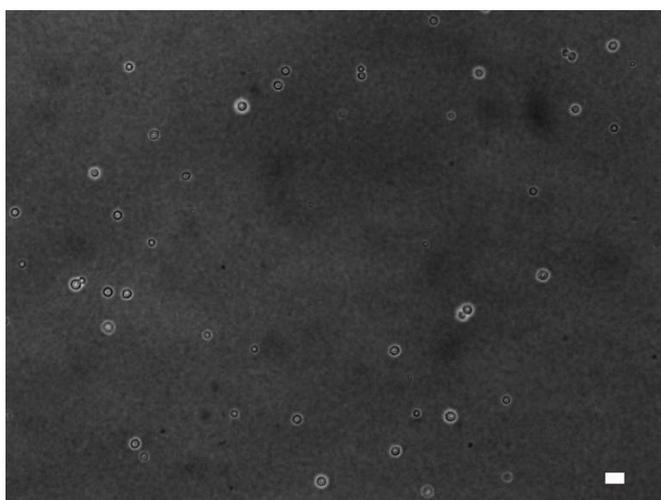


Figura 7. Análise morfológica das células de H99 *C. neoformans* em microscopia óptica no meio mínimo sem CO₂, com corpo celular e cápsula de tamanho menor em comparação com CO₂. Barra de escala: 10 µm

Como pode ser observado na Figura 7, as células de *C. neoformans* em meio mínimo sem CO₂ possuem as cápsulas menores e dispersão na cápsula polissacarídea e apresentaram tamanho muito menor quando comparadas ao meio mínimo com CO₂ (figura 8 e figura 6).

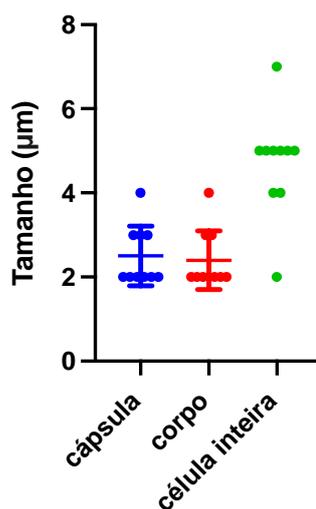


Figura 8. Efeito do meio mínimo no tamanho celular, capsular e total das células de *C. neoformans*. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada utilizando ANOVA.

5.2 Meio mínimo suplementado com piruvato de sódio

Os resultados obtidos com o meio NB destacaram sua composição e possíveis componentes que desencadeiam a formação de células titãs. Para isso, piruvato de sódio, em concentrações variáveis (1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM e 0,125 mM), foi diluído em 50 ml de meio mínimo (MM) filtrado e esterilizado. Após cinco dias de incubação a 37°C com 5% de CO₂. A análise morfológica foi realizada através de contraste com tinta nanquim e microscopia óptica.

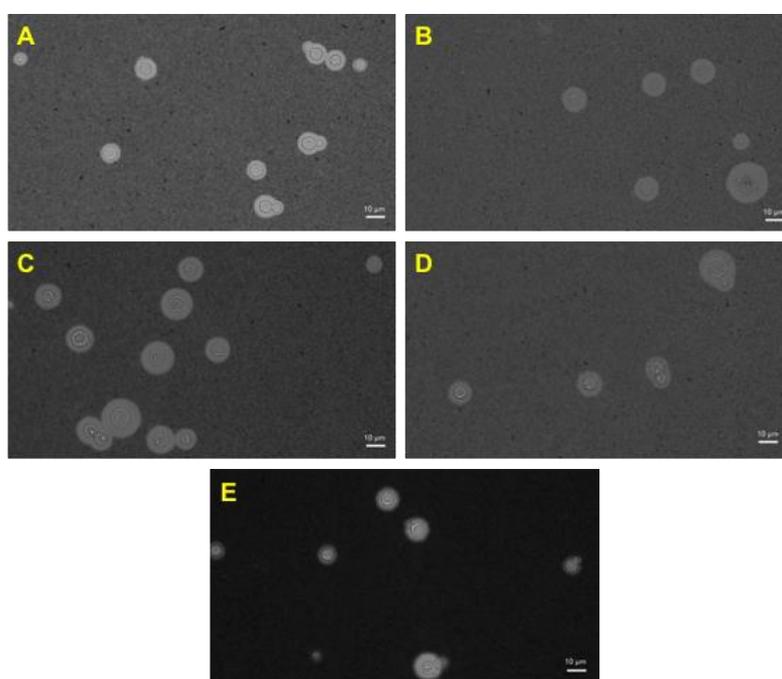


Figura 9. Análise morfológica das células de *C. neoformans* H99 em microscopia óptica nas diferentes concentrações de piruvato de sódio (obj 60x). Meio mínimo suplementado com piruvato de sódio na concentração de: Painel A: 1mM ; Painel B: 0,5mM; Painel C: 0,25mM; Painel D: 0,125mM e Painel E: controle com meio mínimo.

A Figura 9 apresenta os efeitos do piruvato de sódio em diferentes concentrações nas células de *C. neoformans*. Na figura 9A (1mM), observa-se uma cápsula compacta, semelhante às células cultivadas em meio mínimo, com algumas células ligeiramente maiores que outras. Na figura 9B (0,5mM), a cápsula continua compacta, mas células aparentemente maiores, algumas com morfologia de células gigantes, começam a aparecer. Na figura 9C (0,25mM) mostra características semelhantes a figura 9B, com a adição de células com morfologia diferenciada. Na figura 9D (0,125mM), as observações são comparáveis às da figura 9B. Por fim, a figura 9E mostra o controle com meio mínimo, onde as células exibem cápsula compacta e tamanho celular visualmente normal.

Na Figura 10, uma análise detalhada revela que independentemente das concentrações testadas, as células de *C. neoformans* mantiveram um tamanho capsular comparável ao observado nas células cultivadas em MM, como demonstrado e evidenciado na Figura 10A. Esse resultado sugere uma estabilidade no desenvolvimento da cápsula, independentemente da variação na concentração de piruvato de sódio.

No que concerne ao corpo celular das células cultivadas sob diferentes concentrações em comparação com o MM, observou-se um fenômeno notável apenas na concentração de 0,125mM. Neste caso, houve um leve aumento no tamanho do corpo celular, que se mostrou estatisticamente significativo em relação ao meio mínimo, conforme evidenciado na Figura 10B. Tal observação indica que em condições de menor concentração de piruvato de sódio, pode ocorrer uma discreta modificação na morfologia das células de *C. neoformans*, com um aumento sutil, porém estatisticamente relevante, no tamanho do corpo celular.

Além disso, a análise da medida do tamanho celular completo não revelou variações significativas em comparação com o MM, como ilustrado na Figura 9C. Isso sugere que apesar da possível influência da concentração de piruvato de sódio no tamanho do corpo celular, o tamanho global das células de *C. neoformans* permaneceu relativamente estável em todas as concentrações testadas.

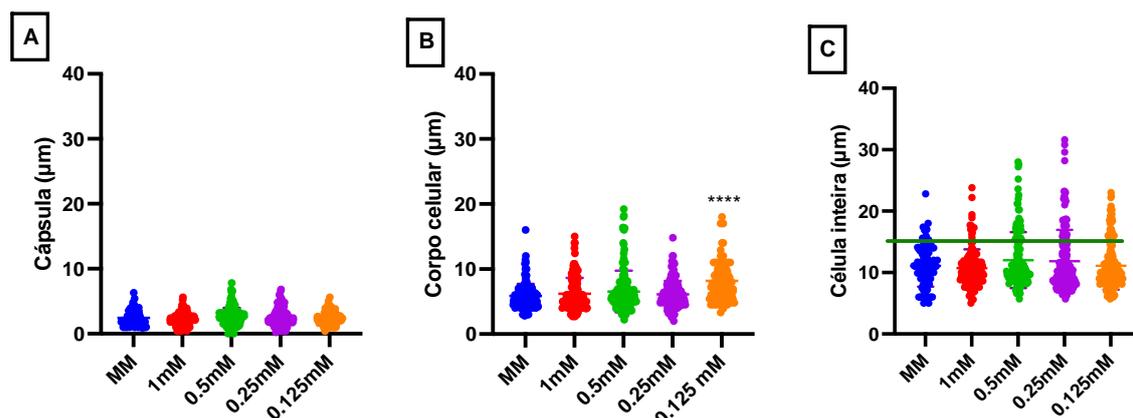


Figura 10. Efeito das diferentes concentrações de piruvato de sódio nas células de *C. neoformans* analisados em comparação ao meio padrão (MM). A: Gráfico de tamanho da capsula polissacarídea, B: Gráfico de tamanho do corpo celular, C: Gráfico do tamanho celular completo. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada utilizando ANOVA. Os asterísticos (****) indicam o p-valor <0.0001. A linha verde delimita o tamanho para ser considerada titã.

Como visto na tabela 2, o maior percentual de células titãs foi encontrado na concentração de 0.5mM onde 19,3% das leveduras presentes tinham tamanhos característicos de células titãs.

Tabela 2. Percentual de células titãs nas diferentes concentrações de piruvato de sódio(n=150).

Concentração	Percentual de células titãs
MM	8% ± 3.383
1mM	7,3% ± 3.057
0,5 mM	19,3% ± 4.549
0,25mM	18% ± 5.108
0,125 mM	16% ± 3.896

5.3 Meio mínimo suplementado com L-dopa

As células de *C. neoformans* cultivadas com L-dopa em diferentes concentrações (10 mM, 5 mM, 2,5 mM e 1,25 mM) diluídas em 10 mL de meio mínimo filtrado e esterilizado por autoclavagem apresentaram crescimento após cinco dias de

incubação a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, foi realizada a análise morfológica, utilizando contraste com tinta nanquim e microscopia óptica.

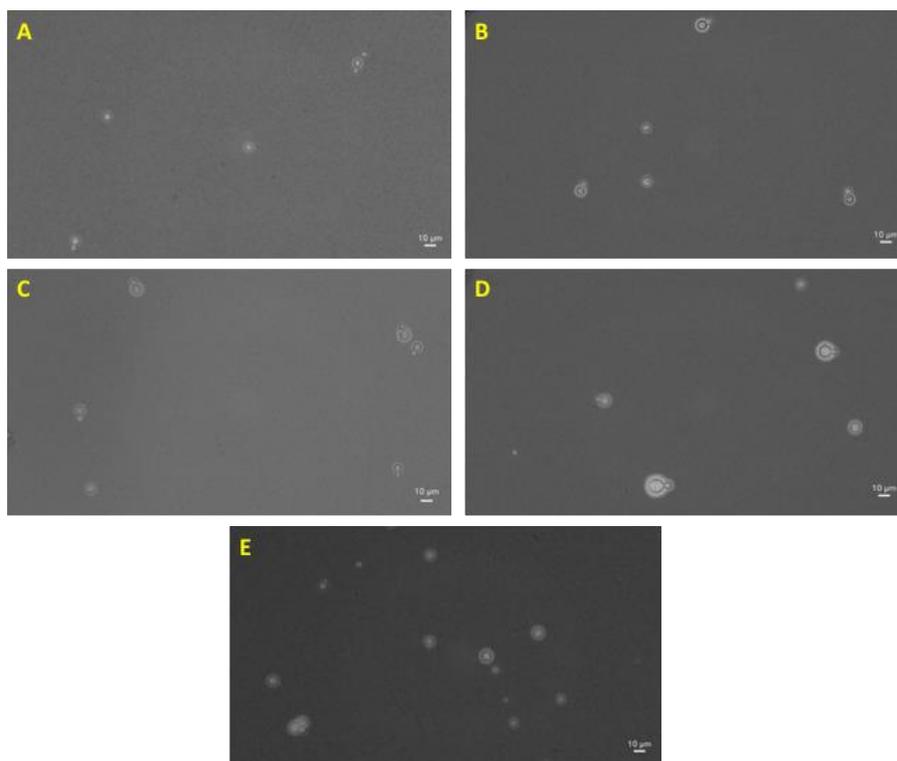


Figura 11. Análise morfológica das células de H99 *C. neoformans* em microscopia óptica nas diferentes concentrações de L-dopa (obj 40x). Meio mínimo suplementado com L-dopa na concentração de Painel A: 10mM; Painel B 5mM; Painel C: 2,5mM; Painel D: 1,25mM; Painel E: controle com meio mínimo.

Na Figura 11, são apresentados figuras que ilustram os efeitos da L-dopa em diferentes concentrações nas células de *C. neoformans*. Na figura 11A (10mM), observamos uma cápsula compacta, semelhante às células cultivadas em meio mínimo, com algumas células ligeiramente maiores que outras. A figura 11B (5mM) mostra características semelhantes a figura 11A, com uma cápsula compacta e células de tamanho relativamente uniforme. Na figura 11C (2,5mM), as células apresentam uma aparência semelhante à observada nas figuras 11A e 11B, com uma cápsula compacta e células que variam ligeiramente em tamanho, mantendo uma semelhança marcante com as células cultivadas no meio mínimo. A figura 11D (1,25mM) também exibe uma cápsula compacta e células de tamanho variável, consistentes com as observações nas figuras anteriores. A figura 11E mostra o controle com meio mínimo, onde as células exibem uma cápsula compacta e tamanho celular visualmente normal. Isso fornece uma referência para avaliar as diferenças nas morfologias celulares observadas nos outros painéis da Figura 11. Em resumo, os

resultados sugerem que as concentrações de L-dopa testadas não tiveram um efeito pronunciado na morfologia das células de *C. neoformans*, com todas as concentrações apresentando uma cápsula compacta e células de tamanho variável, mas dentro de uma faixa considerada normal em comparação com o MM.

A Figura 12 revela que para todas as concentrações testadas, as células de *Cryptococcus neoformans* mantiveram um tamanho capsular (Figura 12A) comparável ao observado nas células cultivadas em meio mínimo. Essa consistência na morfologia capsular sugere uma estabilidade no desenvolvimento da cápsula, independentemente da variação na concentração de L-dopa.

Quanto ao corpo celular das células cultivadas em diferentes concentrações em comparação com o meio mínimo padrão, observa-se que todas as células de *C. neoformans* mantiveram um tamanho capsular similar às células cultivadas em MM, como ilustrado na figura 12B. Isso indica que a concentração do composto testado não afetou significativamente o tamanho do corpo celular, mantendo-se estável em todas as condições avaliadas. Entretanto, ao analisar o tamanho celular completo, observou-se uma pequena diferença na concentração de 2,5mM em comparação com o meio mínimo, conforme evidenciado na figura 12C.

Em suma, os resultados indicam que as concentrações testadas não afetaram significativamente o tamanho da cápsula ou do corpo celular das células de *C. neoformans*, mas uma concentração específica (2,5mM) pode influenciar levemente o tamanho celular completo.

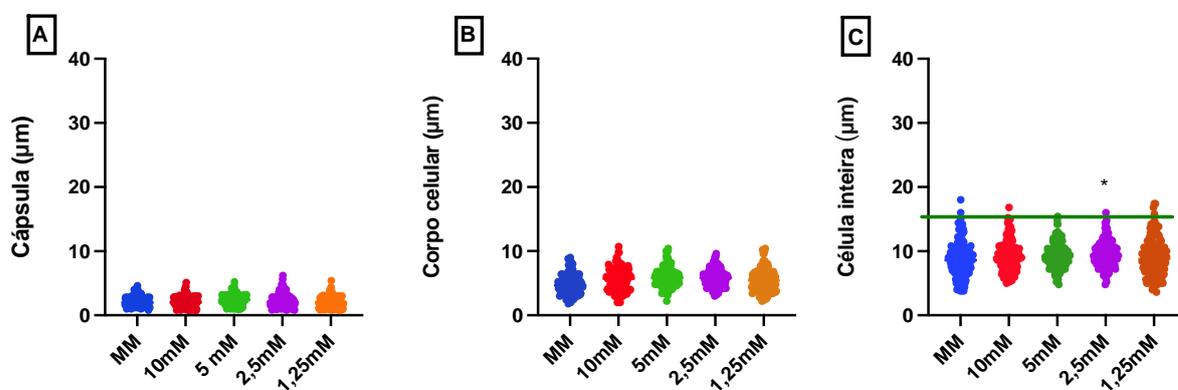


Figura 12. Efeito das diferentes concentrações de L-dopa nas células de *C. neoformans* analisados em comparação ao meio padrão (MM). A: Gráfico de tamanho da capsula polissacarídea, B: Gráfico de tamanho do corpo celular, C: Gráfico do tamanho celular completo. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada

utilizando ANOVA. Os asterísticos (*) indicam o p-valor 0,0250. A linha verde delimita o tamanho para ser considerada titã.

Na Tabela 3 foi visto que o maior percentual de células titãs foi encontrado na concentração de 2,5mM onde 3% das leveduras presentes tinham tamanhos característicos de células titãs.

Tabela 3. Percentual de células titãs nas diferentes concentrações de L-dopa (n=150).

Concentração	Percentual de células titãs
MM	1,3% ± 2.642
10mM	1,3% ± 2.392
5 mM	0% ± 1.978
2,5mM	3% ± 1.958
1,25 mM	1% ± 2.915

5.4 Meio mínimo suplementado com norepinefrina

As células de *C. neoformans* cultivadas com soluções de norepinefrina em diferentes concentrações (0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,004 mg/ml e 0,002 mg/ml) foram visualizadas após cinco dias de incubação a 37°C com 5% de CO₂. Foi feita uma análise morfológica subsequente, utilizando contraste com tinta nanquim e microscopia óptica.

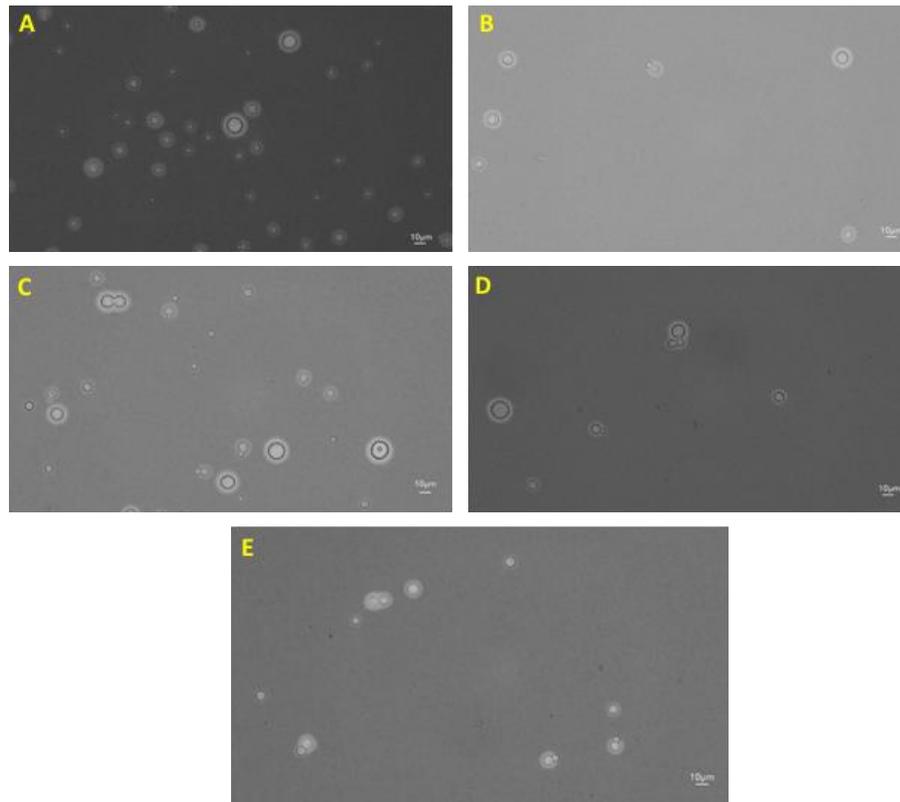


Figura 13. Análise morfológica das células *C. neoformans* por microscopia óptica nas diferentes concentrações de norepinefrina (obj 40x). Meio mínimo suplementado com norepinefrina concentração de Painel A: 0,012mM; Painel B: 0,060mM; Painel C: 0,0012mM; Painel D: 0,0060mM; Painel E: controle com MM.

A Figura 13 apresenta uma análise detalhada dos efeitos da norepinefrina em diferentes concentrações nas células de *C. neoformans*. Na figura 13A (0,012mM) observa-se uma cápsula compacta, semelhante àquela das células cultivadas em MM. Algumas células parecem ser ligeiramente maiores que outras, sugerindo uma heterogeneidade na população celular. Já na figura 13B (0,060mM), a cápsula permanece compacta, porém menor em comparação com a observada no meio mínimo. Esta diferença sugere uma resposta da célula à menor concentração de norepinefrina, resultando em uma diminuição no tamanho da cápsula. A figura 13C (0,0012mM) mostra características semelhantes a figura 13B mostra características com uma cápsula compacta e tamanho reduzido, indicando uma resposta consistente à concentração mais baixa de norepinefrina. Na figura 13D (0,0060mM), as células exibem uma morfologia semelhante àquela observada na figura 13B, sugerindo que a diminuição adicional na concentração de norepinefrina não resultou em mudanças significativas na morfologia celular. Por fim, Na figura 13E mostra o controle com MM,

onde as células apresentam uma cápsula compacta e um tamanho celular visualmente normal. Isso fornece uma referência para avaliar as diferenças nas morfologias celulares observadas nos outros painéis da Figura 13.

Conforme exemplificado na Figura 14, as diversas concentrações avaliadas nas células de *C. neoformans* revelaram uma redução no tamanho capsular em comparação com as células cultivadas em meio mínimo, com exceção da concentração de 0,012mM (Figura 4 e 14A). Além disso, foi observada uma variação no tamanho do corpo celular das células cultivadas nas diferentes concentrações em comparação com o meio mínimo padrão. Destaca-se que a concentração de 0,0012mM apresentou um discreto aumento no tamanho do corpo celular, enquanto a concentração de 0,0060mM demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao meio mínimo (Figura 14B).

A análise abrangente do tamanho celular completo revelou uma diminuição consistente em todas as concentrações testadas, sendo que a concentração de 0,0060mM se aproximou mais do tamanho observado no MM (Figura 3 e 14C).

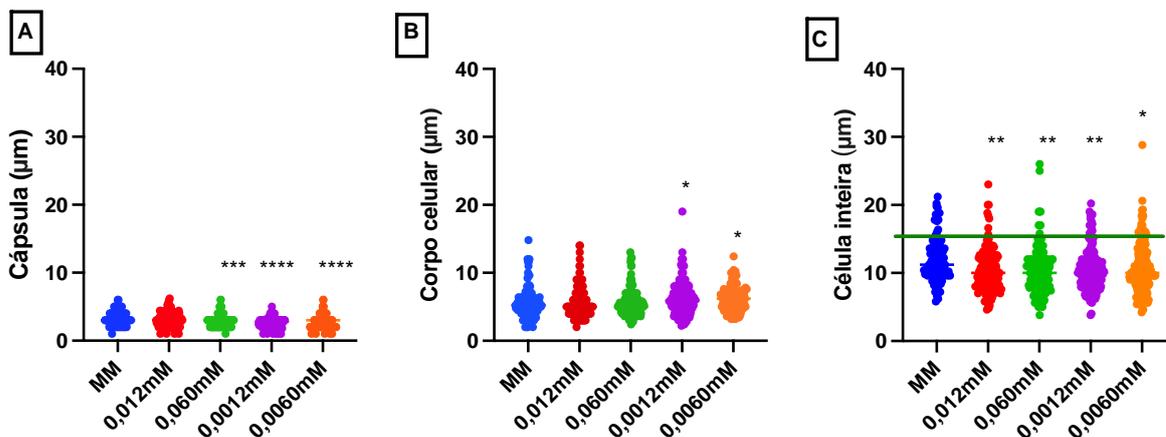


Figura 14. Efeito das diferentes concentrações de norepinefrina nas células de *C. neoformans* analisados em comparação ao meio padrão (MM). A: Gráfico de tamanho da capsula polissacarídea, B: Gráfico de tamanho do corpo celular, C: Gráfico do tamanho celular completo. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada utilizando ANOVA. No gráfico de cápsula os asterísticos (****) indicam o p-valor <0.0001, (***) equivale a p-valor de 0,001. No de corpo celular os asterísticos (*) da concentração de 0,0012mM indicam o p-valor de 0.0229, e da concentração de 0,0060mM indicam o p-valor de 0.0154. No gráfico de célula inteira os asterísticos (**) na concentração de 0,012mM indicam o p-valor de 0,0013, na concentração de 0,060mM indicam p-valor de 0,0010, na concentração de 0,0012mM indicam o p-valor de 0,0053 e de 0,0060mM indicam o p-valor de 0,0288. A linha verde delimita o tamanho para ser considerada titã

Na Tabela 4 foi visto que o maior percentual de células titãs foi encontrado nas concentrações de 0,0012 e 0,0060 mg, onde 6,6% das leveduras presentes tinham tamanhos característicos de células titãs.

Tabela 4. Percentual de células titãs nas diferentes concentrações de norepinefrina (n=150).

Concentração	Percentual de células titãs
MM	6,6% ± 3.250
0,012 mM	4,6% ± 3.081
0,060mM	6% ± 3.466
0,0012mM	6,6% ± 3.147
0,0060mM	6,6% ± 3.751

5.5 Meio mínimo suplementado com epinefrina.

A epinefrina foi utilizada em diferentes concentrações (10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM) diluídas em 10 mL de meio mínimo, visando compreender os mecanismos subjacentes às variações observadas na morfologia e no comportamento celular.

Após o crescimento por 5 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂, as células de *C. neoformans* foram preparadas para análise morfológica por microscopia óptica.

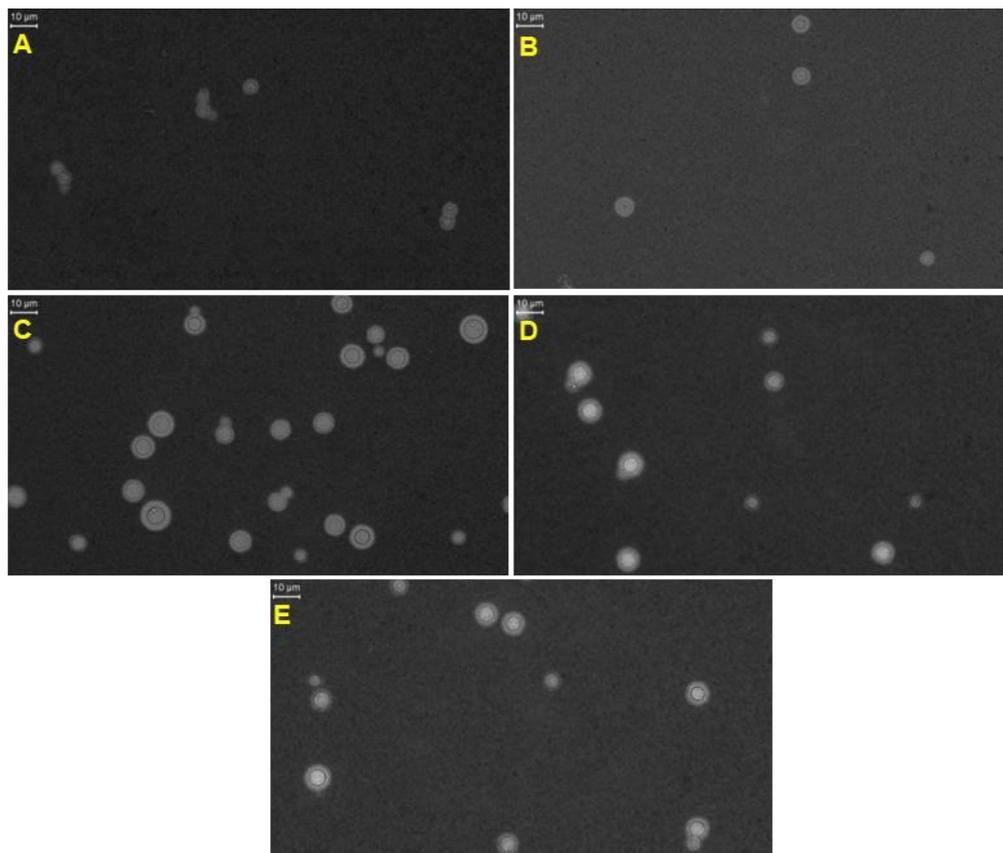


Figura 15. Análise morfológica das células de H99 *C. neoformans* em microscopia óptica nas diferentes concentrações de epinefrina (obj 60x). Painei A: epinefrina na concentração de 10mM; Painei B: epinefrina na concentração de 5mM; Painei C: epinefrina na concentração de 2,5mM; Painei D: epinefrina na concentração de 1,25mM; Painei E: controle com meio mínimo.

A Figura 15 apresenta uma análise detalhada dos efeitos da epinefrina em diferentes concentrações nas células de *C. neoformans*. Na figura 15A (10mM) observa-se uma cápsula compacta, porém menor que a do meio mínimo, acompanhada por células de tamanho reduzido. Essa diminuição no tamanho capsular e celular sugere uma resposta às altas concentrações de epinefrina. Na figura 15B (5mM) mostra uma cápsula compacta, aparentemente semelhante às células do controle. Essa observação indica que em concentrações mais moderadas de epinefrina, a morfologia das células pode se assemelhar àquela observada nas condições de controle. Na figura 15C (2,5mM) as células exibem uma cápsula compacta e pequena, o que sugere uma resposta consistente à concentração intermediária de epinefrina. Na figura 15D (1,25mM) mostra características semelhantes ao controle, indicando que em concentrações mais baixas de epinefrina, a morfologia das células se assemelha àquela observada nas condições de controle.

Por fim, a figura 15E mostra o controle com meio mínimo, onde as células apresentam uma cápsula compacta e um tamanho celular visualmente normal. Isso fornece uma referência para avaliar as diferenças nas morfologias celulares observadas nos outros painéis da Figura 15.

A investigação dos efeitos das distintas concentrações de epinefrina sobre as células de *Cryptococcus neoformans*, como evidenciado na figura 16A, revelou reduções substanciais no tamanho da cápsula nas concentrações de 10 mM, 2,5 mM e 1,25 mM, quando comparadas às células cultivadas em meio mínimo (Figuras 4 e 16A). Ademais, foi observada uma variação no tamanho do corpo celular entre as células cultivadas em diferentes concentrações em comparação com o meio mínimo padrão. Notavelmente, as concentrações de 10 mM e 5 mM apresentaram uma diminuição no tamanho do corpo celular em relação ao controle (Figuras 16B). A análise do tamanho total das células revelou uma redução significativa nas concentrações de 10 mM e 5 mM (Figuras 16C), sugerindo um efeito pronunciado da epinefrina sobre as dimensões celulares.

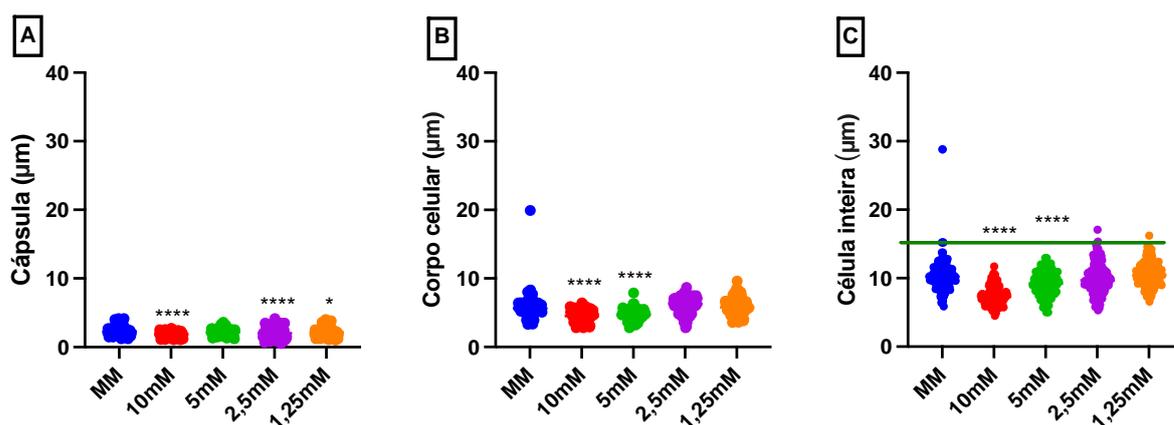


Figura 16. Efeito das diferentes concentrações de epinefrina nas células de *C. neoformans* analisados em comparação ao meio padrão (MM). Os asterísticos (****) indicam o p-valor <0.0001 e (***) equivale a p-valor de 0,0005. A linha verde delimita o tamanho para ser considerada titã pelo nosso grupo. A: Gráfico de tamanho da capsula polissacarídea, B: Gráfico de tamanho do corpo celular, C: Gráfico do tamanho celular completo. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada utilizando ANOVA. Os asterísticos (****) indicam o p-valor <0.0001. A linha verde delimita o tamanho para ser considerada titã.

Na tabela 5 foi visto que epinefrina obteve baixo percentual de células titãs, onde o controle e as concentrações de 1,25mM e 2,5mM foi os que mais obtiveram células titãs.

Tabela 5. Percentual de células titãs em diferentes concentrações de epinefrina (n=150).

Concentração	Percentual de células titãs
MM	4% ± 2.768
10mM	0% ± 1.421
5mM	0% ± 1.672
1,25mM	0,66% ± 2.202
2,5mM	2% ± 1.731

5.6 Estimulando o crescimento de células titãs no suplemento B27

O suplemento B27, também conhecido como B-27 Supplement (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA), é uma mistura de componentes que são adicionados aos meios de cultura celular para promover o crescimento e a sobrevivência de células nervosas, especialmente neurônios. O B27 contém uma série de nutrientes e fatores de crescimento essenciais para as células nervosas, incluindo antioxidantes, vitaminas, lipídios e hormônios. Esses componentes ajudam a manter a viabilidade celular, promovem o crescimento neurítico e estimulam a formação de sinapses entre neurônios em cultura (BREWER et al., 1993).

Após o crescimento por 5 dias em estufa a 37°C com 5 % de CO₂, as células foram contrastadas com tinta nanquim a fim de estudar sua morfologia por microscopia óptica.

Durante a execução de todos os experimentos para a obtenção *in vitro* de células titãs de *C. neoformans* foi realizada uma triplicata experimental para assegurar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados. No entanto, com o B27, uma das repetições da triplicata apresentou inconsistências significativas devido a uma falha técnica. Após uma análise criteriosa dos dados e das condições experimentais, foi decidido excluir essa repetição do experimento com o suplemento B27, comprometido dos resultados finais. Dessa forma, os dados apresentados correspondem à média

dos dois experimentos bem-sucedidos da triplicata. Foi observado que as células de *C. neoformans* apresentaram alterações morfológicas dependendo do ambiente nutricional encontrado (Figura 17).

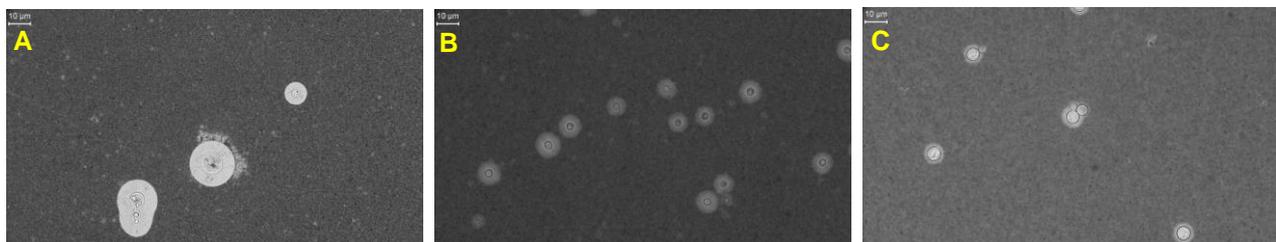


Figura 17. Análise morfológica das células de H99 *C. neoformans* em microscopia óptica nos diferentes meios (obj 60x). Painel A: NB com o suplemento b27 que foi utilizado como controle; Painel B: NB sem o suplemento b27 e Painel C: B27.

A Figura 17 apresenta uma análise detalhada dos efeitos da epinefrina em células de *C. neoformans*, representadas em três painéis distintos: A, B e C. Na figura 17A, onde as células foram cultivadas em meio NB com suplemento B27, observa-se uma morfologia caracterizada por uma cápsula gigante e compacta. Além disso, o corpo celular é relativamente grande e os corpos lipídicos estão claramente em evidência. Essa morfologia sugere uma resposta robusta das células à epinefrina, com a formação de uma cápsula volumosa e a presença de corpos lipídicos indicando atividade metabólica aumentada. Na figura 17B, onde as células foram cultivadas em meio NB sem o suplemento B27, observa-se uma cápsula polissacarídica mais dispersa e menor em comparação com o controle da figura 16A. Essa morfologia sugere que a ausência do suplemento B27 pode ter impactado negativamente a formação da cápsula, resultando em uma estrutura mais frágil e menos compacta. Por fim, na figura 17C, as células foram cultivadas em B27, resultando em uma cápsula compacta e pequena.

A avaliação do tamanho capsular das células tratadas com B27, conforme ilustrado na figura 18, demonstrou uma redução significativa em comparação com o grupo controle NB (Figuras 18A). Além disso, em relação ao tamanho do corpo celular, observou-se uma diminuição tanto nas células tratadas com B27 quanto no grupo NB sem B27, em comparação com o controle (Figuras 18B).

A análise do tamanho celular completo corroborou esses resultados, revelando uma redução tanto nas células tratadas com B27 quanto no grupo NB sem B27 em comparação com o controle (Figuras 18C).

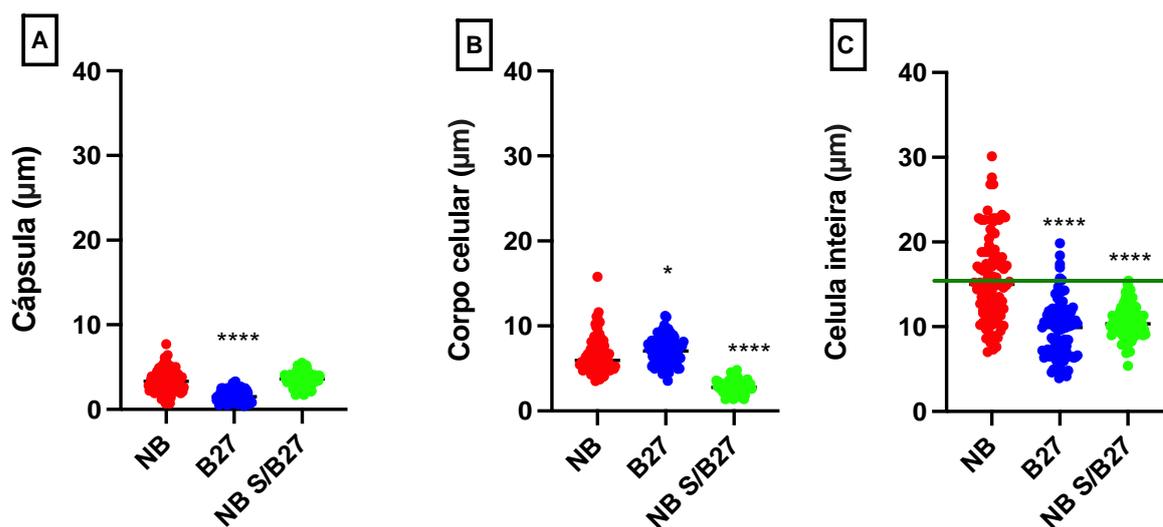


Figura 18. Efeito dos diferentes meios e componentes nas células de *C. neoformans* analisados em comparação ao meio neurobasal (NB). A: Gráfico de tamanho da capsula polissacarídea, B: Gráfico de tamanho do corpo celular, C: Gráfico do tamanho celular completo. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada utilizando ANOVA. Os asterísticos (****) indicam o p-valor <0.0001, (*) indicam o p-valor 0,0237. A linha verde delimita o tamanho para ser considerada titã. A linha verde delimita o tamanho para ser considerada titã

Na tabela 6 foi visto que o maior percentual de células titãs foi encontrado no meio NB suplementado com b27 onde 50% das leveduras presentes tinham tamanhos característicos de células titãs.

Tabela 6. Percentual de células titãs nos meios neurobasal (NB), neurobasal sem suplemento B27 (NB s/B27) e apenas o suplemento B27 (n=100).

Concentração	Percentual de células titãs
NB C/B27	50% ± 1.287
B27	3% ± 0.6915
NB S/B27	0% ± 0.8635

6 DISCUSSÃO

C. neoformans é um patógeno fúngico de importância médica significativa, cuja capacidade de formar células gigantes, conhecidas como células titãs, representa um aspecto fascinante e crucial de sua biologia (LAROCQUE-DE-FREITAS et al., 2018). O desenvolvimento metodológico de um meio de cultivo de referência para a obtenção *in vitro* dessas células titãs é fundamental para estudos sobre sua biologia, patogenicidade e resposta a tratamentos antifúngicos (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ et al., 2017).

A compreensão das características das células titãs é essencial para elucidar os mecanismos subjacentes à patogenicidade deste fungo e desenvolver estratégias terapêuticas eficazes. Estudos futuros podem se concentrar na identificação de genes e vias metabólicas envolvidos na formação e manutenção das células titãs, bem como na avaliação do impacto dessas células na resposta imunológica do hospedeiro e na eficácia de tratamentos antifúngicos (ZAGAROZA e NIELSEN, 2013).

Além disso, é importante notar que diferentes estudos têm relatado variações nos critérios de definição de células titãs (Tabela 1), o que pode influenciar a comparação e interpretação dos resultados. No entanto, ao adotarmos um critério claro de tamanho celular total igual ou superior a 15 μm , concluído através de uma média das variações das células de *C. neoformans* descritas na literatura, conseguimos estabelecer uma base sólida para a caracterização das células titãs neste estudo.

Ao longo deste trabalho, exploramos diversas abordagens e meios de cultura na tentativa de induzir a formação de células titãs. A seleção de componentes específicos do meio de cultura é fundamental, uma vez que fatores como a disponibilidade de nutrientes, a osmolaridade, a temperatura e o pH podem influenciar significativamente o desenvolvimento e a morfologia das células de *C. neoformans* (MUKAREMERA et al., 2018).

Os resultados obtidos revelam respostas importantes sobre os meios de cultivo e seus efeitos na formação de células titãs de *C. neoformans*. A observação de células titãs em diferentes condições de cultivo permite avaliar como as características individuais de cada meio influenciam esse processo e identificar os fatores essenciais para a formação dessas células.

Meio Neurobasal (NB)

O meio NB demonstrou ser o mais eficaz na indução de células titãs, com um percentual de 72,66% das leveduras apresentando tamanhos característicos dessas células. Isso sugere que a composição balanceada de nutrientes e fatores de crescimento do NB, que mimetizam o ambiente neural (CRABTREE et al., 2012), é altamente propícia para a formação de células titãs. A presença do suplemento B27 no NB parece ser um fator determinante, promovendo o crescimento e a viabilidade das células a longo prazo, e fornecendo os elementos essenciais para a diferenciação morfológica necessária à formação de células titãs. Estudos anteriores também destacaram a importância de ambientes ricos em nutrientes e fatores de crescimento para a viabilidade celular e a expressão de fenótipos específicos (WANG et al., 2018).

Meio NS34

O meio NS34, embora projetado para promover o crescimento e a expressão de neurônios pós-mitóticos (AFONSO, 2011), não obteve o crescimento de células titãs necessário para os objetivos do estudo. Isso indica que, apesar de sua capacidade de suportar a proliferação e diferenciação de células neurais, os componentes específicos e as condições proporcionadas pelo NS34 não são tão eficazes quanto os do meio NB na indução de células titãs.

Meio OLIGO

O meio OLIGO, destinado à diferenciação de oligodendrócitos (SOARES et al., 2020), não atingiu a eficácia esperada na formação de células titãs. Embora os oligodendrócitos desempenhem um papel crucial no sistema nervoso central, as condições específicas do meio OLIGO podem não ter fornecido os estímulos necessários para induzir a formação de células titãs de maneira eficiente. A ausência de componentes essenciais, como os presentes no NB, pode ter sido um fator limitante.

Meio mínimo com piruvato de sódio

O meio mínimo com piruvato de sódio não conseguiu fornecer as condições ideais para a formação de células titãs, sugerindo que outros nutrientes e fatores de crescimento presentes em conjunto no NB são cruciais para esse processo.

Meio mínimo com L-DOPA, Epinefrina e Norepinefrina

As células cultivadas em meio mínimo enriquecido com L-DOPA, epinefrina e norepinefrina também não apresentaram um crescimento significativo de células titãs. Esses compostos, apesar de suas propriedades biológicas, podem não ter proporcionado um ambiente suficientemente favorável para a indução da formação de células titãs. Isso sugere que a presença de neurotransmissores isoladamente não é suficiente para replicar o ambiente complexo necessário para a formação dessas células.

Meio mínimo com B27

A inclusão do B27 demonstrou consistentemente promover o crescimento de células titãs, apesar de sua formulação rica, deve ser utilizado em conjunto ao meio neurobasal, no qual foi observado que sua presença é essencial para a formação de células titãs.

Em suma, os objetivos deste estudo foram delineados com base em uma revisão abrangente da literatura sobre os determinantes da formação de células titãs em *C. neoformans*, visando contribuir para uma compreensão mais profunda deste fenômeno e seu potencial impacto na patogênese do fungo.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos revela que o meio NB foi o mais eficaz na indução de células titãs de *C. neoformans* com 72,66% de células titãs, destacando a importância de um ambiente rico em nutrientes e fatores de crescimento. A composição balanceada do NB, incluindo o suplemento B27, parece fornecer os elementos essenciais para a diferenciação morfológica necessária à formação de células titãs. Outros meios, embora tenham mostrado algum potencial, não conseguiram replicar a eficácia do NB, sugerindo que a combinação específica de nutrientes e fatores de crescimento é crucial para esse processo. Esses achados contribuem para uma compreensão mais profunda dos mecanismos subjacentes à formação de células titãs e têm implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra infecções fúngicas.

8 ANEXOS

1

		<p style="text-align: center;">Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)</p>	
Nome do Processo:			
Protocolo para obtenção <i>in vitro</i> de células titãs de <i>Cryptococcus neoformans</i>			
Objetivo Estratégico:			
Estabelecer um protocolo de cultivo e determinar o meio de cultura padrão para a obtenção de células titãs de <i>C. neoformans in vitro</i> em estado puro			
Campo de aplicação: Laboratórios de pesquisa focados em estudos de patogênese fúngica e interação patógeno-hospedeiro.			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Biofísica de Fungos		1	1/4

Sumário

I. Palavras-chave	2
II. Dicionário de termos e siglas	2
III. Resultado(s) final(is) do processo (opcional)	2
IV. Documentos de referência	2
V. Formulários usados no processo	
VI. Parâmetros para medição do desempenho do processo	2
VII. Outras observações (opcional)	2
VIII. Procedimentos	3
IX. Condições de biossegurança	3
X. Fluxograma	3
XI. Controle das alterações	3
XII. Controle de aprovações para uso	3

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Juliana de Godoy Miranda Orsino		

	Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
	Nome do Processo: Protocolo para obtenção <i>in vitro</i> de células titãs de <i>Cryptococcus neoformans</i>	
Unidade responsável: Laboratório de Biofísica de Fungos	Versão: 1	Número de páginas: 2/4

I. Palavras-chave

- Cryptococcus neoformans*
- Meio Neurobasal
- Células titãs
- In vitro*

II. Dicionário de termos e siglas

Termo/Sigla	Significado
Meio NB	Meio Neurobasal
MM	Meio mínimo

III. Resultado(s) final(is) do processo

Obtenção de um alto percentual de células titãs de *Cryptococcus neoformans*

IV. Documentos de referência

Referência	Descrição
Wang et al. (2018)	Estudo sobre a composição do meio NB e sua aplicação em culturas neuronais.
Crabtree et al. (2012)	Pesquisa sobre a influência de fatores de diferenciação celular na formação de células titãs.

V. Formulários usados no processo

VI. Parâmetros para medição do desempenho do processo

- Percentual de células titãs ($\geq 15 \mu\text{m}$)
- Tamanho do corpo celular e da cápsula

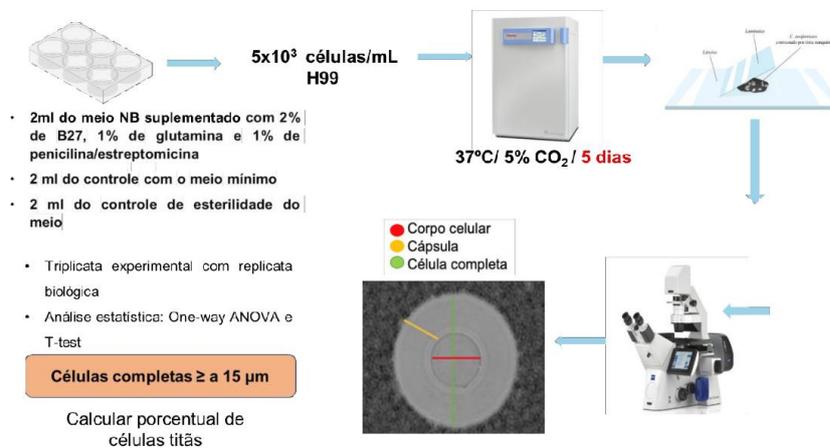
Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Juliana de Godoy Miranda Orsino		

		
Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)		
Nome do Processo: Protocolo para obtenção <i>in vitro</i> de células titãs de <i>Cryptococcus neoformans</i>		
Unidade responsável:	Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Biofísica de Fungos	1	4/4

IX. Condições de biossegurança

- Utilizar EPI (Equipamento de Proteção Individual) adequado.
- Manipular as culturas em cabine de segurança biológica.
- Descartar resíduos biológicos conforme as normas de biossegurança.

X. Fluxograma



XI. Controle das alterações

Nº da versão	Data	Tipo de alteração	Itens revisados	Responsável pela revisão
1	04/07/2022	Elaboração inicial	Todos os itens	Juliana de Godoy Miranda Orsino
2	11/03/2023	Alteração banca projeto	Referências, ortografia, inclusões	Juliana de Godoy Miranda Orsino
3	10/12/2023	Inclusões de experimentos finais	Inclusões	Juliana de Godoy Miranda Orsino
4	05/04/2023	Alterações pela banca da previa	Título, ortografia, e inclusões	Juliana de Godoy Miranda Orsino

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Juliana de Godoy Miranda Orsino		

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
Protocolo para obtenção <i>in vitro</i> de células titãs de <i>Cryptococcus neoformans</i>			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Biofísica de Fungos		1	4/4

XII. Controle de aprovações para uso

Data da aprovação	Nome do responsável pela aprovação	Unidade/subunidade aprovadora:

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Juliana de Godoy Miranda Orsino		

9 REFERÊNCIAS

AFONSO, HOLANDA, D. C. R. **Caracterização de células-tronco tumorais em glioblastoma humano**. Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2011.

BOSE, I; REESE A. J; ORY J. J, JANBON G, DOERING TL. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 4, p. 655-63, ago. 2003. <https://doi.org/10.1128/EC.2.4.655-663.2003>

BREWER, G. J.; TORRICELLI, J. R.; EVEGE, E. K.; PRICE, P. J. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. **Journal of Neuroscience Research**, v. 35, n. 5, p. 567-576, 1993. <https://doi.org/10.1002/jnr.490350513>

CRABTREE J. N.; OKAGAKI L. H.; WIESNER D. L.; STRAIN A.K.; NIELSEN J .N.; NIELSEN K. Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**. v.80, n. 11, p. 3776-85, nov. 2012. <https://doi.org/10.1128/IAI.00507-12>.

DAMBUZA, I. M.; DRAKE, T.; CHAPUIS, A.; ZHOU, X.; CORREIA, J.; TAYLOR-SMITH, L.; BROWN, G. D. The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1006978, 18 mai. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006978>

DE, M.; FERREIRA, F. Prevalência de antigenemia criptocócica em pacientes hiv positivos com imunossupressão avançada acompanhados no instituto nacional de infectologia. Fundação OSWALDO CRUZ INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/28631/marcela_ferreira_ini_mest_2016.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em: 5 maio. 2024.

EVANS, R. J., LI, Z., HUGHES, W. S., DJORDJEVIC, J. T., NIELSEN, K., & MAY, R. C. Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation

and control of titan cell morphology during macrophage infection. **Infection and immunity**, v. 83, n. 4, p. 1296–1304, abr. 2015. <https://doi.org/10.1128/IAI.03104-14>

GASKILL PJ, KHOSHBOUEI H. Dopamine and norepinephrine are embracing their immune side and so should we. **Curr Opin Neurobiol**. v.77, p.102626, dec. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102626>.

GARCÍA-RODAS, Rocío; TREVIJANO-CONTADOR, Nuria; ROMÁN, Elvira; JANBON, Guilhem; MOYRAND, Frédérique; PLA, Jesús; CASADEVALL, Arturo; ZARAGOZA, Oscar. Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 12 ago. 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00798>

GARCÍA-RODAS, R., DE OLIVEIRA, H. C., TREVIJANO-CONTADOR, N., & ZARAGOZA, O. Cryptococcal Titan Cells: When Yeast Cells Are All Grown up. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 422, p. 101–120, 2018. https://doi.org/10.1007/82_2018_145

GOLDMAN D, FRIES B, FRANZOT S, MONTELLA L, CASADEVALL A. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 95, p. 14967-14972, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14967>

GRANGER, D. L., PERFECT, J. R., & DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **The Journal of clinical investigation**, v. 76, n. 2, p. 508–516, 1985. <https://doi.org/10.1172/JCI112000>

HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J.; PÉREZ-GARCÍA, L. A.; Niño-Vega, G. A.; Mora-Montes, H. M Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. **J. Fungi**, v. 3, n. 51, p. 2-28, 23 set. 2017. <https://doi.org/10.3390/jof3040051>

HEITMAN, J.; KOZEL, TR.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus*: de patógeno humano a levedura modelo. **Imprensa ASM**; Washington, DC: 2011.

HOFMANN, K.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R.; GAEBLER, A.; CASALS, N.; SCHELLER, A.; KUERSCHNER, L. Astrocytes and oligodendrocytes in grey and white matter regions of the brain metabolize fatty acids. **Sci Rep.** 2017 Sep 7;7(1):10779. doi: 10.1038/s41598-017-11103-5

LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F., ROCHA, J. D. B., NUNES, M. P., OLIVEIRA, P. A. V., NASCIMENTO, D. O., FREIRE-DE-LIMA, L., TAKIYA, C. M., MORROT, A., DECOTE-RICARDO, D., PREVIATO, J. O., DOSREIS, G. A., MENDONÇA-PREVIATO, L., & FREIRE-DE-LIMA, C. G. Involvement of the capsular GalXM-induced IL-17 cytokine in the control of *Cryptococcus neoformans* infection. **Scientific Reports**, p. 1-16, 6 nov. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34649-4>

KIKUCHI, S.; NINOMIYA, T.; KOHNO, T.; KOJIMA, T.; TATSUMI, H. Cobalt inhibits motility of axonal mitochondria and induces axonal degeneration in cultured dorsal root ganglion cells of rat. **Cell Biology and Toxicology**, v. 34, p. 93–107. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9402-0>

KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y. S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>

LIN, X.; HEITMAN, J. (2006) The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142102

LLORENS-BOBADILLA, E.; CHELL, J. M.; LE MERRE, P.; WU, Y.; ZAMBONI, M.; BERGENSTRÅHLE, J.; STENUDD, M.; SOPOVA, E.; LUNDEBERG, J.; SHUPLIAKOV, O.; CARLÉN, M.; FRISÉN, J. A latent lineage potential in resident neural stem cells enables spinal cord repair. **Science**, v. 370, n. 6512, p. eabb8795, 2 out. 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abb8795>

MAY, R. C.; STONE, N.R.H.; WIESNER, D.L., BICANIC, T; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews**

Microbiology, v.14, n. 2. p. 106–117, fev. 2016.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>

MISU, Y.; GOSHIMA, Y.; UEDA, H.; & OKAMURA, H. Neurobiology of L-DOPAergic systems. **Progress in neurobiology**, v.49, n.5, p. 415-454, 1996.
[https://doi.org/10.1016/0301-0082\(96\)00025-1](https://doi.org/10.1016/0301-0082(96)00025-1)

MUKAREMERA, L; LEE K.K; WAGENER, J; WIESNER, D.L; GOW, N. A. R; NIELSEN K. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. **Cell Surf**, v. 1, p. 15-24, mar. 2018.

OKAGAKI, L. H.; NIELSEN, K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. **Eukaryot Cell** v. 11, p.820-826. 2012.
<https://doi.org/10.1128/EC.00121-12>

QURESHI, Z. A.; GHAZANFAR, H.; ALTAF, F.; GHAZANFAR, A.; HASAN, K. Z.; KANDHI, S.; FORTUZI, K.; DILEEP, A.; SHRIVASTAVA, S. Cryptococcosis and Cryptococcal Meningitis: A Narrative Review and the Up-to-Date Management Approach. **Cureus**. v. 4, n.16, v.3, p.e55498, mar. 2024 doi: 10.7759/ cureus.55498. PMID: 38571832; PMCID: PMC10990067.

SANTOS, E.F.; FIGUEIREDO, E.F.G. Cryptococcosis: a consequence of *Cryptococcus neoformans* infection in AIDS patients in Brazil . **Research, Society and Development**, [S.l.], v. 10, n. 15, p. e150101522591, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i15.22591. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22591>

SERNA-ESPINOSA B. N; GUZMÁN-SANABRIA D; FORERO-CASTRO M; Escandón, P; SÁNCHEZ-QUITIAN Z. A. Environmental Status of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia. **J Fungi (Basel)**. v. 24, n. 7, p. 410, May. 2021. doi: 10.3390/jof7060410. PMID: 34073882; PMCID: PMC8225054. <https://doi.org/10.3390/jof7060410>

SOARES, J.; ARAUJO, G. R. S.; SANTANA, C.; MATIAS, D.; MOURA-NETO, V.; FARINA, M.; FRASES, S.; VIANA, N. B.; ROMÃO, L.; NUSSENZVEIG, H. M.; PONTES, B. Membrane Elastic Properties During Neural Precursor Cell

Differentiation. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1323, 26 mai. 2020.
<https://doi.org/10.3390/cells9061323>

TREVIJANO-CONTADOR, N.; DE OLIVEIRA, H. C.; GARCÍA-RODAS, R.; ROSSI S. A.; LLORENTE, I., ZABALLOS, Á.; JANBON, G.; ARIÑO, J.; ZARAGOZA, Ó. *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. **PLoS Pathog.** V. 14, n. 5, p. e1007007, mai. 2018.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007007>

VERONESI, R. F., R. . **Tratado de Infectologia**. 4a ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

WANG, L.; SCHLAGAL C. R.; GAO, J.; HAO, Y.; DUNN, T. J.; MCGRATH E. L.; LABASTIDA J. A.; Y. U, Y.; FENG S. Q.; LIU S. Y.; W. U, P. Oligodendrocyte differentiation from human neural stem cells: A novel role for c-Src. **Neurochem Int.** v. 120, p.21-32, nov. 2018. <https://doi: 10.1016/j.neuint.2018.07.006>

ZARAGOZA, O.; FRIES, B.C.; CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO(2). **Infection and Immunity**, v. 71, n.11, p.6155–64, nov. 2003. <https:// doi: 10.1128/IAI.71.11.6155-6164.2003>

ZARAGOZA, O.; GARCIA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; LUIS, J. et al. Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. **PLoS Pathogens**. v. 6, n. 6, e1000945,17 dez. 2010.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000945>

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**. v. 68, p. 133–216, 2009. [https:// doi: 10.1016/S0065-2164\(09\)01204-0](https:// doi: 10.1016/S0065-2164(09)01204-0)

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 409–13, ago. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.006>

