UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Variabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas
e não melanizadas entre linhagens de *Cryptococcus neoformans* e
entre linhagens de *Cryptococcus laurentii***

Letícia Aparecida Schiave

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Variabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas e não melanizadas entre linhagens de *Cryptococcus neoformans* e entre linhagens de *Cryptococcus laurentii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Letícia Aparecida Schiave

Orientador: Gilberto Úbida Leite Braga

Ribeirão Preto
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Schiave, Letícia Aparecida

Variabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas e não melanizadas entre linhagens de *Cryptococcus neoformans* e entre linhagens de *Cryptococcus laurentii*. Ribeirão Preto, 2007.

102f. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Braga, Gilberto Úbida Leite

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. *Cryptococcus laurentii*. 3. Tolerância à radiação

Autora: **Letícia Aparecida Schiave**

Título do trabalho: Variabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas e não melanizadas entre linhagens de *Cryptococcus neoformans* e entre linhagens de *Cryptococcus laurentii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Gilberto Úbida Leite Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Instituição: FCFRP-USP _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

As grandes conquistas da vida exigem muito trabalho, perseverança e bom humor.

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, por terem me dado condições para não desistir, serenidade e coragem para superar todos os desafios e força para seguir em frente. Obrigada pelo amor incondicional e por todas as vezes que abdicaram dos seus sonhos para que os meus pudessem ser realizados.

Às minhas irmãs, pela paciência, pelo companheirismo e por todo o carinho.

Vocês são o meu maior orgulho, meu maior amor e exemplo. Enfim, vocês são a base da minha vida.

Agradecimentos

“Nesta página, hoje, estou homenageando aqueles, aquelas, que têm estado comigo seja como for, para o que der e vier, mesmo quando estou cansada, estou burra, estou irritada ou desatinada, pois às vezes eu sou tudo isso, ah! Sim... E o bom mesmo é que na amizade, se verdadeira, a gente não precisa se sacrificar nem compreender, nem perdoar, nem inventar desculpas, nem esconder rugas ou tristezas. A gente pode simplesmente ser: que alívio, neste mundo complicado e desanimador, deslumbrante e terrível, fantástico e cansativo. Pois o verdadeiro amigo é confiável e estimulante, engraçado e grave, às vezes irritante; pode se afastar, mas sabemos que retorna; ele nos agüenta e nos chama, nos dá impulso e abrigo, e nos faz ser melhores: como no verdadeiro amor”.

(Adaptado do texto Ensaio sobre a amizade – Lya Luft)

- Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga, ofereço minha ilimitada admiração e gratidão por estender a mão e me ajudar nos meus primeiros passos no caminho da ciência. Agradeço por me mostrar de forma fraternal meus erros e meus defeitos para que eu pudesse amadurecer. Obrigada pela dedicação, pela confiança e pelo exemplo de profissionalismo e paciência.

*- A Prof^ª. Dra. Regina Célia Cândido, por ter-nos cedido as linhagens de *Cryptococcus* e por todas as críticas e sugestões dadas no meu exame de qualificação, e pela oportunidade de participar do Programa PAE, sob a sua supervisão.*

*- Ao aluno de doutorado do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Reginaldo dos Santos Pedroso, por nos ceder as linhagens de *Cryptococcus*, e por dividir um pouco dos seus conhecimentos e das suas experiências. Obrigada pela amizade, pela generosidade e pela disponibilidade constante. Sua ajuda foi indispensável para a realização deste trabalho.*

- Aos amigos do laboratório de Genética e Fotobiologia de Microrganismos: Ana Luiza, Bruno, Érika, Everaldo, Gabriela, “Leca”, Ludmilla, Sérgio e Tiago, que sempre me ajudaram nas horas difíceis dentro e fora do laboratório, com conselhos, palavras de apoio e de incentivo e com muito carinho. Agradecê-los de forma digna não seria possível neste espaço tão finito. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse cumprir essa etapa. Sinto-me privilegiada por ter pessoas tão especiais como vocês ao meu lado.

-A Raquel Tognon, que foi meu braço direito no começo deste trabalho.

-A Fernanda P. Gonzales, que dividiu comigo as inseguranças e dificuldades no início deste caminho.

*-A Prof^a. Dra. Cláudia M. L. Maffei, por ter-nos cedido uma linhagem de *Cryptococcus neoformans* e por toda crítica e contribuição que me foi dada no exame de qualificação.*

*-A Prof^a. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, e a Prof^a. Dra. Maria José Mendes Giannini, por ter-nos cedido uma linhagem de *Cryptococcus neoformans*.*

-Ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, por permitir que eu aprendesse um pouco sobre virologia e sobre os seres humanos.

-Aos alunos do Laboratório de Virologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelas amizades formadas.

-A Miriã F. Criado, Lizandra G. Magalhães, Fabiana Polachini e Cybele M. V. Lorenzon; amigas que me deram as mãos quando me faltaram os pés. Agradeço a Deus por ter pessoas tão especiais ao meu lado.

-Agradeço aos meus avós maternos Maria e Fiori (in memoriam), e paternos Adelina e Lourenço, por todo amor e principalmente pelas orações, que foram fundamentais.

-Agradeço a toda minha família, especialmente meu tio “Beto” e meus primos Matheus e Denner, pelo apoio, pelo carinho e pela torcida para que tudo desse certo em todos os momentos da minha vida.

-A todos aqueles que um dia estiveram presentes em minha vida e que de uma maneira ou de outra me fizeram ser melhor...

-A FAPESP, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado (Processo 05/5333-9).

-Agradeço, sobretudo a Deus, por me julgar merecedora desta vida repleta de pessoas e momentos tão especiais.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Cryptococcus neoformans</i>	1
1.2. <i>Cryptococcus laurentii</i>	3
1.3. A radiação UV.....	4
1.4. A proteção celular contra a radiação solar.....	5
1.5. Melaninas e melanização.....	6
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	16
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1. Linhagens de <i>C. neoformans</i> e <i>C. laurentii</i>	18
4.2. Meio não indutor e indutor da melanização.....	19
4.3. Câmara de irradiação, lâmpadas e filtro.....	20
4.4. Obtenção de células melanizadas e não melanizadas em meio líquido.....	21
4.5. Obtenção de células melanizadas e não melanizadas em meio sólido.....	22
4.6. Avaliação quantitativa da suscetibilidade à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. laurentii</i>	22
4.7. Delineamento experimental e análise estatística.....	23
4.8. Avaliação semiquantitativa em microplacas da suscetibilidade à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. laurentii</i>	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Crescimento e melanização em meios líquido e sólido com e sem L-dopa.....	25
5.2. Suscetibilidade à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. laurentii</i> crescidas em meio líquido.....	28
5.3. Suscetibilidade à radiação UVB das células não melanizadas e melanizadas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. laurentii</i> crescidas em meio sólido.....	37
5.4. Avaliação semiquantitativa da suscetibilidade à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. laurentii</i>	38

6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÕES.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
9. APÊNDICES.....	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS	Síndrome da Imonodeficiência Adquirida (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
ATCC	American Type Culture Collection
DHN	1,8-Dihidroxi-naftaleno
Dopa	Dopamina
<i>g</i>	Gravidade
<i>g L⁻¹</i>	Gramas por litro
KDa	Quilodalton
KJ	Quilojoule
KJ m⁻²	Quilojoule por metro quadrado
KW	Quilowatts
L-Dopa	L-3,4 diidroxifenilalanina
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mW	Miliwatt
mW m⁻²	Miliwatt por metro quadrado
nm	Nanômetro
<i>o</i>	Orto
<i>ρ</i>	Para
PDA	Potato Dextrose Ágar
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultra Violeta
UVA	Ultra Violeta A (320-400 nm)
UVB	Ultra Violeta B (280-320 nm)
UVC	Ultra Violeta C (100-280 nm)

Lista de Figuras

Figura 1.	Irradiância espectral das lâmpadas filtradas com diacetato de celulose.....	21
Figura 2.	Melanização das linhagens ATCC 90112 e ATCC 28957 de <i>C. neoformans</i> e CRN 6 e CRN 9 de <i>C. laurentii</i> , crescidas em meio líquido indutor e não indutor de melanização por 4 e 8 dias.....	26
Figura 3.	Melanização das linhagens de <i>C. neoformans</i> e <i>C. laurentii</i> , crescidas em meio líquido indutor e não indutor de melanização por quatro dias.....	27
Figura 4.	Melanização das linhagens ATCC 90112 e ATCC 28957 de <i>C. neoformans</i> e CRN 6 e CRN 9 de <i>C. laurentii</i> , crescidas em meio sólido por 4 dias.....	28
Figura 5.	Sobrevivência relativa (%) das células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i> e de <i>C. laurentii</i> crescidas em meio líquido indutor e não indutor de melanização (2 e 4 dias) e expostas a radiação UVB (30 e 60 min).....	29
Figura 6.	Sobrevivência relativa (%) de células melanizadas e não melanizadas das linhagens ATCC 90112 e ATCC 28957 de <i>C. neoformans</i> e CRN 6 e CRN 9 de <i>C. laurentii</i> , crescidas em meio líquido indutor e não indutor de melanização por períodos de 2 a 8 dias e expostas a radiação UVB por 60 min.....	32
Figura 7.	Sobrevivência relativa (%) de células melanizadas e não melanizadas da linhagem ATCC 28957 de <i>C. laurentii</i> , crescidas em meio líquido indutor e não indutor de melanização por 2 a 8 dias e expostas a radiação UVB por 120 min.....	33
Figura 8A.	Efeito das exposições à radiação UVB em células da linhagem ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> e CRN 6 de <i>C. laurentii</i> , crescidas por períodos de 2 a 8 dias em meio líquido indutor e não indutor de melanização.....	34
Figura 8B.	Efeito das exposições à radiação UVB em células da linhagem ATCC 28957 de <i>C. neoformans</i> e CRN 9 de <i>C. laurentii</i> , crescidas por períodos de 2 a 8 dias em meio líquido indutor e não indutor de melanização.....	35
Figura 9.	Efeito da exposição das células à irradiância de 1000 mW m ⁻² no desenvolvimento das colônias das linhagens ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> e CRN 6 de <i>C. laurentii</i>	36
Figura 10.	Sobrevivência relativa (%) das células melanizadas e não melanizadas das linhagens ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> e CRN 6 de <i>C. laurentii</i> , crescidas em meio sólido indutor e não indutor de melanização.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1	Origem geográfica e substrato no qual as linhagens de <i>C. neoformans</i> e <i>C. laurentii</i> foram isoladas.....	19
Tabela 2	Avaliação do crescimento após 24 h, em microplacas, de células melanizadas e não melanizadas, crescidas em meio líquido indutor e não indutor de melanização (2 e 4 dias) das linhagens ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> e CRN 6 de <i>C. laurentii</i> , após a exposição à radiação UVB.....	39
Tabela 3	Avaliação do crescimento após 48 h, em microplacas, de células melanizadas e não melanizadas, crescidas em meio líquido indutor e não indutor de melanização (2 e 4 dias) das linhagens ATCC 90112 de <i>C. neoformans</i> e CRN 6 de <i>C. laurentii</i> , após a exposição à radiação UVB.....	40

RESUMO

SCHIAVE, L. A. **Variabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas e não melanizadas entre linhagens de *Cryptococcus neoformans* e entre linhagens de *Cryptococcus laurentii*.** 2007. 102 f. Dissertação de (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A radiação solar é um dos principais fatores responsáveis pelo controle das populações de fungos no meio ambiente. A inativação de estruturas de dispersão e de infecção pela radiação UVA e UVB é ainda mais importante no controle de fungos que se dispersam pelo ar e que podem infectar o hospedeiro, quando inalados, como é o caso de espécies do gênero *Cryptococcus*. *C. neoformans* é capaz de produzir melanina na presença de substratos exógenos, como a L-dopa. A melanização é capaz de proteger o fungo contra diversos fatores ambientais bióticos e abióticos. Neste trabalho, foi avaliado o efeito de exposições a uma intensidade ambiental de radiação UVB (1.000 mW m^{-2}) na sobrevivência de células melanizadas e não melanizadas de quatro linhagens de *Cryptococcus neoformans* e de quatro linhagens de *Cryptococcus laurentii*. Foi determinada a sobrevivência relativa (sobrevivência das células expostas em relação à das células não expostas à radiação) de células com 2, 4, 6 e 8 dias, crescidas em meio com e sem L-dopa, após exposição às doses de 1.8 e de 3.6 kJ m^{-2} . Tanto a irradiância, como as doses, são observadas no meio ambiente, mesmo em regiões temperadas. Foram observadas diferenças na tolerância à radiação UVB, tanto entre as linhagens de *C. neoformans*, como entre as linhagens de *C. laurentii*. As linhagens de *C. neoformans* foram mais sensíveis à radiação do que as linhagens de *C. laurentii*. Em *C. neoformans*, foram observadas diferenças na tolerância à radiação ao longo do desenvolvimento, tanto nas células melanizadas como nas não melanizadas. Na maioria das situações (linhagem, tempo de crescimento, dose de UVB), não houve diferença significativa entre a tolerância das células melanizadas e não melanizadas e, quando isso ocorreu, a diferença foi menor do que a observada anteriormente com UVC. Em *C. laurentii*, não houve diferença na tolerância à radiação ao longo do desenvolvimento das células melanizadas e não melanizadas. Também não foram observadas diferenças significativas entre a tolerância das células melanizadas e não melanizadas em nenhuma das linhagens.

Palavras-chave: Fotobiologia de fungos, melanização em fungos, tolerância à radiação UV, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*.

ABSTRACT

SCHIAVE, L. A. **Variability on tolerance to UVB radiation of melanized and non-melanized cells of *Cryptococcus neoformans* strains and *Cryptococcus laurentii* strains.** 2007. 102f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Solar radiation is one of the major factors responsible for the control of fungus populations in the environment. The inactivation of dispersal and infection structures by UVA and UVB radiation is even more important for the control of fungi that disperse through the air and that can infect the host when inhaled, as it is the case for *Cryptococcus*. *C. neoformans* can produce melanin in the presence of exogenous substrates such as L-dopa. Melanization can protect the fungus against various biotic and abiotic factors. In the present study, we investigated the effect of exposure to an environmental intensity of UVB radiation of 1,000 mW m⁻² on the survival of melanized and non-melanized cells of four strains of *Cryptococcus neoformans* and of four strains of *Cryptococcus laurentii*. The relative survival (survival of cells exposed to radiation in relation to cells not exposed) of 2, 4, 6 and 8 day cells grown on medium with and without L-dopa was determined after exposure to doses of 1.8 and 3.6 kJ m⁻². Both irradiance and these doses are observed in the environment even in temperate regions. Difference in tolerance to UVB radiation were observed both in the *C. neoformans* and *C. laurentii* strains. The *C. neoformans* strains were more sensitive to radiation than the *C. laurentii* strains. In *C. neoformans*, differences in tolerance to radiation were observed during development both in melanized and non-melanized cells. For most features (strain, time of growth and UVB dose) there was no difference in tolerance between melanized and non-melanized cells and when differences occurred they were smaller than those previously observed with UVC. In *C. laurentii*, there was no difference in tolerance to radiation during development between melanized and non-melanized cells. Also, no significant differences in tolerance were observed between melanized and non-melanized cells of any strain.

Key Words: Fungal photobiology, fungal melanization, UVB tolerance, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Cryptococcus neoformans*

O basidiomiceto encapsulado *Cryptococcus neoformans* é um fungo saprófita, cosmopolita, que normalmente é isolado de solos contaminados com excretas de aves e de detritos vegetais em decomposição. Apesar da existência saprofítica, o fungo é capaz de infectar e de causar doença em uma grande variedade de hospedeiros animais, como mamíferos, aves e insetos (SORRELL; ELLIS, 1997; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; HEITMAN; LIN, 2006).

C. neoformans era considerada uma espécie homogênea até 1942, quando a existência de quatro sorotipos distintos, baseados nas propriedades antigênicas de sua cápsula de polissacarídeos, foi revelada (revisado por HEITMAN; LIN, 2006). A heterogeneidade da espécie, entretanto, permaneceu desconhecida até meados da década de 70, quando foram descobertos dois teleomorfos morfologicamente distintos de *C. neoformans*: *Filobasidiella neoformans*, produzido por linhagens dos sorotipos A e D, e *Filobasidiella bacillispora*, produzido por linhagens dos sorotipos B e C. A correlação entre os sorotipos e os dois diferentes teleomorfos indicou que as diferenças entre os dois sorogrupos não estavam limitadas a suas propriedades antigênicas. Estudos posteriores mostraram que as duas espécies também diferiam em características como nicho ecológico, epidemiologia, bioquímica e genômica estrutural (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

À medida que novos métodos foram utilizados para a genotipagem das linhagens, foi observada a existência de uma grande diversidade intraespecífica, de modo que a determinação do número de espécies crípticas dentro de *C. neoformans* tornou-se um assunto polêmico (HEITMAN; LIN, 2006). Atualmente, o agente etiológico da criptococose é

classificado em duas espécies, *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) e variedade *neoformans* (sorotipo D) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (KWON-CHUNG et al., 2000). Kwon-Chung e Varma (2006) revisaram as características taxonômicas do grupo e validaram, com base nos três maiores conceitos de espécie, a divisão atual do grupo em apenas duas espécies.

As variedades *neoformans* e *grubii* apresentam distribuição cosmopolita e causam doença principalmente em indivíduos imunocomprometidos (HEITMAN; LIN, 2006). As duas variedades são freqüentemente isoladas de solos contaminados com excretas de pombos (SOARES et al., 2005). *C. gattii* é usualmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais e pode infectar indivíduos imunocompetentes (HARRISON, 2000; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Tanto as variedades *neoformans* como *gattii* são encontradas como colonizadores perenes de espécies arbóreas e em detritos vegetais em decomposição (HAJJEH et al., 1995; NOSANCHUK et al., 1999; RANDHAWA et al., 2001; CASADEVALL et al., 2003; NOSANCHUK et al., 2003; RANDHAWA et al., 2006).

O surgimento da AIDS e a utilização de novas práticas médicas, como as terapias imunossupressoras, aumentaram muito o número de indivíduos acometidos pela doença (BICANIC; HARRISON, 2005; MITCHELL; PERFECT, 1995). Considerada uma condição definidora da AIDS, a meningite criptocócica é a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central e a terceira causa mais freqüente de complicações em pacientes com AIDS (DEL VALLE; PINA-OVIEDO, 2006; BICANIC; HARRISON, 2005).

A identificação da fonte ambiental e da natureza das células infectivas de *C. neoformans* é extremamente importante para o entendimento da patogenicidade e da ecologia do fungo. Acredita-se que a infecção por *Cryptococcus* inicia-se com a inalação de leveduras desidratadas ou basidiósporos (HEITMAN; LIN, 2006). Apesar de a inalação de células de *C. neoformans* ser comum, a doença é rara e ocorre predominantemente em indivíduos imunocomprometidos (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). *Cryptococcus* raramente é

isolado como comensal humano e a transmissão de indivíduo para indivíduo não ocorre, de modo que a infecção humana é considerada um evento acidental e terminal no ciclo de vida do fungo (HEITMAN; LIN, 2006).

Apesar dos recentes avanços na genética e na biologia molecular obtidos após o sequenciamento completo do genoma de diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*, diversos aspectos da ecologia, da estrutura populacional e da reprodução desses patógenos ambientais ainda não foram estabelecidos (HEITMAN; LIN, 2006).

1.2. *Cryptococcus laurentii*

C. laurentii também é um basidiomiceto saprófita e encapsulado, com ampla distribuição geográfica, que ocupa diversos nichos ecológicos. O fungo tem sido isolado de solo contaminado com excreta de pombos e gansos (PEDROSO, 2004; PEDROSO et al., 2007; FILION et al., 2006), ocos de árvores e detritos vegetais em decomposição (RANDHAWA et al., 2000; FELL; STATEZELL-TALLMAN, 1998; TOSI et al., 2002) e da superfície de frutos (LI; TIAN, 2006).

C. laurentii tem sido utilizado no controle biológico como antagonista de fungos que causam podridão pós-colheita em frutos (LI; TIAN, 2006; BLUM et al., 2004). Aparentemente, *C. laurentii* atua inibindo a germinação dos conídios de diversas espécies de fungos filamentosos que provocam a podridão (ZHENG et al., 2004).

Do ponto de vista taxonômico, *C. laurentii* é considerado uma espécie geneticamente heterogênea. Estudos baseados na análise de seqüências ITS (“Internal Transcribed Spacer”) de DNAr 28S revelaram uma grande variabilidade intraespecífica e demonstraram que as diferenças entre dez linhagens analisadas foram grandes o suficiente para que as mesmas fossem agrupadas em sete diferentes espécies (SUGITA et al., 2000).

Até o final do século passado, *C. laurentii*, como outras espécies de *Cryptococcus* não-*neoformans*, era considerado um saprófita não patogênico. Entretanto, nos últimos anos, o número de micoses causadas por *C. laurentii* vem crescendo, particularmente em indivíduos imunocomprometidos, e o fungo já é considerado um patógeno emergente (CHENG et al., 2001; BAUTERS et al., 2002; AVERBUCH et al., 2002; IKEDA; MAEDA, 2004; SIMON et al., 2005; MANFREDI et al., 2006). As infecções causadas por *C. laurentii* normalmente têm sido facilmente tratadas; entretanto, a existência de linhagens resistentes a antifúngicos comumente utilizados no tratamento de micoses, como fluconazol e anfotericina B, já foi descrita (AVERBUCH et al., 2002; MANFREDI et al., 2006).

C. laurentii é uma das poucas espécies do gênero capazes de produzir a enzima lacase e de sintetizar melanina a partir de substratos exógenos como L-dopa (KWON-CHUNG et al., 1981; IKEDA et al., 2002; FILION et al., 2006).

A grande cápsula produzida por *C. laurentii*, constituída por uma mistura de três diferentes polissacarídeos, é considerada o principal fator de proteção e de virulência do fungo (BYSTRICKY et al., 2004).

1.3. A radiação UV

A fração UV do espectro solar tem sido apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo controle de populações naturais de fungos (ROTEM et al., 1985; WILLOCQUET et al., 1996; PAUL et al., 1997; PARNELL et al., 1998, BRAGA et al., 2001; BRAGA et al., 2006). O espectro ultravioleta é convencionalmente dividido em UVA (400 a 320 nm), UVB (320 a 280 nm) e UVC (280 a 100 nm). A fração UV do espectro solar que atinge a superfície da Terra é composta exclusivamente pelas radiações UVA e UVB, já que o ozônio atmosférico reduz drasticamente a penetração de radiações com comprimentos de onda

menores do que 320 nm e impede completamente a penetração de radiações com comprimentos de onda menores do que 290 nm (BRAGA et al., 2006). Embora os efeitos da radiação UV em fungos sejam estudados há décadas, grande parte desses estudos utilizou e continua utilizando a radiação UVC (WANG; CASADEVALL, 1994; CHELICO et al., 2005; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; CENHOUR et al., 2006; FRASES et al., 2007). Como os seres vivos não estão expostos à radiação UVC no ambiente natural e como não foram expostos a UVC durante a sua história evolutiva recente, a extrapolação dos resultados obtidos com a UVC para outras situações deve ser feita com cautela (BRAGA et al., 2006). Sendo assim, é importante a utilização de distribuições espectrais que se aproximem da radiação solar nos estudos que objetivam a determinação dos efeitos fisiológicos e moleculares da radiação UV em fungos.

1.4. A proteção celular contra a radiação solar

O efeito deletério da radiação UV nos fungos ao longo da evolução fez com que eles desenvolvessem uma série de sistemas de proteção cuja função básica é manter a integridade do material genético e dos componentes celulares essenciais à vida. Em todos os sistemas biológicos já estudados, a tolerância celular à radiação é multifatorial e complexa e envolve (1) pigmentos, como as melaninas, que são capazes de bloquear a entrada da radiação no interior da célula (WANG; CASADEVALL, 1994; BHARTI; KHURANA, 1997; BUTLER; DAY, 1998; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; BRAGA et al., 2006; ICENHOUR et al., 2006; ICENHOUR et al., 2006; FRASES et al., 2007); (2) proteínas, açúcares e micosporinas capazes de proteger as macromoléculas e os componentes celulares contra os efeitos danosos da radiação (NICHOLSON et al., 2000; BENAROUDJ et al., 2001); (3) sistemas enzimáticos complexos capazes de reparar os danos

provocados pela radiação em ácidos nucleicos e em proteínas (TRAUTINGER et al., 1996; GRIFFITHS et al., 1998; GOLDMAN et al., 2002), e (4) enzimas e antioxidantes, como carotenóide e polióis, que são capazes de inativar substâncias tóxicas e/ou mutagênicas, como os radicais livres induzidos por exposições à radiação UV (MILLER et al., 2004). A atividade desses diferentes sistemas de proteção muitas vezes se sobrepõe parcialmente. Alguns desses mecanismos atuam prevenindo ou reduzindo os danos a componentes celulares, como é o caso dos pigmentos, enquanto outros sistemas atuam no reparo dos danos causados pela radiação e na recuperação celular.

1.5. Melaninas e melanização

A presença de pigmentos, como as melaninas, pode, em maior ou menor extensão, aumentar a tolerância à radiação solar, tanto em leveduras, como em conídios de diversas espécies de fungos filamentosos (GUNASEKERA et al., 1997; BRAGA et al., 2006; RANGEL et al., 2006). A importância evolutiva desse grupo de pigmentos é evidenciada pelo fato de os mesmos serem produzidos por organismos de praticamente todos os grupos taxonômicos, desde procariotos até vertebrados superiores (BUTLER; DAY, 1998; PLONKA; GRABACKA, 2006). Apesar de as melaninas serem os pigmentos fotoprotetores mais estudados, diversos aspectos relacionados à sua estrutura química, biossíntese e função permanecem desconhecidos, principalmente devido às dificuldades técnicas encontradas para o seu estudo.

Melaninas são pigmentos hidrofóbicos, de alto peso molecular, negativamente carregados e formados pela polimerização de compostos fenólicos e/ou indólicos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006). A estrutura das melaninas é pouco conhecida devido à incapacidade de as técnicas bioquímicas e biofísicas atuais fornecerem suas

estruturas moleculares definitivas (KAXIRAS et al., 2006). A dificuldade deve-se principalmente ao fato de as melaninas serem amorfas e inapropriadas para os estudos estruturais, tanto cristalográficos, como em soluções. Dessa maneira, as informações sobre a estrutura das melaninas foram obtidas de análises de seus produtos de degradação e de análises espectroscópicas (WILLIAMSON et al., 1998; WAKAMATSU; ITO, 2002). Além disso, *in vivo*, as melaninas geralmente encontram-se, quase sempre, complexadas com proteínas e com carboidratos. As proteínas e os carboidratos são completamente destruídos pelos tratamentos drásticos a que a célula é submetida durante a extração das melaninas, impossibilitando a determinação da natureza dos ligantes e da estrutura dos complexos que contêm melaninas (WANG et al., 1996; BUTLER; DAY, 1998). A estrutura molecular das melaninas e o tipo/tipos de monômeros que fazem parte da sua constituição variam muito de organismos para organismo. Apesar de a estrutura molecular do polímero intacto não ser conhecida, algumas substâncias biológicas vêm sendo historicamente classificadas como melaninas por possuírem características físicas e químicas comuns. Embora não haja um consenso universal, o critério físico-químico geralmente aceito para a caracterização das melaninas baseia-se nas seguintes características: (1) cor escura (marrom ou negra) ou avermelhada; (2) insolubilidade em água quente ou fervente e em solventes orgânicos; (3) resistência à degradação por ácidos concentrados quentes ou frios; (4) branqueamento por agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio; (5) solubilização e degradação por soluções alcalinas; (6) presença de centros persistentes de radicais livres na molécula e (7) capacidade de ligação a íons multivalentes (revisto por MEREDITH; SARNA, 2006; BUTLER; DAY, 1998).

Os mamíferos sintetizam melaninas através de tirosinases que catalisam a oxidação de monofenóis a *o*-diidroxifenóis e posteriormente a *o*-quinonas (WAKAMATSU; ITO, 2002; PLONKA; GRABACKA, 2006). Os microrganismos normalmente sintetizam melaninas

através de fenoloxidasas (como tirosinases, lacases ou catecolases) e/ou através da via da “polyketide syntase” (revisto por LANGFELDER et al., 2003; KROKEN et al., 2003; BUTLER; DAY, 1998). Os dois tipos mais comuns de melaninas em fungos são as DHN-melaninas (denominação devida a um de seus intermediários metabólicos, o 1,8-diidroxinaftaleno) e a dopa-melanina (denominação devida a um de seus precursores, a L-3,4-diidroxifenilalanina). *C. neoformans* sintetiza melaninas através da via L-dopa-melanina, que é composta pela enzima lacase e por diversas proteínas acessórias (WALTON et al., 2005; WILLIAMSON et al., 1998; WILLIAMSON, 1997).

As melaninas sintetizadas a partir da 3,4-diidroxifenilalanina (dopa) por fenoloxidasas, denominadas eumelaninas, são normalmente pretas ou marrons. As melaninas amarelas ou vermelhas, chamadas feomelaninas, têm, além da dopa, a cisteína incorporada durante a sua biossíntese. As melaninas marrons sintetizadas por tirosinases a partir do ácido homogentísico são chamadas piomelaninas. As melaninas formadas a partir do acetato pela via da “polyketide syntase”, chamadas diidroxinaftaleno melaninas, são tipicamente pretas ou marrons (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006; PLONKA; GRABACKA, 2006).

A lacase de *C. neoformans* faz parte de uma classe de multicobre oxidases que são primariamente proteínas extracelulares expressas em bactérias, fungos, plantas e insetos (NAKAMURA, GO, 2005). Dentre as supostas funções da enzima, estão a polimerização de lignanas (fenol) para a produção de lignina (polifenol) na parede celular de plantas e a decomposição da lignina por fungos decompositores ou fitopatogênicos (WATERMAN et al., 2007; NAKAMURA; GO, 2005). Waterman et al. (2007) especularam que, no meio ambiente, *C. neoformans* utiliza a lacase para hidrolisar lignina, já que o fungo é comumente encontrado em ocos de árvores e em solos contendo detritos vegetais em decomposição. Isso explicaria a localização da enzima na parede celular, onde tem fácil acesso aos polímeros de lignina. Adicionalmente, a localização da lacase na parede, que é única em fungos, também

poderia ter evoluído por proteger a célula contra a fagocitose por predadores ambientais. A localização periférica da enzima também permite que, no hospedeiro animal, a lacase tenha acesso a substratos pequenos, como catecolaminas e metais, que são capazes de permear através dos poros da cápsula (ZHU; WILLIAMSON, 2004).

Zhu et al. (2001) verificaram que a enzima está covalentemente ligada à parede celular, provavelmente por pontes dissulfeto ou tioéster. Linhagens de *C. neoformans* com mutações em genes necessários para a integridade da parede (como o gene para a quitina sintase) podem apresentar um extravasamento da lacase e, conseqüentemente, podem melanizar o meio extracelular, enquanto a melanização, na linhagem selvagem, está restrita à célula fúngica (WALTON et al., 2005).

Em *C. neoformans*, existem dois genes parálogos, *LAC1* e *LAC2*, que codificam para lacases (MISSALL et al., 2005). O gene *LAC1*, anteriormente chamado de *CNLAC1*, codifica para um polipeptídeo com 624 aminoácidos. O produto funcional é uma enzima glicosilada, contendo cobre, com 75 kDa e atividade de difenol oxidase. A enzima é capaz de oxidar diversos substratos difenólicos e diamínicos nas posições orto e meta, mas não grupamentos monofenólicos, como o fenol, a tiramina ou a tirosina (WILLIAMSON, 1994).

Os genes *LAC1* e *LAC2* possuem uma estrutura muito parecida entre os seus 14 éxons e possuem uma identidade de 76% nos nucleotídeos e de 72% nos aminoácidos codificados. Entretanto, a similaridade é muito menor em suas regiões promotoras, sugerindo a existência de diferenças entre a expressão e a regulação dos dois genes (MISSALL et al., 2005). Tendo L-dopa como substrato, tanto a lacase produzida por *LAC1* como a produzida por *LAC2* contribuem para a produção de melaninas; entretanto, a análise funcional dos genes deixou claro que *LAC1* é o principal responsável pela síntese (MISSALL et al., 2005).

A regulação da expressão das lacases em *C. neoformans* é complexa e ocorre através de vias que respondem a múltiplos sinais (PUKKILA-WORLEY, 2005; HEUNG et al., 2005).

A síntese de lacase é induzida por diversos fatores ambientais, como cálcio, ferro e cobre, e reprimida por nutrientes, como glicose e nitrogênio, e por temperaturas elevadas (ZHU; WILLIAMSON, 2004). Ambos os genes são induzidos pela ausência de glicose; entretanto, o nível de transcrição basal de *LAC2* é muito menor do que de *LAC1* (PUKKILA-WORLEY et al., 2005). A regulação da expressão de *LAC1* pela fonte de carbono apóia a hipótese de que a enzima é importante para a utilização da lignina como fonte de carbono no meio ambiente (PANEPINTO; WILLIAMSON, 2006). Zhang et al. (2006) verificaram que a proteína Ssa1 de *C. neoformans*, que é homóloga a Hsp70, atua como um co-ativador transcricional da lacase em resposta à privação de glicose, ferro, cobre, cálcio e à temperatura.

A enzima Lac1 localiza-se na parede celular, enquanto a enzima Lac2, aparentemente, localiza-se no citoplasma, entretanto sua localização pode ser alterada pela ausência da enzima Lac1 (MISSALL et al., 2005).

Valderrama et al. (2003) sugerem que as lacases de *Filobasidiella neoformans* e de *Aspergillus nidulans*, por pertencem a um grupo evolutivo distinto do ramo principal das *bona fide* lacases, não são lacases verdadeiras, apesar de serem capazes de utilizar os substratos típicos do grupo.

Walton et al. (2005) identificaram cinco novos genes envolvidos na biossíntese de melanina em *C. neoformans*. Esses genes codificam para homólogos da proteína transportadora de cobre Ccc2, da cobre-chaperona Atx1, da quitina sintase Chs3 do co-ativador transcricional Mbfl e da enzima remodeladora de cromatina Snf5.

Em *C. neoformans*, a biossíntese de melanina por lacases requer a presença de substratos exógenos, já que o fungo é incapaz de sintetizar os precursores necessários à síntese. Esse é um caso raro, já que a maioria dos fungos melanogênicos produz o pigmento através de substratos endógenos (BUTLER; DAY, 1998). A lacase inicia a conversão de catecolaminas, como a dopamina, oxidando-a em *o*-quinona (DAQ). As DAQs, por serem

extremamente reativas, condensam-se, de maneira não enzimática, entre si e/ou com outros metabólitos, para formar a melanina (ZHU; WILLIAMSON, 2004).

Wang e Casadevall (1994) acompanharam o crescimento e a melanização de *C. neoformans* (sorotipo D) em meio líquido, com e sem L-dopa, e verificaram que, em meio contendo L-dopa, a melanização aumentou com o tempo de crescimento. As curvas de crescimento e a viabilidade das células foram muito semelhantes para os dois tipos de meio. Wang et al. (1996) verificaram que a melanização de *C. neoformans*, em meio contendo 1 mM de L-dopa, aumentou linearmente durante um período de 14 dias de crescimento e que a intensidade da melanização variou muito entre as diferentes linhagens estudadas. Em algumas situações, a melanina representou até 15% da massa seca das células (WANG et al., 1996).

Como a síntese de melanina por *C. neoformans* requer substratos exógenos, o tipo do pigmento sintetizado varia, dependendo das características do substrato presente no meio (CASADEVALL et al., 2003). Pigmentos sintetizados a partir de *o*-difenóis com grupamentos hidroxilas nas posições 2,3- ou 3,4- são escuros e predominantemente associados à parede celular, enquanto pigmentos produzidos a partir de *p*-difenóis, com grupamentos hidroxilas nas posições 1,4- ou 2,5-, são solúveis e se difundem para o meio (CHASKES; TYNDALL, 1975). Garcia-Rivera et al. (2005) observaram que as características do pigmento produzido por *C. neoformans* variaram dependendo do substrato utilizado (L-dopa, metil-dopa, epinefrina e norepinefrina) e que nem todos os pigmentos produzidos apresentaram as características necessárias para serem considerados melaninas. Curiosamente, Eisenman et al. (2005) observaram que melaninas sintetizadas por *C. neoformans* a partir de diferentes substratos possuem estrutura semelhante. Mesmo na presença de substratos apropriados, a biossíntese de melaninas ou de pigmentos semelhantes a melaninas é dependente da fonte de nitrogênio. As melhores fontes para a melanização são a glutamina, a glicina e a asparagina (CHASKES; TYNDALL, 1975).

Melaninas isoladas de *C. neoformans* retêm a forma das células, resultando em esferas ocas chamadas de “fantasmas de melaninas” (WANG et al., 1996). Estudos de microscopia de força atômica e de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que essas estruturas são constituídas por grânulos discretos de melanina, com diâmetro de aproximadamente 40-130 nm, distribuídos em múltiplas camadas concêntricas na parede celular (EISENMAN et al., 2005). A espessura da camada, aparentemente, depende da idade da célula. A RNM-crioporometria revelou que os “fantasmas de melanina” possuem poros com diâmetros entre 1 e 4 nm e poros, em número menor, localizados mais internamente, com diâmetro de aproximadamente 30 nm. O diâmetro do poro diminuiu com o aumento da idade das células (EISENMAN et al., 2005). Estudos de exclusão molecular conduzidos por Jacobson e Ikeda (2005) mostraram que células melanizadas são menos porosas do que as células não melanizadas e que o tamanho máximo dos poros é de 4 e de 10,4 nm nas células melanizadas e não melanizadas, respectivamente.

Os substratos utilizados pelo fungo para sintetizar pigmentos podem estar presentes no hospedeiro animal (WILLIAMSON et al., 1998; TIAN et al., 2003), na matéria orgânica que serve como substrato para o desenvolvimento do fungo ou podem ser sintetizados por microrganismos, como bactérias, que compartilham o mesmo nicho ecológico com *C. neoformans*. Frases et al. (2007) observaram que linhagens de todos os sorotipos de *C. nefomans* são capazes de produzir melanina utilizando o ácido homogentísico (precursor da síntese de melanina em bactéria), sugerindo uma nova fonte de substrato para a melanização do fungo no meio ambiente. A produção de dopamina por *Klebsiella aerogenes* permitiu a melanização de *C. neoformans* quando os dois microrganismos cresceram juntos em meio de cultura (FRASES et al. 2006). Com base nessas observações, é possível especular que, no meio ambiente, outras espécies de microrganismos também forneçam substratos para a melanização do fungo.

Mesmo sendo um melanogênico facultativo, existem evidências de que *C. neoformans* encontra-se melanizado no meio ambiente. Estruturas semelhantes aos “fantasmas de melanina” obtidos de células melanizadas de *Cryptococcus* foram isoladas de excretas de pombos contaminadas com o fungo (NOSANCHUK et al., 1999).

As propriedades fotoprotetora e antioxidante das melaninas são, provavelmente, as principais responsáveis pelas diversas funções biológicas postuladas para esse grupo de pigmentos (MEREDITH; SARNA, 2006; GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005; BUTLER; DAY, 1998). Diversas funções têm sido atribuídas às melaninas produzidas por fungos e, de maneira geral, baseiam-se nas propriedades físico-químicas da molécula. Entretanto, é difícil avaliar qual dessas funções é realmente relevante para a existência saprofítica do fungo sem um conhecimento profundo da sua biologia e ecologia (BUTLER; DAY, 1998).

A produção de melaninas e de uma cápsula de polissacarídeos e a capacidade de se desenvolver à temperatura de 37°C são os fatores de patogenicidade mais bem estudados em *C. neoformans* (MAXSON et al., 2007; WALTON et al., 2005; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; CASADEVALL et al., 2000; WILLIAMSON, 1997). Apesar de ser um importante fator de virulência, é muito provável que a melanização tenha sido selecionada por conferir ao fungo proteção contra fatores ambientais bióticos e abióticos (revisto por NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). A melanização aumenta a sobrevivência de *C. neoformans* após o fungo ser fagocitado ou ingerido por predadores, como amebas (STEENBERGEN et al., 2001) ou nematóides (MYLONAKIS et al., 2002). Células efectoras do sistema imune, como os macrófagos, utilizam espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio para inativar as células dos microrganismos fagocitados. Células melanizadas de *C. neoformans* são mais tolerantes a espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio do que células não melanizadas (WANG et al.,

1995; WANG; CASADEVALL, 1994; JACOBSON; TINELL, 1993). A melanização também reduziu a sensibilidade do fungo a antifúngicos, como a anfotericina B, caspofungina e fluconazol (IKEDA et al., 2003; van DUIN et al., 2002).

Células melanizadas foram mais resistentes do que células não melanizadas às enzimas capazes de degradar a parede celular (ROSAS; CASADEVALL, 2001). Enzimas capazes de hidrolisar componentes da parede do fungo são produzidas tanto por predadores ambientais como por antibiontes.

A melanização protegeu *C. neoformans* contra o frio e ao calor. Células melanizadas de *C. neoformans* foram mais tolerantes ao calor do que células não melanizadas da mesma idade. Células melanizadas, no início da fase estacionária, foram mais tolerantes ao frio do que células não melanizadas. Entretanto, células melanizadas provenientes da fase estacionária tardia foram mais sensíveis ao frio do que as células não melanizadas da mesma idade (ROSAS; CASADEVALL, 1997).

A capacidade que as eumelaninas têm de se ligar a diversos íons metálicos é uma de suas principais características (revisto por MEREDITH; SARNA, 2006). Melaninas produzidas por fungos ligam-se a metais pesados (e tóxicos, dependendo da concentração), como níquel, cobre, zinco, cádmio e chumbo, comumente encontrados no meio ambiente (FOGARTY; TOBIN, 1996). Células melanizadas de *C. neoformans* foram mais tolerantes ao nitrato de prata devido à ação quelante das melaninas (GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001).

As dopa melaninas (eumelaninas) são capazes de converter a energia proveniente da absorção das radiações visível, UV e infravermelha em calor. No caso de excitação da melanina pela UV, mais de 99,9% de todos os fótons absorvidos tem a sua energia dissipada através de mecanismos não radiativos, o que é uma propriedade extremamente interessante para um fotoprotetor. Dessa forma, as melaninas protegem as células contra os efeitos

danosos da radiação solar, convertendo rapidamente a energia dos fótons absorvidos em calor através de alterações vibracionais e rotacionais da molécula, sem que ela tenha tempo de participar de processos fotoquímicos (MEREDITH; SARNA, 2006).

Células melanizadas de *C. neoformans* são mais tolerantes à radiação UVC do que células não melanizadas (WANG e CASADEVALL, 1994; FRASES et al., 2007). Apesar de a melanização ser freqüentemente apontada como capaz de aumentar a tolerância de *C. neoformans* à radiação solar (GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003), nenhum estudo conduzido com distribuições espectrais encontradas no meio ambiente foi feito para confirmar essa hipótese. Neste estudo, nós utilizamos doses e uma irradiância de UVB encontradas pelo fungo no meio ambiente para: (1) estimar a variabilidade na tolerância à radiação UVB de células melanizadas e de células não melanizadas entre linhagens de *C. neoformans* e entre linhagens de *C. laurentii* e (2) para determinar a importância relativa da melanização na tolerância à radiação UVB nessas duas espécies.

2. Justificativa e Relevância

A radiação solar é freqüentemente apontada como um dos principais - se não o principal - fatores ambientais capazes de controlar o tamanho das populações e de limitar a dispersão de muitas espécies de fungo no meio ambiente. A pressão seletiva exercida pela radiação solar fez com que os seres vivos adquirissem, durante a evolução, uma série de mecanismos capazes de conferir proteção contra os efeitos danosos da radiação. A determinação dos efeitos da radiação UV sobre etapas específicas do ciclo de vida e a identificação dos fatores genéticos e ambientais capazes de influenciar na tolerância à radiação UV de uma determinada espécie de fungo fornecem subsídios importantes para o melhor entendimento de sua biologia.

3. Objetivos Específicos

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1- Estimar a variabilidade na tolerância à radiação UVB (tanto de células melanizadas como de células não melanizadas) entre linhagens de *C. neoformans* e entre linhagens de *C. laurentii*.
- 2- Estimar o efeito do tempo de crescimento em meio indutor e em meio não indutor da melanização na tolerância à radiação UVB.
- 3- Estimar a diferença na tolerância à radiação UVB entre células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e de *C. laurentii*.
- 4- Estimar o efeito do meio de cultura (líquido ou sólido) na tolerância à radiação UVB em *C. neoformans* e em *C. laurentii*.
- 5- Estabelecer uma metodologia alternativa à metodologia baseada na determinação das UFCs para avaliar a sensibilidade à radiação UVB em *Cryptococcus*.

4-Materiais e Métodos

4.1-Linhagens de *C. neoformans* e *C. laurentii*

A linhagem de *C. neoformans* var. *neoformans* 968 (sorotipo D) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Cláudia Maria Leite Maffei, do Departamento de Biologia Celular Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP); a linhagem de *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957 (sorotipo D) e a linhagem de *C. neoformans* var. *grubii* ATCC 90112 (sorotipo A) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA); a linhagem de *C. neoformans* CRN 20 e as quatro linhagens de *C. laurentii* (CRN 6, CRN 9, CRN 10, CRN 21) foram isoladas por Reginaldo dos Santos Pedroso, entre agosto de 2002 e julho de 2003, de excreta de pombo (PEDROSO, 2004). A origem geográfica e o substrato do qual as linhagens foram isoladas são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Origem geográfica e substrato no qual as linhagens de *C. neoformans* e *C. laurentii* foram isoladas.

Isolado	Espécie	Hospedeiro/Substrato	Origem geográfica
CRN 6	<i>C. laurentii</i>	Excreta de pombo	Ribeirão Preto, SP, Brasil
CRN 9	<i>C. laurentii</i>	Excreta de pombo	Ribeirão Preto, SP, Brasil
CRN 10	<i>C. laurentii</i>	Excreta de pombo	Ribeirão Preto, SP, Brasil
CRN 21	<i>C. laurentii</i>	Excreta de pombo	Ribeirão Preto, SP, Brasil
CRN 20	<i>C. neoformans</i>	Excreta de pombo	Ribeirão Preto, SP, Brasil
ATCC 28957	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Lesão óssea	Não conhecida
ATCC 90112	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	Líquido cerebroespinhal	Pensilvânia, EUA
968	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Líquido cerebroespinhal	Ribeirão Preto, SP, Brasil

4.2-Meio não indutor e indutor da melanização

O meio líquido não indutor (MLNI) da melanização é composto por 5 g L⁻¹ de glicose (Vetec, RJ, Brazil), 4 g L⁻¹ de KH₂PO₄ (Labsynth, SP, Brazil), 2,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O (Labsynth, SP, Brazil), 1 g L⁻¹ de L-asparagina monoidratada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 1 g L⁻¹ de glicina (Sigma), 1 g L⁻¹ de glutamina (Sigma) e 0,1 g L⁻¹ de tiamina (Sigma). O meio líquido indutor (MLI) foi preparado adicionando-se 1 g L⁻¹ de L-3,4 diidroxifenilalanina (Sigma) ao MLNI. O meio sólido não indutor (MSNI) e o meio sólido indutor (MSI) foram preparados adicionando-se 20 g L⁻¹ de ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) ao MLNI e ao MLI.

4.3-Câmara de irradiação, lâmpadas e filtro

As exposições à radiação UVB foram conduzidas a $28\pm1^{\circ}\text{C}$, em câmara com circulação interna de ar (Nova Ética, SP, Brasil). A radiação UVB foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes TL-20W/12 RS (Phillips, Eindhoven, Holanda), com pico de emissão em 313 nm. Para a obtenção de um nível estável de emissão ao longo dos experimentos, as lâmpadas foram envelhecidas por 100 h antes de serem utilizadas. Durante as exposições, o material irradiado foi coberto com um filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (JCS Industries, Le Mirada, CA, EUA), que bloqueia radiações com comprimentos de onda menores do que 290 nm. O filtro permitiu a passagem da maior parte das radiações UVA e UVB, mas filtrou a radiação UVC (<280 nm) e a radiação UVB com comprimentos de onda menores que 290 nm. A irradiância espectral (Figura 1) foi medida em incrementos de 1 nm, com um espectroradiômetro com duplo monocromador (Optronic Model 742, Orlando, FL), como descrito por BRAGA et al (2001a,b). O espectroradiômetro foi calibrado com uma lâmpada padrão de 1-kW de tungstênio-alogênio, certificada pelo “National Institute of Standards and Technology”. O espectro de ação de dano no DNA (dimerização de pirimidinas), desenvolvido por Quate et al (1997) e normalizado para a unidade a 300 nm, foi utilizado para calcular a irradiância da UVB, como descrito e discutido anteriormente (BRAGA et al., 2002).

Figura 1. Irradiância espectral das lâmpadas filtrada com diacetato de celulose.

4.4-Obtenção de células melanizadas e não melanizadas em meio líquido

As linhagens de *C. neoformans* e *C. laurentii* foram crescidas em meio batata dextrose ágar (PDA) (Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI, EUA), a 28°C, por dois dias. Células provenientes de colônias isoladas foram crescidas em tubos de polipropileno com fundo cônico de 50 mL (TPP, Suíça), com as tampas frouxamente atarraxadas, contendo 21 mL de meio líquido indutor e não indutor da melanização, a 30°C, com agitação de 200 rpm, no escuro. As oito linhagens foram crescidas por 2 e 4 dias e, a fim de avaliar o efeito de períodos maiores de crescimento (e de melanização) na tolerância à radiação, 2 linhagens de *C. neoformans* (ATCC 90112 e ATCC 28957) e 2 linhagens de *C. laurentii* (CRN 6 e CRN 9) foram crescidas por até 8 dias. A concentração inicial de células no meio de cultura foi aproximadamente 10^5 células mL⁻¹ para todas as linhagens. Após o crescimento, os tubos foram centrifugados a 1.100 g por 15 min, as células foram lavadas e ressuspensas em solução fisiológica e a concentração foi ajustada para 10^4 células mL⁻¹.

4.5-Obtenção de células melanizadas e não melanizadas em meio sólido

As linhagens de *C. neoformans* e *C. laurentii* foram crescidas em 7 mL de meio sólido indutor e em meio sólido não indutor da melanização, em placas de Petri (60 × 15 mm), a 28°C, por 2 e 4 dias, tanto no escuro, como com fotoperíodos de 12:12 h (escuro:claro). A iluminação foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes Daylight Plus F30W/155-T8 (Sylvania, Germany). Após o crescimento, as células foram suspensas em solução fisiológica e a concentração foi ajustada para 10^4 células mL⁻¹.

4.6-Avaliação quantitativa da suscetibilidade à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e *C. laurentii*

As células (100 µl, 10^4 células mL⁻¹) foram espalhadas na superfície de 23 mL de PDA em placas de Petri (90 × 15 mm) e imediatamente expostas à irradiância de 1.000 mW m⁻² de UV (irradiância calculada) por 30, 60 e 120 min. A dose total fornecida ao final das exposições foi de 1,8, 3,6 e 7,2 kJ m⁻², respectivamente. Em cada experimento, foram irradiadas quatro placas-réplica por período de exposição e quatro placas-controle foram protegidas da radiação por papel alumínio no interior da câmara. Após a exposição, as placas foram mantidas no escuro a 24°C. A contagem do número de colônias em cada placa foi iniciada após 24 h e a sobrevivência relativa percentual (número de colônias nas placas expostas à radiação UVB em relação ao número de colônias nas placas-controle não expostas) foi estimada como descrito anteriormente (BRAGA et al 2001). Em suma, a sobrevivência relativa (%) = $(M_t/M_c) \times 100$, sendo M_t

a média do número de colônias das quatro replicatas expostas à radiação pelo período de tempo t e M_c a média do número de colônias das quatro placas-controle.

4.7-Delineamento experimental e análise estatística

Devido à limitação de espaço no interior da câmara de irradiação, foram expostas duas linhagens de cada vez. Para cada par de linhagens, foram feitos três experimentos independentes. Não houve necessidade de nenhum tipo de transformação dos dados para a análise estatística. Para analisar a influência das variáveis [linhagens, meio de crescimento (sem e com L-dopa), período de crescimento (2, 4, 6 e 8 dias) e período de exposição à radiação UVB (30 e 60 min)] na tolerância à radiação, foi utilizado um modelo linear de efeitos fixos. As comparações das médias foram feitas através do teste t . Todas as análises computacionais foram feitas com a utilização do aplicativo PROC MIXED do programa SAS/STAT versão 9.0.

4.8-Avaliação semiquantitativa em microplacas da suscetibilidade à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e *C. laurentii*

Para verificar a possibilidade de estimar o efeito da radiação UVB na sobrevivência de células de *C. neoformans* e de *C. laurentii* através de uma metodologia menos trabalhosa do que a baseada na contagem das UFCs e possível de ser parcialmente automatizada, foram conduzidos experimentos em microplacas de 96 poços, com a linhagem ATCC 90112 de *C. neoformans* e com a linhagem CRN 6 de *C. laurentii*.

Cem microlitros de suspensão contendo 2×10^3 células mL^{-1} foram colocados nos poços de microplacas (96 poços, fundo plano, TPP, Suíça). As suspensões de células melanizadas e não melanizadas foram expostas à irradiância de 1.000 mW m^{-2} por 0, 90, 120, 150, 180 e 210 min. As doses totais fornecidas ao final de cada período de exposição foram, respectivamente, 0,0; 5,4; 7,2; 9,0; 10,8 e $12,6 \text{ kJ m}^{-2}$. Após as exposições, foram adicionados 100 μl de Potato Dextrose Broth, (PDB) (DIFCO) em cada poço e as placas foram incubadas, a 28°C , no escuro. O crescimento nos diferentes tratamentos foi avaliado visualmente após 24 e 48 h. Foram atribuídos valores empíricos para crescimento intenso (+++), para crescimento reduzido (++) , para crescimento mínimo (+) e para ausência de crescimento (0). Foram realizados três experimentos independentes. Os resultados foram comparados com os obtidos nos experimentos baseados na contagem das UFCs.

5-Resultados

5.1-Crescimento e melanização em meio líquido e em meio sólido com e sem L-dopa

Todas as linhagens de *C. neoformans* e de *C. laurentii* apresentaram curvas de crescimento semelhantes, tanto no meio líquido indutor (com L-dopa), como no meio líquido não indutor (sem L-dopa). As linhagens, em ambos os meios, atingiram o início da fase estacionária após dois dias de desenvolvimento. A viabilidade das células de todas as linhagens manteve-se inalterada ao longo do desenvolvimento e não foram observadas diferenças significativas entre a viabilidade das células melanizadas e não melanizadas (dados não mostrados). Embora não tenha sido feita nenhuma análise quantitativa dos pigmentos produzidos pelas diferentes linhagens, foi possível perceber, visualmente, que a intensidade da melanização aumentou com o tempo de desenvolvimento (Figura 2) e variou muito entre as linhagens de ambas as espécies (Figura 3).

Figura 2. Melanização das linhagens ATCC 90112 e 28957 de *C. neoformans* e CRN 6 e CRN 9 de *C. laurentii*, crescidas em meio líquido não indutor (esquerda) e indutor (direita), por 4 (A e C) e 8 (B e D) dias. Ao final do crescimento, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em solução salina e a concentração foi ajustada para aproximadamente 10^6 células mL^{-1} .

Figura 3. Melanização das linhagens de *C. laurentii* e de *C. neoformans*, crescidas em meio líquido não indutor (esquerda) e indutor (direita), por 4 dias. Ao final do crescimento, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em solução salina e a concentração foi ajustada para aproximadamente 10^6 células mL^{-1} .

Resultados semelhantes aos observados em meio líquido foram obtidos quando as linhagens cresceram em meio sólido com e sem L-dopa. Todas as linhagens melanizaram no meio indutor e a intensidade da melanização aumentou com o aumento do tempo de crescimento. Uma característica marcante de todas as linhagens de *C. laurentii* foi a melanização do meio na redondeza das colônias (Figura 4).

Figura 4. Melanização das linhagens CRN 6 (A) e CRN 9 (B) de *C. laurentii* e ATCC 90112 (C) e 28957 (D) de *C. neoformans*, crescidas em meio sólido não indutor (esquerda) e indutor (direita), por 4 dias.

5.2-Suscetibilidade à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e *C. laurentii* crescidas em meio líquido

O efeito das exposições à irradiância de 1.000 mW m^{-2} na sobrevivência das células das quatro linhagens de *C. neoformans* e das quatro linhagens de *C. laurentii* é mostrado na Figura 5. As células foram crescidas em meio líquido indutor e não indutor por 2 e 4 dias.

Figura 5. Sobrevivência relativa (%) das células melanizadas e não melanizadas de *Cryptococcus neoformans* e de *Cryptococcus laurentii* crescidas em meio líquido indutor e não indutor (2 e 4 dias) e expostas à radiação UVB (30 e 60 min). (A) Células com dois dias de crescimento, expostas por 30 min à radiação UVB; (B) células com dois dias de crescimento, expostas por 60 min; (C) células com quatro dias de crescimento, expostas por 30 min; (D) células com quatro dias de crescimento, expostas por 60 min. A sobrevivência relativa foi estimada em relação aos controles não expostos à radiação. Cada valor representa a média de três experimentos independentes e a barra indica o desvio-padrão da média.

Diferença na tolerância entre as linhagens. Foi observada uma diferença significativa na sobrevivência, tanto das células melanizadas como das células não melanizadas, entre as linhagens, após as exposições à radiação UVB ($P < 0.0001$, para todos os casos). A variabilidade na tolerância foi maior entre as linhagens de *C. neoformans* do que entre as linhagens de *C. laurentii*.

A comparação da tolerância entre as espécies mostrou que tanto as células melanizadas como as células não melanizadas de *C. neoformans* foram mais sensíveis à radiação UVB do que as células de *C. laurentii*, em todas as situações (2 e 4 dias de

crescimento e 30 e 60 min de exposição) ($P<0,0001$ para todos os casos). A diferença na sensibilidade à radiação UVB entre as duas espécies foi ressaltada nas exposições por 60 min (Figuras 5B e 5D).

Efeito do tempo de exposição à radiação UVB. Houve um efeito significativo do tempo de exposição à radiação (30 ou 60 min) na sobrevivência ($P<0,001$) e esse efeito foi maior nas linhagens de *C. neoformans* (comparação das figuras 5A com 5B e 5C com 5D). Sessenta minutos de exposição à radiação foram suficientes para reduzir a sobrevivência de três das quatro linhagens de *C. neoformans* avaliadas a menos de 10%, enquanto a sobrevivência das quatro linhagens de *C. laurentii* manteve-se acima de 50%. (Figura 5D).

Efeito do tempo de crescimento em meio não indutor e indutor. Não foram observadas diferenças significativas na tolerância à radiação UVB entre as células crescidas em meio líquido indutor por dois e quatro dias. A única exceção foi a linhagem ATCC 28957, cujas células melanizadas com 4 dias foram menos tolerantes do que as células melanizadas com 2 dias ($P=0,0009$) (comparação da Figura 5B com 5D e Figura 6A).

Para a maioria das linhagens, também não foram observadas diferenças significativas na tolerância à radiação UVB entre as células crescidas em meio líquido não indutor por dois e quatro dias. Entretanto, as células não melanizadas, com 4 dias, das linhagens CRN10, CRN20 e ATCC 90112 foram mais sensíveis à exposição por 60 min do que as células não melanizadas com dois dias. ($P=0,006$, $P=0,008$ e $P=0,00001$, respectivamente) (comparação da Figura 5B com a Figura 5D).

A avaliação da influência do tempo de crescimento em meio indutor e não indutor na tolerância à radiação UVB foi estendida para duas linhagens de *C. neoformans* (ATCC 90112 e 28957) e duas linhagens de *C. laurentii* (CRN 6 e CRN 9), que foram crescidas por até 8 dias (Figura 6). A linhagem ATCC 90112 apresentou uma

redução acentuada na tolerância das células não melanizadas e um aumento gradativo na tolerância das células melanizadas a partir do segundo dia de crescimento. A tolerância das células melanizadas foi maior do que a tolerância das células não melanizadas a partir do 4º dia (Figura 5A). O comportamento da linhagem ATCC 28957 foi menos regular. Apenas nas células com dois dias de crescimento a tolerância das células melanizadas foi significativamente maior do que a tolerância das células não melanizadas (Figura 6B).

Tanto as células melanizadas como as células não melanizadas das duas linhagens de *C. laurentii*, apresentaram pouca variação na tolerância à radiação UVB ao longo do crescimento. Em nenhuma das linhagens foram observadas diferenças significativas entre a tolerância das células melanizadas e não melanizadas expostas à radiação UVB por 60 min (Figuras 6C e 5D). Resultados semelhantes foram observados nas exposições à radiação UVB por 120 min (Fig. 7), embora, neste caso, tenha ficado evidente a redução na tolerância, tanto das células melanizadas como das não melanizadas, após dois dias de crescimento.

Figura 6. Sobrevivência relativa (%) de células melanizadas e não melanizadas das linhagens ATCC 90112 e 28957 de *Cryptococcus neoformans* e das linhagens CRN 6 e CRN 9 de *Cryptococcus laurentii*, crescidas em meio líquido indutor e não indutor da melanização por períodos de 2 a 8 dias e expostas à radiação UVB por 60 min. A sobrevivência relativa foi estimada em relação aos controles não expostos à radiação. Cada valor representa a média de três experimentos independentes e a barra indica o desvio-padrão da média. As letras indicam a significância da comparação entre médias de diferentes tempos de crescimento e * indica a significância da comparação das médias entre as células melanizadas e não melanizadas dentro de cada tempo. Em ambos os casos, $P < 0,05$.

Figura 7. Sobrevivência relativa (%) de células melanizadas e não melanizadas da linhagem CRN 9 de *Cryptococcus laurentii*, crescida em meio líquido indutor e não indutor da melanização por períodos de 2 a 8 dias e expostas à radiação UVB por 120 min. A sobrevivência relativa foi estimada em relação aos controles não expostos à radiação. Cada valor representa a média de três experimentos independentes e a barra indica o desvio-padrão da média. As letras indicam a significância da comparação entre médias de diferentes tempos de crescimento e * indica a significância da comparação das médias entre as células melanizadas e não melanizadas dentro de cada tempo. Em ambos os casos, $P < 0,005$.

O efeito das exposições à radiação UVB (30 a 120 min) na sobrevivência e no desenvolvimento das células sobreviventes das linhagens ATCC 90112 e 28957 de *C. neoformans* e das linhagens CRN 6 e CRN 9 de *C. laurentii* é mostrado nas Figuras 8A e 8B. A correspondência dos resultados com os dados quantitativos apresentados nas Figuras 6 e 7 é evidente.

Figura 8A. Efeito de exposições à radiação UVB em células da linhagem ATCC 90112 de *C. neoformans* (A: não melanizada e B: melanizada) e CRN 6 de *C. laurentii* (C: não melanizada e D: melanizada), crescidas por períodos de 2 a 8 dias em meio não indutor e indutor da melanização. As células ($10 \mu\text{L}$, com concentração variando entre 10^6 e 10^3 células mL^{-1}) foram expostas à irradiância de 1.000 mW m^{-2} por períodos de 30 até 120 min. Após as exposições, as placas foram incubadas, no escuro, a 28°C por 48 h.

Figura 8B. Efeito de exposições à radiação UVB em células da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans* (A: não melanizada e B: melanizada) e CRN 9 de *C. laurentii* (C: não melanizada e D: melanizada), crescidas por períodos de 4 a 8 dias em meio não indutor e indutor da melanização. As células ($10 \mu\text{L}$, com concentração variando entre 10^6 e 10^3 células mL^{-1}) foram expostas à irradiância de 1.000 mW m^{-2} por períodos de 30 até 120 min. Após as exposições, as placas foram incubadas, no escuro, a 28°C por 48 h.

Colônias originadas das células que sobreviveram à exposição à radiação UVB apresentaram uma grande heterogeneidade morfológica e um marcante atraso no desenvolvimento em relação às colônias originadas por células não expostas à radiação. A Figura 9 mostra colônias, com 48 h, das linhagens de *C. neoformans* ATCC 90112 e de *C. laurentii* CRN 6, provenientes de células que sobreviveram a exposições de 30 e de 60 min à radiação UVB.

Figura 9. Efeito da exposição das células à irradiância de 1.000 mW m^{-2} no desenvolvimento das colônias das linhagens ATCC 90112 de *C. neoformans* e CRN 6 de *C. laurentii*. A e D: colônias, com 48 h, das linhagens ATCC 90112 e CRN 6, respectivamente, originadas de células não expostas à radiação. B e E: colônias, com 48 h, originadas de células expostas à radiação por 30 min. C e F: colônias, com 48 h, originadas de células expostas à radiação por 60 min. Barra = 0,5 cm.

5.3-Suscetibilidade à radiação UVB das células não melanizadas e melanizadas de *C. neoformans* e *C. laurentii* crescidas em meio sólido

A tolerância à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas das linhagens ATCC 90112 de *C. neoformans* e CRN 6 de *C. laurentii*, provenientes de colônias crescidas em meio sólido indutor e não indutor da melanização, é mostrada na Figura 10.

Figura 10. Sobrevivência relativa (%) das células melanizadas e não melanizadas das linhagens CRN 6 de *C. laurentii* e ATCC 90112 de *C. neoformans*, crescidas em meio sólido indutor e não indutor da melanização. (A) Células com dois dias de crescimento, expostas por 30 min à radiação UVB; (B) células com dois dias de crescimento, expostas por 60 min; (C) células com quatro dias de crescimento, expostas por 30 min; (D) células com quatro dias de crescimento, expostas por 60 min. A sobrevivência relativa foi estimada em relação a controles não expostos à radiação. Cada valor representa a média de três experimentos independentes e a barra indica o desvio-padrão.

Os resultados obtidos nas exposições das células crescidas em meio sólido foram muito semelhantes aos obtidos com as células crescidas em meio líquido ($P=0,294$). A tolerância à radiação UVB da linhagem de *C. laurentii* CRN 6 foi significativamente maior do que a tolerância da linhagem de *C. neoformans* ATCC 90112 ($P<0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas entre a tolerância das células crescidas por 2 dias e a tolerância das células crescidas por 4 dias ($P=0,4466$). Também não foram observadas diferenças significativas entre a tolerância das células não melanizadas e a tolerância das células melanizadas ($P=0,5472$).

5.4-Avaliação semiquantitativa da suscetibilidade à radiação UVB das células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e *C. laurentii*

Os resultados dos experimentos para avaliar a sensibilidade de células melanizadas e não melanizadas, realizados em microplacas, foram coincidentes com os resultados dos experimentos baseados na contagem das UFCs. O crescimento (avaliado após 24 h e após 48 h) das linhagens ATCC 90112 de *C. neoformans* e CRN 6 de *C. laurentii*, após as células terem sido expostas à radiação UVB (0 a 210 min), é mostrado nas Tabelas 2 e 3. A linhagem ATCC 90112 de *C. neoformans* foi mais sensível às exposições à radiação UVB do que a linhagem CRN 6 de *C. laurentii*. Para ambas as linhagens e para ambos os tipos de células (melanizadas e não melanizadas), a inibição do desenvolvimento foi diretamente proporcional ao tempo de exposição à radiação UVB. Em nenhuma das linhagens foram observadas diferenças evidentes na sensibilidade à radiação UVB entre as células melanizadas e não melanizadas.

Tabela 2. Crescimento, após 24 h, em microplacas, de células melanizadas (2 e 4 dias de crescimento em meio indutor) e não melanizadas (2 e 4 dias de crescimento em meio não indutor) das linhagens ATCC 90112 de *C. neoformans* e CRN 6 de *C. laurentii*, após exposição à radiação UVB. Crescimento intenso (+++), crescimento reduzido (++) , crescimento mínimo (+), e ausência de crescimento (0). Após a exposição, as placas foram incubadas, no escuro, a 28°C. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Linhagens	Crescimento avaliado 24 h após o final da exposição					
	Tempo de exposição à radiação UVB (min)					
	0	90	120	150	180	210
CRN 6 melanizada (2 dias, em meio indutor)	+++	++	++	++	++	++
CRN 6 não melanizada (2 dias, em meio não indutor)	+++	++	++	++	++	++
ATCC 90112 melanizada (2 dias, em meio indutor)	+++	+	0	0	0	0
ATCC 90112 não melanizada (2 dias, em meio não indutor)	+++	0	0	0	0	0
CRN 6 melanizada (4 dias, em meio indutor)	+++	+++	+++	+++	+++	++
CRN 6 não melanizada (4 dias, em meio não indutor)	+++	+++	+++	++	++	++
ATCC 90112 melanizada (4 dias, em meio indutor)	+++	++	0	0	0	0
ATCC 90112 não melanizada (4 dias, em meio não indutor)	+++	++	0	0	0	0

Tabela 3. Crescimento após 48 h, em microplacas, de células melanizadas (2 e 4 dias de crescimento em meio indutor) e não melanizadas (2 e 4 dias de crescimento, em meio não indutor) das linhagens ATCC 90112 de *C. neoformans* e CRN 6 de *C. laurentii*, após exposição à radiação UVB. Crescimento intenso (+++), crescimento reduzido (++) , crescimento mínimo (+), e ausência de crescimento (0). Após a exposição, as placas foram incubadas, no escuro, a 28°C. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Linhagens	Crescimento avaliado 48 h após o final da exposição					
	Tempo de exposição à radiação UVB (min)					
	0	90	120	150	180	210
CRN 6 melanizada (2 dias, em meio indutor)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CRN 6 não melanizada (2 dias, em meio não indutor)	+++	+++	+++	+++	++	++
ATCC 90112 melanizada (2 dias, em meio indutor)	+++	+++	++	+	0	0
ATCC 90112 não melanizada (2 dias, em meio não indutor)	+++	+++	++	+	0	0
CRN 6 melanizada (4 dias, em meio indutor)	+++	+++	+++	+++	+++	+
CRN 6 não melanizada (4 dias, em meio não indutor)	+++	+++	+++	+++	+++	+
ATCC 90112 melanizada (4 dias, em meio indutor)	+++	+++	++	++	0	0
ATCC 90112 não melanizada (4 dias, em meio não indutor)	+++	+++	+++	+++	+++	++

6-Discussão

A radiação solar é um dos principais fatores capazes de controlar as populações de fungos, limitando a sobrevivência e a dispersão de espécies patogênicas no meio ambiente (BRAGA et al., 2006). A produção de melaninas e de pigmentos semelhantes às melaninas é capaz de aumentar a tolerância de *C. neoformans* à radiação UVC (FRASES et al., 2007; WANG; CASADEVALL, 1994) e a diversos fatores ambientais, bióticos e abióticos (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

A fração UV da radiação solar que atinge a superfície da Terra é constituída exclusivamente pelas radiações UVA e UVB. A radiação UVC, por ser completamente filtrada pela camada de ozônio, não atinge a superfície e, portanto, não apresenta relevância ambiental (MADRONICH, 1993; TYRREL, 1995). Entretanto, como a radiação UVC produz um espectro de danos nas células que se sobrepõe parcialmente ao produzido pela radiação UVB, ela é comumente utilizada para simular os efeitos da radiação solar em sistemas biológicos. Apesar disso, deve-se considerar que existe uma grande diferença entre a efetividade biológica dos dois tipos de radiação. Utilizando-se a mesma dose, a inativação das células pela radiação UVC é muito maior do que pela radiação UVB. Adicionalmente, em células metabolicamente ativas, é comum a ausência de reciprocidade entre exposições à radiação UV com diferentes intensidades ou diferentes frações espectrais (BRAGA et al., 2001). A importância da melanização para a tolerância de *Cryptococcus neoformans* às radiações UVA e UVB é desconhecida e pouco se sabe a respeito da variabilidade na tolerância à radiação UVB entre linhagens e entre espécies do gênero *Cryptococcus*. Neste trabalho, foram avaliadas a tolerância de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e de *C. laurentii* a uma intensidade ambiental de radiação UVB.

Todas as linhagens de *C. neoformans* e de *C. laurentii* apresentaram curvas de crescimento semelhantes nos meios com e sem L-dopa. Após dois dias de crescimento, todas

as linhagens encontravam-se no início da fase estacionária. Estudos com outras linhagens de *C. neoformans* mostraram que a presença de L-dopa no meio não reduziu a velocidade de crescimento (WANG; CASADEVALL, 1994; ROSAS; CASADEVALL, 1997), apesar de o brotamento em células melanizadas requerer mecanismos complexos para a degradação e síntese da melanina depositada na parede celular (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). *C. neoformans* não é capaz de utilizar a L-dopa como fonte de carbono ou nitrogênio (POLACHEK et al., 1990).

Embora as linhagens tenham apresentado curvas de crescimento semelhantes, a cinética e a intensidade da melanização variou muito, tanto entre as linhagens de *C. neoformans*, como entre as linhagens de *C. laurentii*. Algumas linhagens, como a 968, ATCC 90112 e CRN 20 de *C. neoformans* e CRN 10 de *C. laurentii*, melanizaram-se mais rápido e mostraram uma pigmentação final mais intensa. A variabilidade na cinética e na intensidade da melanização foi observada em outras linhagens de *C. neoformans* (WANG et al., 1996). Em meio contendo L-dopa, *C. neoformans* acumula melanina de maneira progressiva e linear ao longo da fase estacionária. Em algumas linhagens, a melanina representou 15% da massa seca da célula (ROSAS; CASADEVALL, 1997).

Independentemente da melanização e da idade, as células vegetativas de *C. neoformans* foram muito sensíveis à radiação UVB, o que indica que estão pouco adaptadas a exposições diretas à radiação solar. Infelizmente, não existem informações a respeito da sensibilidade de outras estruturas do fungo, como esporos e leveduras desidratadas. Exposições de apenas uma hora foram suficientes para reduzir drasticamente a viabilidade, tanto das células melanizadas, como das células não melanizadas de todas as linhagens. Na maioria das linhagens de *C. neoformans*, foi observada uma diminuição na tolerância das células não melanizadas com o aumento da idade, principalmente do segundo para o quarto dia de crescimento. O comportamento das células melanizadas variou entre as linhagens de *C.*

neoformans. Por exemplo, a linhagem ATCC 90112 apresentou um aumento discreto e contínuo na tolerância com o aumento da idade, enquanto a linhagem ATCC 28957 apresentou um comportamento irregular e difícil de ser interpretado. Na maioria das situações (linhagens, tempo de crescimento e dose), não houve diferença significativa entre a tolerância das células melanizadas e não melanizadas. Quando a diferença foi significativa, como no caso da linhagem 90112, ela foi consequência da acentuada redução da tolerância das células não melanizadas com o aumento da idade. É interessante notar o fato de que as linhagens que apresentaram rápida e intensa melanização, como a 968 e a ATCC 90112, foram mais sensíveis à radiação UVB do que linhagens que apresentaram uma melanização mais lenta e menos intensa, como a ATCC 28957. Isso indica que outros fatores celulares, além da melanização, estão envolvidos na tolerância do fungo à radiação UVB. Libkind et al. (2004) verificaram que as exposições de *C. laurentii* à luz visível e a radiação UVA, durante o desenvolvimento, induziram a produção de fotoprotetores, como carotenóides e micosporinas.

Apesar de ser difícil a comparação entre os resultados de experimentos que utilizaram diferentes comprimentos de onda, doses e irradiâncias, em alguns aspectos, os resultados obtidos nesse experimento com a radiação UVB foram semelhantes aos observados anteriormente com a radiação UVC. Wang e Casadeval (1994) também observaram redução na tolerância das células não melanizadas e manutenção da tolerância das células melanizadas ao longo da curva de crescimento. Entretanto, no mesmo experimento, o padrão de resposta à radiação UVC variou muito em função da dose de UVC.

Tanto as células melanizadas como as células não melanizadas de *C. laurentii* foram mais tolerantes à radiação UVB do que as células de *C. neoformans*, permitindo facilmente a distinção entre as duas espécies por essa característica. Em comparação com *C. neoformans*, a variação intraespecífica observada em *C. laurentii* foi menor, o que é condizente com o fato de todas as linhagens terem sido isolados de um mesmo nicho (excreta de pombos), em uma área geográfica restrita. Existem diversos exemplos, tanto em leveduras, como em fungos

filamentosos, mostrando a adaptação de diferentes linhagens aos seus níveis ambientais de radiação UV (BRAGA et al., 2001; BIDOCHKA et al., 2001; GUNASEKERA et al., 1997; FARGUES et al., 1996). Não houve diferenças na tolerância ao longo da curva de crescimento, nem nas células melanizadas e nem nas células não melanizadas. Em nenhuma linhagem e em nenhuma condição (por exemplo: tempo de crescimento e dose) foi observada diferença significativa entre a tolerância das células melanizadas e não melanizadas. Isso indica que a importância relativa da melanização para a tolerância à radiação UVB é pequena ou inexistente em *C. laurentii*.

Células melanizadas e não melanizadas crescidas em meio sólido mostraram um padrão de tolerância semelhante ao das células crescidas em meio líquido, o que permite supor que a natureza do substrato (sólido ou líquido) no qual as células se desenvolvem não interfere de maneira significativa na tolerância a radiação UVB. Entretanto, deve-se ressaltar que as comparações entre os meios limitaram-se a duas linhagens (uma de cada espécie) e a 2 e 4 dias de desenvolvimento.

Os resultados dos testes de sensibilidade à radiação UVB em microplacas, baseados na inibição do crescimento, apresentaram uma grande concordância com os experimentos de sobrevivência baseados nas contagens das UFCs. Dessa forma, esse tipo de metodologia alternativa pode ser utilizada para avaliar, de maneira confiável, a sensibilidade à radiação em *Cryptococcus* e em outras espécies de fungos leveduriformes.

Em suma, embora em algumas linhagens e em alguns tempos de crescimento tenha sido observada uma maior tolerância das células melanizadas em relação às células não melanizadas, isso ocorreu principalmente devido à redução da tolerância das células não melanizadas ao longo do desenvolvimento. Na maioria das situações, não houve diferença significativa entre a tolerância das células melanizadas e não melanizadas. Em conjunto, os resultados indicam que a proteção contra a radiação UVB conferida pela melanização é menor do que a observada para a radiação UVC.

7-Conclusões

Todas as linhagens de *C. neoformans* e de *C. laurentii* apresentaram curvas de crescimento semelhantes em meio com e sem L-dopa.

Existe uma variabilidade intraespecífica na tolerância à radiação UVB, tanto em *C. neoformans*, como em *C. laurentii*.

A tolerância à radiação UVB varia em função do tempo de crescimento nas duas espécies.

Tanto as células melanizadas como as células não melanizadas de *C. laurentii* são mais tolerantes à radiação UVB do que as células de *C. neoformans*.

A proteção conferida pela melanização contra a radiação UVB é pequena ou inexistente nessas duas espécies de fungos.

É possível estimar a sensibilidade à radiação UVB nessas duas espécies através de ensaios baseados na inibição do crescimento em microplacas.

8-Referências Bibliográficas

AVERBUCH, D.; BOEKHOUTT, T; FALK, R.; ENGELHARD, D.; SHAPIRO, M.; BLOCK, C.; POLACHECK, I. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. **Medical Mycology**, v.40, p.479-484, 2002.

BAUTERS, T. G. M.; SWINNE, D.; BOEKHOUT, T.; NOENS, L.; NELIS, H. J. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. **Mycopathologia**, v.153, p.133-135. 2002.

BENAROUDJ, N.; LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **Journal of Biological Chemistry**, v.27, p.24261-24267, 2001.

BHARTI, A. K.; KHURANA, J. P. Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v.65, p.765-776, 1997

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal Meningitis. **British Medical Bulletin**, v.72, p.99-118, 2005.

BIDOCHKA, M. J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J.; De CROOS, J. N. A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1335-1342, 2001.

BIONDO, C.; MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; BOMBACI, M.; MESSINA, L.; BENINATI, C.; TETI, G. Identification of major proteins secreted by *Cryptococcus neoformans*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v.6, p. 645-651, 2006.

BYSTRICKY, S.; PAULOVICOVA, E.; MACHOVA, E. Synthesis and immunogenicity of polysaccharide-protein conjugate composed of galactoglucoxylomannan of *Cryptococcus laurentii*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v.235, p.311-314, 2004.

BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; VALDEBENITO-SANHUAZA, R. M.; GUIMARÃES, L. S.; DEZANETE, A.; NETO, P. H. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.433-436, 2004.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, p.734-739, 2001a.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effects of UVB on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v.105, p.874-882, 2001b.

BRAGA, G. U. L.; FLINT S. D.; MESSIAS C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, v.73, p.140-146, 2001c.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J., ROBERTS, D. W. Damage and recovery from UVB exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, v.94, p.912-920, 2002.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT. S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p.418-422, 2006.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes a *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.71-83, 1998.

BUTLER, M. J.; GARDINER, R. B.; DAY, A. W. Fungal melanin detection by use of copper sulfide-silver. **Mycologia**, v.97, p.312-319, 2005.

BUTLER, N. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.1115-1136, 1998.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. J.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.354-358, 2000.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUCK, J. D. “Ready made” virulence and “dual use” virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.332-337, 2003.

CHASKES, S.; TYNDALL, R. L. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.7, p.146-152, 1977.

CHELICO, L.; HAUGHIAN, J. L.; WOYTOWICH, A. E.; KHACHATOURIANS, G. G. Quantification of ultraviolet-C irradiation induced cyclobutane pyrimidine dimers and their removal in *Beauveria bassiana* conidiospore DNA. **Mycologia**, v. 97, p.621-7, 2005.

CHENG, M-F.; CHIOU, C. C.; LIU, Y-C., WANG, H-Z.; HSIEH, K-S. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.1608-1611, 2001.

DEL VALLE, L.; PINA-OVIEDO, S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.718-732, 2006.

EISENMAN, H. C.; NOSANCHUK, J. D.; WEBBER, J. B. W.; EMERSON, R. J.; CAMESANO, T. A.; CASADEVALL, A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemistry**, v.44, p.3683-3693, 2005.

FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; Smits, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L. A.; LOMER, C. J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, v.135, p.171-181, 1996.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1351-1371, 1998.

FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. **Mycopathologia**, v.162, p.363-368, 2006.

FOGARTY, R. V.; TOBIN, J. M. Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.19, p.311-317, 1996.

FRASES, S.; SALAZAR, A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.615-621, 2007.

FRASES, S.; SALAZAR, A.; CASADEVALL, A. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a melanin-like pigment in *Cryptococcus neoformans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1542-1550, 2006.

GARCIA-RIVERA, J.; EISENMAN, H. C.; NOSANCHUK, J. D.; AISEN, P.; ZARAGOZA, O.; MOADEL, T.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. **Fungal Genetics and Biology**, v.42, p.989-998, 2005.

GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Medical Mycology**, v.39, p.353-357, 2001.

GONÇALVES, R. C. R.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.1129-1131, 2005.

GOLDMAN, G. H.; MCGUIRE, S. L.; HARRIS, S. D. The DNA damage response in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.35, p.183-195, 2002.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and fungi. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.16, p.91-96, 2003.

GRIFFITHS, H. R.; MISTRY, P.; HERBERT, K. E.; LUNEC, J. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.35, p.189-237, 1998.

GUNASEKERA, T. S.; PAUL, N. D.; AYRES, P. J. Responses of *Phylloplane* yeasts to UV-B (290-320 nm) radiation: inter-specific differences in sensitivity. **Mycological Research**, v.101, p.776-778, 1997.

HAJJEH, R. A.; BRANDT, M.E.; PINNER, R. W. Emergence of Cryptococcal disease: Epidemiologic perspectives 100 years after its discovery. **Epidemiologic Reviews**, v.17, p.303-320, 1995.

HARRISON, T. S. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. **Journal of Infection**, v.41, p.12-17, 2000.

HEITMAN, J.; LIN, X. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **The Annual Review of Microbiology**, v.60, p.69-105, 2006.

HEUNG, L. J.; KAISER, A. E.; LUBERTO, C.; DEL POETA, M. The role and mechanism of diacylglycerol-protein kinase C1 signaling in melanogenesis by *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.31, p.28547-28555, 2005.

HULL, C. M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Genetics**, v.36, p.557-615, 2002.

ICENHOUR, C. R.; KOTTOM, T. J.; LIMPER, A. H. *Pneumocystis* melanins confer enhanced organism viability. **Eukaryotic Cell**, v.5, p.916-923, 2006.

IKEDA, R.; MAEDA, T. Structural studies of the capsular polysaccharide of a non-*neoformans* *Cryptococcus* species identified as *C. laurentii*, which was reclassified as *Cryptococcus flavescens*, from a patient with AIDS. **Carbohydrate Research**, v.339, p.503-509, 2004.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology Immunology**, v.47, p.271-277, 2003.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1214-1218, 2002.

JACOBSON, E. S.; IKEDA, R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. **Medical Mycology**, v.43, p.327-333, 2005.

JACOBSON, E. S.; TINELL, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.7102-7104, 1993.

KAXIRAS, E.; TSOLAKIDIS, A.; ZONIOS, G.; MENG, S. Structural model of eumelanin. **Physical Review Letters**, v.97, p.218102-1-218102-4, 2006.

KROKEN, S.; GLASS, N. L.; TAYLOR, J. W.; YODER, O. C.; TURGEON, B. G. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.15670-15675, 2003.

KWON-CHUNG, K. J.; HILL, W. B.; BENNETT, J. E. New, special stain for histopathological diagnosis of Cryptococcosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, p.383-387, 1981.

KWON-CHUNG, K. J.; SORREL, T.C.; DROMER, F.; FUNG, E.; LEVITZ, S. M. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Medical Mycology**, v.38, p.205-213, 2000.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. p.574-587, 2006.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1992, p. 867.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.38, p.143-158, 2003.

LAZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAMA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medicinal Veterinary Mycological**, v.31, p.449-454, 1993.

LI, B. Q.; TIAN, S. P. Effect of intracellular trehalose in *Cryptococcus laurentii* and exogenous lyoprotectants on its viability and biocontrol efficacy on *Penicillium expansum* in apple fruit. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, p.1-6, 2006.

LIBKIND, D.; PÉREZ, P.; SOMMARUGA, R.; DIÉGUEZ, M. C.; FERRARO, M.; BRIZZIO, S.; ZAGARESE.; BROOCK, M. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. **Photochemistry and Photobiology Science**, v.3, p.281-286, 2004.

MADRONICH, S. In "UV radiation in natural and perturbed atmosphere. In UV-B Radiation and Ozone Depletion" (M. Tevini, Ed.), Lewis, Boca Raton, FL, 1993, p.17-69.

MANFREDI, R. M. D.; FULGARO, C. M. D.; SABBATANI, S. M. D.; LEGNANI, G. M. D.; FASULO, G. M. D. Emergence of Amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. **AIDS Patient Care and STDs**, v.20, p.227-232, 2006.

MAXSON, M. E.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O. Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Eukariotic Cell**, v.6, p.95-109, 2007.

MEREDITH, P.; SARNA, T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment Cell Research**, v.19, p.572-594, 2006.

MILLER, C. D.; RANGEL, D.; BRAGA, G. U.; FLINT, S.; KWON, S. I.; MESSIAS, C. L.; ROBERTS, D.W.; ANDERSON, A. J. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. **Canadian Journal Microbiology**, v.50, p.41-9, 2004.

MISSALL, T. A.; MORAN, J. M.; CORBETT, J. A.; LODGE, J. K. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. **Eukaryotic Cell**, v.4, p.202-208, 2005.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS- 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p.515-548, 1995.

MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, p.15675-15680, 2002.

NAKAMURA, K.; GO, N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins- Review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.1-17, 2005.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.548-572, 2000.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. **Infection and Immunity**, v.65, p.1836-1841, 1997.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v.149, p.1945-1951, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v.5, p.203-223, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.3519-3528, 2006.

NOSANCHUK, J. D.; RUDOLPH, J.; ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implication for pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.67, p.5477-5479, 1999.

PALIWAL, D. K.; RANDHAKA, H. S. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.7, p.346-348, 1978.

PANEPINTO, J. C.; WILLIAMSON, P. R. Intersection of fungal fitness and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v.6, p.489-498, 2006.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, p.299-305, 2003.

PARNELL, M.; BURT, P. J. A.; WILSON, K. The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing Black Sigatoga disease of banana and plantain. **International Journal of Biometeorology**, v.42. p.22-27, 1998.

PAUL, N. D.; RASANAYAGAM, S.; MOODY, S. A.; HATCHER, P. E.; AYRES, P. G. The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems. **Plant Ecology**, v.128, p.296-308, 1997.

PEDROSO, R. S. ***Cryptococcus* spp de fontes ambientais em Ribeirão Preto: ocorrência, fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos**. 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, área de concentração: Análises Clínicas. Ribeirão Preto.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus spp.* from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiological Research**, *in press*, 2007.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v.53, p.429-443, 2006.

POLACHECK, I.; PLATT, Y.; ARONOVITCH, J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.58, p.2919-2922, 1990.

PUKKILA-WORLEY, R.; GERRALD, Q. D.; KRAUS, P. R.; BOILY, M-J.; DAVIS, M. J.; GILES, S. S.; COX, G. M.; HEITMAN, J.; ALSPAUGH, J. A. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukariotic Cell**, v.4, p.190-201, 2005.

QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, v.358, p.576-578, 1992.

RANDHAWA, H. S.; MUSSA, A. Y.; KHAN, Z. U. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. **Mycopathologia**, v.151, p.63-69, 2001.

RANGEL, D. E. N.; BUTLER, M. J.; TORABINEJAD, J.; ANDERSON, A. J.; BRAGA, G. U. L.; DAY, A. W.; ROBERTS, D. W. Mutants and isolates of *Metharhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.93, p.170-182, 2006.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v.68, p.3696-3703, 2000.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v.153, p.265-272, 1997.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. **Mycopathologia**, v.151, p.53-56, 2001.

ROTEM, J.; WOODING, B.; AYLOR, D. E. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. **Phytopathology**, v.75, p.510-514, 1985.

SIMON, G.; SIMON, G.; ERDÖS, M.; MARÓDI, L. Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a nine-year-old boy with X-linked hyper-immunoglobulin M syndrome. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.24, p.935-937, 2005.

SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, p.31-36, 2005.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Review Iberoamerican Micology**, v.14, p.42-43, 1997.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v.5, p.667-675, 2003.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASEDEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.15245-15250, 2001.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NAKASE, T.; SHINODA, T. Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribe spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *C. laurentii* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1468-1471, 2000.

TIAN, S.; RIVERA, J. G.; YAN, B.; CASADEVALL, A.; STARK, R. E. Unlocking the molecular structure of fungal melanin using ^{13}C biosyntenthetic labeling and solid-state NMR. **Biochemistry**, v.42, p.8105-8109, 2003.

TRAUTINGER, F.; KINDAS-MÜGGE, I.; KNOBLER, R. M.; HÖNIGSMANN, H. Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.35, p.141-148, 1996.

TYRRELL, R. M. Biological dosimetry and action spectra. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.31, p.35-41, 1995.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.46, p.3394-3400, 2002.

VALDERRAMA, B.; OLIVER, P.; MEDRANO-SOTO, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.289-299, 2003.

WAKAMATSU, K.; ITO, S. Advanced chemical methods in melanin determination. **Pigment Cell Research**, v.15, p.174-183, 2002.

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v.57, p.1381-1396, 2005.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and Immunity**, v.63, p.3131-3136, 1995.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. Melanin, melanin “ghosts” and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.64, p.2420-2424, 1996.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.3864-3866, 1994.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, p.541-545, 1996.

WANG, Y.; CASEDEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infection and Immunity**, v.40, p.3004-3007, 1994.

WATERMAN, S. R.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SHIN, S.; WILLIAMSON, P. R. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. **Infection and Immunity**, v.75, p.714-722, 2007.

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.656-664, 1994.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Bioscience**, v.2, p.99-107, 1997.

WILLIAMSON, P. R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1570-1572, 1998.

WILLOCQUET, L.; COLOMBET, D.; ROUGIER, M.; FARGUES, J.; CLERJEAU, M. Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.441-449, 1996.

ZHANG, S.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SOOWAN, S.; ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. The Hsp70 member, Ssa1, acts as a DNA-binding transcriptional co-activator of laccase in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v.62, p.1090-1101, 2006.

ZHENG, X.; ZHANG, H.; XI, Y. Effect of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner on biocontrol of postharvest decay of arbutus berries. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.55-60, 2004.

ZHU, X.; GIBBONS, J.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A.; WILLIAMSON, P. R. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infection and Immunity**, v.69, p.5589-5596, 2001.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v.5, p.1-10, 2004.

9-APÊNDICES

Apêndice 1. Comparação entre as médias da sobrevivência relativa das células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e *C. laurentii*. As células foram crescidas em meio líquido por 2 dias e expostas à radiação UVB por 30 min.

Isolado	Diferença média estimada	P
CRN 6	0,000	1,000
CRN 9	-7,000	0,433
CRN 10	5,000	0,575
CRN 21	-4,667	0,601
CRN 20	-18,000	0,045*
ATCC 90112	2,000	0,823
ATCC 28957	-5,000	0,575
968	-8,000	0,371

* Significativo ao nível de 5%

Apêndice 2. Comparação entre as médias da sobrevivência relativa das células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e *C. laurentii*. As células foram crescidas em meio líquido por 2 dias e expostas à radiação UVB por 60 min.

Isolado	Diferença média estimada	P
CRN 6	-0,667	0,946
CRN 9	6,000	0,607
CRN 10	-13,000	0,147
CRN 21	7,667	0,391
CRN 20	-14,333	0,110
ATCC 90112	-39,667	<0,0001
ATCC 28957	18,670	0,0158
968	-1,667	0,852

Apêndice 3. Comparação entre as médias da sobrevivência relativa das células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* e *C. laurentii*. As células foram crescidas em meio líquido por 4 dias e expostas à radiação UVB por 30 min.

Isolado	Diferença média estimada	P
CRN 6	-14,000	0,118
CRN 9	0,333	0,970
CRN 10	-3,000	0,737
CRN 21	3,333	0,709
CRN 20	-10,333	0,248
ATCC 90112	0,000	1,000
ATCC 28957	-7,000	0,433
968	-5,333	0,550

Apêndice 4. Comparação entre as médias da sobrevivência relativa das células melanizadas e não melanizadas de *C. neformans* e *C. laurentii*. As células foram crescidas em meio líquido por 4 dias e expostas à radiação UVB por 60 min.

Isolado	Diferença média estimada	P
CRN 6	-0,667	0,946
CRN 9	20,00	0,1011
CRN 10	-0,667	0,940
CRN 21	-6,333	0,478
CRN 20	1,000	0,911
ATCC 90112	9,000	0,0021
ATCC 28957	4,670	0,504
968	-3,333	0,709

Apêndice 5. Comparações entre as médias da sobrevivência relativa das linhagens em cada situação (células melanizadas e não melanizadas, 2 e 4 dias de crescimento e 30 e 60 min de exposição à radiação UVB).

Comparações	Diferença média estimada	P
(CRN 6-CRN 9) 30min melanizada 2 dias	-11,333	0,205
(CRN 6-CRN 9) 60min melanizada 2 dias	-4,333	0,627
(CRN 6-CRN 9) 30min não melanizada 2 dias	-4,333	0,627
(CRN 6-CRN 9) 60min não melanizada 2 dias	11,000	0,219
(CRN 6-CRN 9) 30min melanizada 4 dias	14,333	0,110
(CRN 6-CRN 9) 60min melanizada 4 dias	8,333	0,351
(CRN 6-CRN 9) 30min não melanizada 4 dias	0,000	1,000
(CRN 6-CRN 9) 60min não melanizada 4 dias	0,000	1,000
(CRN 6-CRN 10) 30min melanizada 2 dias	2,000	0,823
(CRN 6-CRN 10) 60min melanizada 2 dias	-15,000	0,094
(CRN 6-CRN 10) 30min não melanizada 2 dias	7,000	0,433
(CRN 6-CRN 10) 60min não melanizada 2 dias	-36,000	<0,0001*
(CRN 6-CRN 10) 30min melanizada 4 dias	-8,667	0,332
(CRN 6-CRN 10) 60min melanizada 4 dias	-15,000	0,094
(CRN 6-CRN 10) 30min não melanizada 4 dias	2,333	0,794
(CRN 6-CRN 10) 60min não melanizada 4 dias	6,000	0,502
(CRN 6-CRN 21) 30min melanizada 2 dias	0,000	1,000
(CRN 6-CRN 21) 60min melanizada 2 dias	-17,667	0,049*
(CRN 6-CRN 21) 30min não melanizada 2 dias	-4,667	0,601
(CRN 6-CRN 21) 60min não melanizada 2 dias	-18,000	0,045*
(CRN 6-CRN 21) 30min melanizada 4 dias	-20,667	0,022*
(CRN 6-CRN 21) 60min melanizada 4 dias	-20,333	0,024*
(CRN 6-CRN 21) 30min não melanizada 4 dias	-3,333	0,709
(CRN 6-CRN 21) 60min não melanizada 4 dias	-5,000	0,575
(CRN 6-CRN 20) 30min melanizada 2 dias	31,333	0,001*
(CRN 6-CRN 20) 60min melanizada 2 dias	51,333	<0,0001*
(CRN 6-CRN 20) 30min não melanizada 2 dias	13,333	0,137

Continua

(CRN 6-CRN 20) 60min não melanizada 2 dias	29,000	0,001*
(CRN 6-CRN 20) 30min melanizada 4 dias	24,000	0,008*
(CRN 6-CRN 20) 60min melanizada 4 dias	47,667	<0,0001*
(CRN 6-CRN 20) 30min não melanizada 4 dias	27,667	0,002
(CRN 6-CRN 20) 60min não melanizada 4 dias	70,333	<0,0001*
(CRN 6-ATCC 90112) 30min melanizada 2 dias	14,000	0,118
(CRN 6-ATCC 90112) 60min melanizada 2 dias	54,000	<0,0001*
(CRN 6-ATCC 90112) 30min não melanizada 2 dias	16,000	0,075
(CRN 6-ATCC 90112) 60min não melanizada 2 dias	35,667	0,0001*
(CRN 6-ATCC 90112) 30min melanizada 4 dias	17,000	0,058
(CRN 6-ATCC 90112) 60min melanizada 4 dias	45,667	<0,0001*
(CRN 6-ATCC 90112) 30min não melanizada 4 dias	31,000	0,001*
(CRN 6-ATCC 90112) 60min não melanizada 4 dias	71,333	<0,0001*
(CRN 6-ATCC 28957) 30min melanizada 2 dias	12,333	0,168
(CRN 6-ATCC 28957) 60min melanizada 2 dias	24,667	0,006*
(CRN 6-ATCC 28957) 30min não melanizada 2 dias	7,333	0,412
(CRN 6-ATCC 28957) 60min não melanizada 2 dias	18,667	0,038*
(CRN 6-ATCC 28957) 30min melanizada 4 dias	-1,000	0,911
(CRN 6-ATCC 28957) 60min melanizada 4 dias	17,000	0,058
(CRN 6-ATCC 28957) 30min não melanizada 4 dias	6,000	0,502
(CRN 6-ATCC 28957) 60min não melanizada 4 dias	26,667	0,003*
(CRN 6-968) 30min melanizada 2 dias	40,000	<0,0001*
(CRN 6-968) 60min melanizada 2 dias	60,000	<0,0001*
(CRN 6-968) 30min não melanizada 2 dias	32,000	0,001*
(CRN 6-968) 60min não melanizada 2 dias	50,333	<0,0001*
(CRN 6-968) 30min melanizada 4 dias	31,000	0,001*
(CRN 6-968) 60min melanizada 4 dias	46,333	<0,0001*
(CRN 6-968) 30min não melanizada 4 dias	39,667	<0,0001*
(CRN 6-968) 60min não melanizada 4 dias	64,667	<0,0001*
(CRN 9-CRN 10) 30min melanizada 2 dias	-9,333	0,296
(CRN 9-CRN 10) 60min melanizada 2 dias	-19,333	0,032*
(CRN 9-CRN 10) 30min não melanizada 2 dias	2,667	0,765
(CRN 9-CRN 10) 60min não melanizada 2 dias	-25,000	0,006*
(CRN 9-CRN 10) 30min melanizada 4 dias	5,667	0,526
(CRN 9-CRN 10) 60min melanizada 4 dias	-6,667	0,455
(CRN 9-CRN 10) 30min não melanizada 4 dias	2,333	0,794
(CRN 9-CRN 10) 60min não melanizada 4 dias	6,000	0,502
(CRN 9-CRN 21) 30min melanizada 2 dias	2,667	0,765
(CRN 9-CRN 21) 60min melanizada 2 dias	-11,333	0,205
(CRN 9-CRN 21) 30min não melanizada 2 dias	-22,000	0,015
(CRN 9-CRN 21) 60min não melanizada 2 dias	-9,000	0,314
(CRN 9-CRN 21) 30min melanizada 4 dias	-7,000	0,433
(CRN 9-CRN 21) 60min melanizada 4 dias	-6,333	0,478
(CRN 9-CRN 21) 30min não melanizada 4 dias	-12,000	0,180
(CRN 9-CRN 21) 60min não melanizada 4 dias	-3,333	0,709
(CRN 9-CRN 20) 30min melanizada 2 dias	-5,000	0,575
(CRN 9-CRN 20) 60min melanizada 2 dias	47,000	<0,0001*
(CRN 9-CRN 20) 30min não melanizada 2 dias	9,000	0,314
(CRN 9-CRN 20) 60min não melanizada 2 dias	40,000	<0,0001*

Continua

(CRN 9-CRN 20) 30min melanizada 4 dias	38,333	<0,0001*
(CRN 9-CRN 20) 60min melanizada 4 dias	56,000	<0,0001*
(CRN 9-CRN 20) 30min não melanizada 4 dias	27,667	0,002*
(CRN 9-CRN 20) 60min não melanizada 4 dias.	70,333	<0,0001*
(CRN 9-ATCC 90112) 30min melanizada 2 dias	2,667	0,765
(CRN 9-ATCC 90112) 60min melanizada 2 dias	49,667	<0,0001*
(CRN 9-ATCC 90112) 30min não melanizada 2 dias	11,667	0,192
(CRN 9-ATCC 90112) 60min não melanizada 2 dias	46,667	<0,0001*
(CRN 9-ATCC 90112) 30min melanizada 4 dias	31,333	0,001*
(CRN 9-ATCC 90112) 60min melanizada 4 dias	54,000	<0,0001*
(CRN 9-ATCC 90112) 30min não melanizada 4 dias	31,000	0,001*
(CRN 9-ATCC 90112) 60min não melanizada 4 dias	71,333	<0,0001*
(CRN 9-ATCC 28957) 30min melanizada 2 dias	1,000	0,911
(CRN 9-ATCC 28957) 60min melanizada 2 dias	20,333	0,024*
(CRN 9-ATCC 28957) 30min não melanizada 2 dias	3,000	0,737
(CRN 9-ATCC 28957) 60min não melanizada 2 dias	29,667	0,001*
(CRN 9-ATCC 28957) 30min melanizada 4 dias	13,333	0,137
(CRN 9-ATCC 28957) 60min melanizada 4 dias	25,333	0,005*
(CRN 9-ATCC 28957) 30min não melanizada 4 dias	6,000	0,502
(CRN 9-ATCC 28957) 60min não melanizada 4 dias	26,667	0,003*
(CRN 9-968) 30min melanizada 2 dias	28,667	0,002*
(CRN 9-968) 60min melanizada 2 dias	55,667	<0,0001*
(CRN 9-968) 30min não melanizada 2 dias	27,667	0,002*
(CRN 9-968) 60min não melanizada 2 dias	61,333	<0,0001*
(CRN 9-968) 30min melanizada 4dias	45,333	<0,0001*
(CRN 9-968) 60min melanizada 4 dias	54,667	<0,0001*
(CRN 9-968) 30min não melanizada 4 dias	39,667	<0,0001*
(CRN 9-968) 60min não melanizada 4 dias	64,667	<0,0001*
(CRN 10-CRN 21) 30min melanizada 2 dias	-2,000	0,823
(CRN 10-CRN 21) 60min melanizada 2 dias	-2,667	0,765
(CRN 10-CRN 21) 30min não melanizada 2 dias	-11,667	0,192
(CRN 10-CRN 21) 60min não melanizada 2 dias	18,000	0,045*
(CRN 10-CRN 21) 30min melanizada 4 dias	-12,000	0,180
(CRN 10-CRN 21) 60min melanizada 4 dias	-5,333	0,550
(CRN 10-CRN 21) 30min não melanizada 4 dias	-5,667	0,526
(CRN 10-CRN 21) 30min não melanizada 4 dias	-11,000	0,219
(CRN 10-CRN 20) 30min melanizada 2 dias	29,333	0,001*
(CRN 10-CRN 20) 60min melanizada 2 dias	66,333	<0,001*
(CRN 10-CRN 20) 30min não melanizada 2 dias	6,333	0,478
(CRN 10-CRN 20) 60min não melanizada 2 dias	65,000	<0,0001*
(CRN 10-CRN 20) 30min melanizada 4 dias	32,667	0,0001*
(CRN 10-CRN 20) 60min melanizada 4 dias	62,667	<0,0001*
(CRN 10-CRN 20) 30min não melanizada 4 dias	25,333	0,005*
(CRN 10-CRN 20) 60min não melanizada 4 dias.	64,333	<0,0001*
(CRN 10-ATCC 90112) 30min melanizada 2 dias	12,000	0,180
(CRN 10-ATCC 90112) 60min melanizada 2 dias	69,000	<0,0001*
(CRN 10-ATCC 90112) 30min não melanizada 2 dias	9,000	0,314
(CRN 10-ATCC 90112) 60min não melanizada 2 dias	71,667	<0,0001*
(CRN 10-ATCC 90112) 30min melanizada 4 dias	25,667	0,005*

Continua

(CRN 10-ATCC 90112) 60min melanizada 4 dias	60,667	<0,0001*
(CRN 10-ATCC 90112) 30min não melanizada 4 dias	28,667	0,002*
(CRN 10-ATCC 90112) 60min não melanizada 4 dias	65,333	<0,0001*
(CRN 10-ATCC 28957) 30min melanizada 2 dias	10,333	0,248
(CRN 10-ATCC 28957) 60min melanizada 2 dias	39,667	<0,0001*
(CRN 10-ATCC 28957) 30min não melanizada 2 dias	0,333	0,970
(CRN 10-ATCC 28957) 60min não melanizada 2 dias	54,667	<0,0001*
(CRN 10-ATCC 28957) 30min melanizada 4 dias	7,667	0,391
(CRN 10-ATCC 28957) 60min melanizada 4 dias	32,000	0,001*
(CRN 10-ATCC 28957) 30min não melanizada 4 dias	3,667	0,681
(CRN 10-ATCC 28957) 60min não melanizada 4 dias	20,667	0,022*
(CRN 10-968) 30 min melanizada 2 dias	38,000	<0,0001*
(CRN 10968) 60min melanizada 2 dias	75,000	<0,0001*
(CRN 10-968) 30min não melanizada 2 dias	25,000	0,006*
(CRN 10-968) 60min não melanizada 2 dias	86,333	<0,0001*
(CRN 10-968) 30min melanizada 4dias	39,667	<0,0001*
(CRN 10-968) 60min melanizada 4 dias	61,333	<0,0001*
(CRN 10-968) 30min não melanizada 4 dias	37,333	<0,0001*
(CRN 21-CRN 20) 30min melanizada 2 dias	-31,333	0,001*
(CRN 21-CRN 20) 60min melanizada 2 dias	-69,000	<0,0001*
(CRN 21-CRN 20) 30min não melanizada 2 dias	-18,000	0,045*
(CRN 21-CRN 20) 60min não melanizada 2 dias	-47,000	<0,0001*
(CRN 21-CRN 20) 30min melanizada 4 dias	-44,667	<0,0001*
(CRN 21-CRN 20) 60min melanizada 4 dias	-68,000	<0,0001*
(CRN 21-CRN 20) 30min não melanizada 4 dias	-31,000	0,001*
(CRN 21-CRN 20) 60min não melanizada 4 dias.	-75,333	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 90112) 30min melanizada 2 dias	-14,000	0,118
(CRN 21-ATCC 90112) 60min melanizada 2 dias	-71,667	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 90112) 30min não melanizada 2 dias	-20,667	0,022*
(CRN 21-ATCC 90112) 60min não melanizada 2 dias	-53,667	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 90112) 30min melanizada 4 dias	-37,667	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 90112) 60min melanizada 4 dias	-66,000	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 90112) 30min não melanizada 4 dias	-34,333	0,0001*
(CRN 21-ATCC 90112) 60min não melanizada 4 dias.	-76,333	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 28957) 30min melanizada 2 dias	12,333	0,168
(CRN 21-ATCC 28957) 60min melanizada 2 dias	42,333	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 28957) 30min não melanizada 2 dias	12,000	0,180
(CRN 21-ATCC 28957) 60min não melanizada 2 dias	36,667	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 28957) 30min melanizada 4 dias	19,667	0,029*
(CRN 21-ATCC 28957) 60min melanizada 4 dias	37,333	<0,0001*
(CRN 21-ATCC 28957) 30min não melanizada 4 dias	9,333	0,296
(CRN 21-ATCC 28957) 60min não melanizada 4 dias	31,667	0,001*
(CRN 21-968) 30min melanizada 2 dias	40,000	<0,0001*
(CRN 21-968) 60min melanizada 2 dias	77,667	<0,0001*
(CRN 21-968) 30min não melanizada 2 dias	36,667	<0,0001*
(CRN 21-968) 60min não melanizada 2 dias	68,333	<0,0001*
(CRN 21-968) 30min melanizada 4dias	51,667	<0,0001*
(CRN 21-968) 60min melanizada 4 dias	66,667	<0,0001*
(CRN 21-968) 30min não melanizada 4 dias	43,000	<0,0001*

Continua

Conclusão

(CRN 21-968) 60min não melanizada 4 dias	69,667	<0,0001*
(CRN 20-ATCC 90112) 30min melanizada 2 dias	17,333	0,054
(CRN 20-ATCC 90112) 60min melanizada 2 dias	-2,667	0,765
(CRN 20-ATCC 90112) 30min não melanizada 2 dias	-2,667	0,765
(CRN 20-ATCC 90112) 60min não melanizada 2 dias	-6,667	0,455
(CRN 20-ATCC 90112) 30min melanizada 4 dias	7,000	0,433
(CRN 20-ATCC 90112) 60min melanizada 4 dias	2,000	0,823
(CRN 20-ATCC 90112) 30min não melanizada 4 dias	-3,333	0,709
(CRN 20-ATCC 90112) 60min não melanizada 4 dias	-1,000	0,911
(CRN 20-ATCC 28957) 30min melanizada 2 dias	-19,000	0,035*
(CRN 20-ATCC 28957) 60min não melanizada 2 dias	-6,000	0,502
(CRN 20-ATCC 28957) 60min não melanizada 2 dias	-10,333	0,248
(CRN 20-ATCC 28957) 30min melanizada 4 dias	-25,000	0,006*
(CRN 20-ATCC 28957) 60min melanizada 4 dias	-30,667	0,001*
(CRN 20-ATCC 28957) 30min não melanizada 4 dias	-21,667	0,016*
(CRN 20-ATCC 28957) 60min não melanizada 4 dias	-43,667	<0,0001*
(CRN 20-968) 30min melanizada 2 dias	8,666	0,332
(CRN 20-968) 60min melanizada 2 dias	8,667	0,332
(CRN 20-968) 30min não melanizada 2 dias	18,667	0,038*
(CRN 20-968) 60min não melanizada 2 dias	21,333	0,018*
(CRN 20-968) 30min melanizada 4dias	7,000	0,433
(CRN 20-968) 60min melanizada 4 dias	-1,333	0,881
(CRN 20-968) 30min não melanizada 4 dias	12,000	0,180
(CRN 20-968) 60min não melanizada 4 dias	-5,667	0,526
(ATCC 90112-ATCC 28957) 30min melanizada 2 dias	-1,667	0,852
(ATCC 90112-ATCC 28957) 60min melanizada 2 dias	-29,333	0,001*
(ATCC 90112-ATCC 28957) 30min não melanizada 2 dias	-8,667	0,332
(ATCC 90112-ATCC 28957) 60min não melanizada 2 dias	-17,000	0,058
(ATCC 90112-ATCC 28957) 30min melanizada 4 dias	-18,000	0,045*
(ATCC 90112-ATCC 28957) 60min melanizada 4 dias	-28,667	0,002*
(ATCC 90112-ATCC 28957) 30min não melanizada 4 dias	-25,000	0,006
(ATCC 90112-ATCC 28957) 60min não melanizada 4 dias	-44,667	<0,0001*
(ATCC 90112-968) 30min melanizada 2 dias	26,000	0,004
(ATCC 90112-968) 60min melanizada 2 dias	6,000	0,502
(ATCC 90112-968) 30min não melanizada 2 dias	16,000	0,075
(ATCC 90112-968) 60min não melanizada 2 dias	14,667	0,102
(ATCC 90112-968) 30min melanizada 4 dias	14,000	0,118
(ATCC 90112-968) 60min melanizada 4dias	0,667	0,940
(ATCC 90112-968) 30min não melanizada 4dias	8,667	0,332
(ATCC 90112-968) 60min não melanizada 4 dias	-6,667	0,455
(ATCC 28957-968) 30min melanizada 2 dias	-27,667	0,002*
(ATCC 28957-968) 60min melanizada 2 dias	-35,333	0,0001*
(ATCC 28957-968) 30min não melanizada 2 dias	-24,667	0,006*
(ATCC 28957-968) 60min não melanizada 2 dias	-31,667	0,001*
(ATCC 28957-968) 30min melanizada 4 dias	-32,000	0,001*
(ATCC 28957-968) 60min melanizada 4 dias	-29,333	0,001*
(ATCC 28957-968) 30min não melanizada 4dias	-33,667	0,0001*
(ATCC 28957-968) 60min não melanizada 4 dias	-38,000	<0,0001*

* Significativo ao nível de 5%

Apêndice 6. Comparações das médias da sobrevivência relativa entre células melanizadas com 2 e com 4 dias de crescimento de *C. neoformans* e *C. laurentii*. As células foram expostas à radiação UVB por 30 e 60 min.

Comparações	Diferença média estimada	P
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min CRN 6	13,667	0,127
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min CRN 6	12,333	0,168
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min CRN 9	-12,000	0,180
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min CRN 9	-0,333	0,970
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min CRN 10	3,000	0,736
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min CRN 10	12,333	0,168
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min CRN 21	-7,000	0,433
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min CRN 21	9,667	0,279
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min CRN 20	6,333	0,478
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min CRN 20	8,667	0,332
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min ATCC 90112	16,667	0,063
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min ATCC 90112	4,000	0,654
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min ATCC 28957	0,333	0,970
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min ATCC 28957	4,667	0,601
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min 968	4,667	0,601
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min 968	-1,333	0,881

Apêndice 7. Comparações das médias da sobrevivência relativa entre células não melanizadas com 2 e com 4 dias de crescimento de *C. neoformans* e *C. laurentii*. As células foram expostas à radiação UVB por 30 e 60 min.

Comparações	Diferença média estimada	P
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min CRN6	-0,333	0,970
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min CRN 6	-17,333	0,054
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min CRN 9	-4,667	0,601
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min CRN 9	-6,333	0,478
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min CRN 10	-5,000	0,575
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min CRN 10	24,667	0,006*
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min CRN 21	1,000	0,911
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min CRN 21	-4,333	0,627
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min CRN 20	14,000	0,118
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min CRN 20	24,000	0,008*
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min ATCC 90112	14,667	0,102
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min ATCC 90112	18,333	0,041*
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min ATCC 28957	-1,667	0,852
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min ATCC 28957	-9,333	0,296
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min 968	7,333	0,412
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min 968	-3,000	0,736

* Significativo ao nível de 5%

Apêndice 8. Comparação da sobrevivência relativa entre células melanizadas e não melanizadas das linhagens CRN6 *C. laurentii* ATCC 90112 de *C. neoformans*, crescidas em meio sólido.

Comparações	Diferença média estimada	P
(30min melan-30min não melan) 2dias CRN 6	-2,000	0,8644
(30min melan-30min não melan) 4dias CRN 6	-2,333	0,842
(60min melan-60min não melan) 2dias CRN 6	13,333	0,260
(60min melan-60min não melan) 4dias CRN 6	10,333	0,381
(30min melan-30min não melan) 2dias ATCC 90112	-13,333	0,260
(30min melan-30min não melan) 4dias ATCC 90112	3,667	0,754
(60min melan-60min não melan) 2dias ATCC 90112	1,000	0,932
(60min melan-60min não melan) 4dias ATCC 90112	9,333	0,428

Apêndice 9. Comparações entre as linhagens CRN6 de *C. neoformans* e ATCC 90112 de *C. neoformans* (30 e 60 min, melanizadas e não melanizadas e 2 e 4 dias de crescimento), crescidas em meio sólido.

Comparações	Diferença média estimada	P
(CRN 6-ATCC 90112) 30min melanizada 2dias	23,000	0,057
(CRN 6-ATCC 90112) 60min melanizada 2dias	73,333	<,0001*
(CRN 6-ATCC 90112)30min não melanizada 2dias	11,667	0,323
(CRN 6-ATCC 90112)60min não melanizada 2dias	61,000	<,0001*
(CRN 6-ATCC 90112)30min melanizada 4dias	27,667	0,024*
(CRN 6-ATCC 90112)60min melanizada 4dias	53,000	<,0001*
(CRN 6-ATCC 90112)30min não melanizada 4dias	33,667	0,007*
(CRN 6-ATCC 90112)60min não melanizada 4dias	52,000	0,0001*

* Significativo ao nível de 5%

Apêndice 10. Comparações entre a tolerância das células melanizadas e não melanizadas das linhagens CRN6 de *C. laurentii* e ATCC 90112 de *C. neoformans*, crescidas em meio sólido.

Comparações	Diferença média estimada	P
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30min CRN 6	-8,33	0,4786
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min CRN 6	4,333	0,7117
(melan 2 dias-melan 4 dias) 30minATCC 90112	-3,6667	0,7544
(melan 2 dias-melan 4 dias) 60min ATCC 90112	-16,0000	0,1785
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min CRN 6	-8,6667	0,4613
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min CRN 6	1,3333	0,9094
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 30min CRN 6	13,3333	0,2600
(não melan 2 dias-não melan 4 dias) 60min CRN 6	-7,6667	0,5142

Apêndice 11. Comparação da tolerância das células melanizadas e não melanizadas da linhagem ATCC 90112 de *C. neoformans* entre os tempos de crescimento (2, 4, 6 e 8 dias). As células foram expostas à radiação UVB por 60 minutos.

Comparações	Diferença média estimada	P
(2 dias-4 dias) célula melanizada	-4,3333	0,0921
(2 dias-6 dias) célula melanizada	-7,6667	0,0064
(2 dias-8 dias) célula melanizada	-13,6667	<0,0001
(4 dias-6 dias) célula melanizada	-3,3333	0,1859
(4 dias-8 dias) célula melanizada	-9,3333	0,0016
(6 dias-8 dias) célula melanizada	-6	0,0253
(2 dias-4 dias) célula não melanizada	44,3333	<0,0001
(2 dias-6 dias) célula não melanizada	44,3333	<0,0001
(2 dias-8 dias) célula não melanizada	44,3333	<0,0001
(4 dias-6 dias) célula não melanizada	6,66E-16	0,999
(4 dias-8 dias) célula não melanizada	-2,44E-15	0,999
(6 dias-8 dias) célula não melanizada	-3,11E-15	0,999
(melanizada-não melanizada) 2 dias	-39,6667	<0,0001
(melanizada-não melanizada) 4 dias	9	0,0021
(melanizada-não melanizada) 6 dias	12,3333	0,0001
(melanizada-não melanizada) 8 dias	18,3333	<0,0001

Apêndice 12. Comparação da tolerância das células melanizadas e não melanizadas da linhagem ATCC 2897 de *C. neoformans* entre os tempos de crescimento (2, 4, 6 e 8 dias). As células foram expostas à radiação UVB por 60 min.

Comparações	Diferença média estimada	P
(2 dias-4 dias) célula melanizada	28,67	0,0009
(2 dias-6 dias) célula melanizada	5,00	0,4742
(2 dias-8 dias) célula melanizada	18,67	0,0158
(4 dias-6 dias) célula melanizada	-23,67	0,0037
(4 dias-8 dias) célula melanizada	-10,00	0,1635
(6 dias-8 dias) célula melanizada	13,67	0,0641
(2 dias-4 dias) célula não melanizada	14,67	0,0489
(2 dias-6 dias) célula não melanizada	-11,33	0,1177
(2 dias-8 dias) célula não melanizada	0,67	0,9233
(4 dias-6 dias) célula não melanizada	-26,00	0,0019
(4 dias-8 dias) célula não melanizada	-14,00	0,0586
(6 dias-8 dias) célula não melanizada	12,00	0,0994
(melanizada-não melanizada) 2 dias	18,67	0,0158
(melanizada-não melanizada) 4 dias	4,67	0,5037
(melanizada-não melanizada) 6 dias	2,33	0,7366
(melanizada-não melanizada) 8 dias	0,67	0,9233

Apêndice 13. Comparação da tolerância das células melanizadas e não melanizadas da linhagem CRN 6 de *C. laurentii* entre os tempos de crescimento (2, 4 ,6 e 8 dias). As células foram expostas à radiação UVB por 60 min.

Comparações	Diferença média estimada	P
(2 dias-4 dias) célula melanizada	123.333	0.2194
(2 dias-6 dias) célula melanizada	16.667	0.8645
(2 dias-8 dias) célula melanizada	53.333	0.5870
(4 dias-6 dias) célula melanizada	-106.667	0.2849
(4 dias-8 dias) célula melanizada	-70.000	0.4776
(6 dias-8 dias) célula melanizada	36.667	0.7080
(2 dias-4 dias) célula não melanizada	123.333	0.2194
(2 dias-6 dias) célula não melanizada	96.667	0.3307
(2 dias-8 dias) célula não melanizada	53.333	0.5870
(4 dias-6 dias) célula não melanizada	-26.667	0.7851
(4 dias-8 dias) célula não melanizada	-70.000	0.4776
(6 dias-8 dias) célula não melanizada	-43.333	0.6584
(melanizada-não melanizada) 2 dias	-0.6667	0.9456
(melanizada-não melanizada) 4 dias	-0.6667	0.9456
(melanizada-não melanizada) 6 dias	73.333	0.4573
(melanizada-não melanizada) 8 dias	-0.6667	0.9456

Apêndice 14. Comparação da tolerância das células melanizadas e não melanizadas da linhagem CRN 9 de *C. laurentii* entre os tempos de crescimento (2, 4 ,6 e 8 dias). As células foram expostas à radiação UVB por 60 min.

Comparações	Diferença média estimada	P
(2dias-4 dias) célula melanizada	8,67	0,4596
(2 dias-6 dias) célula melanizada	11,33	0,3369
(2 dias-8 dias) célula melanizada	12,33	0,2974
(4 dias-6 dias) célula melanizada	2,67	0,8184
(4 dias-8 dias) célula melanizada	3,67	0,7524
(6 dias-8 dias) célula melanizada	1,00	0,9313
(2 dias-4 dias) célula não melanizada	22,67	0,0666
(2 dias-6 dias) célula não melanizada	9,33	0,4265
(2 dias-8 dias) célula não melanizada	11,00	0,3508
(4 dias-6 dias) célula não melanizada	-13,33	0,2615
(4 dias-8 dias) célula não melanizada	-11,67	0,3233
(6 dias-8 dias) célula não melanizada	1,67	0,8858
(melanizada-não melanizada) 2 dias	6,00	0,6068
(melanizada-não melanizada) 4 dias	20,00	0,1011
(melanizada-não melanizada) 6 dias	4,00	0,7308
(melanizada-não melanizada) 8 dias	4,67	0,6884

Apêndice 15. Comparação da tolerância das células melanizadas e não melanizadas da linhagem CRN 9 de *C. laurentii* entre os tempos de crescimento (2, 4, 6 e 8 dias). As células foram expostas à radiação UVB por 120 min.

Comparações	Diferença média estimada	P
(2 dias-4 dias) célula melanizada	22,6667	0,0418
(2 dias-6 dias) célula melanizada	28	0,0151
(2 dias-8 dias) célula melanizada	23	0,0393
(4 dias-6 dias) célula melanizada	5,3333	0,6063
(4 dias-8 dias) célula melanizada	0,3333	0,9742
(6 dias-8 dias) célula melanizada	-5	0,6288
(2 dias-4 dias) célula não melanizada	26,6667	0,0196
(2 dias-6 dias) célula não melanizada	29	0,0124
(2 dias-8 dias) célula não melanizada	34,6667	0,0041
(4 dias-6 dias) célula não melanizada	2,3333	0,8209
(4 dias-8 dias) célula não melanizada	8	0,4423
(6 dias-8 dias) célula não melanizada	5,6667	0,5842
(melanizada-não melanizada) 2 dias	9	0,3887
(melanizada-não melanizada) 4 dias	13	0,2196
(melanizada-não melanizada) 6 dias	10	0,3397
(melanizada-não melanizada) 8 dias	20,6667	0,0604