CRISLAINE LAMBIASE CALVETE

O papel das permeases de aminoácidos Aap6 e Aap8 sobre a sobrevivência, a virulência e a filamentação em *Cryptococcus neoformans.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnólogicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2018

CRISLAINE LAMBIASE CALVETE

O papel das permeases de aminoácidos Aap6 e Aap8 sobre a sobrevivência, a virulência e a filamentação em *Cryptococcus neoformans.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Intituto Butantan / IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Oritentadora: Profª Dra. Renata Castiglioni Pascon

Versão original.

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Calvete, Crislaine
O papel das permeases de aminoácidos Aap6 e Aap8 sobre a sobrevivência, a virulência e a filamentação em Cryptococcus neoformans. / Crislaine Calvete; orientador Renata Pascon. -- São Paulo, 2018.
112 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Cryptococcus neoformans. 2. Permeases de aminoácidos. 3. Antifúngicos. 4. Transportador de membrana. I. Pascon, Renata, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): **Crislaine Lambiase Calvete**

Titulo da Dissertação: **O papel das permeases de aminoácidos Aap6 e Aap8 sobre a sobrevivência, a virulência e a filamentação em *Cryptococcus neoformans*.**

Orientadora: **Profª Dra. Renata Castiglioni Pascon**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 18 de agosto de 2018
CEP N 7053080618

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Crislaine Lambiase Calvete
Depto/Disc: Laboratório De Interações Microbianas
Renata Castiglioni Pascon (orientador)

Título do projeto: "O papel das permeases de aminoácidos Aap6 e Aap8 sobre a sobrevivência, a virulência e a filamentação em Cryptococcus neoformans.".

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

As infecções causadas por fungos, principalmente os gêneros Candida, Aspergilus e Cryptococcus, estão em constante crescimento na população imunocomprometida devido à incidência da AIDS, aumento de pacientes submetidos à quimioterapia tumoral e transplantados. A espécie Cryptococcus neoformans é um patógeno oportunista humano que causa meningite fúngica. Estima-se que existam mais de um milhão de casos de criptococose em pacientes com AIDS no mundo e que esta doença é responsável por mais de 600.000 óbitos/ano, o que é justificado pelas falhas terapêuticas devido ao surgimento de resistência, inconstância no tratamento, etc. O aumento na incidência da doença estimulou as pesquisas sobre a criptococose e seu agente causal, proporcionando o desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular para análise de genes relacionados a patogênese e à virulência. Na comparação das sequencias genômicas de 24 permeases de aminoácidos de S. cerevisiae com C. neoformans, foi obtido dez proteínas com similaridade (Aap1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, Mup 1 e 3). Destes genes, dois não são expressos sob as condições experimentais usadas (Aap3 e Aap7) e todas as outras codificam permeases globais de aminoácidos. Os genes que codificam as permeases aap6, aap8 e dupla deleção de aap1 e aap2 ainda não foram estudados em relação aos fatores de virulência do fungo nas suas ausências (deleção gênica). Portanto, este trabalho pretende explorar as relações existente entre estas permeases com a captação de aminoácidos, a virulência e testar com as drogas já existentes no mercado (fluconazol e anfotericina B). Por se instalarem na membrana celular, as permeases se tornam interessantes alvos de drogas antifúngicas uma vez que inibidores não precisariam adentrar a célula para exercer seu papel inibitório. Espera-se que o desenvolvimento deste projeto contribua de forma significativa para a identificação de novos tratamentos

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 11/06/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais, Antônio Calvete (*in memoriam*) e Lucina Calvete, com amor e gratidão por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes e decisivos, acreditando em mim e no meu potencial.

Agradeço, com muito apreço e amor, ao meu marido Guilherme Alonso, por sempre me encorajar, dar carinho, apoiar e dar suporte para a realização deste projeto. Também agradeço a minha filha, Thayla Alonso, que por mais que não compreenda a magnitude deste trabalho, sua presença desperta, incentiva e impulsiona meu crescimento profissional e pessoal todos os dias.

Um agradecimento especial, e totalmente merecido, a minha orientadora Dra. Renata Castiglioni Pascon que sempre esteve presente me auxiliando, apoiando e direcionando, não somente no desenvolvimento desta pesquisa mas também em diversas situações pessoais. Quaisquer elogios designado a este trabalho é consequência e mérito de sua orientação e dedicação. Estendo o agradecimento também para o professor Dr. Marcelo Vallim, que sempre agiu como um co-orientador, por mais que oficialmente este não fosse o seu papel.

Aos meus colegas e amigos do laboratório Stefania Pegorin, Sônia Uêda, Gabrielle Felizardo, Aline Araújo, Thais Paganini, Kevin Martho, João Daniel Fernandes, João Miguel Nunes, Alexandre Paes, Rafael Tomita, Fabiano Gontijo, Camila de Oliveira Ferreira e, em especial, a amiga Amanda Teixeira de Mello que diversas vezes me amparou, aconselhou e instruiu nesta caminhada, com muito afeto e amizade.

Agradeço à Universidade de São Paulo (USP), à Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade de desenvolver este trabalho, assim como ao financiamento que foi fornecido através de bolsa de mestrado (processo nº 131266/2015-2).

RESUMO

Calvete, C L. O papel das permeases de aminoácidos Aap6 e Aap8 sobre a sobrevivência, a virulência e a filamentação em *Cryptococcus neoformans*., 2018. 112 f. Dissertação (Mestado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Criptococose, causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans,* é uma doença sistêmica, potencialmente fatal em pacientes com o sistema imune debilitado e a progressão da mesma pode causar Meningite criptocócica. Estima-se que ela acarrete globalmente 15% dos óbitos relacionadas à AIDS, devido a falhas terapêuticas, surgimento de resistência, inconstância no tratamento e restrição nas opções de antifúngicos. As vias de biossíntese e/ou de assimilação de alguns aminoácidos representam uma portunidade de validação de alvos moleculares para prospecção de novos antifúngicos. Estudos prévios identificaram 10 permeases de aminoácidos (AAP1 a AAP8, MUP1 e MUP3) em *C. neoformans*. AAP4 e AAP5 foram consideradas principais e redundantes, e uma dupla deleção (***aap4Δ/aap5Δ***) causou sensibilidade térmica e ao estresse oxidativo e avirulento em modelo animal. Permeases Aap1 e Aap2 possuem 80,9% de identidade na sequencia de aminoácidos, não são essenciais individualmente, porém podem ser redundantes. As permeases Aap6 e Aap8 não foram estudadas, portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das deleções simples das pemeases *AAP6* e *AAP8* e da dupla deleção *AAP1/AAP2* sobre a captação de aminoácidos, fatores de virulência, sobrevivência em diversas condições nutricionais, infecção em modelo animal, suceptibilidade a fármacos, e a capacidade de acasalamento. A dupla deleção das permeases *AAP1/AAP2* repercutiu na capacidade de crescimento de alguns L-aminoácidos principalmente a 37 ºC, alterou o tamanho da cápsula polissacarídica, causou hipovirulência em modelo animal de invertebrados e foi mais susceptível à AmB do que o tipo selvagem. As permeases AAP6, AAP8 e AAP1/AAP2 podem ser consideradas permeases globais de aminoácidos.

Palavras-chave:. *Cryptococcus neoformans*. Permeases de aminoácidos. Antifúngicos.

ABSTRACT

Calvete**,** C L. The role of Aap6 and Aap8 amino acid permeases on survival, virulente and filamentation in *Cryptococcus neoformans*, 2018. 112 f. Dissertation (Masters thesis in Biotecnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Cryptococcosis, caused by *Cryptococcus neoformans* yeast, is a systemic and potentially fatal disease for weakened immune system patients. The progression of the disease involves the invasion of the central nervous system causing Meningoencephalitis. It is estimated that this disease causes, globally, 15% of AIDS-related deaths, what is justified by therapeutic failures caused by pathogen resistance to drugs, inconstancy in the treatment and few antifungal options. The study of biosynthesis and/or assimilation of some amino acids represents a good opportunity for the validation of molecular targets to prospect new selective toxicity antifungals. *C. neoformans* has ten 10 amino acids permeases of APC family (Aap1 to Aap8, Mup1 and Mup3) and six of these permeases were studied already. Aap4 and Aap5 were considered major and redundant, and the *aap4Δ/aap5Δ* mutant was responsable for thermal sensitivity and oxidative stress and hypovirulent in animal model. The Aap1 and Aap2 amino acid permeases are not essential individually but they have 80.9% identity of amino acid sequence, suggesting they could be redundant. The Aap6 and Aap8 have not been studied so far. We investigated four amino acids permeases of *C. neoformans* to identify their substrate specificity, role in the growth, filamentation and virulence. Our data point out that the mutant *aap1Δ/aap2Δ* has reduced growth (37° C) in some L-amino acids, capsule reduced size, hypovirulence in animal model of invertebrates and it was more sentive to AmB than wild type. The data corroborate the Aap4 and Aap5 permeases are dominant in the process of amino acids uptake, and the Aap6, Aap8 and Aap1/Aap2 were considered global amino acid permeases.

Keyword: *Cryptococcus neoformans*. Amino acid permease. Antifungal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. NÚMERO ABSOLUTO DE TRANSPLANTES 17
FIGURA 2. CICLO INFECCIOSO DE *C. NEOFORMANS*.....20
FIGURA 3. CICLO DE VIDA BISSEXUAL DE *C. NEOFORMANS*.....24
FIGURA 4. CICLO DE VIDA UNISSEXUAL DE *C. NEOFORMANS*.. 24
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA 10 PERMEASES DE AMINOÁCIDOS.....28
FIGURA 6. TRANSPORTE PASSIVO E ATIVO DE SOLUTOS ATRAVÉS DA MEMBRANA 29
FIGURA 7. PROTEÍNAS ATUANDO COMO UNIPORTE, SIMPORTE E ANTIPORTE 30
FIGURA 8. ESTRUTURA DO COMPOSTO EUGENOL 32
FIGURA 9. PCR DIAGNÓSTICO PARA CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO DOS GENES *AAP6* E *AAP8* ..58
FIGURA 10. PCR PARA CONFIRMAÇÃO DA DUPLA DELEÇÃO DAS PERMEASES 1 E 2. 59
FIGURA 11. ESTRATÉGIA DE SOUTHERN BLOT PARA MUTAÇÕES *AAP1::HYG*^{R}/*AAP2::NEO*^{R}.....60
FIGURA 12. SOUTHERN BLOT. 60
FIGURA 15. CRESCIMENTO DA LINHAGEM SELVAGEM 63
FIGURA 16. INFECÇÃO EM MODELO ANIMAL DE INVERTEBRADOS *GALLERIA MELLONELLA*. 67
FIGURA 17. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CÁPSULA. 72
FIGURA 18. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA 73
FIGURA 19. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE B 74
FIGURA 20. TESTE PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UREASE.....75
FIGURA 21. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS 76
FIGURA 22. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO SOB ESTRESSE OXIDATIVO 78
FIGURA 23. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DELEÇÃO NOS PH'S 6, 7 E 8 79
FIGURA 24 . AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DELEÇÃO SOB ESTRESSE OSMÓTICO E SALINO.....80
FIGURA 25. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DELEÇÃO SOB ESTRESSE DE PAREDE. 82
FIGURA 26. ACASALAMENTO ENTRE CÉLULAS MATA E MATALPHA. 84
FIGURA 27. GRAMPOS DE CONEXÃO FUSIONADOS. 85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. HOMÓLOGOS DE PERMEASES DE *C. NEOFORMANS* _____ 61
TABELA 2. ASSIMILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS INDIVIDUAIS A 30 °C. _____ 65
TABELA 3. ASSIMILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS A 37° C _____ 66
TABELA 4. CONCETRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FLUCONAZOL. _____ 69
TABELA 5. RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE AO ANTIFÚNGICO ANFORECININA B____ 70
TABELA 6. RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE AO COMPOSTO EUGENOL _____ 70
TABELA 7. RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE AO COMPOSTO EUGENOL (YNB). _____ 71

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	-	Porcentagem
°C	-	Graus Celsius
µL	-	Microlitro
APC	-	Aminoácido-Poliamina-Colina
AAP	-	Permease de aminoácido (gene)
aapΔ	-	Permease de aminoácido (mutante – ausência do gene)
Aap	-	Permease de aminoácido (proteína)
$CaCl_2$	-	Cloreto de Cálcio
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G418	-	Gentamicina
GXM	-	Glucoronoxilomanana
GXMGal	-	Galactoxilomanana
h	-	Hora
H_2O_2	-	Peróxido de hidrogênio
HCl	-	Ácido Clorídrico
HIV	-	*Human Immunodeficiency Virus*
Hyg^R	-	Resistencia a higromicina
IFI	-	Infeção fúngica invasiva
KCl	-	Cloreto de potássio
L	-	Litro
M	-	Molar
mL	-	mililitro
mM	-	miliMolar
NaCl	-	Cloreto de Sódio
$NaNO_2$	-	Nitrito de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
NCR	-	Repressão Catabólica
Neo^R	-	*Resitência a gentamicina*
nM	-	nanoMolar
PLB	-	Fosfolipase B
q.s.p.	-	Quantidade suficiente para
r.p.m.	-	Rotação por minuto
s/	-	sem
SD	-	Synthetic dextrose
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
SIDA	-	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SSC	-	*Saline Sodium Citrate*
U	-	Unidade
YNB	-	Yeast Nitrogen Base
YPD	-	Yeast Extract Peptone
µm	-	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**
1.1 Classificação, ciclo infeccioso e aspectos gerais do patógeno **18**
1.2 *C. neoformans* e seu ciclo de vida **23**
1.3 *Modelo biológico de estudo* **25**
1.4 Transporte através da membrana e as permeases de aminoácidos **29**
1.5 Regulação e captação de aminoácidos por permeases APC em *C. neoformans* **31**
2 OBJETIVOS **34**
2.1 Objetivos específicos **34**
3 MATERIAIS E MÉTODOS **35**
3.1 *Materiais* **35**
3.1.1 Condições gerais de esterilização, solidificação dos meios de cultivo e crescimento dos microrganismos. *35*
3.1.2 ***Linhagens de microrganismos*** *35*
3.1.3 ***Oligonucleotídeos*** *35*
3.1.4 ***Meios e soluções*** *36*
3.1.4.1 YPD *36*
3.1.4.2 YPD suplementado com NaCl *36*
3.1.4.3 YPD suplementado com KCl *36*
3.1.4.4 YPD suplementado com H_2O_2 ..... *37*
3.1.4.5 YPD suplementado com $NaNO_2$ *37*
3.1.4.6 YPD suplementado com Congo Red 0,5 % *37*
3.1.4.7 YPD suplementado com SDS 0,03% *37*
3.1.4.8 YNB 10X *37*
3.1.4.9 YNB s/ sulfato de amônia e s/ aminoácido 10X *37*
3.1.4.10 YNB c/ sulfato de amônia e s/ aminoácido 10X *38*
3.1.4.11 YNB c/ sulfato c/ aminoácidos (YNB+N+AA) *38*
3.1.4.12 YNB s/ sulfato c/ aminoácidos (YNB-N+AA) *38*
3.1.4.13 YNB s/ sulfato s/ aminoácidos (YNB-N-AA) *38*
3.1.4.14 YNB c/ sulfato s/ aminoácidos (YNB+N-AA) *39*

3.1.4.15 YNB com acréscimo de NaCl *39*
3.1.4.16 YNB com adição de KCl *39*
3.1.4.17 YNB com adição de H_2O_2 ..... *39*
3.1.4.18 YNB com adição de $NaNO_2$ *40*
3.1.4.19 Ágar para filamentação *40*
3.1.4.20 Ágar gema *40*
3.1.4.21 Agar Níger Seed *40*
3.1.4.22 Christensen's urea Agar *41*
3.1.4.23 Solução de Dextrose 20 % *41*
3.1.4.24 Solução de HCl 1 M *42*
3.1.4.25 Solução de aminoácidos 10X *42*
3.1.5 ***Antibióticos*** *42*
Descrição dos antibióticos utilizados nesta pesquisa. *42*
3.1.5.1 Solução de Higromicina *42*
3.1.5.2 Solução estoque de G418 (Gentamicina) *42*
3.1.6 ***Eletroforese*** *43*
Descrição das soluções utilizadas nesta técnica. *43*
3.1.6.1 Solução estoque de brometo de etídeo (10 mg/mL) *43*
3.1.6.2 Gel de agarose 0,8% *43*
3.1.6.3 Solução estoque de tampão de corrida para eletroforese (50 X) *43*
3.1.6.4 Tampão de amostra para eletroforese (6 X) *43*
3.1.7 ***Extração de DNA*** *44*
Descrição das soluções utilizadas nesta técnica. *44*
3.1.7.1 Tampão de extração *44*
3.1.7.2 Tris-EDTA (TE) *44*
3.1.8 ***Southern Blot*** *44*
Descrição das soluções utilizadas nesta técnica. *44*
3.1.8.1 Solução de desnaturação *44*
3.1.8.2 Solução de neutralização *44*
3.1.8.3 Solução estoque SSC 20 X *45*
3.1.8.4 Solução de lavagem 1 ..... *45*
3.1.8.5 Solução de lavagem 2 ..... *45*
3.2 *Métodos* **45**
3.2.1 Crescimento de microrganismos em cultura líquida *45*
3.2.2 Construção de cassetes de deleção por "Double joint". *46*
3.2.3 Transformação de C. neoformans por técnica de biolística *46*

3.2.4 Extração de gDNA de C. neoformans (HOFFMAN; WINSTON, 1987) 47
3.2.5 Reação de PCR 48
3.2.6 Eletroforese 48
3.2.7 Reação de PCR diagnóstico 48
3.2.8 Southern blot para confirmação de deleção gênica 48
3.2.9 Ensaio de assimilação de L-aminoácidos 50
3.2.10 Ensaio de virulência in vivo 50
3.2.11 Diluição seriada 51
3.2.12 Avalição do crescimento 51
3.2.13 Ensaio de produção de urease 51
3.2.14 Ensaio de produção de melanina 52
3.2.15 Ensaio para avaliação de produção de fosfolipase 52
3.2.16 Ensaio para avaliação da produção de cápsula polissacarídica 52
3.2.17 Ensaio para avaliação de resistência ao estresse salino, osmótico, alcalino, oxidativo e nitrosativo. 53
3.2.18 Concentração inibitória mínima – MIC 54
3.2.19 Ensaio para avaliação de viabilidade da parede e membrana celular 55
3.2.20 Avaliação da capacidade de acasalamento e frutificação haploide 55
3.2.21 Testes estatísticos 55
3.2.22 Bioinformática 56
4 RESULTADOS 57
4.1 Confirmação e caracterização genotípica dos mutantes simples *aap6*Δ, *aap8*Δ e duplo mutante *aap1*Δ/*aap2*Δ 57
4.2 Comparação das permeases Aap6, Aap8, Aap1 e Aap2 com *S. cerevisiae* e *H. sapiens* 61
4.3 Assimilação de L – aminoácidos 62
4.4 Infecção em modelo animal de lagarta (*Galleria mellonella*) 67
4.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima - MIC 68
4.5.1 Fluconazol (FL) 69
4.5.2 Anfotericina B (AmB) 69
4.5.3 Eugenol 70
4.6 Impacto das deleções na expressão dos fatores de virulência 71
4.6.1 Produção de cápsula 71
4.6.2 Produção de melanina 73
4.6.3 Produção de fosfolipase B 73

4.6.4 Produção de urease 75
4.6.5 Avaliar o crescimento em diferentes condições nutricionais 75
4.6.6 Avaliação de resistência ao estresse 77
4.6.6.1 Estresse oxidativo 77
4.6.6.2 Estresse alcalino 79
4.6.6.3 Estresse osmótico e salino 80
4.6.6.4 Resistência ao estresse de parede celular 82
4.7 Impacto das deleções sobre o acasalamento 83
5 DISCUSSÃO 86
6 CONCLUSÃO 90
REFERÊNCIAS* 91
ANEXOS 102
A. Lista de microrganismos utilizados neste trabalho 102
B. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho 103
C. Alinhamento entre permeases AAP1 e AAP2 104
D. Estratégia de deleção AAP6 e AAP8 105
E. Dados das permeases AAP6 e AAP8 para deleção individual 106
F. Dados das permeases AAP1 para deleção individual 107
G. Alinhamento de permeases de *C. neoformans, S. cerevisiae* e *H. sapiens* 108
H. E-test de Anfotericina B 112

1 INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans é um basidiomiceto leveduriforme e cosmopolita com capacidade de infectar tanto o ser humano como os animais. A doença causada por esse patógeno é conhecida como Criptococose, uma doença sistêmica (subaguda ou crônica) e potencialmente fatal em pacientes com o sistema imune debilitado. A progressão da doença acarreta a invasão do Sistema Nervoso Central, causando a Meningite criptocócica (PERFECT; CASADEVALL, 2002; VÉLEZ; ESCANDÓN, 2016; AGUIAR et al., 2017; RHODES et al., 2017).

Anteriormente à pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) a Criptococose era considerada uma doença muito pouco comum, mas após o seu surgimento os números de casos da doença cresceram significativamente (KWON-CHUNG, 2014; AGUIAR et al., 2017; PK; MU., 2017).

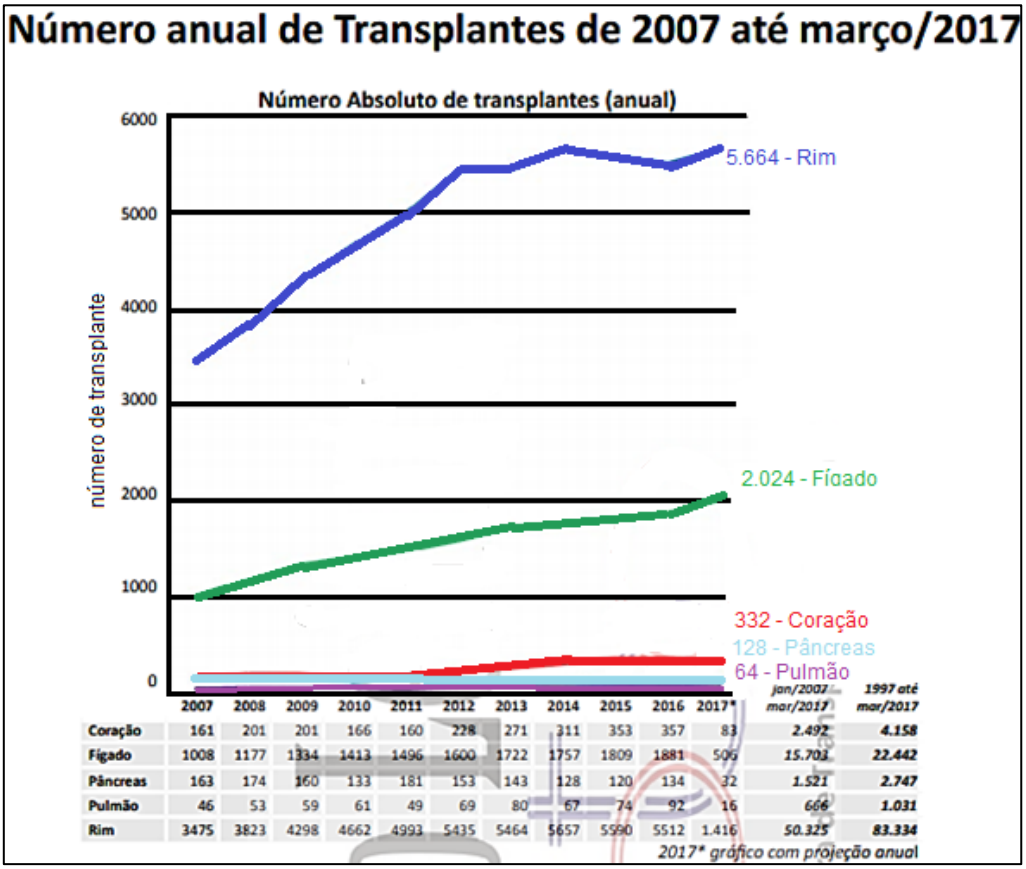
Um levantamento de dados realizado por Rajasingham et al (2017) estimou o número de pessoas soropositivas para *C. neoformans* (pesquisa do antígeno Criptocócico) e as mortes relacionadas a doença (entre 1989 e 2016) em pacientes ambulatoriais infectados pelo HIV em 29 países. Em 1 ano os países de baixa renda apresentaram mortalidade de 70 % em pacientes que passaram por tratamento (anti-retroviral e/ou anfotericina B), e para pacientes que não recebem cuidado a porcentagem é de 100%. Para países de renda média o óbito foi de 40% e 60% para pacientes em tratamento e sem tratamento, respectivamente. Na Europa oriental e Rússia foi estimado óbito em 30% dos pacientes em tratamento e 45% em pacientes sem tratamento e na América do Norte as mortes relacionadas à doença são de 20 e 30 % para os pacientes tratados e não tratados, respectivamente. De maneira geral estima-se que a meningite criptocócica acarrete globalmente 15% dos óbitos relacionados à AIDS, sendo a segunda maior causa de morte, atrás apenas da tuberculose (RAJASINGHAM et al., 2017).

Não só os pacientes portadores de HIV estão em risco de desenvolver a criptococose, pacientes transplantados e em terapias imunossupressoras são bons

candidatos também. Pesquisas apontam que entre 2-3% dos receptores de órgãos sólidos desenvolvem infecção criptocócica nos EUA (MOURAD; PERFECT, 2018).

Um levantamento estatístico de transplantes realizados entre 2007 e 2017 no Brasil disponibilizado pela Associação Brasileira de Transplantes (**Figura 1**) mostra que de maneira geral a cada ano que passa o número de transplantes realizados no Brasil está aumentando e, provavelmente, tende a refletir nos dados de criptococose no país.

Figura 1. Número absoluto de transplantes disponibilizado pelo Registro Brasileiro de Transplantes (RBT): Número anual de transplantes de 2007 até março/2017 (http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=476&c=0&s=157).



	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017*	jan/2007 mar/2017	1997 até mar/2017
Coração	161	201	201	166	160	228	271	311	353	357	83	2.492	4.158
Fígado	1008	1177	1334	1413	1496	1600	1722	1757	1809	1881	506	15.703	22.442
Pâncreas	163	174	160	133	181	153	143	128	120	134	32	1.521	2.747
Pulmão	46	53	59	61	49	69	80	67	74	92	16	666	1.031
Rim	3475	3823	4298	4662	4993	5435	5464	5657	5590	5512	1.416	50.325	83.334

Existem hoje diversas estratégias para classificar o grau de risco do paciente através de ferramentas de diagnóstico (como histopatologia de tecidos infectados, técnicas de cultura, PCR, MOLDI-TOF, ressonância magnética, sequenciamento gênico, biomarcadores específicos, etc) os quais auxiliam no direcionamento do método terapêutico e profilático mais adequado (PERFECT, 2017).

As recomendações e orientações disponibilizadas pela Organização Mundial de Saúde (http://www.who.int/en/) sobre a melhor abordagem no tratamento da meningite criptocócica, para portadores de HIV, estabelece que se deva administrar os compostos deoxicolato de anfotericina B em sinergismo com flucitosina (5FC) seguido de fluconazol (Fl), podendo variar entre 1 e 2 semanas de tratamento. Para consolidação e manutenção terapêutica deve-se administrar fluconazol como profilaxia secundária após 8 semanas do tratamento inicial (WHO, 2018).

Esses compostos possuem diferentes formas de ação: A anfotericina B (AmB) atua ligando-se ao ergosterol aumentando a permeabilidade da membrana celular causando a fuga dos constituintes, a lise celular e consequentemente a morte. O fluconazol age na inibição da enzima citocromo P450 envolvida na síntese do ergosterol. E a 5-flucitosina interrompe a síntese de DNA, divisão nuclear e altera a síntese de proteínas (KAVANAGH, 2005a; ANDES, 2013; PERFECT, 2017).

Embora estes medicamentos sejam clinicamente úteis, nos últimos anos eles mostraram algumas limitações, como a toxicidade e o aumento de resistência. Para um manejo bem-sucedido, no que se refere as IFI's, faz-se necessária a contínua expansão e o uso pertinente de drogas antimicóticas novas e clássicas. Portanto, novos antifúngicos são necessários (SMITH et al., 2015; PERFECT, 2017; MOURAD; PERFECT, 2018).

1.1 Classificação, ciclo infeccioso e aspectos gerais do patógeno

A classificação do agente causal da cryptococococse baseia-se em dois "complexos": o *Complexo Cryptococcus neoformans* tem distribuição geográfica global, é responsável por afetar pacientes com imunossupressão profunda como os portadores de HIV-AIDS em estágio avançado, indivíduos com defeitos de células T, pacientes com doenças pulmonares, hepáticas e renais crônicas, assim como, pacientes que recebem terapia imunossupressora para transplante de órgãos (MUKAREMERA; NIELSEN, 2017).

O segundo Complexo, *Cryptococcus gattii*, afeta pacientes imunocompetentes e sua maior concentração é em áreas tropicais e subtropicais. Entretanto, existem registros na literatura de casos de criptococose causada por *C.gattii* no oeste do Canadá e no noroeste do Pacífico dos Estados Unidos, sugerindo que o fungo pode ter expandido seu nicho ecológico devido às modificações climáticas, fato este ainda não confirmado (KIDD et al., 2004; MACDOUGALL et al., 2007; MEYER et al., 2009; AGUIAR et al., 2017; ACHESON et al., 2018).

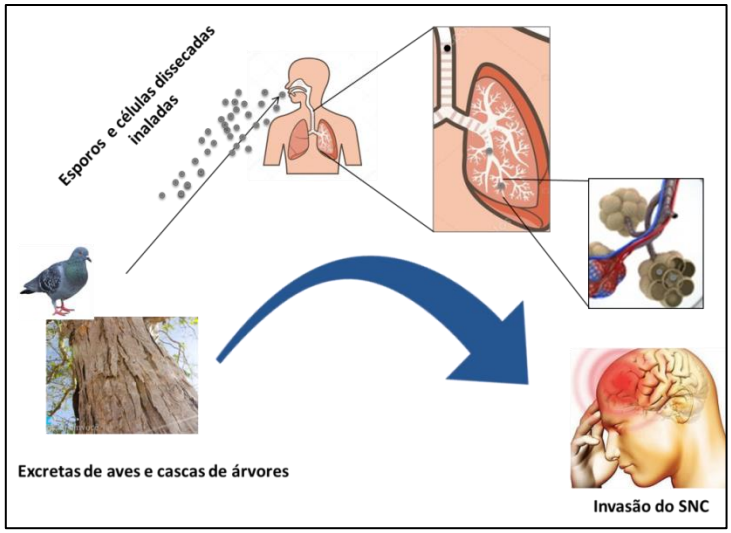
Neste trabalho focaremos na espécie *C. neoformans* (variedade *grubbii* linhagem H99), um patógeno oportunista humano e animal, geralmente isolado do ambiente a partir de excrementos de pombos, cascas de árvore e madeira em decomposição (KWON-CHUNG, 2014; SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017). *As* cepas da variedade *grubii* são geralmente mais virulentas e, globalmente, causam a maior parte das doenças criptococócicas, sendo responsáveis por mais de 99% das infecções em pacientes com AIDS (JANBON et al., 2014).

O contato do patógeno com o hospedeiro ocorre na maioria das vezes por inalação de propágulos ou esporos e, de modo menos frequente, por ingestão ou contato com a pele. Na natureza, as células de levedura de *Cryptococcus sp.* possuem tamanho entre 1 e 3 µm, o que facilita sua inalação e passagem através de pequenos brônquios. *C. neoformans* inicia a infecção nos pulmões, no entanto, o principal fator de mortalidade é a invasão do SNC e progressão para meningite fúngica (NEGRONI, 2012; KWON-CHUNG et al., 2014; DENHAM; BROWN, 2018).

A combinação de fatores de virulência do microrganismo e a suscetibilidade imunológica do hospedeiro é um dos principais determinantes da instalação da doença. Em um hospedeiro saudável o próprio sistema imune é capaz de eliminar a maioria das células de *C. neoformans* que foram inaladas (KWON-CHUNG et al., 2014), porém, nos estudos de Garcia–Hermoso (1999) aborda-se a hipótese de que os indivíduos podem abrigar organismos dormentes por até 13 anos antes da infecção ser ativada (GARCIA-HERMOSO; JANBON, 1999).

Em pacientes com o sistema imune debilitado as manifestações clínicas variam desde uma infecção assintomática no qual as leveduras permanecem latentes e viáveis até o momento oportuno para se multiplicar e disseminar pelo corpo (KWON-CHUNG et al., 2014); ou como uma infecção aguda pulmonar (localizada) até a infecção sistêmica (crônica) com a colonização em diversos órgãos, como pele, ossos, glândula prostática, trato urinário, nódulos linfáticos e finalmente o cérebro, para o qual o patógeno possui tropismo **(Figura 2)** (CASADEVALL; PERFECT, 1998; LIN et al., 2009; LIU; YANG; SHI, 2009; NEGRONI, 2012; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; KWON-CHUNG, 2014).

Figura 2. Ciclo infeccioso de *C. neoformans*. A levedura habita a casca de árvores, solo, excretas de aves (um ambiente ácido e rico em nitrogênio). A imagem ilustra a instalação da infecção no hospedeiro humano através da inalação de esporos e/ou células de leveduras. Dentro dos pulmões os fungos inalados se depositam nos alvéolos, podendo ser eliminados, ficar latentes ou iniciarem uma infecção com migração para o SNC e iniciar a meningite criptococócica. (Fonte: elaborada pelo autor).



C. neoformans é especialmente adaptado para a sobrevivência no hospedeiro, já que após poucas horas de infecção em modelo animal (como demonstrado em experimentos com murinos e peixes-zebra) as células de levedura podem ser vistas no interior de fagócitos e permaneceram viáveis (VECCHIARELLI et al., 1994; DENHAM; BROWN, 2018). Ademais, *C. neoformans* parece ser imunologicamente inerte, isto é, capaz de minimizar a resposta pró-inflamatória ao entrar no hospedeiro humano, resultando em um mascaramento imunológico (MAY et al., 2016).

Os determinantes genéticos da patogenicidade e da virulência são resultados diretos das interações e forças seletivas que *C. neoformans* encontra no ambiente (SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017). Essa habilidade que o patógeno “adquiriu” (hipótese de evolução de características em resposta a pressões seletivas ambientais) (MAY et al., 2016) de adentrar, sobreviver no hospedeiro e causar a infecção é decorrente de um conjunto de fatores de virulência. Esses fatores incluem todos os mecanismos que o permitem multiplicar, infectar e permanecer no hospedeiro de forma eficiente; fatores que o habilitam a resistir aos incessantes ataques do sistema imune do hospedeiro e a fatores que eventualmente possam danificar suas células (STEENBERGEN et al., 2003; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; AGUIAR et al., 2017).

O primeiro fator de virulência destacado aqui é a produção de cápsula polissacarídica. O fungo faz um esforço biossintético significativo na construção de uma cápsula com um raio que pode ter várias vezes o tamanho de seu corpo celular. Ela consiste principalmente de dois polissacarídeos, ± 90% de glucoronoxilomanana (GXM), ± 9% de galactoxilomanana (GXMGal) e de pequenas quantidades de manoproteínas. A cápsula está intimamente associada à parede celular e desempenha vários papéis diferentes durante a patogênese; possui propriedades antifagocíticas que prejudicam o reconhecimento dos epítopos presentes na superfície da parede celular pelos receptores fagocíticos, dificultando a fagocitose, a ativação do sistema complemento e a resistência ao estresse oxidativo (KOZEL; HERMERATH, 1984; LEVITZ; DUPONT; SMAIL, 1994; LIU et al., 2008; ZARAGOZA et al., 2009; KUMAR et al., 2011; MCQUISTON; LUBERTO; DEL POETA, 2011; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; DENHAM et al., 2018).

Experimentos mostraram que as células fúngicas acapsuladas de *C. neoformans* são rapidamente fagocitadas, ao contrário das células que não foram fagocitadas (após 24 horas de inoculação) por possuírem um volume capsular maior. Além disso, a cápsula é de extrema necessidade para a sobrevivência de *C. neoformans* no interior dos fagócitos já que células acapsulares não conseguem se replicar (DENHAM; BROWN, 2018).

Outro artifício utilizado pela levedura é a produção da enzima lacase. *C. neoformans* possui dois genes responsáveis por produzir esta enzima (*LAC1* e *LAC2)* e ambas catalisam a síntese de melanina. Este pigmento é um importante fator de virulência pois colabora para a proteção do fungo contra danos oxidativos causados por fagócitos e radiações ionizantes, e ainda pode proteger o patógeno contra a ação de agentes antifúngicos (KWON-CHUNG; RHODES, 1986; IKEDA et al., 2003). No meio ambiente a melanina também é útil sendo capaz de absorver a luz UV da radiação solar. A enzima lacase tem atividade de ferroxidase, contribuindo para aumentar a disponibilidade de ferro no interior do fagossoma, o qual é carente de nutrientes (WILLIAMSON, 1994; ERB-DOWNWARD et al., 2008; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; ALMEIDA; WOLF; ARTURO CASADEVALL, 2015).

Outra forma de proteção de *C. neoformans* é pela atividade da enzima fosfolipase B (Plb), produzida pelo gene *PLB*1, durante a infecção (COX et al., 2001; SANTANGELO et al., 2004). A Plb é responsável por iniciar e facilitar a adesão do fungo nas células epiteliais do pulmão, iniciando a infecção. Auxilia também na disseminação para os vasos linfáticos pulmonares, sangue e outros órgãos, mas não para o SNC. Também ajuda na lise celular, permitindo que a levedura escape do fagossomo no momento oportuno (GANENDREN et al., 2004; SANTANGELO et al., 2004; CHRISMAN et al., 2011; DENHAM; BROWN, 2018)

A ureia é um metabólito encontrado em alta concentração na corrente sanguínea (LEE et al., 2013) e outra ferramenta utilizada por *C. neoformans* é a enzima urease, que catalisa a hidrólise de uréia em amônia, carbamato e CO_2. A amônia é a fonte de nitrogênio mais prontamente assimilada e preferencialmente utilizada pela maioria dos fungos para economia energética (SINGH et al., 2013; FEDER et al., 2015). O papel desempenhado pela urease na invasão do SNC continua enigmático, porém, há hipóteses de que a amônia (que é tóxica para as células de mamíferos) seja liberada localmente na barreira hematoencefálica como produto da urease e possa enfraquecer a parede do vaso endotelial, facilitando a entrada de fungos (MAY et al., 2016).

Por último, a termotolerância, a habilidade de crescimento a temperatura corporal humana de 37 ºC é considerada o fator de virulência mais importante para o

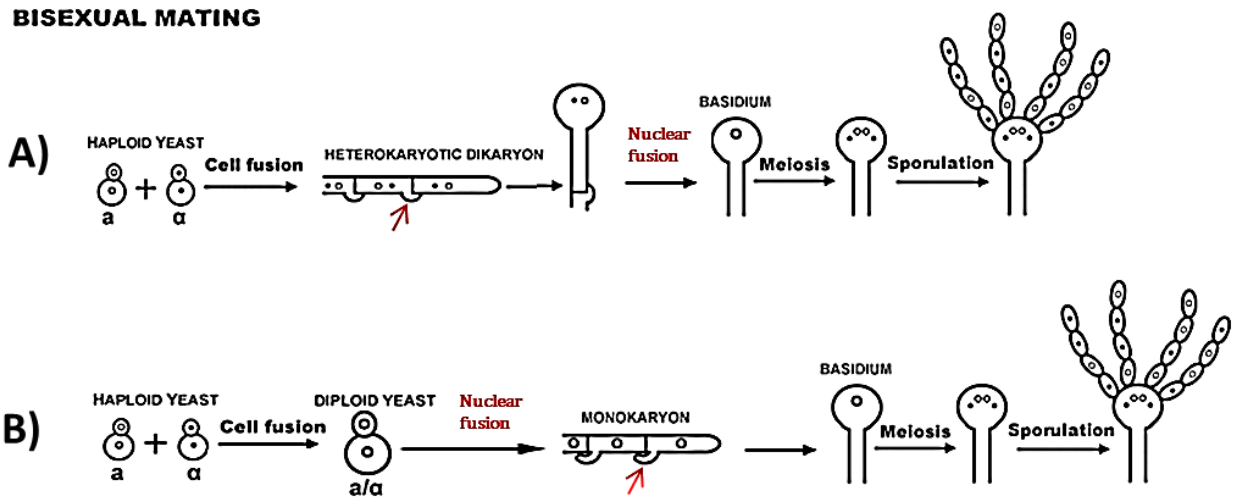
patógeno, já que alguns organismos, filogeneticamente próximos, possuem fatores de virulência como a cápsula e a lacase, mas não são agentes patogênicos por serem incapazes de sobreviver na temperatura dos mamíferos. Dessa forma a termotolerância é uma característica comum para os patógenos (ROBERT; CASADEVALL, 2009; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

1.2 *C. neoformans* e seu ciclo de vida

Um dos aspectos que mais contribui para o uso de *C. neoformans* como modelo biológico de estudo é o seu ciclo de vida: trata-se de uma levedura haplóide na maior parte do tempo, unicelular, de fácil manipulação e que se reproduz assexuadamente por brotamento (KOZUBOWSKI; HEITMAN, 2012; SUN et al., 2014; GYAWALI et al., 2017). Entretanto, *C. neoformans* é heterotálico (possui dois tipos sexuais a e α) sendo ambos os tipos patogênicos, embora a maioria dos isolados clínicos seja *MATα* (FU; MORRIS; WICKES, 2013). É capaz de realizar uma transição dimórfica (habilidade de crescer tanto na forma leveduriforme quanto na forma filamentosa) e essa alteração fenotípica pode ser visualizada durante o *mating* (acasalamento) ou a frutificação haplóide (reprodução unissexual) (NI et al., 2011; GYAWALI et al., 2017).

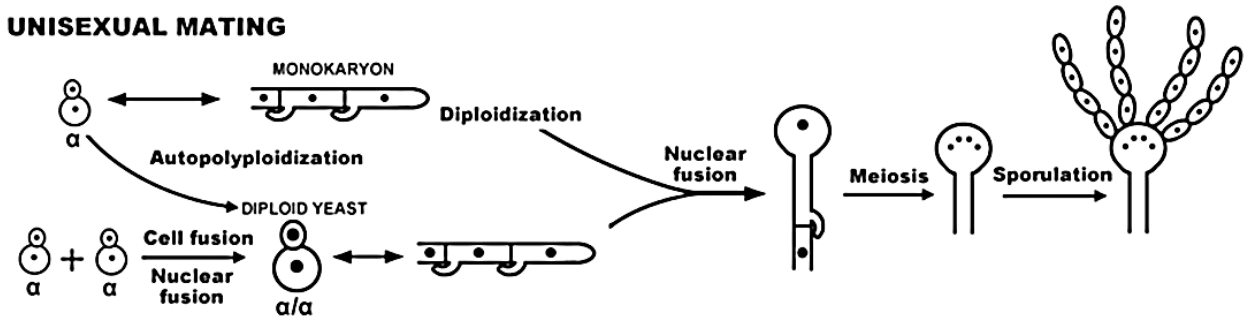
No acasalamento ocorre a fusão citoplasmática das células contendo os tipos sexuais *a* e *α.* Há formação de hifas dicarióticas com grampos de conexão fusionados (indicado com seta na **Figura 3A**). No ápice da hifa forma-se o basídio, local onde ocorre a fusão dos núcleos. Através de meiose seguida por diversas mitoses há formação dos esporos haplóides de dois tipos sexuais (basidiósporos) sobre o basídio. Esses esporos darão origem às leveduras que se dividem por brotamento. A outra opção no acasalamento é similar a anteriormente descrita, porém a união dos núcleos ocorre logo no início do ciclo formando o monocário (ao invés de dicário) e nesse processo os grampos de conexão não se fundem na hifa posterior como indicado na seta (**Figura 3B**) (LIN et al., 2009; KRONSTAD et al., 2011; WANG; LIN, 2011; KOZUBOWSKI; HEITMAN, 2012; SUN et al., 2014; GYAWALI et al., 2017).

Figura 3. Ciclo de vida bissexual de *C. neoformans*. Cruzamento entre tipos sexuais opostos a-α com formação do basídio, seguido da elaboração de basidiósporos por meiose e mitoses. Os esporos dão origem às leveduras que se dividem por brotamento (Fonte: modificado de WANG; LIN, 2011).



A frutificação haplóide ocorre somente entre tipos sexuais iguais **(Figura 4)**. O tipo sexual *a* ou *α* é capaz de se unir com uma célula do mesmo tipo ou se autopoliploidizar. Nas duas opções ocorre a filamentação até a formação do basídio e, através de meiose e mitoses, formam-se os basidiósporos de um único tipo sexual (LIN; HULL; HEITMAN, 2005; LIN et al., 2009; KRONSTAD et al., 2011; WANG; LIN, 2011; KOZUBOWSKI; HEITMAN, 2012; FU; MORRIS; WICKES, 2013).

Figura 4. Ciclo de vida unissexual de *C. neoformans*. Conjugação entre células do mesmo tipo α-α com formação de basidiósporos por meiose e mitoses. Os esporos dão origem às leveduras que se dividem por brotamento. Os grampos de conecção não se fxam na hifa posterior (WANG; LIN, 2011).



A reprodução sexual permite que os organismos usem a recombinação de alelos para purificar o genoma de mutações deletérias além de contribuir para a geração de diversidade (FU et al., 2016).

1.3 *Modelo biológico de estudo*

À medida que os casos de HIV-AIDS e, consequentemente, a Criptococose aumentou, foi notório a necessidade de ampliar o conhecimento e desenvolver estratégias de diagnóstico para uma compreensão mais profunda no que tange combater essa doença. Ao longo do tempo diversos pesquisadores e profissionais da área foram capazes de aprimorar técnicas e criar ferramentas sofisticadas de análise que auxiliam na compreensão da biologia deste patógeno (KWON-CHUNG, 2014).

Hoje, com o avanço científico e tecnológico, *C. neoformans* pode ser considerado um modelo para os estudos de biologia molecular, patogênese, biologia celular e genética de leveduras patogênicas. Além de possuir vários genomas sequenciados, também detém um sistema de transformação estável por biolística, método esse que favorece a construção de linhagens geneticamente modificadas e permite avaliar o impacto de deleções gênicas na sobrevida e virulência desta levedura (COX et al., 2000; FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001; SEIDER et al., 2010; VOELZ; MAY, 2010; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014).

Ademais, *C. neoformans* conta com um modelo celular (macrófago) e animal (larvas, camundongo e coelho) de infecção, os quais são bastante eficientes para as avaliações dos aspectos biológicos da interação patógeno-hospedeiro, virulência, sobrevivência e patogênese (COX et al., 2000; FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001; SEIDER et al., 2010; VOELZ; MAY, 2010; KRONSTAD et al., 2011).

Dentre esses modelos, a forma larval de *Galleria mellonella* tem sido amplamente utilizada como modelo alternativo de estudo para avaliar a virulência de patógenos fúngicos e bacterianos, além de investigar a eficácia de drogas antimicrobianas. A justificativa para o aumento desse tipo de estudo baseia-se na correlação de dados obtidos em estudos com murinos. Pesquisas comprovam que *G.*

mellonella possue um sistema imune celular e humoral inato que se assemelha à resposta imune inata de vertebrados. A resposta imune celular é mediada por *hemócitos* que apresentam fortes semelhanças estruturais e funcionais com fagócitos de mamíferos. Hemócitos foram capazes de fagocitar células bacterianas e fúngicas e a cinética da fagocitose e morte microbiana mostrou-se similar tanto nos hemócitos dos insetos quanto nos neutrófilos humanos (BERGIN et al., 2005; MAURER et al., 2015). Além disso, existem inúmeras vantagens da utlização de *G. mellonella* sobre os modelos de mamíferos, tais como: baixo custo, fácil manipulação e o potencial para realizar estudos em larga escala. Ainda, o uso deste inseto vai ao encontro das tendências mundiais no que diz respeito à ética e bem-estar animal (MYLONAKIS et al., 2005; ROSSI et al., 2016).

Muitos dos conhecimentos adquiridos nestes estudos podem ser transferidos para outros patógenos eucariotos. A disponibilidade destes modelos biológicos de infecção permitiu que as bases genéticas da interação patógeno-hospedeiro fossem elucidadas em grandes detalhes (FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001; SEIDER et al., 2010; VOELZ; MAY, 2010; KOZUBOWSKI; HEITMAN, 2012; KRONSTAD et al., 2012).

Apesar de todos os progressos quanto aos aspectos básicos da biologia deste patógeno as formas de tratamentos ainda deixam muito a desejar e, de modo consequente, há uma grande demanda por novos antifúngicos (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010; MEHRA et al., 2012; ANDES, 2013; MOURAD; PERFECT, 2018).

O surgimento de resistência e a baixa toxicidade seletiva de fármacos continuam a ser um grande problema na aplicação clínica e descoberta de terapias para a criptococose. Fungos, assim como células de mamíferos, são eucariotos e suas semelhanças (como estrutura celular e metabolismo) limitam seus alvos moleculares para prospecção de novos fármacos, afetando a disponibilidade de terapias modernas para o tratamento dessa doença (KAVANAGH, 2005a; ANDES, 2013; MOURAD; PERFECT, 2018).

Sabendo da importância que os aspectos nutricionais desempenham na patogenicidade, instalação da doença e na resposta imune do hospedeiro, é evidente que já existam estudos direcionados nessas áreas com o intuito de encontrar novos alvos moleculares para a prospecção de fármacos, e as vias de biossíntese de aminoácidos são exemplos desse tipo de pesquisa (YANG et al., 2002; PASCON, 2004; FERNANDES et al., 2015; OLIVE; SASSETTI, 2016; WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

As vias de biossíntese de aminoácidos são ótimas oportunidades de validação de alvos para novos fármacos antifúngicos, principalmente porque nove destas são inexistentes em mamíferos mas estão presentes nos microrganismos (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), o que aumenta a toxicidade seletiva dos fármacos que poderão ser desenvolvidos contra estes alvos (YANG et al., 2002; PASCON, 2004; KINGSBURY; MCCUSKER, 2009, 2010a, 2010b; FERNANDES et al., 2015).

Os aminoácidos são essenciais para a sobrevivência do patógeno, portanto, se uma das vias de biossíntese for interrompida e/ou a capacidade assimilação através da membrana for bloqueada, a persistência do mesmo no hospedeiro pode diminuir significativamente, aumentando a chance de sucesso terapêutico (YANG et al., 2002; PASCON, 2004; FERNANDES et al., 2015).

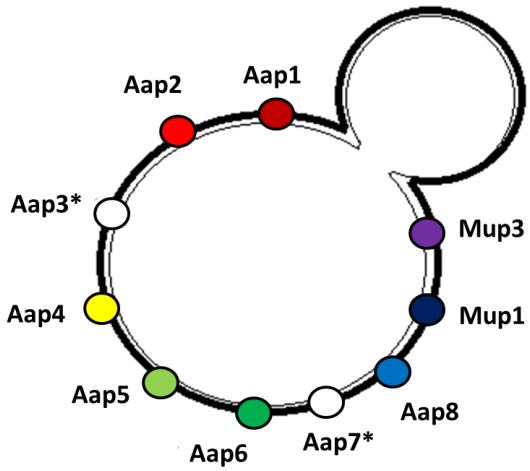
Alguns possíveis alvos para novos fármacos já foram estudados previamente, como as vias de biossíntese da lisina, isoleucina, valina, metionina, treonina e triptofano (YANG et al., 2002; KINGSBURY, 2004; KINGSBURY et al., 2004; PASCON, 2004; KINGSBURY; MCCUSKER, 2009, 2010a, 2010b; FERNANDES et al., 2015).

Kingsbury et al. (2004) relataram que mutações nos genes da via de biossíntese da lisina levam à diminuição do crescimento e a atenuação da virulência em modelo animal. Da mesma forma, bloqueios na via de biossíntese da metionina geraram deficiências na expressão de fatores de virulência. Testes com modelo animal apontaram que as interrupções nesta via de síntese causam avirulência em camundongos (YANG et al., 2002; KINGSBURY et al., 2004; PASCON, 2004).

Semelhantemente como demonstrado sobre a essencialidade da via de síntese de treonina (KINGSBURY; MCCUSKER, 2010a), Fernandes et al. (2015) comprovaram que o bloqueio na via de biossíntese de triptofano é também essencial para *C. neoformans*. No entanto, através de estudos utilizando a tecnologia de RNA interferente foi possível mostrar que a captação do aminoácido triptofano pode ser aumentada na ausência da fonte preferencial (amônia) em meio de cultivo às baixas temperaturas, levando a um leve aumento no crescimento (FERNANDES et al., 2015).

Fernandes et al. (2015) levantou a hipótese de que a captação de aminoácidos por meio de permeases pode ser um mecanismo pouco eficiente em *C. neoformans* devido à existência de poucos genes codificadores de permeases. Uma comparação *in silico* entre 24 permeases de membrana e 7 permeases vacuolares de *S. cerevisiae* e o genoma de *C. neoformans* (H99 sorotipo A) apontou que esta levedura codifica somente 10 permeases de aminoácidos pertencentes à família das APCs, identificadas com Aap1 à Aap8, Mup1 e Mup3 (**Figura 5**), dados estes que podem indicar que realmente *C. neoformans* tem poucas permeases de aminoácidos e, assim, tem dificuldades para satisfazer a auxotrofia à certos aminoácidos (FERNANDES et al., 2015).

Figura 5. Representação esquemática de *C. neoformans* com as 10 permeases de aminoácidos da família APC identificados por Fernandes et al . (2015). * permeases não expressas conforme demonstrado por Fernanders et al.(2015) (créditos da imagem: Amanda Teixeira de Melo).



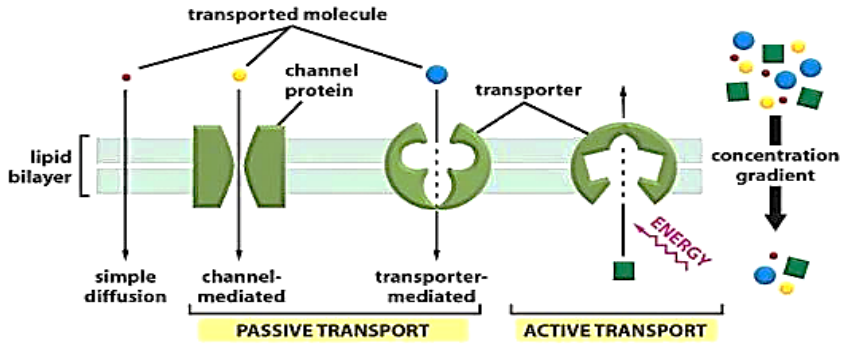
Ademais, Fernandes et al. (2015) realizaram uma análise de expressão gênica em diferentes fontes nutricionais e mostraram que das dez permeases identificadas, duas não são expressas na condição experimental usada (*AAP3* e *AAP7*); as demais permeases mostraram padrão distinto de expressão de acordo com a fonte preferencial de nitrogênio, a presença de aminoácidos no meio de cultura e a privação de nitrogênio (FERNANDES et al., 2015).

1.4 Transporte através da membrana e as permeases de aminoácidos

O transporte através da membrana em geral, com exceção da difusão simples, é realizado através das proteínas carreadoras. Essas proteínas são divididas em "proteínas transportadoras" e "proteínas de canal", sendo essas responsáveis por transferir solutos específicos, ou uma classe deles, para dentro ou fora da célula (ALBERTS BRUCE et al., 2004).

Esse transporte pode ocorrer sem gasto de energia através de um gradiente eletroquímico (transporte passivo) ou pelo transporte ativo que requer um aporte energético mediado por transportadores que captam energia para bombear o soluto contra o seu gradiente eletroquímico (**Figura 6)** (ALBERTS BRUCE et al., 2004).

Figura 6. Transporte passivo e ativo de solutos através da membrana celular (ALBERTS BRUCE et al., 2004)**.**

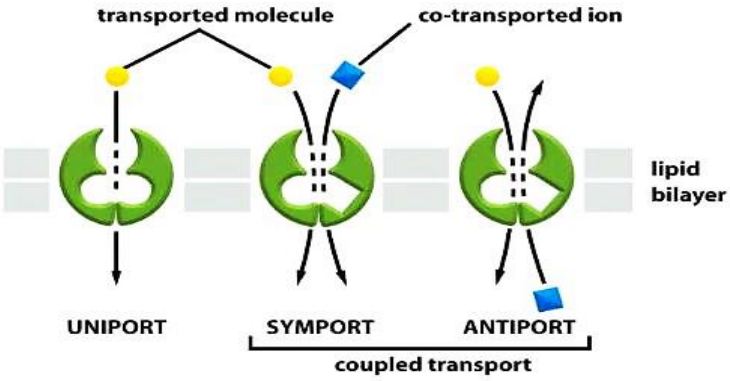


Essas proteínas de transporte possuem um ou mais sítios de ligação específicos ao seu substrato, que após sua ligação irá desencadear alterações

conformacionais na proteína transportadora permitindo que seu ligante passe para outro lado da membrana (ALBERTS BRUCE et al., 2004).

As permeases de aminoácidos em geral utilizam o mecanismo de transporte passivo para movimentar seu substrato, e esse transporte pode ser de diferentes tipos de aminoácidos ou seletivo (aminoácidos específicos). Conforme ilustrado na **Figura 7** a entrada do aminoácido pode estar acoplada à saída ou a entrada de outra molécula (chamado antiporte e simporte, respectivamente) ou o aminoácido pode ser simplesmente transportado através da membrana (chamado uniporte) (ALBERTS BRUCE et al., 2004; WIPF et al., 2012).

Figura 7. Proteínas transportadoras de membrana atuando como uniporte, simporte e antiporte (ALBERTS BRUCE et al., 2004).



Existem diversas superfamílias de proteínas que atuam no transporte de aminoácidos em bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais. Uma comparação dos transportadores de leveduras, plantas e humanos (*Saccharomyces cerevisiae, Arabidopsis thaliana* e *Homo sapiens,* respectivamente) mostrou que eles se enquadram em 5 superfamílias diferentes. Essa análise forneceu evidências da existência de uma multiplicidade de transportadores que diferem em relação à localização, mecanismos de transporte e distribuição tecidual, além de auxiliar na caracterização funcional de transportadores ainda não classificados (WIPF et al., 2002).

Em leveduras o transporte de aminoácidos ocorre na membrana plasmática, na membrana vacuolar e, em menor frequência, na membrana mitocondrial. Essas proteínas transportadoras podem conter até 14 segmentos transmembrana e

pertencem a três superfamílias diferentes: APC (Aminoácido Poliamina-Colina), MFS (Superfamília Facilitadora principal) e AAPT II (Transportadora de Aminoácidos e Poliaminas II) (POPOV-ČELEKETIĆ et al., 2016).

Como citado anteriormente, para *S. cerevisiae* a captação de aminoácidos através da membrana plasmática é mediada por 24 transportadores pertencentes à superfamília APC. Esses transportadores podem ser altamente específicos, transportando apenas 1 tipo de aminoácido, ou ter uma ampla gama de substratos, podendo transportar vários aminoácidos diferentes para a redistribuição e homeostase das concentrações intracelulares (ANDRÉ, 1995; SOPHIANOPOULOU; DIALLINAS, 1995; WIPF et al., 2012; GOURNAS et al., 2015; POPOV-ČELEKETIĆ et al., 2016). Homólogos de transportadores APC também são encontrados em animais e plantas. Uma análise filogenética mostrou uma subdivisão de grupos no qual a maioria das permeases de *S. cerevisiae* assemelha-se as permeases de plantas e poucas delas assemelham-se a permeases de humanos (WIPF et al., 2012).

Em *C. neoformans* esse transporte de aminoácidos é realizado pela superfamília APC e são frequentemente referidos como *permeases de aminoácidos* (AAPs) (FERNANDES et al., 2015; POPOV-ČELEKETIĆ et al., 2016). O transporte de aminoácidos mediado por membros dessa família localiza-se principalmente na membrana plasmática e utilizam o sistema de co-transporte de sódio e hidrogênio através do método simporte ou antiporte com funções de absorção e nutrição. Essas proteínas possuem 12 domínios transmembranas, porém em alguns casos é possível encontrar até 14 domínios (SOPHIANOPOULOU; DIALLINAS, 1995; WIPF et al., 2012; POPOV-ČELEKETIĆ et al., 2016).

1.5 Regulação e captação de aminoácidos por permeases APC em *C. neoformans*

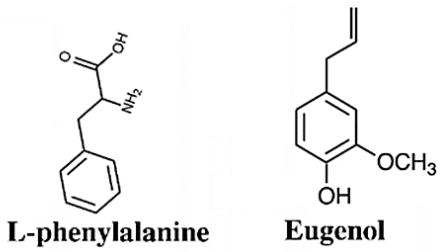
A expressão de genes codificadores de permeases de aminoácidos é regulada por um sistema da repressão catabólica por nitrogênio (NCR), no qual a presença de amônia (que é a fonte preferencial de nitrogênio) reprime a expressão de genes associados à assimilação de fontes secundárias de nitrogênio, como por exemplo, os aminoácidos. Dessa forma, esses genes somente serão expressos na ausência da

fonte preferencial (SOPHIANOPOULOU; DIALLINAS, 1995; RUSSEL LEE et al., 2011). Dando continuidade ao trabalho de Fernandes et al (2015) no que refere-se as permeases de aminoácidos de *C. neoformans*, Martho et al . (2016) estudaram 5 das 8 AAP's (*AAP2, AAP4, AAP5, MUP1 e MUP3*) cujo padrão de expressão pode ser identificado por qPCR. Este estudo, feito através de deleção gênica individual mostrou que, diferentemente das permeases de *S. cerevisiae*, todas elas são permeases globais, isto é, não tem preferência por transportar aminoácidos específicos (MARTHO et al., 2016).

O estudo comprovou também que as permeases Aap4 e Aap5 são dominantes e redundantes, sendo que o duplo mutante é incapaz de crescer em aminoácidos como fonte única de nitrogênio, é sensível ao estresse oxidativo, tem forte termossensibilidade, é avirulento em modelo animal (murino Balb/c e *Galleria mellonella*) e hipersensível ao fluconazol. Além, esse estudo também ratificou que as permeases são alvo de um inibidor fúngico, o eugenol (MARTHO et al., 2016).

O eugenol é o principal componente fenólico biologicamente ativo dos óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum),* uma planta aromática cultivada em países asiáticos e africanos. A estrutura molecular do eugenol é muito semelhante aquela dos precursores de aminoácidos aromáticos **(Figura 8)** e, devido a esta semelhança estrutural, sugere-se que o eugenol pode interagir com os sítios ativos de transporte das permeases da membrana, podendo alterar sua permeabilidade ou causar alterações conformacionais que perturbam a membrana citoplasmática da levedura levando à liberação de componentes intracelulares (DARVISHI et al., 2013).

Figura 8. A estrutura do composto eugenol é semelhante aos aminoácidos aromáticos. Ele é sintetizado nas plantas através da via fenilpropanóide da fenilalanina (DARVISHI et al., 2013).



Das permeases identificadas por Fernandes et al . (2015), as permeases Aap1 e Aap2 mostram ser bastante semelhantes quanto à sequência de aminoácidos (80,9% identidade), mas até o presente não se sabe se são redundantes e essenciais como Aap4 e Aap5 descritas por MARTHO et al., 2016.

Foram construídos mutantes contendo deleções das permeases Aap6 (*aap6Δ*) e Aap8 (*aap8Δ*) individualmente, no entanto, estes estudos não foram concluídos e, portanto, também não se sabe se atuam como permeases globais ou no transporte de aminoácidos específicos. Outro aspecto relevante, mas ainda não explorado, é o impacto que a deleção destas permeases tem sobre a capacidade de filamentação que ocorre durante o acasalamento em *C. neoformans.*

Em vista disso, ainda são necessários vários estudos para completar o entendimento do sistema de transporte de aminoácidos que *C. neoformans* utiliza. Estes estudos são importantes porque as permeases estão localizadas na membrana celular, o que as torna um atraente alvo para o desenvolvimento de inibidores, uma vez que inibidores não precisariam adentrar a célula para exercer seu papel inibitório. Portanto, é de grande interesse avaliar o papel que as outras permeases ainda não estudadas têm sobre o transporte de aminoácidos e sobre a virulência de *C. neoformans*.

2 OBJETIVOS

Avaliar o papel das deleções simples das pemeases Aap6 e Aap8 assim como a dupla deleção das permeases Aap1 e Aap2 sobre a captação de aminoácidos, sobre os fatores de virulência, sobre a capacidade de sobrevivência de *C. neoformans* em diversas condições nutricionais e também verificar se essas deleções afetam o acasalamento.

2.1 Objetivos específicos

- Criar a dupla deleção dos genes codificadores das permeases *AAP*1 e *AAP*2 (*aap1Δ/aap2Δ*) e confirmar a modificação genética por PCR e Southern Blot;
- Reconfirmar as deleções dos genes *AAP*6 (*aap6Δ*) e *AAP*8 (*aap8Δ*) por PCR;
- Verificar o impacto das mutações (*aap6Δ, aap8Δ e aap1Δ/aap2Δ)* tem sobre a assimilação de L- aminoácidos individualmente;
- Verificar o impacto que as mutações (*aap6Δ*, *aap8Δ e aap1Δ/aap2Δ)* têm sobre a virulência de *C. neoformans in vivo* usando o modelo animal de infecção de lagarta (*Galleria mellonella*);
- Verificar o impacto que as mutações (*aap6Δ*, *aap8Δ e aap1Δ/aap2Δ)* têm sobre os antifúngicos utilizados atualmente (Anfotericina B e Fluconazol) e também o inibidor fúngico eugenol;
- Verificar o impacto das mutações (*aap6Δ*, *aap8Δ e aap1Δ/aap2Δ)* sobre os fatores de virulência (produção de cápsula polissacarídica, melanina, fosfolipase B e urease) e em situações de estresse (nutricional, oxidativo, alcalino, osmótico, salino e de parede celular);
- E verificar o impacto que as mutações (*aap6Δ*, *aap8Δ e aap1Δ/aap2Δ*) tem na capacidade de acasalamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição de todos os insumos, técnicas e microrganismos utilizados nesta pesquisa.

3.1 *Materiais*

Detalhamento de condições gerais de esterilização, meios de cultura, microrganismos, oligonucleotídeos, soluções, antibióticos empregados neste experimento.

3.1.1 Condições gerais de esterilização, solidificação dos meios de cultivo e crescimento dos microrganismos.

Todas as soluções e meios de cultura utilizados neste trabalho, passíveis de autoclavagem passaram por este tipo de esterilização a 121 ºC, 1 ATM durante 15 minutos. As esterilizações por filtração foram feitas em filtros de porosidade de 0,22 µm em frascos previamente estéreis. A esterilidade dos materiais e procedimentos foi mantida por meio da manipulação em fluxo laminar. Os meios sólidos foram acrescidos de 20 g/L de Agar bacteriológicos (BD, Difco) e para meios líquidos foi retirado o mesmo da solução.

A temperatura de cultivo foi de 25 °C, 30 ºC ou/e a 37 ºC, dependendo do delineamento experimental.

3.1.2 Linhagens de microrganismos

Todos os microrganismos utilizados neste trabalho foram listados na tabela do **Anexo A** com as devidas características. Todas as linhagens de *C. neoformans* usadas pertencem ao sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii* H99).

3.1.3 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram adquiridos da “Integrated DNA Technologies” na escala de 25 nmol. A solução estoque foi preparada com água

MilliQ estéril na concentração de 100 µM, sendo que a concentração de trabalho foi ajustada para 10 µM. As sequências dos oligonucleotídeos foram descritas na tabela do **Anexo B.**

3.1.4 **Meios e soluções**

3.1.4.1 YPD

1% Extrato de levedura (Difco)	10g/L
2% Peptona (Difco)	20g/L
1M HCl	5mL/L
10% Solução estoque de 20% de D- glicose (Synth)	100mL/L
Água MilliQ q.s.p	900mL/L

O preparo do meio foi feito de acordo com Amberg et al . (2005). O meio de cultura foi esterilizado por autoclavagem.

3.1.4.2 YPD suplementado com NaCl

1M NaCl (Synth)	58,44 g/L
0,75 M NaCl (Synth)	43,83 g/L

O meio YPD foi preparado de acordo com o item 3.1.4.1, acrescido de 0,75 M ou 1 M de NaCl de acordo com a metodologia de Zaragoza (2000) e esterilizado por autoclavagem (ZARAGOZA; GANCEDO, 2000).

3.1.4.3 YPD suplementado com KCl

1M KCl (Vetec)	74,56 g/L
0,75 M KCl (Vetec)	55,92 g/L

O preparo do meio YPD foi feito conforme o item 3.1.4.1 e acrescido de 0,75 M ou 1 M de KCl e autoclavado (ZARAGOZA; GANCEDO, 2000).

3.1.4.4 YPD suplementado com H_2O_2

O preparo do meio YPD foi conforme o item 3.1.4.1 e autoclavado. Após a esterilização a temperatura do meio foi equilibrada para 50 °C e o mesmo foi acrescido de H_2O_2 (Vetec) estéril nas concentrações de 1 mM ou 2,5 mM (LI et al., 2016).

3.1.4.5 YPD suplementado com $NaNO_2$

O preparo do meio YPD foi de acordo com o item 3.1.4.1 e após a autoclavagem foi adicionado $NaNO_2$ estéril nas concentrações de 1 mM ou 2,5 mM (LI et al., 2016).

3.1.4.6 YPD suplementado com Congo Red 0,5 %

0,5% Vermelho de congo (Vetec) 0,5 g/L

Após o preparo do YPD de acordo com o item 3.1.4.1 adicionou-se 0,5 % de vermelho de congo e seguiu-se com a esterilização por autoclavagem (ZARAGOZA; GANCEDO, 2000).

3.1.4.7 YPD suplementado com SDS 0,03%

0,03% SDS (Estoque10 %) 3 µL/mL

Após o preparo do YPD de acordo com o item 3.1.4.1 adicionou-se 0,03% de SDS conforme a metodologia de (AN et al., 2014) e seguidamente o meio foi autoclavado.

3.1.4.8 YNB 10X

YNB c/ aminoácido c/ sulfato de amônia (Sigma) 6,75 g /100 mL

A solução do meio sintético YNB foi preparada na concentração de 10X e esterilizada por filtração. Será usada a nomenclatura SD (*Synthetic dextrose*) para se referir ao YNB.

3.1.4.9 YNB s/ sulfato de amônia e s/ aminoácido 10X

YNB s/ aminoácido s/ sulfato de amônia (Sigma) 6,75 g / 100 mL

A solução do meio sintético YNB foi preparada na concentração de 10X e esterilizada por filtração.

3.1.4.10 YNB c/ sulfato de amônia e s/ aminoácido 10X

YNB c/ sulfato de amônia s/ aminoácido (Sigma)	6,75g/100mL

A solução do meio sintético YNB c/ sulfato foi preparada na concentração de 10X e esterilizada por filtração.

3.1.4.11 YNB c/ sulfato c/ aminoácidos (YNB+N+AA)

YNB c/ sulfato de amônia e c/ aminoácido (estoque 10X).	100 mL/L
10% D-glicose (estoque de 20 %) (Synth).	100 mL/L
Água MilliQ q.s.p	800 mL/L

A solução estoque 10X foi diluída para 1X, adicionou-se a glicose previamente esterilizada por autoclavagem e completou-se o volume com água MilliQ estéril.

3.1.4.12 YNB s/ sulfato c/ aminoácidos (YNB-N+AA)

10X YNB	100 mL/L
10X Solução de aminoácidos	100 mL/L
Solução estoque de 20% de D-glicose (Synth)	100 mL/L
Água MilliQ q.s.p	700 mL/L

A solução estoque 10X foi diluída para 1X, adicionou-se a glicose previamente esterilizada por autoclavagem, a solução de aminoácidos e completou-se o volume com água MilliQ estéril.

3.1.4.13 YNB s/ sulfato s/ aminoácidos (YNB-N-AA)

10X YNB s/ sulfato de amônia e s/ aminoácido	100 mL/L

Solução estoque de 20 % de D-glicose (Synth)	100 mL/L
Água MilliQ q.s.p	800 mL/L

A solução estoque 10X foi diluída para 1X, adicionou-se a glicose previamente esterilizada por autoclavagem e completou-se o volume com água MilliQ estéril.

3.1.4.14 YNB c/ sulfato s/ aminoácidos (YNB+N-AA)

10X YNB c/ sulfato de amônia e s/ aminoácido	100 mL/L
Solução estoque de 20% de D-glicose (Synth)	100 mL/L
Água MilliQ q.s.p	800 mL/L

A solução estoque 10X foi diluída para 1X, adicionou-se a glicose previamente esterilizada por autoclavagem e completou-se o volume com água MilliQ estéril.

3.1.4.15 YNB com acréscimo de NaCl

NaCl 1 M (Synth)	58,44 g/L
NaCl 0,75 M (Synth)	43,83 g/L

Ao meio descrito no item 3.1.4.11 adicionou-se 0,75 M ou 1 M de NaCl.

3.1.4.16 YNB com adição de KCl

KCl 1 M (Vetec)	74,56 g/L
KCl 0,75 M (Vetec)	55,92 g/L

Ao meio descrito no item 3.1.4.11 adicionou-se 0,75 M ou 1 M de KCl.

3.1.4.17 YNB com adição de H_2O_2

Ao meio descrito no item 3.1.4.11 adicionou-se H_2O_2 (Vetec) estéril nas concentrações de 1 mM ou 2,5 mM (LI et al., 2016).

3.1.4.18 YNB com adição de $NaNO_2$

Ao meio descrito no item 3.1.4.11 equilibrado na temperatura de 50 °C adicionou-se $NaNO_2$ (Vetec) estéril nas concentrações de 1 mM ou 2,5 mM (LI et al., 2016).

3.1.4.19 Ágar para filamentação

YNB S/ Aminoácido S/ Sulfato de amônia (Sigma)	6,75 g/L
Agar (BD)	40 g/L
Dextrose (20%)	25 mL
Água MilliQ q.s.p	975 mL

Todos os componentes foram autoclavados por 40 minutos com exceção da dextrose. Após a autoclavagem a fonte de carbono (dextrose 20%) foi adicionada na concentração final de 0,5 %.

3.1.4.20 Ágar gema

Sabouraud Dextrose Agar (Himedia)	65 g/L
NaCl 1M (Synth)	68, 44 g/L
$CaCl_2$ 1M (Synth)	2, 5 mL
Egg yolk Emulsion (Himedia)	80 mL
Água MilliQ q.s.p	9,17 L

A gema de ovo estéril foi adicionada após a solução autoclavada e equilibrada a 55 °C.

3.1.4.21 Agar Níger Seed

Semente de Niger (*Guizotia abyssinica*) 7,5%	75 g/L
Dextrose (Synth) 1%	10 g/L
Agar (BD) 2%	20 g/L

Água MilliQ q.s.p	1 L

As sementes de Niger previamente maceradas foram autoclavadas por 15 minutos em 350 mL de água MilliQ e filtradas com auxílio de gaze ou papel de filtro. Em seguida, foram adicionados os outros componentes, o volume completado para 1 L e autoclavado por 40 minutos.

3.1.4.22 Christensen's urea Agar

Peptona (Difco)	1g/L
Dextrose (Synth)	1g/L
NaCl 1M (Synth)	5 g/L
Fosfato de potássio monobásico (Synth)	2 g/L
Ureia (Sigma)	20 g/L
Vermelho de fenol (Synth)	0,012 g/L
Agar (BD)	20g/L
Água MilliQ q.s.p	1L

O ágar foi adicionado à 900 mL de água MilliQ e autoclavado. Os outros componentes foram diluídos em 100mL de água MilliQ e esterilizado por filtração e adicionados ao ágar previamente equilibrado na temperatura de 55°C. O meio foi vertido em tubos de ensaio estéreis (13x100mm) e inclinados até a solidificação.

3.1.4.23 Solução de Dextrose 20 %

Dextrose D-glicose (Synth)	200 g/L
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

3.1.4.24 Solução de HCl 1 M

HCl (Synth)	83 mL
Água MilliQ q.s.p	917 mL

A solução foi preparada e mantida a temperatura ambiente.

3.1.4.25 Solução de aminoácidos 10X

Histidina (Sigma)	0,1 g/L
Metionina (Sigma)	0,2 g/L
Triptofano (Sigma)	0,2 g/L
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi esterilizada por filtração e armazenada a 4°C

3.1.5 **Antibióticos**

Descrição dos antibióticos utilizados nesta pesquisa.

3.1.5.1 Solução de Higromicina

Higromicina	50 mg/mL

O antibiótico Higromicina foi adquirido da Thermo Fisher Scientific e vem previamente diluído, tendo sido adicionado ao meio YPD líquido ou sólido na concentração final de 200 µg/mL no meio equilibrado à temperatura de 55 ºC

3.1.5.2 Solução estoque de G418 (Gentamicina)

G418 (Thermo Fisher Scientific)	200 mg/mL

A solução estoque foi preparada em água MilliQ, esterilizada por filtração e estocada à -20 °C. Concentração final de uso foi de 200 µg/mL.

3.1.6 **Eletroforese**

Descrição das soluções utilizadas nesta técnica.

3.1.6.1 Solução estoque de brometo de etídeo (10 mg/mL)

Brometo de etídeo (Sigma)	1 g
Água MilliQ q.s.p	100 mL

A solução de Brometo de etídeo foi preparada e mantida a 4ºC na ausência de luz.

3.1.6.2 Gel de agarose 0,8%

Agarose (Sigma)	8g/L
Tampão TAE 1X	1L
Brometo de etídeo	175 µg/µL

A agarose foi dissolvida no TAE (1X) por aquecimento. Adicionou-se brometo de etídeo quando a solução atingiu 50ºC e verteu-se no molde de gel.

3.1.6.3 Solução estoque de tampão de corrida para eletroforese (50 X)

Triz Base 2M	242 g/L
Ácido acético glacial 2M	57,1 mL/L
EDTA 0,5 M pH 8,0 50mM	0,1 mL/L
Água MilliQ	1 L

A solução foi autoclavada e mantida à temperatura ambiente.

3.1.6.4 Tampão de amostra para eletroforese (6 X)

Azul de bromofenol (Synth)	0,25 %
Glicerol (Synth)	30 %
Xileno Cianol (Sigma)	0,25 %

A solução estoque foi preparada em água MilliQ estéril e armazenada a 4ºC.

3.1.7 **Extração de DNA**

Descrição das soluções utilizadas nesta técnica.

3.1.7.1 Tampão de extração

Triton X-100 (Sigma) 10 %	2 %
SDS (Synth) 10 %	1 %
NaCl (Synth) 2 M	100 mM
Tris (Sigma) pH 8,0	10 mM
EDTA (Synth)	1 mM
Água MilliQ q.s.p.	100 mL

Solução foi autoclavada e mantida à temperatura ambiente

3.1.7.2 Tris-EDTA (TE)

Tris (Sigma) pH 8,0	10 mM
EDTA (Synth)	1mM

Solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente.

3.1.8 **Southern Blot**

Descrição das soluções utilizadas nesta técnica.

3.1.8.1 Solução de desnaturação

NaOH 10 M (Synth)	50 mL/L
NaCl 5 M (Synth)	300 mL/L
Água MilliQ q.s.p.	650 mL

3.1.8.2 Solução de neutralização

NaCl 5 M	300 mL/L

Tris base 1 M (Sigma)	668 mL
Água MilliQ q.s.p.	32 mL

3.1.8.3 Solução estoque SSC 20 X

NaCl 5 M (Synth)	300 mL/L
Citrato de sódio (Synth)	88,2 g
Água MilliQ q.s.p.	800 mL

O pH foi ajustado para 7.0 e a solução foi autoclavada. Para obter a solução 2X concentrada, 100mL da solução 20X foi diluída em 900mL de água MilliQ.

3.1.8.4 Solução de lavagem 1

SSC 20X	5 mL
20% SDS	2,5 mL
Água MilliQ q.s.p	447,5 mL

3.1.8.5 Solução de lavagem 2

SSC 20X	2,5 mL
20% SDS	2,5 mL
Água MilliQ q.s.p	495 mL

3.2 *Métodos*

Descrição de todas as metodologias que foram empregadas nesta pesquisa.

3.2.1 Crescimento de microrganismos em cultura líquida

As culturas foram realizadas a partir de colônias isoladas de cada uma das linhagens de interesse, inoculadas em tubos de ensaios contendo 5 mL do meio de cultura apropriado, incubadas sob agitação de 150 r.p.m. em shaker orbital. A

temperatura e o tempo de crescimento variaram de 30 a 37 °C e de 16, 24 e até 48 h, de acordo com o delineamento experimental realizado.

3.2.2 Construção de cassetes de deleção por "Double joint".

O duplo mutante *aap1*::Hyg^R/*aap2*::*Neo*^{R} foi feito pela transformação da linhagem CNU037, a qual contém a deleção do gene *AAP*2 (MARTHO et al., 2016), com a construção de deleção para *AAP*1, construída pelo aluno de iniciação científica João Miguel Nunes e gentilmente cedida para este trabalho. A metodologia empregada para construção do cassete de deleção *aap1*::Hyg^R foi descrita na literatura (KIM et al., 2009). Na estratégia descrita por este autor, a sequência codificadora do gene de interesse foi substituída por um marcador seletivo que é um gene de resistência à antibiótico. A sequência deste marcador é flanqueada pelas sequencias do promotor e do terminador do gene de interesse, o que vai dirigir a integração homóloga do cassete de deleção no momento da integração. A construção foi feita por fusão de produtos de PCR segundo o protocolo as bandas de tamanho esperado foram purificadas com o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) como constam nas especificações do fabricante.

3.2.3 Transformação de *C. neoformans* por técnica de biolística

De acordo com o protocolo de (TOFFALETTI et al., 1993), a linhagem CNU037 (*aap*2Δ::*Neo*^{R}) de *C. neoformans* foi cultivada em 50 mL de meio YPD, com agitação de 150 rpm, a 30ºC por um período de 16 a 20 horas. As células foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, em seguida lavadas com água estéril e ressuspendidas em 500µL de água destilada esterilizada. Com auxílio de uma alça de Drigalski estéril esta suspensão foi espalhada em duas placas contendo meio YPD e 1M de sorbitol. Posteriormente, 1µg de DNA foi adicionado à 50µL de partículas de ouro (0,6 µm) previamente preparadas e suspendidas em etanol absoluto ou 50% de glicerol em um eppendorf estéril. A suspensão foi homogeneizada em vortex Gene-2 (Scientific Industries) durante 5 segundos, acrescida de 50µL de $CaCl_2$ (2,5 M) e novamente agitou-se em vortex por 5 segundos, acrescentou-se 20µL de espermidina (1 M) e o material foi homogeneizado em vortex e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por 10

segundos em microcentrífuga (13.000 rpm) e o sobrenadante removido. Adicionou-se 140 µL de etanol 70% para lavagem das partículas recobertas pelo DNA e novamente centrifugados para remoção do sobrenadante. Repetiu-se a lavagem com 140 µL etanol (absoluto), centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante. As partículas foram ressuspendidas em 20 µL de etanol 100%. Este volume foi transferido para dois macrocarreadores (previamente esterilizados com etanol 100%) dividindo em duas alíquotas de 10µl. Para prosseguir com o disparo os discos foram inseridos nos suportes metálicos previamente flambados. O disco de ruptura utilizado foi de 1350 psi de pressão, as partículas foram aceleradas a uma distância de 60 mm do alvo, no vácuo com a proteção de tela metálica previamente flambada. Após 24h de incubação a 30°C as células foram removidas com auxílio de uma espátula estéril em 10mL de água MilliQ estéril. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm, ressuspendidas em 500µL de água MilliQ estéril e inoculado em placa de seleção contendo Higromicina, sendo incubadas pelo período de 7 dias a 30 °C.

3.2.4 Extração de gDNA de *C. neoformans* (HOFFMAN; WINSTON, 1987)

As linhagens foram crescidas em meio YPD e as células coletadas por centrifugação (10 minutos a 4000 rpm). O pellet foi ressuspendido em 0,5 mL de tampão de extração e transferidas para tubos de rosca estéreis contendo pérolas de vidro (0,5mm) e 0,5mL de fenol-clorofórmio. As células ficaram sob agitação durante 10 minutos com o auxílio do vórtex, seguido de centrifugação por 4 minutos a 8000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo estéril e acrescentou-se 50 µL de NaAC 3 M e 1 mL de etanol 100% para precipitar o DNA. Esta suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 4°C (13000 rpm), descartou-se todo o sobrenadante e foi acrescentado 0,5 mL de etanol 70% para lavar o precipitado. Novamente foi centrifugado por 5 minutos (13000 rpm) e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 50 µL de TE contendo 10 µg/mL de RNase A e o material foi incubado a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, todas as amostras foram quantificadas e armazenadas a -20 °C.

3.2.5 Reação de PCR

Para reação de PCR (volume final de 50 µL) foram adicionados 1unidade de *ExTaq* (Takara), 5 µL de *ExTaq buffer* 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl e 1,5 mM $MgCl_2$), 4µL de 2,5 mM dNTP's (concentração final de 0,2 mM), 0,2 µM de cada oligonucleotídio, 50ng/µL de material genômico e o volume foi completado para 50µL com água MilliQ estéril. As amplificações foram realizadas no termociclador (BioRad ou Applied Biosystems) nas condições de 1 ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos, sendo a desnaturação 94 °C por 30 segundos, a condição de anelamento foi de acordo com a temperatura de "melting" dos oligonucleotídeos por 30 segundos, 72°C por tempo dependente do tamanho do amplicom (1 minuto para cada 1000pb), seguido da extensão por 7 minutos a 72 °C.

3.2.6 Eletroforese

Após a amplificação, adicionou-se 3µL de LB *loading buffer* (LB) e as amostras foram aplicadas no gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo. O resultado da eletroforese foi visualizado sob luz ultravioleta com auxílio de um transiluminador, com filtro de cor laranja, sendo que os registros foram feitos em fotodocumentador LPix (Loccus).

3.2.7 Reação de PCR diagnóstico

Para o PCR diagnóstico de mutações de *C. neoformans* utilizou-se colônias transformantes das placas de seleção após a transformação por Biolística. Essas placas continham YPD acrescido de G418 e/ou YEPD contendo Higromicina. Com o auxílio de uma ponteira transferiu-se uma pequena quantidade de células de uma colônia isolada de uma das placas para um tubo de PCR contendo 10 µL de água MilliQ estéril. O tubo contendo as células foi aquecido a 95 °C durante 10 minutos para lise celular. Seguiu-se com a etapa de amplificação e eletroforese descrita anteriormente.

3.2.8 Southern blot para confirmação de deleção gênica

Um total de 15µg de DNA genômico do selvagem e dos mutantes foi digerido com 10 U da enzima de restrição apropriada. As digestões foram feitas conforme a

indicação do fabricante da enzima de restrição e as reações foram incubadas entre 16 e 24 horas à 37 ºC. Todo o volume da reação de digestão acrescido de 3µL de 6 X *Loading buffer* foi aplicado em gel de agarose 0,8 % contendo brometo de etídeo. A migração eletroforética foi feita à 100 V durante 3 a 4 horas (ou até que o azul de bromofenol chegasse ao final do gel). O gel foi marcado (um corte em uma das extremidades superiores) para orientação e também registrado com auxílio de uma régua fluorescente (ao lado do marcador de peso molecular), colocando o número "zero" da régua na mesma direção do poço. Após, ocorreu a depurinação do gel por 2 vezes de 15 minutos com HCl 0,25 M. A desnaturação durou 1 hora com auxílio da solução de desnaturação sob agitação. As mesmas condições foram aplicadas com a solução de neutralização. A transferência do DNA para a membrana de nylon (Hybond) foi feita com solução 2X SSC durante 16 -18 horas.

Para a síntese das sondas foi utilizado o kit da Roche PCR DIG *probe synthesis kit* seguindo as especificações do fabricante e usando oligonucleotídeos específicos responsáveis por amplificar uma região de interesse.

A membrana foi lavada com solução de 2X SSC e colocada para secar ao ar livre. Após, a membrana foi depositada em uma garrafa de vidro própria para hibridização contendo 5 mL de solução de hibridização (Roche) para pré-hidridizar por 30 minutos a 50°C, sob rotação 10rpm. Em paralelo, a sonda foi desnaturada a 100°C por 5 minutos e rapidamente transferida para o gelo. Adicionou-se a sonda à garrafa de hibridização na proporção de 0,5µL/mL de solução de hibridização. Prosseguiu-se com hibridização por um período de 16 a 24 horas.

Após a hibridização, a membrana foi removida da garrafa e lavada por duas vezes durante 5 minutos com a solução de lavagem 1 (item 3.1.8.4). Descartou-se a solução e lavou-se novamente a membrana com a solução de lavagem 2 previamente aquecida a 50°C por duas vezes (cada lavagem por 15 minutos), item 3.1.8.5.

Novamente a membrana foi lavada usando a solução *DIG Washing buffer* 1X concentrado durante 5 minutos, seguiu-se com a incubação durante 30 minutos com a solução de bloqueio 1X. Após, incubou-se novamente a membrana em solução de

anticorpo durante 30 minutos, em seguida foram feitas duas lavagens com *DIG Washing buffer* 1X por 15 minutos. A membrana foi equilibrada por 5 minutos em solução de revelação 1X e inserida em saco plástico do tipo *ziploc.* Adicionou-se a solução de revelação CPD-Star *ready for use* (Roche), e foi incubada por 5 minutos no escuro. A revelação do feita em fotodocumentador com quimiluminescência Alliance LD4 (Uvitec Cambrige).

3.2.9 Ensaio de assimilação de L-aminoácidos

As linhagens de interesse foram cultivadas de acordo com item 3.1.4.1, as células coletadas por centrifugação e lavadas com PBS (1 X) por 3 vezes e diluídas em PBS 1X para a concentração de $2x10^6$ UFC/mL, no volume total de 3mL. As amostras foram incubas à 30 °C sob agitação (150 rpm) durante duas horas para esgotar as reservas internas de nutrientes. Após, as amostras foram diluídas para a concentração de $2x10^4$ cel/mL e 10 µL desta suspensão foi inoculada em placa de 96 poços previamente preparada contendo 90 µL de meio sintético sem sulfato de amônia (YNB -N) acrescido de 10 mM de um único aminoácido como fonte de nitrogênio. Para este ensaio foram usados 17 aminoácidos (kit de L-aminoácidos SIGMA). Após o preparo, as placas foram protegidas da luz para evitar a fotodegradação de alguns aminoácidos e incubadas nas temperaturas de 30 e 37 °C. O controle positivo do ensaio foi o meio YNB +N-AA e o controle negativo o meio YNB-N-AA. Todos os aminoácidos foram testados em triplicatas técnicas e biológica.

Após o período final de incubação o crescimento foi avaliado por turbidimetria em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 600 nm. A análise estatística foi realizada conforme o item 3.2.21.

3.2.10 Ensaio de virulência *in vivo*

Os ensaios utilizando o modelo animal de invertebrados de *Galleria mellonella* foram conduzidos de acordo com o protocolo de (MYLONAKIS et al., 2005). As colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio rico e incubadas com agitação orbital a 150 rpm por 16-18h. Posteriormente, as suspensões foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes em PBS estéril e ajustadas para $1x10^6$ célula / mL em PBS

suplementado com ampicilina (20 mg / kg de peso corporal). Grupos de 16 lagartas com peso médio de 200mg foram inoculados com 10µL da suspensão com o auxílio de uma seringa Hamilton na região da última pro-pata. As lagartas foram separadas em placas de Petri de vidro e incubadas a 30 °C e 37 °C durante 8 dias. Diariamente as lagartas foram monitoradas observando- se os movimentos espontâneos ou provocados com pinça previamente esterilizada. O experimento foi concluído quando as larvas morreram, ou formaram casulos.

3.2.11 Diluição seriada

As linhagens de interesse foram cultivadas conforme descrito no item 3.2.1. Posteriormente as células foram coletadas por centrifugação (4000rpm /10 minutos), lavadas e ressuspendidas em 1mL de água milliQ estéril. A padronização da concentração das células para $2x10^6$, $2x10^5$,$2x10^4$,$2x10^3$ e $2x10^2$ cel/mL foi possível com auxílio da câmara de *Neubauer* e diluições seriadas.

3.2.12 Avalição do crescimento

A avaliação do crescimento foi realizada pela inoculação de 5µL de cada diluição seriada nas placas contendo o meio de interesse e incubadas a 30 e 37 °C por 48h. A avaliação do experimento (visualmente) foi de acordo com o crescimento das linhagens analisadas comparada ao controle do ensaio (linhagem selvagem H99). O registro do experimento foi feito com auxílio do fotodocumentador Alliance LD4 (Uvitec Cambrige) no prazo final de cada teste. A metodologia empregada foi conforme (ZARAGOZA; GANCEDO, 2000).

3.2.13 Ensaio de produção de urease

Uma colônia isolada de cada linhagem de interesse foi inoculada em meio *Christensen's urea Agar* (item 3.1.4.22) com auxílio de alça estéril perfurando o meio até a base do tubo e estriando a superfície do mesmo. A incubação foi feita a 30 °C por 16-48h. Para controles do ensaio foi utilizado à linhagem selvagem (*H99*) como controle positivo e a *Saccharomyces cerevisiae* (*BY4742*) como negativo. O resultado positivo

para a urease altera a coloração do meio de amarelo para vermelho (ou rosa) enquanto no controle negativo não ocorre alteração, permanecendo a cor amarela.

3.2.14 Ensaio de produção de melanina

Conforme (PALIWAL; RANDHAWA, 1978), todas as linhagens mutantes e controles foram cultivadas em YPD líquido por 16-24 h e crescimento. Esta suspensão foi lavada 3 vezes com água e realizado contagem celular seguida de diluição até $2x10^6$ células por mL. Inoculou-se 5 µL na placa de agar *niger seed,* (item3.1.4.21 3.1.4.21) e incubou-se a 30 °C por cinco dias. Para controle positivo e negativo foram usadas as linhagens de *C. neoformans H99* (selvagem) e *H86* (mutante deficiente para laccase), respectivamente. O resultado positivo para produção de melanina é a observação do pigmento marrom na colônia, enquanto a coloração amarela clara corresponde a não produção de melanina.

3.2.15 Ensaio para avaliação de produção de fosfolipase

Os ensaios de fosfolipase foram feitos a partir de meio de cultura descrito por (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982) e com modificações publicadas em (DE ASSIS GONTIJO et al., 2017), conforme descrito no item 3.1.4.20. As linhagens (na concentração celular de $2x10^6$) foram inoculadas nas placas de ágar gema e incubadas a 30°C no período máximo de cinco dias. A mensuração dos halos de precipitação e colônia foi usada para calcular a proporção entre colônia e halo de precipitação (Pz= $\frac{dc}{dpc}$) de acordo com o protocolo. A Pz é o diâmetro da colônia (dc) dividido pelo diâmetro da colônia somado ao halo de precipitação (dpc). As medidas foram realizadas utilizando régua milimétrica. Os dados foram tratados estatisticamente segundo ANOVA (GRAPHPAD PRISM 7).

3.2.16 Ensaio para avaliação da produção de cápsula polissacarídica

O cultivo das linhagens foi feito em meio YPD por 18-24 h. As células foram coletadas por centrifugação (400 rpm por 5 minutos) e lavadas 2 vezes com PBS (1X), e ressuspendido em meio CO_2 Independente 1X (GIBCO). As suspensões de células foram diluídas até a DO_{600nm} (Espectrofotômetro Bel Photonics) no volume final de 3mL,

incubou-se as culturas a 30° e 37°C sob agitação (150 rpm). Foram recolhidas alíquotas de 5µL de cada cultura, nas diferentes temperaturas, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, aos quais foram adicionados 3µL de Nanquim da Índia (REMEL – BACTIDROP^{TM}). As cápsulas foram visualizadas através de microscopia de campo escuro entre lâmina e lamínula. O equipamento usado foi um microscópio Olympus BX51. Para calcular o volume da cápsula, o diâmetro de toda a célula e o corpo celular foram medidos com o programa ImageJ e o volume da cápsula foi definido como a diferença entre o volume da célula inteira (célula de levedura + cápsula) e o volume do corpo da célula. Para o cálculo do volume capsular utilizou-se protocolo de acordo com (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). Cem células foram medidas para cada determinação. Os dados foram tratados estatisticamente segundo ANOVA (GRAPHPAD PRISM 7).

3.2.17 Ensaio para avaliação de resistência ao estresse salino, osmótico, alcalino, oxidativo e nitrosativo.

As diluições das amostras de interesse foram preparadas conforme descrito no item 3.1.4.1. Para avaliação do estresse salino (NaCl) e osmótico (KCl) em placas YNB utilizou-se os meios descritos no item e 3.1.4.15 e 3.1.4.16, respectivamente3.1.4.16. Para a mesma avaliação em YEPD utilizou-se os meios descritos nos itens 3.1.4.2 e 3.1.4.3, respectivamente.

Para os testes de resistência ao estresse alcalino, as linhagens foram inoculadas em placas de YPD (item 3.1.4.1) ou YNB (item 3.1.4.11) onde o pH de ambos os meios de cultura fora ajustado para 6.0, 7.0 ou 8.0.

Nos meios para avaliação do estresse oxidativo (H_2O_2) e nitrosativo ($NaNO_2$), em placas YNB utilizou-se os meios descritos no item 3.1.4.17 e 3.1.4.18, respectivamente. Para a mesma avaliação em YEPD utilizou-se os meios descritos nos itens 3.1.4.4 e 3.1.4.5. Em todos os casos as placas foram incubadas a 30° e 37 °C por 48h.

Os métodos de crescimento, inoculação (diluição) e avaliação foram conforme descrito nos itens 3.2.1, 3.2.10 e 3.2.12 respectivamente. Após o tempo de incubação,

registraram-se os resultados com auxílio do fotodocumentador Alliance LD4 (Uvitec Cambrige).

3.2.18 Concentração inibitória mínima – MIC

Para avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) do antifúngico Anfotericina B foi usada a metodologia da fita E-test de acordo com o protocolo e especificação do fabricante (Biomérieux, http://www.biomerieux-sua.com). Colônias isoladas das linhagens mutantes e H99 foram obtidas a partir de culturas previamente crescidas em meio YPD sólido por 48-72h e adicionadas individualmente em 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%). As suspensões foram padronizadas utilizando a escala 1 de McFarland. Posteriormente, as culturas foram inoculadas individualmente em meio RPMI acrescido de MOPS com auxílio de swab estéril. Passado 15 minutos para secagem das placas, as fitas de E-test contendo fluconazol ou anfotericina B foram posicionadas sobre a cultura. As culturas foram incubadas a 30° e 37°C por 72h e os resultados foram interpretados conforme as instruções do fabricante.

Para o antifúngico FLuconazol e o composto Eugenol foram utilizados diluição seriada em placas de 96 poços. Primeiramente conduziu com a realização da suspensão celular utilizando 5 colonias em 5 mL de salina 0,85% (suspensão I) compatível a escala 0,5 de McFarland. Para a solução II utilizou-se 0,1 mL da suspensão I em 9,9 mL de salina. Para a solução III foi realizado diluição 1:20 usando a suspensão II em meio RPMI. Para a diluição da droga foi realizado estoque da solução com 400 µL de RPMI para 1 mg da droga. Para realização do teste foi adicionar 20 µl da solução estoque da droga no poço 1 e nos poços 2 a 8 adicionado 10µl de meio RPMI. Após, prosseguiu-se com diluição seriada, utilizando 10µl do poço 1 e introduzindo no poço 2, homogeneizando e retirando 10µL para 3, e assim sucessivamente. Foi descartado 10 µL após o poço 7. Por fim foi adicionado 90 µL da suspensão III em todos os poços. O teste foi realizado a 30 e 37 ºC por 48h para posterior análise de crescimento em leitor de placa utilizando OD_{600nm}.

3.2.19 Ensaio para avaliação de viabilidade da parede e membrana celular

Conforme descrito por AN et al.,(2014), as linhagens mutantes e selvagem foram inoculadas em meio YPD suplementado com 0,5% Congo Red e 0,03% SDS conforme descrito nos itens 3.1.4.6 e3.1.4.7 3.1.4.7 (respectivamente), para avaliação da integridade da parede celular e membrana plasmática. Os métodos de crescimento, inoculação (diluição) e avaliação foram conforme descrito nos itens 3.2.1, 3.2.10 e 3.2.12 respectivamente. Após o tempo de incubação, registraram-se os resultados com auxílio do fotodocumentador Alliance LD4 (Uvitec Cambrige).

3.2.20 Avaliação da capacidade de acasalamento e frutificação haploide

A capacidade das leveduras de realizar acasalamento e a filamentação haploide foi avaliada em meio Agar filamento (CASADEVALL; PERFECT, 1998). As linhagens com deleção das permeases Aap1, Aap2, Aap4, Aap6, Aap8, Aap1/Aap2, Mup1, Mup3, Mup1/Mup3, H99, KN99α e KN99a foram cultivadas e preparadas conforme descrito no item 3.2.1.

O co-cultivo foi feito misturando os tipos sexuais opostos (mutante α + KN99a) na concentração final de $2x10^6$ células/mL. Foram feitos “spots” de 5 µL no meio de cultivo. Para a avaliação da filamentação haploide, foram feitas suspensões individuais de cada linhagem. As placas foram incubadas em temperatura ambiente na ausência de luz por 43 dias e observadas periodicamente com auxílio de uma lupa (Optimus TM-30) e o registro final foi feito com o auxílio do microscópio (Olympus BX51) com aumento de 10x.

3.2.21 Testes estatísticos

Os experimentos envolvendo medições foram feitos em triplicata técnica e biológica. Todos os testes estatísticos foram feitos com o software *Prism 7.0* (GraphPad). Os dados foram analisados por 1 way/ 2 way ANOVA com o teste de Tukey para comparar todos os tratamentos entre si. Em todos os testes foi considerado * $p < 0,03$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$ e **** $p < 0,0001$.

3.2.22 Bioinformática

A busca de similaridade entre seqüências biológicas (para *C. neoformans, S. cerevisiae* e *H. Sapiens*) foi realizada no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information), através da plataforma online Blastp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) que utiliza bancos de dados de seqüências proteicas e calcula a significância estatística.

Para análise e classificação de domínios e assinaturas de proteínas foi utilizado o banco de dados online do MotifScan (https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) e InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/).

4 RESULTADOS

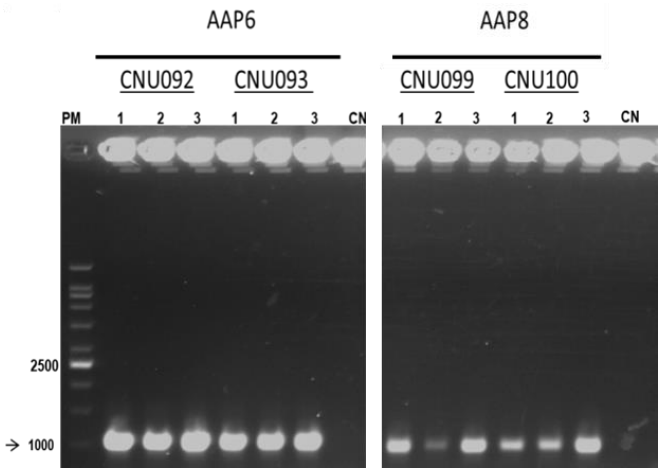
Os dados publicados de Fernandes et al., (2015) e Martho et al., (2016) mostraram que as permeases de aminoácidos não apenas são reguladas no nível transcricional pela condição nutricional, como também mostraram que duas permeases, Aap4 e Aap5, são imprescindíveis para a captação de aminoácidos e a sobrevivência de *C. neoformans in vivo* e *in vitro*. As outras permeases estudadas (Aap2, Mup1, Mup3) foram consideradas acessórias.

4.1 Confirmação e caracterização genotípica dos mutantes simples *aap6*Δ, *aap8*Δ e duplo mutante *aap1*Δ/*aap2*Δ

As permeases Aap6 e Aap8 não foram estudadas, porém o Laboratório de Interações Microbianas dispunha de linhagens mutantes para estas duas permeases individualmente, as quais foram construídas e confirmadas por Southern blot pela aluna de iniciação científica Camila de Oliveira Ferreira.

As linhagens denominadas CNU092 ou CNU093 referem-se a *aap6Δ* e CNU099 ou CNU100 referem-se a *aap8Δ*, todas foram retiradas do crioestoque e submetidas ao PCR diagnóstico para confirmar a deleção dos respectivos genes. A **Figura 9** ilustra as bandas referentes à confirmação das deleções e o controle negativo (CN, sem banda), confirmando o genótipo das linhagens. Os primers usados nestas reações de amplificação estão descritos no **Anexo B** e os mapas representativos dos *loci*, bem como as estratégias de deleção dos estão no **Anexo D e E**.

Figura 9. PCR diagnóstico para confirmação da deleção dos genes *Aap6* (CNU092 e 093) e *Aap8* (CNU099 e 100). Ambas possuem um amplicon confirmatório de 1kb. CN refere-se ao controle negativo. O controle positivo foi realizado, mas não ilustrado.



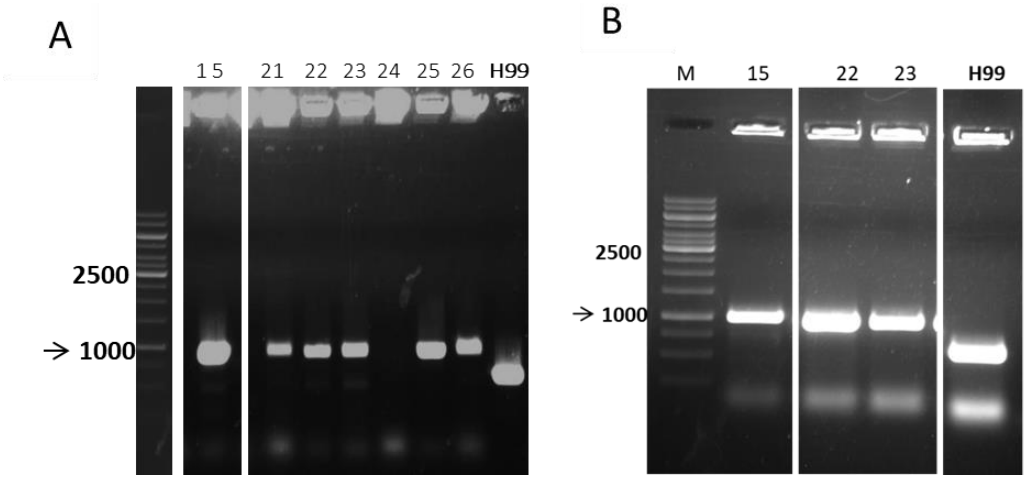
O efeito da deleção da permease Aap1 sobre os fatores de virulência foi estudado pelo aluno de iniciação científica João Miguel Nunes e não apresentou fenótipos que diferenciasse esta linhagem mutante do selvagem H99. No entanto, há uma semelhança considerável na sequência de aminoácidos (80,9%) entre as permeases Aap1 e Aap2 **(Anexo C**), sugerindo que estas possam ser redundantes, como é o caso de Aap4 e Aap5. Portanto, foi do escopo deste trabalho, além de realizar a análise fenotípica dos mutantes *aap6Δ* e *aap*8*Δ*, também criar e analisar um duplo mutante das permeases Aap1 e Aap2 (*aap1Δ/aap2Δ*).

A construção do duplo mutante partiu da linhagem CNU037 (*aap2Δ::Neo*^{R}), a qual foi descrita por Martho et al . (2016). Esta linhagem serviu como receptora da construção de deleção *aap1Δ::Hyg*^{R} que foi introduzida por biolística (Tofalletti et al ., 1983). O DNA recombinante contendo a construção de deleção da região codificadora do gene *AAP1* foi gentilmente cedido pelo aluno João Miguel Nunes e a sua obtenção foi pelo método descrito por Kim et al., (2009)) e encontra-se esquematizado no **Anexo F**.

Vinte e seis transformantes foram selecionados em meio rico contendo higromicina, os quais foram testados por PCR diagnóstico quanto à integração homóloga do cassete de deleção no *locus AAP*1. Destes, 6 acusaram a presença da

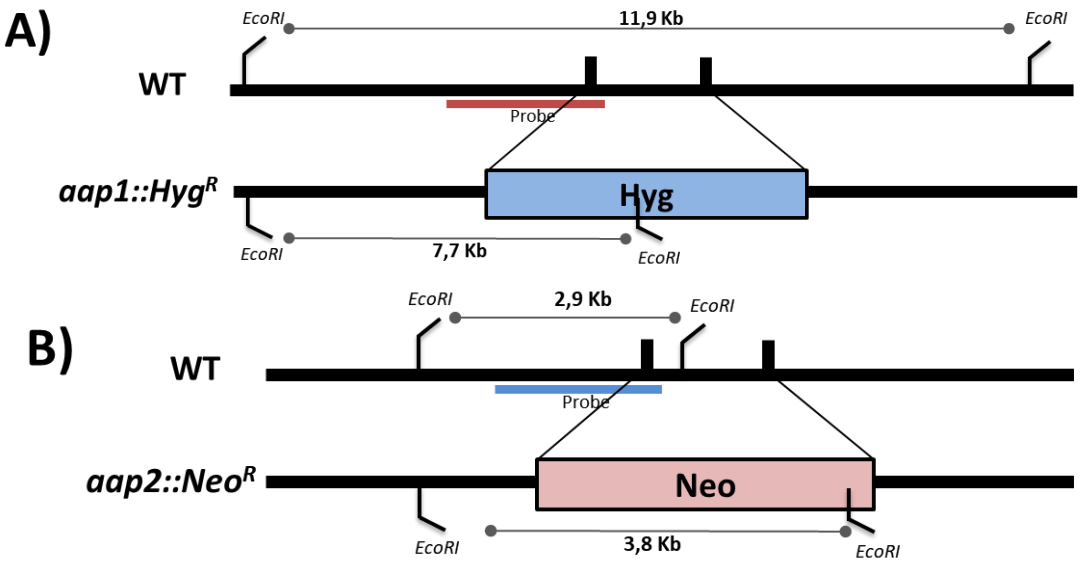
banda que sugere a integração homóloga do cassete de deleção *aap1Δ::Hyg*^{R} (**Figura 10A)**. Todos os 6 transformantes foram testados por PCR diagnóstico para detectar a presença da banda que confirma deleção da permease *AAP2*, que é a mutação residente da linhagem CNU037 (*aap2Δ::Neo*^{R}) que foi usada como receptora. Três transformantes mostraram a banda que sugere a integração homóloga do cassete de deleção *aap2Δ::Neo*^{R} como ilustrado na **Figura 10B**.

Figura 10. PCR para confirmação da dupla deleção das permeases 1 e 2. A) Foram testados 26 transformantes, e destes, 6 amplificaram o fragmento diagnóstico de 1Kb da deleção da permease 1 (15, 21, 22, 23, 25 e 26). B). Esses transformantes positivos foram submetidos à amplificação com primer específicos para confirmação da deleção de *AAP*2 (*aap2Δ* 15, 22 e 23). H99 foi utilizado como controle positivo em todos os casos.



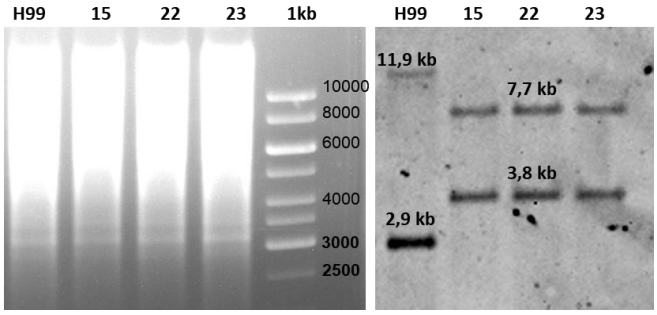
Uma vez feitas todas estas confirmações, os transformantes números 15, 22 e 23 foram submetidos à técnica de Southern Blot para confirmação final. A análise *in silico* mostrou que a digestão do DNA genômico com *Eco*RI do tipo selvagem H99 e dos mutantes deve mostrar uma diferença no tamanho das bandas de 11,9 para 7,7 Kb no caso do *locus AAP*1 (**Figura 11A**) e de 2,9 para 3,8 Kb para o *locus AAP*2 (**Figura 11B**), para o selvagem e mutantes, respectivamente. A posição das duas sondas (probe) pode ser vista na mesma imagem indicadas com barra vermelha e azul.

Figura 11. **Estratégia de Southern Blot para confirmação das mutações *aap1::Hyg^R/aap2::Neo^R*.** A) Mapa de restrição da enzima *Eco*RI para o locus *AAP*1. B) Mapa de restrição da enzima *Eco*RI para o locus *AAP*2. Kb: kilobase**.**



A **Figura 12** mostra a imagem do Southern blot após a revelação, onde é possível detectar os tamanhos das bandas esperadas através da comparação com o marcador de peso molecular da migração eletroforética do gel de agarose, confirmando assim a composição genotípica dos duplos mutantes, os quais foram designados pelos códigos: CNU114, CNU116 e CNU118.

Figura 12. O painel esquerdo mostra o gel de agarose com os DNAs do selvagem (H99) e dos mutantes (15, 22 e 23) digeridos com *Eco*RI, o marcador de peso molecular é 1 Kb Ladder (Fermentas). O painel da direita mostra o Southern blot após a revelação, onde é possível ver a bandas correspondentes aos *loci* selvagens (11,9 e 2,9 kb) e as bandas dos mutantes de 7,7 e 3,8 Kb.



As linhagens mutantes simples *aap6Δ*, *aap8Δ* e os duplos mutantes *aap1Δ/aap2Δ* certificados por PCR diagnóstico e Southern Blot foram então usadas para avaliações fenotípicas, as quais serão descritas a seguir.

4.2 Comparação das permeases Aap6, Aap8, Aap1 e Aap2 com *S. cerevisiae* e *H. sapiens*

Primeiramente antes de iniciar a avaliação e classificação das permeases de aminoácidos Aap6, Aap8, Aap1 e Aap2 é de extrema importância analisar a homologia dessas permeases de *C. neoformans* com as permeases de humanos, já que a idéia primordial é, além de caracterizar essas permeases, também torná-las candidatas de futuros alvos moleculares para prospecção de inibidores.

Através da plataforma Blastp, disponível no site do NCBI, utilizou-se as sequências de aminoácidos das permeases Aap1, Aap2, Aap6 e Aap8 para localizar homólogos em *H. sapiens*, além de confirmar os dados de similaridade com *S. cerevisiae* de Fernandes et al., (2015) e Wipf et al., (2002). Na consulta foi visto que a maior similaridade de sequencia com *H. sapiens* refe-se a permeases Aap1 com 39% de identidade, porém a taxa de cobertura é de apenas 15%, como detalhado na **Tabela 1**, juntamente com as outras análises.

Proteínas de *C. neoformans*	***S. cerevisiae***				***H. sapiens***			
	Name protein	**Accession**	**Ident.**	**Query Cover**	**Name protein**	**Accession**	**Ident.**	**Query Cover**
Aap1 XP_012050220.1	Gap1	NP 012965.3	43%	87%	KIAA 1613	BAB13439.1	39%	15%
Aap2 XP_012052990.1	Lysine permease	NP 014131.1	40%	96%	KIAA 1613	BAB13439.1	32%	26%
Aap6 XP_012049659.1	Agp2p	NP 009690.1	39%	90%	Unnamed protein product	BAB71021.1	24%	29%
Aap8 XP_012046814.1	Hnmp1	NP 011438.1	25%	64%	Amino acid/ metabolite permease	SJM 32844.1	23%	63%

Tabela 1. Homólogos de permeases de *C. neoformans com S. cerevisiae* e *H. sapiens*.

Mesmo com os dados mostrando uma baixa similaridade entre as permeases de *C. neoformans* e *H. sapiens*, foi realizado uma pesquisa dos domínios e assinaturas de cada uma dessas proteínas através do banco de dados online do MotifScan e InterPro. A análise *in silico* mostrou que todas as proteínas de *C. neoformans, S. cerevisiae* e *H. sapiens* complartilham de um domínio conservado e codificam proteínas de membrana com assinatura de *permease de aminoácidos* (Amino acid/polyamine transporter I family / IPR002293 / AA/rel_permease1). Conforme esperado e ilustrado no **Anexo G** existe uma maior relação das permeases de *C. neoformans* com as permeases de *S. cerevisiae.* Também é possível constatar que *C. neoformans* e *H. sapiens* possuem níveis de similaridade e cobertura menores, sugerindo que estas permeases podem ser suficientemente diferentes para serem alvos seletivos de drogas.

4.3 Assimilação de L – aminoácidos

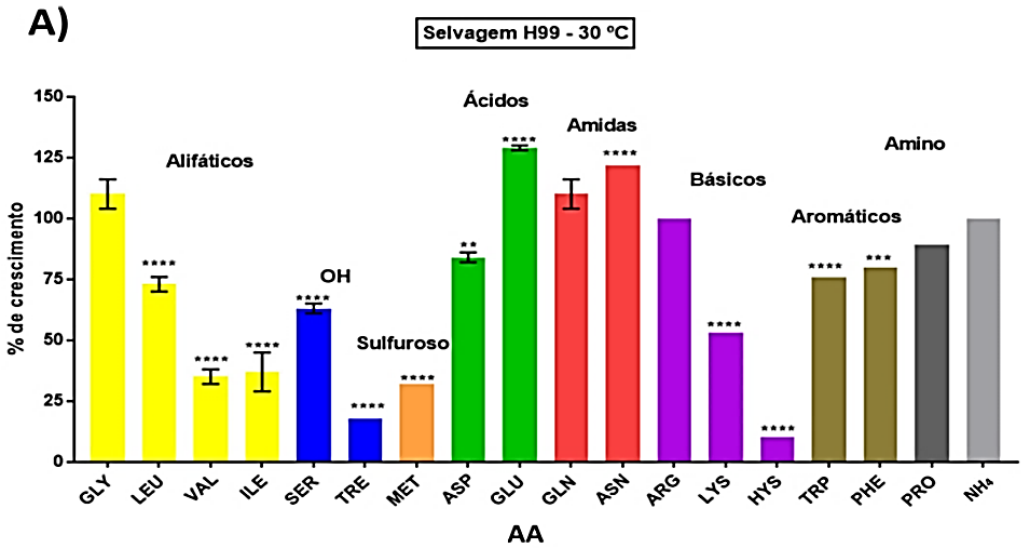
Segundo dados de Martho et al . (2016), as permeases Aap2, Aap4, Aap5, Mup1 e Mup3 de *C. neoformans* foram classificadas como transportadores globais de aminoácidos, indicando que essas permeases possuem a capacidade de assimilar vários aminoácidos do ambiente, em situações onde a fonte preferencial de nitrogênio (amônia) está ausente. Esse sistema de regulação gênica é conhecido como *repressão catabólica por nitrogênio* e garante que as vias secundárias de degradação de fontes de nitrogênio não sejam expressas enquanto as fontes de principais estão disponíveis, isto é, na presença de amônia (RUSSEL LEE et al., 2011; FERNANDES et al., 2015; WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

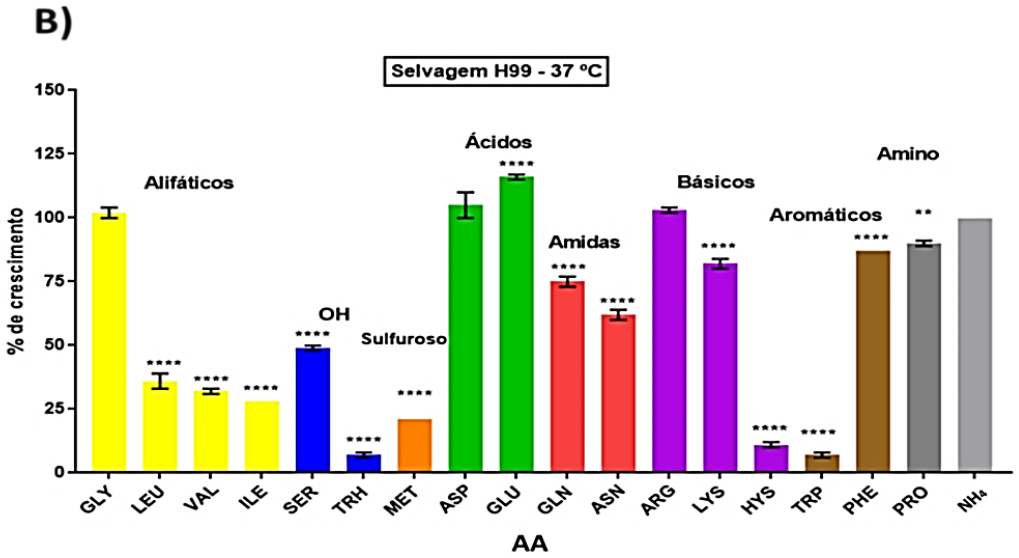
Diante dessa organização metabólica é viável esgotar todas as fontes de nitrogênio existente como reserva do fungo e induzí-lo a assimilar os aminoácidos fornecidos no meio de cultura. Através dessa técnica é possível analisar o impacto que as deleções das permeases AAP6, AAP8 e AAP1/AAP2 causam na absorção de aminoácidos quando comparado com crescimento da linhagem selvagem H99. Ao contrapor esses resultados, frente a uma única fonte de nitrogênio (neste caso, aminoácidos individualmente), é possivel avaliar, indiretamente, se uma permease tem preferência pelo transporte de um determinado aminoácido.

Para realização do experimento o selvagem e os mutantes em questão tiveram as suas reservas internas de nitrogênio esgotadas pela incubação das células já diluídas ($2x10^4$) em PBS (1X) a 30 ºC durante 2 horas com agitação. Após este período, as linhagens foram então incubadas em meio mínimo contendo um único aminoácido como fonte de nitrogênio e o crescimento dos mutantes avaliado em relação ao selvagem. Para este ensaio foram usados 17 aminoácidos, sendo que a L- tirosina foi excluída, devido à sua baixa solubilidade, assim como L- alanina e L- cisteína, por não suportaram o crescimento nem mesmo do tipo selvagem em 30 ° C ou 37 ° C. Os tratamentos considerados como controle positivo e negativo do ensaio foram os meios YNB +N-AA e YNB-N-AA, respectivamente. Todos os aminoácidos foram testados em triplicatas técnicas e biológicas.

Primeiramente, conduziu-se o ensaio de assimilação de aminoácidos para a linhagem H99, com o objetivo de determinar o padrão de crescimento do selvagem nas temperaturas de 30º e 37º C (**Figura 15 A e B**, respectivamente).

Figura 13. Padrão de crescimento da linhagem selvagem em aminoácidos como fonte única de nitrogênio. Porcentagem de crescimento da linhagem selvagem (H99) frente a 17 diferentes L- aminoácidos como fonte única de nitrogênio em comparação à fonte preferencial de nitrogênio (amônia) que representa 100% de crescimento. A concentração celular foi $2x10^4$ células/ mL, e o meio mínimo (YNB-N) acrescido de um único aminoácido a 30° C (A) e 37° C (B) por 48 horas. As diferenças significativas de variação de crescimento entre a assimilação individual de aminoácidos e a fonte preferencial (amônia) estão disponíveis. Significância de P: * $p < 0,03$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$ e **** $p < 0,0001$.





A capacidade de crescimento das linhagens mutantes também foi avaliada perante a fonte preferencial de nitrogênio (amônia) e comparada à linhagem selvagem uytilizando-se testes estatísticos. Não foram observadas diferenças significativas entre mutantes e a linhagem selvagem na mesma condição.

Para de fato avaliar a capacidade de assimilação de aminoácidos para cada uma das linhagens mutantes, todas foram crescidas em meio líquido YNB na ausência de sulfato de amônia e na presença de aminoácidos individuais a 30 ºC por 48h. Após o período final de incubação o crescimento foi avaliado por turbidimetria em espectrofotômetro de placa na $OD_{600\ nm}$. Todos os testes estatísticos foram feitos com o software *Prism 7.0* (GraphPad). Os dados foram analisados por 1way / 2way ANOVA com o teste de Tukey para comparar os tratamentos entre si.

Martho et al. (2016) demonstraram, através desta mesma técnica que um mutante *aap2Δ* a 30 ºC obteve crescimento reduzido quando utilizou os aminoácidos arginina, lisina e isoleucina como únicas fontes de nitrogênio (14%, 40% e 28% comparado ao selvagem, respectivamente).

Os dados obtidos em triplicatas técnicas e biológicas de assimilação de aminoácidos a 30 ºC (**Tabela 2**) do duplo mutante (*aap1Δ/aap2Δ*) vão de encontro aos resultados obtidos por Martho et al (2016), apontando uma diminuição de crescimento frente ao aminoácido básico arginina como única fonte de nitrogênio. Ademais, a dupla

mutação apontou alteração no crescimento a 30º C quando o mesmo esteve na presença do aminoácido glutamina como fonte única de nitrogênio, indicando que a combinação da dupla deleção pode afetar também a absorção deste aminoácido.

Para as deleções individuais de *AAP*6 *(aap6Δ)* e *AAP*8 *(aap8Δ)* não foram observadas reduções significativas de crescimento (em comparação ao selvagem) para todos os aminoácidos analisados.

		aap6Δ		***aap8Δ***		***aap1Δ/2Δ - CNU114***		***aap1Δ/2Δ - CNU116***	
	AA	**Média**	**Signif.**	**Média**	**Signif.**	**Média**	**Signif.**	**Média**	**Signif.**
ALIFÁTICOS	**GLY**	**93%**	NS	**93%**	NS	**77%**	NS	**83%**	NS
	LEU	**89%**	NS	**112%**	NS	**105%**	NS	**113%**	NS
	VAL	**84%**	NS	**85%**	NS	**81%**	NS	**80%**	NS
	ILE	**97%**	NS	**89%**	NS	**82%**	NS	**95%**	NS
OH	**SER**	**111%**	NS	**97%**	NS	**125%**	NS	**113%**	NS
	TREO	**73%**	NS	**108%**	NS	**93%**	NS	**91%**	NS
SULFUROSO	**MET**	**123%**	NS	**113%**	NS	**110%**	NS	**113%**	NS
ÁCIDOS	**ASP**	**82%**	NS	**104%**	NS	**88%**	NS	**81%**	NS
	GLU	**78%**	NS	**108%**	NS	**74%**	NS	**88%**	NS
AMINA	**GLN**	**84%**	NS	**88%**	NS	**64%**	**	**65%**	*
	ASN	**115%**	NS	**105%**	NS	**80%**	NS	**98%**	NS
BÁSICOS	**ARG**	**94%**	NS	**100%**	NS	**42%**	****	**40%**	****
	LYS	**108%**	NS	**102%**	NS	**89%**	NS	**71%**	NS
	HIS	**83%**	NS	**116%**	NS	**86%**	NS	**82%**	NS
AROMÁTICO	**PHE**	**102%**	NS	**100%**	NS	**86%**	NS	**94%**	NS
	TRP	**98%**	NS	**147%**	***	**157%**	****	**115%**	NS
IMINO	**PRO**	**111%**	NS	**97%**	NS	**79%**	NS	**95%**	NS

Tabela 2. Assimilação de aminoácidos individuais a 30 ºC. Percentual de crescimento das linhagens mutantes de permease em relação ao tipo selvagem H99 (que contém 100% de crescimento), em um único aminoácido como fonte de nitrogênio a 30 °C. Foi realizado análise estatística e a significância considerada foi: p ≤ 0,05 *, 0,01**, 0,001*** e 0,0001**** por ANOVA. NS: Não significativo. Signif: Significância. AA: Aminoácidos

Da mesma forma, foi testada a capacidade de assimilação de aminoácidos para cada uma das linhagens mutantes e selvagem a 37º C, e os dados (disponível na **Tabela 3**) mostraram algumas alterações de crescimento estatisticamente significativas.

A deleção individual da permease AAP6 (*aap6Δ*) causou diferença significativa de crescimento a 37º C quando comparada a linhagem selvagem na mesma condição, frente ao aminoácido histidina. A deleção individual da permease AAP8 (*aap8Δ*) causou uma diferença significativa de crescimento a 37º C quando comparada a linhagem selvagem nos aminoácidos treonina, metionina, triptofano e ácido glutâmico causaram uma redução crescimento quando estas foram as únicas fontes disponíveis e individuais de nitrogênio.

Nas linhagens CNU114 e CNU115 que contém a dupla deleção das permeases AAP1 e AAP2 (a*ap1Δ/aap2Δ*) foi possível observar que houve uma diferença significativa de crescimento do fungo em quase todos os aminoácidos individuais que foram testados.

		aap6Δ		***aap8Δ***		***aap1Δ/2Δ - cnu114***		***aap1Δ/2Δ - cnu116***	
	AA	**Média**	**Signif.**	**Média**	**Signif.**	**Média**	**Signif.**	**Média**	**Signif.**
ALIFÁTICOS	**GLY**	**111%**	NS	**84%**	NS	**61%**	****	**66%**	***
	LEU	**91%**	NS	**86%**	NS	**68%**	**	**60%**	****
	VAL	**99%**	NS	**86%**	NS	**36%**	****	**35%**	****
	ILE	**112%**	NS	**111%**	NS	**69%**	**	**71%**	**
OH	**SER**	**96%**	NS	**82%**	NS	**24%**	****	**34%**	****
	THR	**83%**	NS	**58%**	****	**88%**	NS	**88%**	NS
SULFUROSO	**MET**	**82%**	NS	**66%**	***	**88%**	NS	**99%**	NS
ÁCIDOS	**ASP**	**118%**	NS	**125%**	*	**68%**	**	**71%**	**
	GLU	**107%**	NS	**71%**	**	**102%**	NS	**92%**	NS
AMINA	**GLN**	**101%**	NS	**111%**	NS	**58%**	****	**55%**	****
	ASN	**100%**	NS	**92%**	NS	**85%**	NS	**86%**	NS
BÁSICOS	**ARG**	**121%**	NS	**80%**	NS	**74%**	*	**75%**	*
	LYS	**106%**	NS	**80%**	NS	**107%**	NS	**106%**	NS
	HIS	**129%**	**	**89%**	NS	**70%**	**	**72%**	**
AROMÁTICO	**PHE**	**109%**	NS	**116%**	NS	**42%**	****	**38%**	****
	TRP	**100%**	NS	**45%**	****	**119%**	NS	**115%**	NS
IMINO	**PRO**	**95%**	NS	**99%**	NS	**90%**	NS	**92%**	NS

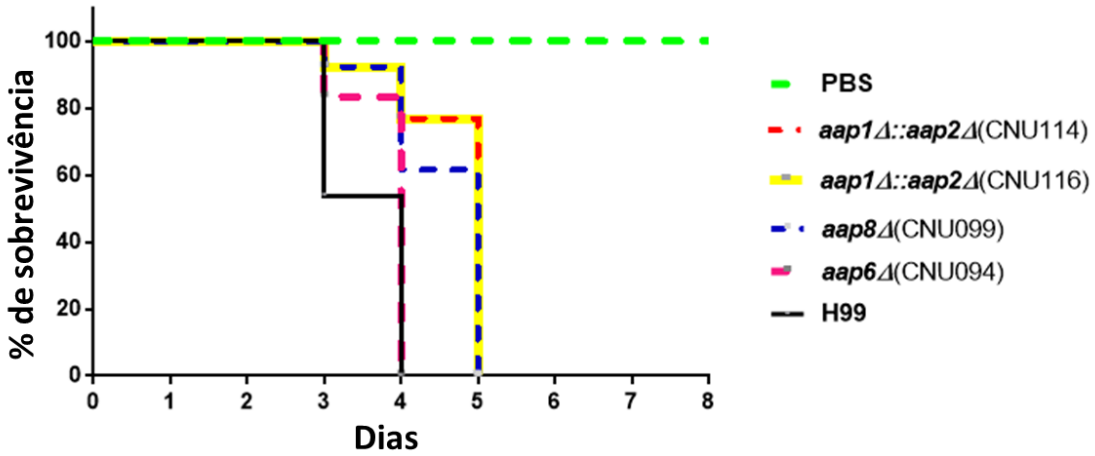
Tabela 3. **Percentual de crescimento das linhagens mutantes de permease em relação ao tipo selvagem H99 (que contém 100% de crescimento), em um único aminoácido como fonte de nitrogênio a 37° C.** Foi realizado análise estatística e a significância considerada foi: p ≤ 0,05 *, 0,01**, 0,001*** e 0,0001**** por ANOVA. NS: Não significativo. Signif.: Significância. AA: Aminoácidos.

4.4 Infecção em modelo animal de lagarta (*Galleria mellonella*)

A forma larval de *Galleria mellonella* vem sendo utilizada na pesquisa como modelos alternativos de estudo para avaliar a virulência de patógenos em geral, já que os estudos mostraram uma semelhança entre o sistema imune celular e humoral inato de insetos e vertebrados (BERGIN et al., 2005; MAURER et al., 2015). Como nossos resultados mostraram que as permeases AAP1 e AAP2 são necessárias para assimilar vários L-aminoácidos à 37 °C, fomos motivados a testar as deleções individuais (*aap*6Δ e *aap*8Δ) e também os duplos mutantes (*aap*1Δ/*aap*2Δ) no modelo animal invertebrado *Galleria mellonella*.

As larvas de *G. mellonella* infectadas com o tipo selvagem ou mutantes foram incubadas a 37 °C por 8 dias (conforme ítem 3.2.10) e durante este período as mortes foram registradas diariamente. O controle experimental positivo foi a linhagem H99 e para controle negativo foi utilizado PBS estéril. As larvas que foram inoculadas com os duplos mutantes (*aap1Δ/aap2Δ*) e o mutante individual (*aap8Δ*) a 37 °C, morreram no quinto dia após a inoculação enquanto que as larvas contendo a linhagem controle H99 foram extintas no dia quatro conforme ilustrado na **Figura 16.**

Figura 14. Infecção em modelo animal de invertebrados *Galleria mellonella*. As larvas foram inoculadas com o tipo selvagem (H99), mutantes individuais (*aap6Δ e aap8Δ*) ou mutantes duplos (*aap1Δ/aap2Δ*) e incubadas a 37 °C por 8 dias. Mutantes *aap8Δ* e *aap1Δ/Aap2Δ* se mostraram hipovirulentos quando comparados a linhagem selvagem com diferença significativa (**** e ***, respectivamente).



Através de testes estatísticos foi possível verificar que as linhagens contendo dupla mutação *aap1Δ/aap2Δ* (CNU114 e 116) e a deleção individual *aap*8Δ foram consideradas como tendo virulência atenuada quando comparadas com a linhagem controle H99 ($p<0,0001$). Para o mutante (*aap6Δ*) a 37º C, não foi encontrada diferença em comparação com o tipo selvagem, sugerindo que não são essenciais para a virulência.

4.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima - MIC

A mortalidade atribuída às infecções fúngicas permanece muito alta (RAJASINGHAM et al., 2017). Os seres humanos e os fungos são muito semelhantes por serem ambos eucariotos e isso leva a uma limitação de alvos moleculares que geram um enorme desafio na prospecção de novos fármacos que sejam capazes de interferir em aspectos essenciais do metabolismo fúngico e eliminá-lo. Uma combinação de novos alvos moleculares que possam atuar em sinergismo com agentes antifúngicos usados na clínica tradicionalmente pode ser um ótimo caminho para aumentar a potência, eficácia, e até mesmo, auxiliar na redução do surgimento da resistência aos medicamentos (KAVANAGH, 2005b; PERFECT, 2017).

Dando continuidade na avaliação do impacto que a deleção de algumas permeases de aminoácidos poderia ter em *C. neoformans*, foram realizados testes de sensibilidade com antifúngicos existentes no mercado nas linhagens mutantes usadas neste trabalho. A anfotericina B (AmB) é considerada padrão-ouro para a terapia da criptococose; e AmB ou fluconazol (FL), com ou sem sinergismo com a 5-flucitosina, são as principais opções terapêuticas indicadas pela OMS para o tratamento da criptococose (TRYPHON K. MAZU et al., 2015; PERFECT, 2017).

Também já foi publicado que as permeases são o alvo de um metabolito secundário da planta eugenol, mostrando-se ser um inibidor antifúngico que possui como alvo as permeases de aminoácidos (MARTHO et al., 2016).

Baseando-se nessa idéia, buscamos avaliar a resistência de *C. neoformans* contendo as deleções dos genes (*aap6Δ, aap8Δ* e *aap1Δ/aap2Δ*) frente aos

antifúngicos utilizados atualmente nos tratamentos das IFI's e comparar esses resultados com a linhagem controle (H99). Também foi avaliado o crescimento das linhagens mutantes e selvagem frente ao inibidor eugenol.

4.5.1 Fluconazol (FL)

Para realização do experimento com FL foi utilizada a metodologia descrita no ítem 3.2.18, por meio de diluição seriada nas temperaturas de 30° e 37°C por 72h.

Como pode ser observada na **Tabela 4** a sensibilidade da linhagem selvagem (H99) frente ao fluconazol a 30 °C foi de 12,5 µg/µL. Entretanto, a concentração de 6,2 µg/µL do fármaco foi o suficiente para inibir o crescimento do mutante individual *aap6Δ.* Para os mutantes *aap8Δ e aap1Δ/aap2Δ* não houve variação de inibição de crescimento quando comparado a linhagem selvagem.

A 37 °C foi observado resultados semelhantes de 12.5 µg/µL para as linhagens H99 e *aap8Δ*. Para os mutantes contendo a deleção individual *aap6Δ e* a dupla deleção *aap1Δ/aap2Δ* foram necessários 6,2 µg/µL de fluconazol para inibir 100% do crescimento, portanto, estes resultados sugerem que essas mutações de permeases tornam o fungo mais sensível à ação do fármaco fluconazol.

Linhagens	**FLUCONAZOL**	
	30°C	**37°C**
H99	12,5 µg/µL	12,5 µg/µL
aap6Δ cnu092	6,2 µg/µL	6,2 µg/µL
aap8Δ cnu099	12,5 µg/µL	12,5 µg/µL
aap1Δ /aap2Δ cnu116	12,5 µg/µL	6,2 µg/µL

Tabela 4. **Avaliação da Concetração Inibitória Mínima de Fluconazol**. Resultado do teste de sensibilidade dos mutantes (*aap1Δ /aap2Δ, aap6Δ e app8Δ*) e selvagem H99 frente ao antifúngico Fluconazol pelo método de diluição seriada, nas temperaturas 30° e 37°C por 72 horas. O valor corresponde a concetração necessária do fármaco para inibir 100% do crescimento.

4.5.2 Anfotericina B (AmB)

O resultado do teste de sensibilidade dos mutantes e selvagem na presença do antifúngico AmB (descrita no ítem 3.2.18 através de fitas e-test) pode ser visto na **Tabela 5.** Em geral, a sensibilidade das linhagems selvagem (H99) e mutantes frente

ao fármaco AmB foram de 0,125 µg/ml a 30 e 37 °C, com exceção apenas das linhagens contendo a dupla deleção *aap1Δ/ap2Δ* que apresentaram 100% de inibição quando utilizado o antifúngico na concentração de 0,094 µg/ml. Portanto, estes resultados sugerem que a deleção das permeases *AAP1/AAP2* tornam o fungo mais sensível à ação da anfotericina B a 37º C. As imagens das placas estão disponíveis no **Anexo H.**

Linhagens	ANFOTERICINA	
	30°C	**37°C**
H99	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL
aap6Δ cnu092	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL
aap8Δ cnu099	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL
aap1Δ /aap2Δ cnu116	0,125 µg/mL	0,094 µg/mL

Tabela 5. Resultado do teste de sensibilidade dos mutantes (*aap1Δ /aap2Δ, aap6Δ e app8Δ*) e selvagem H99 frente ao antifúngico Anforecinina B, pelo método de fita E-test, nas temperaturas 30° e 37°C por 72 horas. O valor corresponde a concentração necessária do fármaco para inibir 100% do crescimento.

4.5.3 Eugenol

A sensibilidade dos mutantes e selvagem na presença do composto Eugenol (descrita no ítem 3.2.18 por meio de diluição seriada) pode ser visto na **Tabela 6.** Em geral, a sensibilidade das linhagems selvagem (H99) e mutantes frente ao composto foram de 0,2 µg/µl a 30 e 37 °C, com exceção apenas da linhagem contendo a deleção individual da permease *AAP6* que apresentara 100% de inibição quando utilizada a concentração 0,1 µg/µl a 37º C, portanto, estes resultados sugerem que a deleção dessas permeases praticamente não afetam o crescimento quando os mesmos estão em contato com o Eugenol.

Linhagens	EUGENOL EM YEPD	
	30°C	**37°C**
H99	0,2 µg/µL	0,2 µg/µL
aap6Δ cnu092	0,2 µg/µL	0,1 µg/µL
aap8Δ cnu099	0,2 µg/µL	0,2 µg/µL
aap1Δ /aap2Δ cnu116	0,2 µg/µL	0,2 µg/µL

Tabela 6. Resultado do teste de sensibilidade dos mutantes (*aap1Δ /aap2Δ, aap6Δ e app8Δ*) e selvagem H99 frente ao composto Eugenol, pelo método de diluição seriada, com meio de cultura

YEPD e nas temperaturas 30° e 37°C por 72 horas. O valor corresponde a concentração necessária do composto para inibir 100% do crescimento**.**

A sensibilidade dos mutantes e selvagem também foi testadai utilizando o composto Eugenol com meio de cultura mínimo YNB e os resultados podem ser vistos na **Tabela 7.** Assim como o teste anterior, a sensibilidade das linhagems selvagem (H99) e mutantes frente ao composto foi de 0,2 µg/µl a 30 e 37 °C, variando apenas na linhagem *aap6Δ* e *aap1Δ /aap2Δ* que apresentaram inibição completa de crescimento quando utilizada a concentração 0,1 µg/µl a 37º C, portanto, estes resultados também sugerem que a deleção dessas permeases praticamente não afeta o crescimento quando os mesmos estão em contato com o Eugenol.

Linhagens	**EUGENOL EM YNB**	
	30°C	**37°C**
H99	0,2 µg/µL	0,2 µg/µL
aap6Δ cnu092	0,2 µg/µL	0,1 µg/µL
aap8Δ cnu099	0,2 µg/µL	0,2 µg/µL
aap1Δ /aap2Δ cnu116	0,2 µg/µL	0,1 µg/µL

Tabela 7. Resultado do teste de sensibilidade dos mutantes (*aap1Δ /aap2Δ, aap6Δ e app8Δ*) e selvagem H99 frente ao composto Eugenol, pelo método de diluição seriada, com meio de cultura YNB, nas temperaturas 30° e 37°C por 72 h. O valor corresponde a concentração necessária do composto para inibir 100% do crescimento.

4.6 Impacto das deleções na expressão dos fatores de virulência

C. neoformans é um patógeno oportunista adaptado para a sobrevivência no hospedeiro humano e possui diversos fatores de virulência que favorecem esta interação. Fatores de virulência incluem todos os mecanismos que permitem que o fungo, eficientemente, possa se multiplicar e sobreviver no interior do hospedeiro, resistindo aos incessantes ataques do sistema imune e eventualmente causando doença (GUERRERO; FRIES, 2008; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

4.6.1 Produção de cápsula

Um fator essencial para a virulência de *C. neoformans* é a produção de uma cápsula polissacarídica que pode mudar drasticamente de tamanho em resposta a

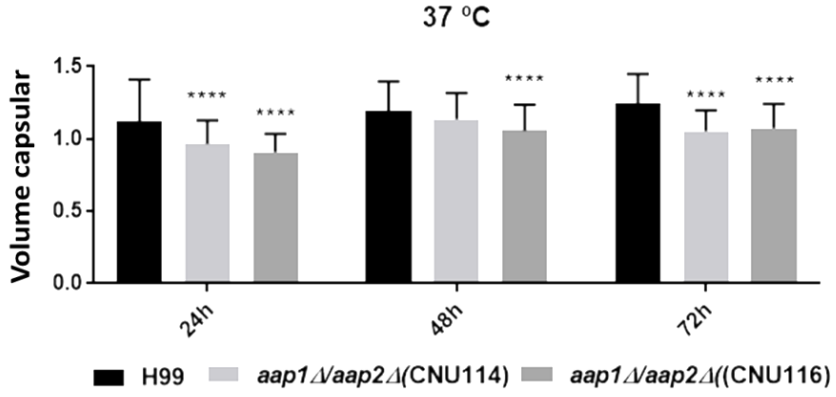
condições ambientais, podendo chegar ao dobro do diâmetro de sua célula (DENHAM et al., 2018).

A cápsula está intimamente associada à parede celular propiciando proteção que inclue diminuição da resposta imune do hospedeiro através da redução das citocinas inflamatórias e complemento, além de propriedades antifagocíticas que prejudicam o reconhecimento dos epítopos presentes na superfície da parede celular pelos receptores fagocíticos. Assim, a cápsula auxilia evitando a fagocitose e a digestão no fagossomas aumentando as chances de sobrevivência de *C. neoformans in vivo* (KOZEL; HERMERATH, 1984; LEVITZ; DUPONT; SMAIL, 1994; LIU et al., 2008; ZARAGOZA et al., 2009; KUMAR et al., 2011; MCQUISTON; LUBERTO; DEL POETA, 2011; O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; DENHAM et al., 2018).

Portanto, foi avaliado o impacto que a deleção das permeases *AAP1/AAP2*, *AAP6* e *AAP8* tem sobre a biossíntese de cápsula (descrito no item 3.2.16) nas temperaturas de 30 e 37 °C durante o período de 24, 48 e 72 h.

Não foi possível visualizar diferença de volume capsular entre as linhagens selvagem e mutantes na temperatura de 30 ºC, entretanto, a 37 ºC as linhagens mutantes (*aap1Δ/aap2Δ)* mostraram uma diminuição de volume cápsular em todos os tempos testados (24, 48 e 72 horas) quando comparados a linhagem selvagem H99 **(Figura 17).**

Figura 15. Avaliação da produção de cápsula a 37 ºC. Avaliação do impacto que a deleção das permeases AAP1/AAP2 tem sobre a biossíntese de cápsula em meio de cultura independente de CO_2 por 24, 48 e 72 horas. H99 foi utilizado como controle positivo produtor de cápsula.



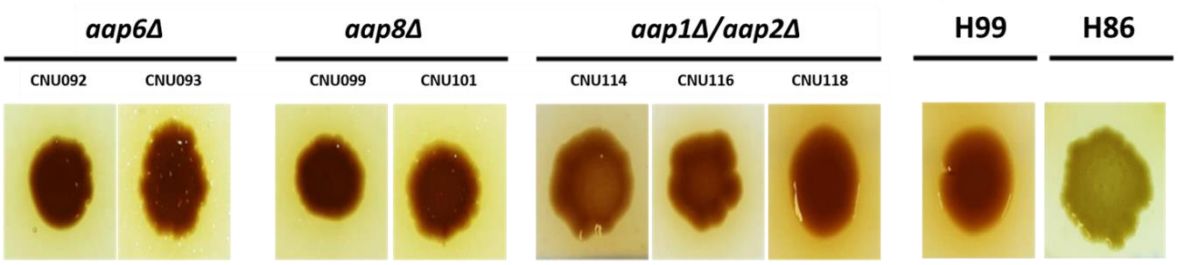
4.6.2 Produção de melanina

A melanina proporciona diversos benefícios como a atividade antioxidante e a rigidez da parede celular que protege o microrganismo em ambientes hostis, favorecendo sua propagação (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

Diante disso, foi avaliado o impacto da deleção das permeases AAP1/AAP2 (*aap1Δ/aap2Δ*), AAP6 (*aap6Δ*) e AAP8 (*aap8Δ*) quanto a biossíntese de melanina (descrito no item 3.2.143.2.14) em meio de cultura agar Niger Seed, na temperatura de 30°C, durante o período de 5 dias. A linhagem selvagem H99 foi utilizada como controle positivo (produtor de melanina) e a linhagem H86, também de *C. neoformans* e com deficiência na enzima laccase, foi utilizada como controle negativo (não produtor de melanina). Para cada inóculo utilizou-se a concentração celular de $2x10^6$ cel/mL.

Durante os 5 dias de experimento foi possível perceber que as linhagens mutantes *aap6Δ, aap8Δ* e *aap1Δ/aap2Δ* comportaram-se exatamente como a linhagem selvagem H99 para a produção de melanina, indicando que a deleção dos genes codificadores destas permeases não influenciam na produção da mesma, como ilustrado na **Figura 18.**

Figura 16. Avaliação da produção de melanina em meio de cultura agar Niger Seed à 30°C por 5 dias. Cada inóculo com concentração de $2x10^6$ células/ mL. *C. neoformans* H99 foi utilizado como controle positivo produtor de melanina e a linhagem H86 (com deficiência na enzima responsável pela produção de melanina – Lacase) foi utilizada como controle negativo pela não produção de melanina.



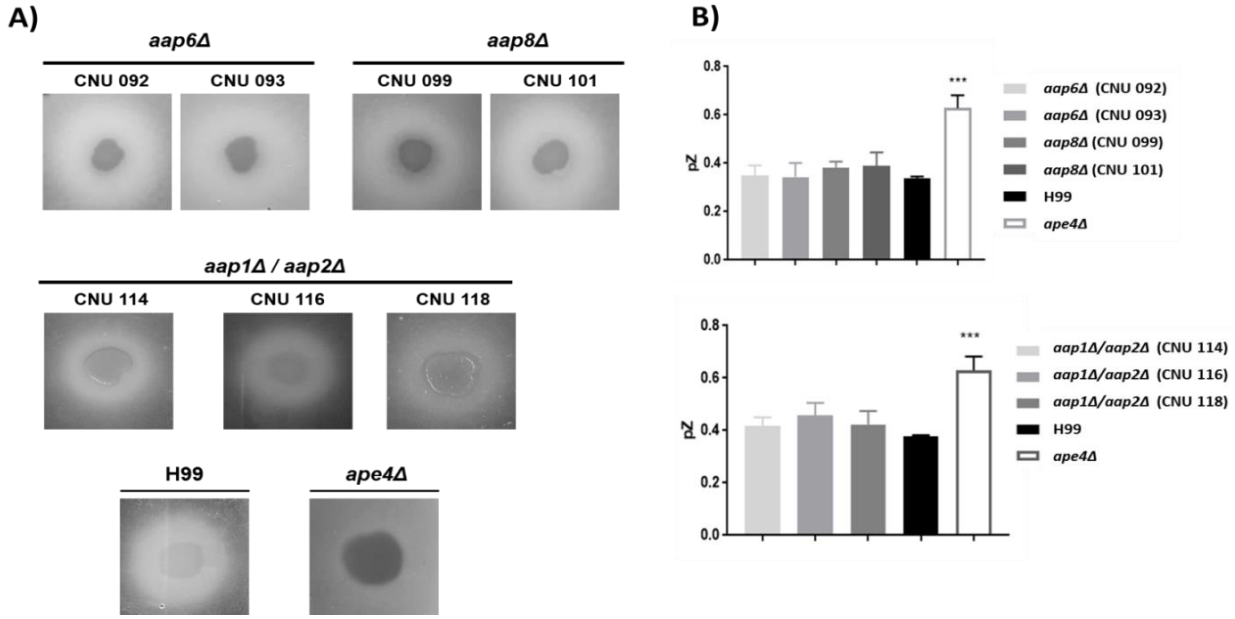
4.6.3 Produção de fosfolipase B

A produção de fosfolipase contribui para a adesão do fungo às células epiteliais de pulmão humano no início da infecção, é responsável pela disseminação através do sangue e está envolvida na sobrevivência e replicação de *Criptoccoccus* em

macrófagos, por promover a lise da membrana do fagossomo, permitindo ao fungo ter acesso aos nutrientes (GANENDREN et al., 2004; CHRISMAN et al., 2011).

Como um importante fator de virulência, a produção de fosfolipase foi testada nos mutantes *aap6Δ, aap8Δ* e *aap1Δ/aap2Δ*, os quais produziram um halo de precipitação ao redor da colônia igual a linhagem selvagem H99 positiva para a produção de fosfolipase B, indicando que a deleção dos genes codificadores destas permeases não influenciam na produção da mesma (**Figura 19-A**). A linhagem *ape*4Δ foi usada como controle negativo para a produção de fosfolipase. Para confirmação desses dados foram aplicados testes estatísticos resultando em valor não significativo, quando comparado ao H99, e o valor de pZ pode ser visto na (**Figura 19-B**).

Figura 17. Avaliação da atividade da fosfolipase B em meio de cultura agar Gema durante 5 dias a 30°C. A) Cada inóculo foi inoculado na concentração celular de $2x10^6$ células/ mL. *C. neoformans* H99 foi utilizado como controle positivo para produção de fosfolipase B e a linhagem *C. neoformans ape4Δ* (com deficiência na atividade da *fosfolipase B*) foi utilizada como controle negativo pela ausência de halo de precipitação. B) A atividade enzimática baseou-se no cálculo de pZ, onde Pz = 1,0 significa ausência de atividade enzimática; 0,64 < Pz < 1,0 significa presença de atividade enzimática e Pz < 0,64 significa atividade enzimática fortemente positiva.

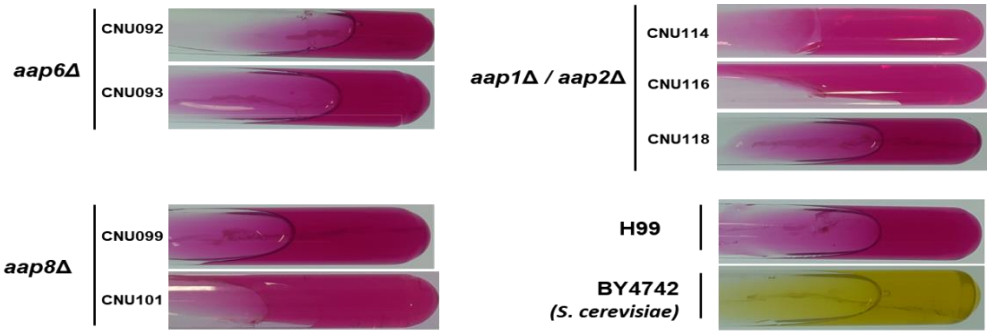


4.6.4 Produção de urease

A urease auxilia na desintoxicação e alcalinização do ambiente circundante facilitando a aquisição de nitrogênio (SINGH et al., 2013). Para avaliar se a deleção das permeases *AAP6*, *AAP8* e *AAP1/AAP2* é capaz de influenciar na produção de urease, foi utilizado o meio de cultura agar urea Christensen's com a metodologia descrita no item 3.2.13. Nesse teste a produção de urease é reconhecida por colorimetria, pois a mesma degrada a ureia formando amônia, que alcaliniza o meio de cultura alterando sua cor de amarelo para vermelho (ou rosa). Para controle do experimento foi utilizado a linhagem selvagem H99 produtora de urease (controle positivo) e *Sacharomyces cerevisiae* linhagem BY4742 como não produtora de urease (controle negativo).

Neste experimento foi constatado que as mutações *aap6Δ, aap8Δ* e *aap1Δ/aap2Δ* não causaram alteração na produção de urease, comportando-se como a linhagem selvagem (H99). Como esperado, o meio de cultura permaneceu na coloração amarela para *S. cerevisiae* linhagem BY4742*,* controle negativo (**Figura 20**).

Figura 18. Teste para avaliação da produção de urease com meio de cultura agar urea Christensen's a 30 ºC por 5 dias. A coloração vermelho (rosa) representa positivo para produtor de urease e amarelo não produtor de urease, *C. neoformans* H99 e *S. cerevisiae* linhagem BY4742, respectivamente. As linhagens mutantes produzem urease tanto quanto a linhagem H99 e no mesmo período.



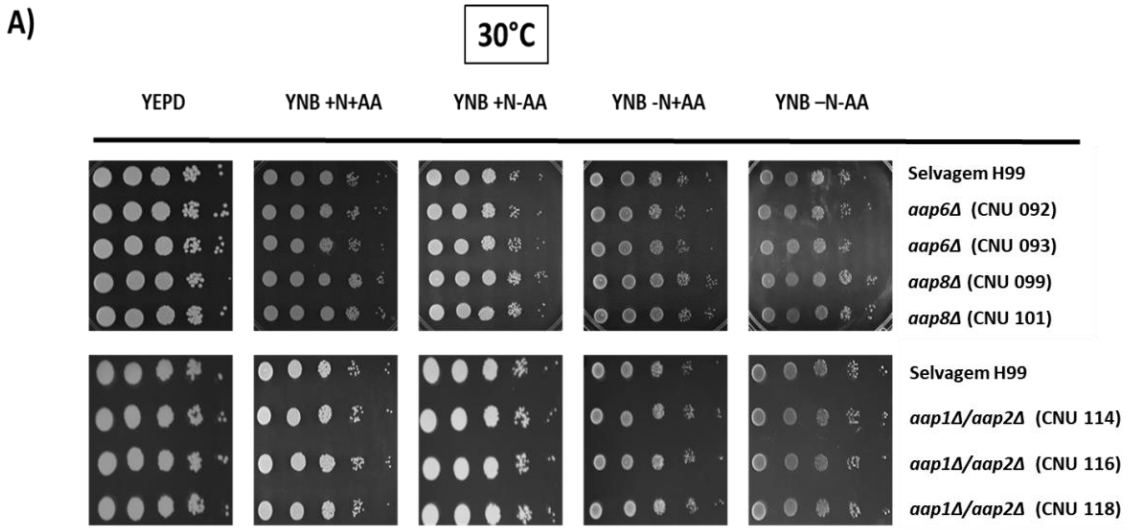
4.6.5 Avaliar o crescimento em diferentes condições nutricionais

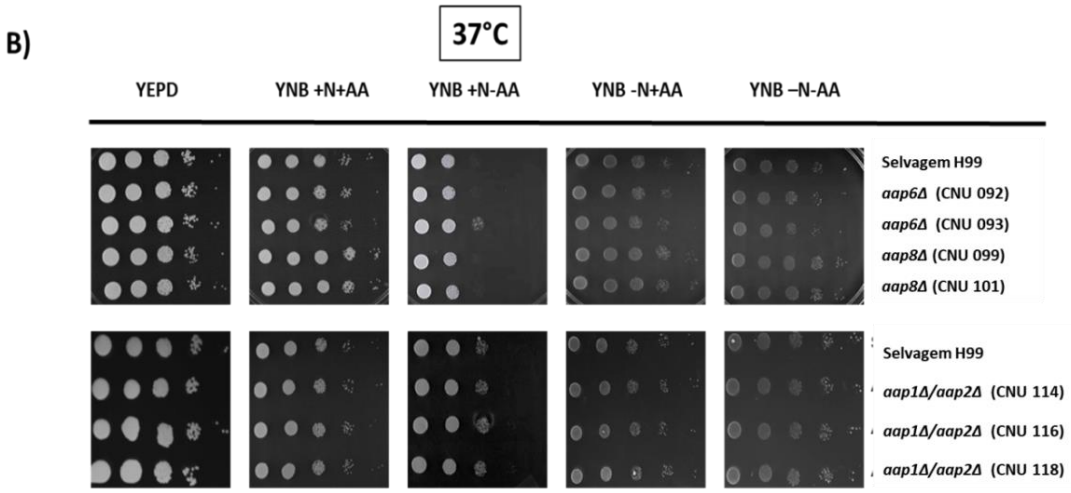
Dentre diversos fatores de virulência utilizados por esta levedura, a capacidade de se adaptar à temperatura fisiológica torna-o patogênico. Após iniciar uma infecção em seres humanos a disponibilidade de nutrientes muda significativamente e para um estabelecimento bem-sucedido nesses nichos torna-se imprescindível a capacidade de

metabolizar os nutrientes disponíveis, incluindo fontes de nitrogênio, carbono e nutrientes essenciais como ferro (LEE et al., 2013; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

Foi avaliado o impacto causado pelas deleções das permeases (*aap6Δ, aap8Δ* e *aap1Δ/aap2Δ*) aos fatores de virulência do microrganismo frente a diferentes fontes nutricionais como o meio rico YEPD e variações do meio pobre YNB com ou sem nitrogênio e aminoácidos (descritos nos itens 3.1.4.1, 3.1.4.11, 3.1.4.12, 3.1.4.13 e 3.1.4.14). A avaliação do crescimento foi feita por inoculação de diluições seriadas em diferentes condições e as leituras dos resultados foram feitas em 24 e 48 horas. Como mostra a **Figura 21,** não foi possível observar diferenças de crescimento entre as linhagens mutantes e o selvagem em ambas as temperaturas, indicando que estas permeases não são essenciais para a sobrevivência nas condições nutricionais testadas.

Figura 19. Avaliação do crescimento da linhagem selvagem e mutantes em diferentes condições nutricionais e temperaturas, através de diluição seriada. A imagem ilustra o crescimento de todas as linhagens (identificadas ao lado direito) nos meios de cultura (identificados na parte superior) como YEPD (rico), YNB+N+AA (com amônia e aminoácidos), YNB+N-AA (só com amônia), YNB-N+AA (só com aminoácidos) e YNB-N-AA (sem fonte de nitrogênio). Diluição celular seriada, da esquerda para direita, nas concentrações de $2x10^6$, $2x10^5$, $2x10^4$, $2x10^3$ e $2x10^2$.





Os mesmos testes de avaliação do crescimento por diluições seriadas em diferentes condições nutricionais foram realizados utilizando as linhagens mutantes e o selvagem com esgotamento de reservas de nutrientes por 2 horas em PBS. Os resultados obtidos foram muito similares aos ilustrados na figura 12, não sendo possível observar diferenças de crescimento entre as linhagens mutantes e o selvagem.

4.6.6 Avaliação de resistência ao estresse

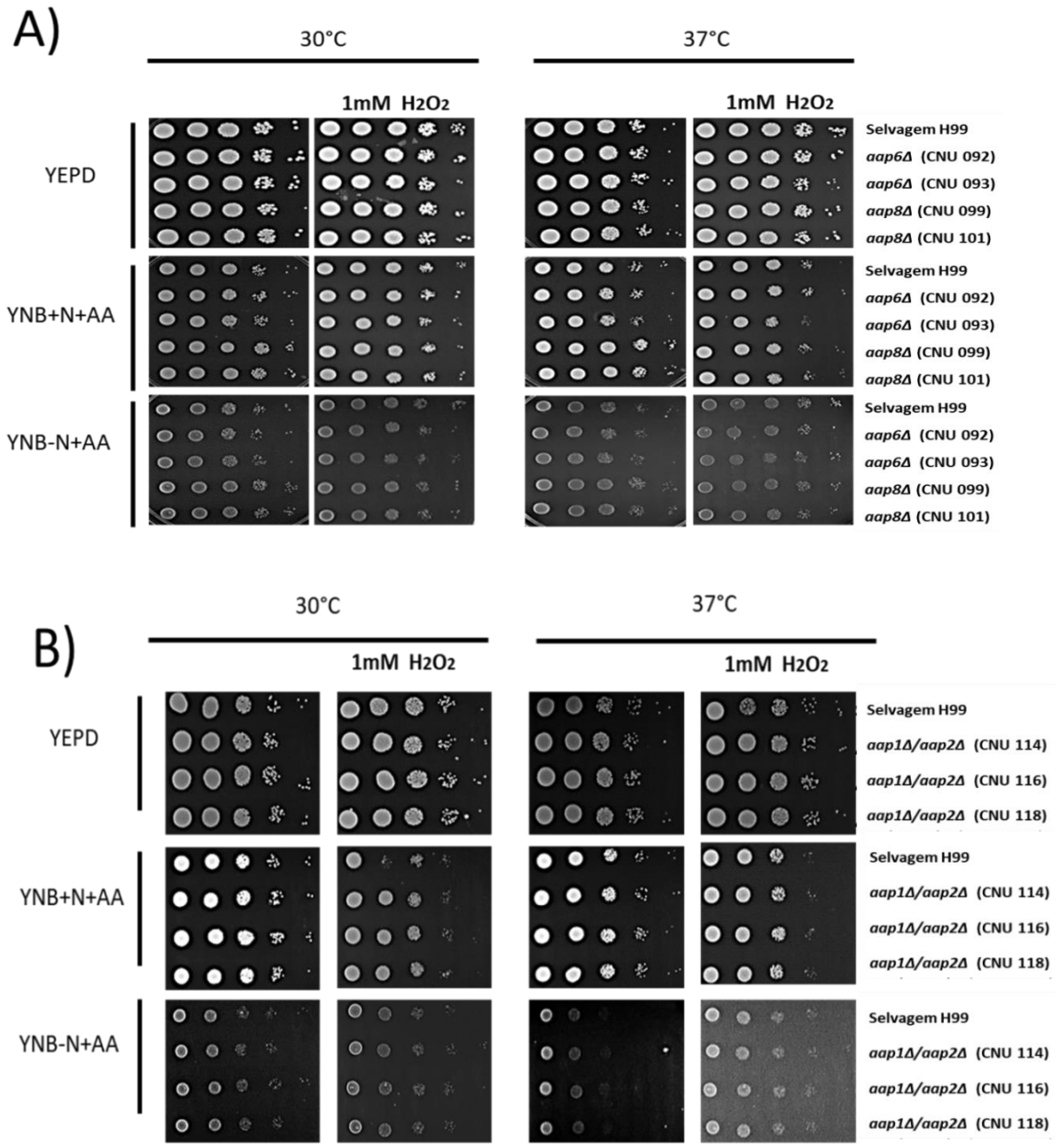
Os ensaios de Martho et al (2016) apontaram que a dupla deleção das permeases de aminoácidos *aap4Δ*/*aap5Δ* é essencial para o crescimento de *C. neoformans* em meio sintético, para a resposta ao estresse térmico e oxidativo; além de causar avirulência em modelo animal de invertebrados, vertebrados e hipersensibilidade ao fluconazol. Seguindo a mesma linha, todas as linhagens mutantes foram submetidas a tipos variados de estresses, simulando as diversas situações encontradas pelo microrganismo quando o mesmo invade o organismo humano.

4.6.6.1 Estresse oxidativo

As linhagens mutantes e o controle (H99) foram crescidos conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.12 e inoculados em meios de cultura agar YEPD, YNB+N+AA e YNB -N+AA acrescido de 1 e 2,5 mM de H_2O_2 nas temperatura de 30 e 37º C por 24 e 48 horas. Não foi possível identificar variações fenotípicas entre as linhagens mutantes e selvagem nas condições de estresse com H_2O_2 à 30 e 37 ºC, concluindo que a

deleção dessas permeases não afeta a resistência ao estresse oxidativo nesta condição (**Figura 22**).

Figura 20. Avaliação do crescimento da linhagem selvagem e mutantes sob estresse oxidativo (1mM de H_2O_2) a 30 e 37 ºC, por diluição seriada. A) Deleção das permeases *AAP6* e *AAP8*. B) Dupla deleção das permeases *AAP1/AAP2*. A análise com 2,5mM de H_2O_2 também não mostrou diferença entre as linhagens (dados não mostrados). Diluição celular seriada, da esquerda para direita, nas concentrações de $2x10^6$, $2x10^5$, $2x10^4$, $2x10^3$ e $2x10^2$.

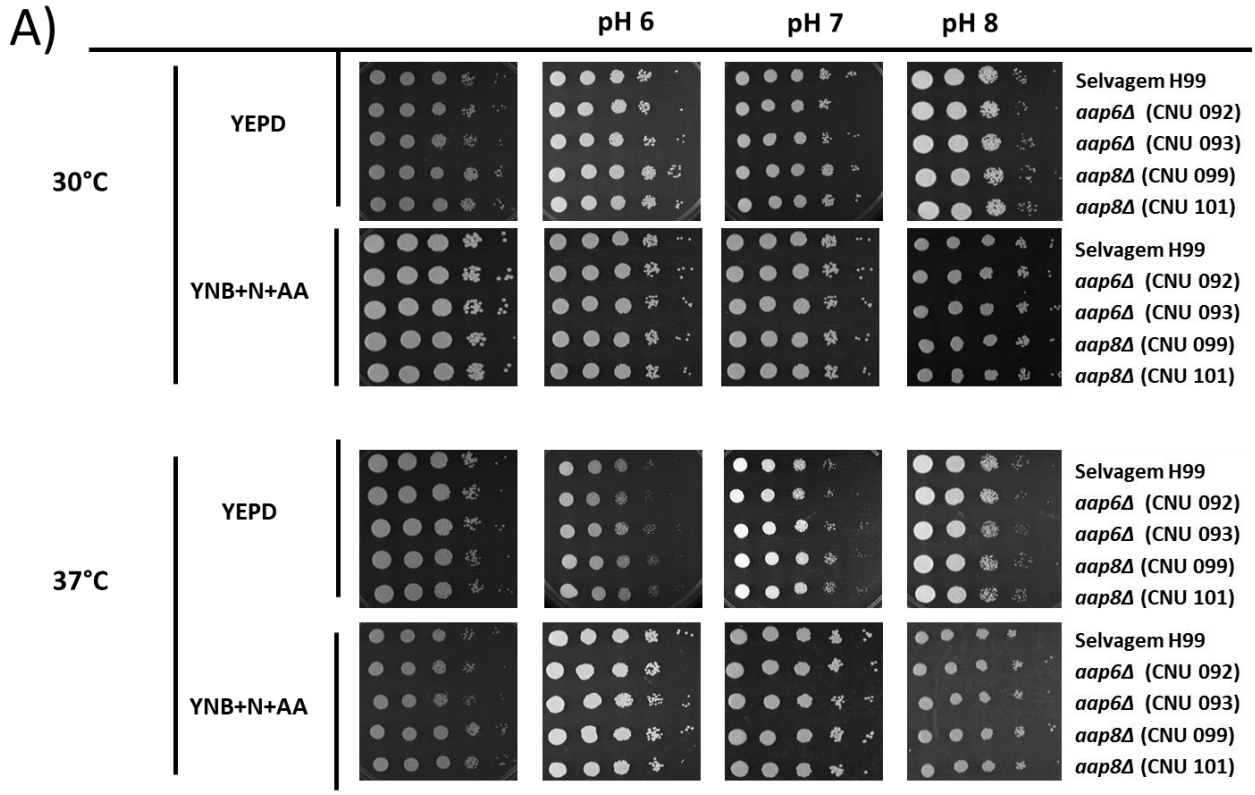


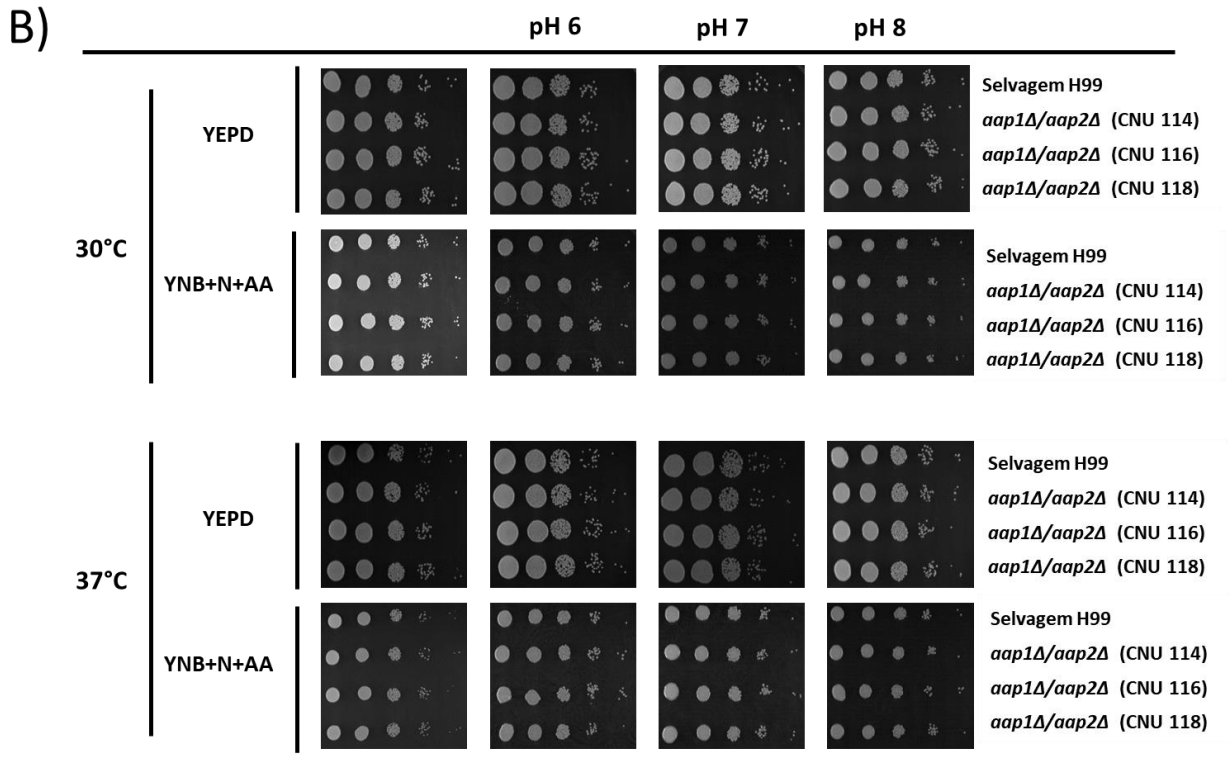
4.6.6.2 Estresse alcalino

As linhagens mutantes e o controle (H99) foram inoculadas em meios de cultura YEPD e YNB+N+AA nos pH's 6, 7 e 8 por método de diluição seriada nas temperatura de 30 e 37º C. A avaliação do experimento ocorreu em 24 e 48 horas.

Não foi possível visualizar variações fenotípicas entre as linhagens selvagem e mutantes (*aap6Δ* e *aap8Δ)* nas condições de estresse a 30 e 37º C nos pH's 6 ,7 e 8 (**Figura 23-A**); e da mesma forma ocorre com as linhagens contendo a dupla mutação *aap1Δ/aap2Δ* (**Figura 23-B**). Concluindo que a deleção dessas permeases não afeta a resistência de *C. neoformans* à estes estresses.

Figura 21. Avaliação do efeito da deleção das permeases *AAP6*, *AAP8* e *AAP1/AAP2* em YEPD e YNB+N+AA nos pH's 6, 7 e 8, a 30 e 37ºC, por diluição seriada. **A)** Spots das linhagens mutantes *aap6Δ* e *aap8Δ* e **B)** Spots das linhagens mutantes *aap1Δ/aap2Δ*. Diluição celular seriada, da esquerda para direita, nas concentrações de $2x10^6$, $2x10^5$, $2x10^4$, $2x10^3$ e $2x10^2$.





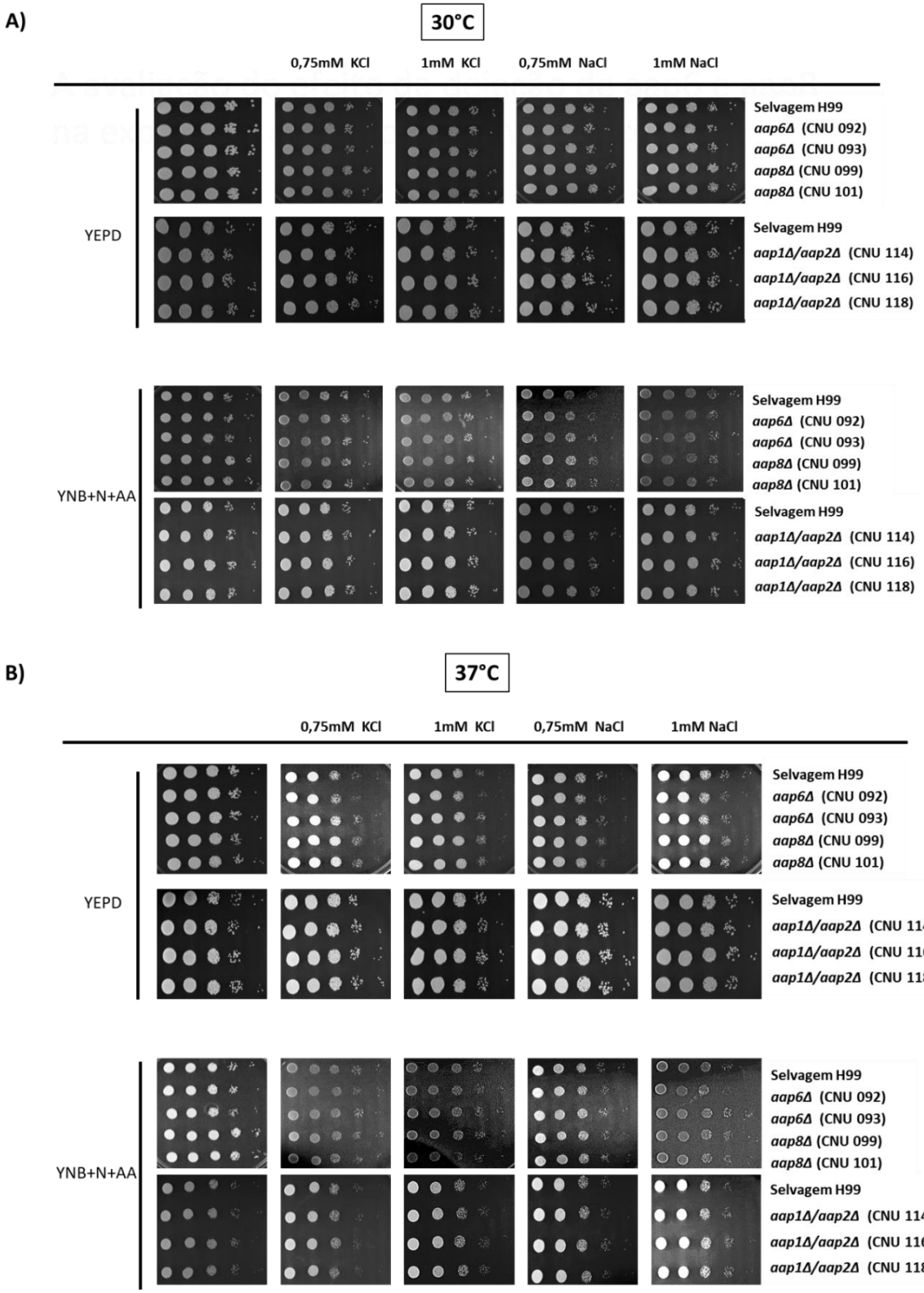
4.6.6.3 Estresse osmótico e salino

As linhagens mutantes e o controle (H99) foram inoculadas em meios de cultura YEPD e YNB+N+AA, acrescido de 0,75 e 1 mM de NaCl e KCl, por método de diluição seriada nas temperaturas de 30 e 37º C. A avaliação do experimento ocorreu em 24 e 48 horas.

Nos diferentes meios e temperaturas não foi possível identificar variações fenotípicas entre todas as linhagens mutantes (quando comparadas à linhagem selvagem) na condição de estresse osmótico e salino a 30 e 37º C, sugerindo que as deleções dos genes *AAP6, AAP8 e AAP1/AAP2* não influenciam no crescimento de *C. neoformans*, nas condições experimentais utilizadas (**Figura 24 A e B**).

Figura 22 . Avaliação do efeito da deleção das permeases *AAP6*, *AAP8* e *AAP1/AAP2* sobre a resistência ao estresse osmótico (KCl) e salino (NaCl) a 30 (A) e 37º C (B). As imagens ilustram o crescimento das diferentes linhagens em meio YEPD e YNB+N+AA nas temperaturas de 30 e 37° e

comparadas com os mesmos meios com adição de 0,75 e 1 mM de KCl e NaCl. Diluição celular seriada, da esquerda para direita, nas concentrações de $2x10^6$, $2x10^5$, $2x10^4$, $2x10^3$ e $2x10^2$.

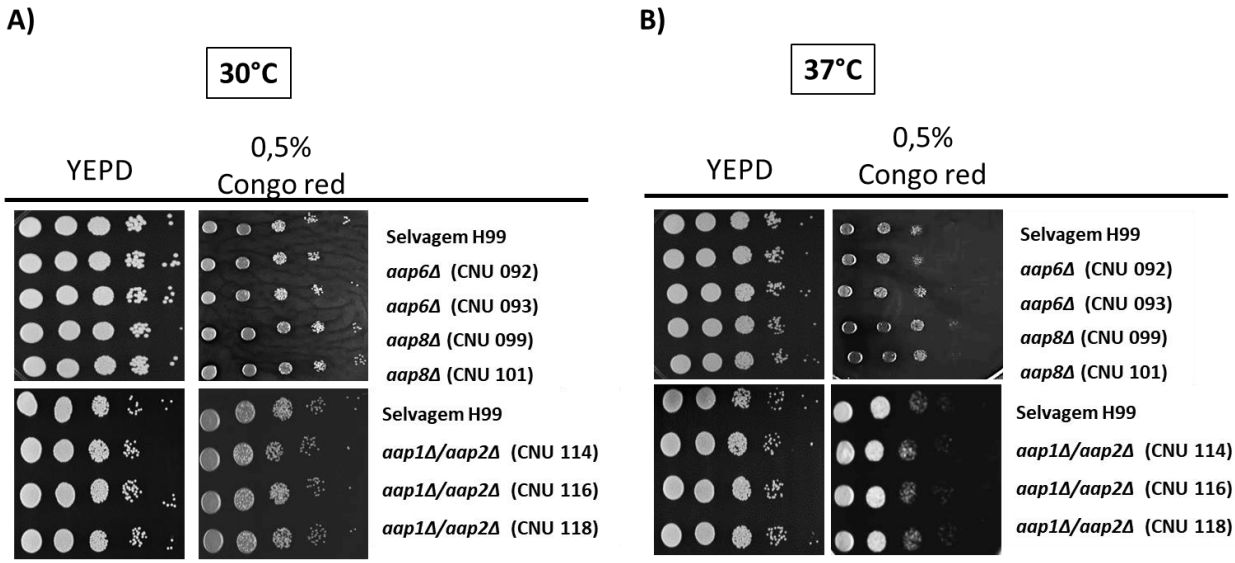


4.6.6.4 Resistência ao estresse de parede celular

O Congo red atua interferindo na montagem da parede celular ligando-se a cadeias de quitina nascentes e inibindo sua síntese (RONCERO; DURAN, 1985). Neste experimento foi analisado se a falta dos genes *AAP6*, *AAP8* e *AAP1/AAP2* afetam a manutenção da parede celular.

Para análise experimental foi utilizado o meio de cultura YEPD, YEPD acrescido de 0,5% de Congo red (item 3.1.4.6). As placas foram incubadas por 24 e 48 horas nas temperaturas 30 e 37 ºC. Através desta análise foi possível concluir que a ausência dos genes que codificam as permeases *AAP6*, *AAP8* e *AAP1/AAP2* não causaram impacto no crescimento em comparação a linhagem selvagem de *C. neoformans* H99 a 30 e 37º C (**Figura 25 A e B**, respectivamente) quando submetidos ao estresse de parede celular.

Figura 23. Avaliação do efeito da deleção dos genes *AAP6*, *AAP8* e *AAP1/AAP2* sobre a resistência ao estresse de parede com 0,5% de congo red. A)30º C e B) 37º C. Diluição celular seriada, da esquerda para direita, nas concentrações de $2x10^6$, $2x10^5$, $2x10^4$, $2x10^3$ e $2x10^2$.



Os mesmos testes de avaliação do crescimento por diluições seriadas em resistência ao estresse de parede com 0,5% de congo red foram realizados utilizando as linhagens mutantes e selvagem em meio de cultura pobre suplementado apenas com nitrogênio e aminoácidos (YNB+N+AA) a 30 ºC. Os resultados obtidos foram muito

similares aos ilustrados na figura 16A, não sendo possível observar diferenças de crescimento entre as linhagens contendo as deleções do genes que codificam as permeases *AAP1AAP2* e o selvagem H99 (dados não mostrados).

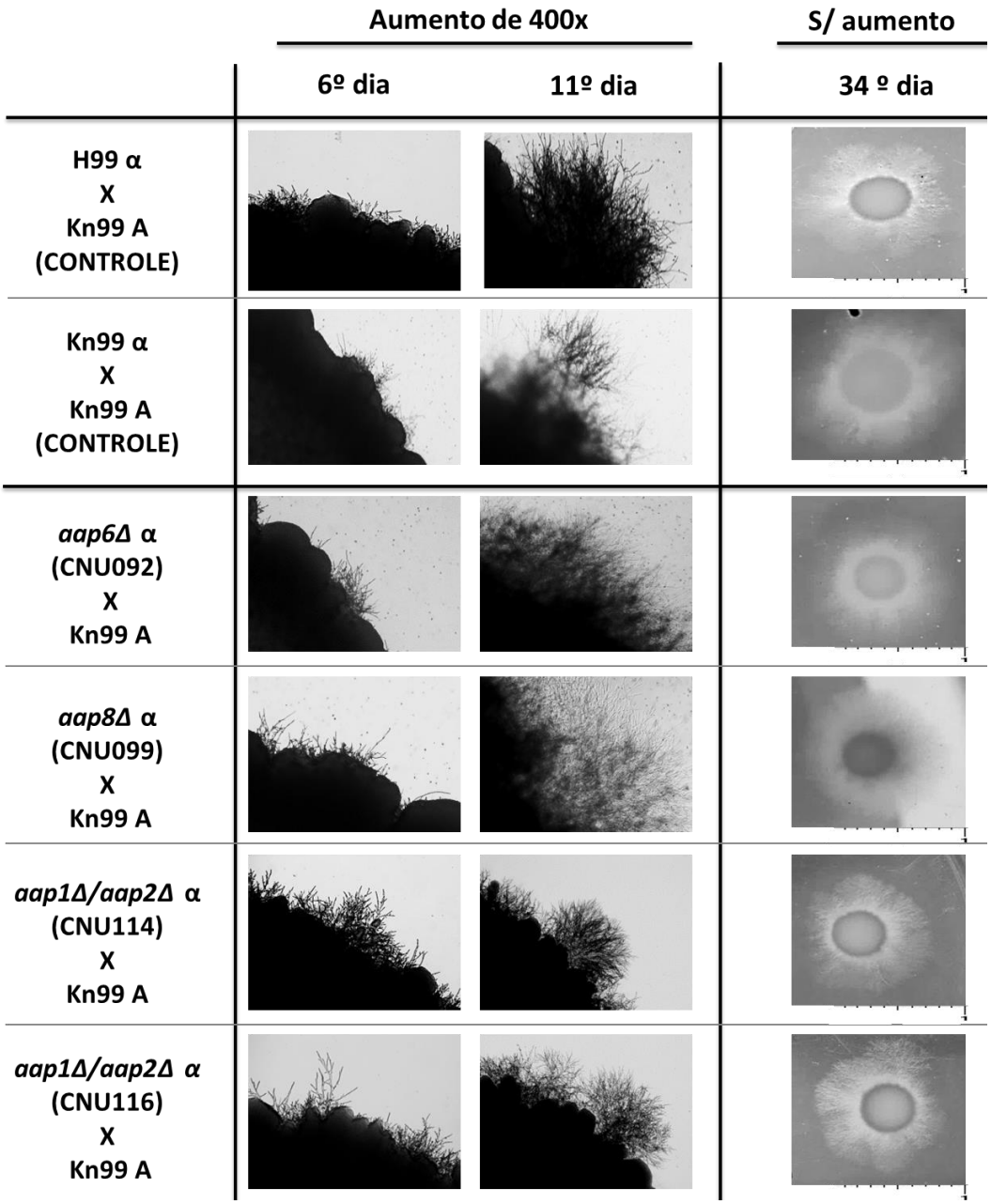
4.7 Impacto das deleções sobre o acasalamento

Por mais que a produção de hifas não seja encontrada em infecções humanas (provavelmente por ser antigênico e estimular uma eliminação rápida pelo hospedeiro) ela é de extrema importância pois essa opção de mudança de fenótipo propicia ao microrganismo maiores oportunidades de cruzamento, além de aumentar a sua capacidade de detectar nutrientes distantes em situações de privação nutricional (LENGELER et al., 2002; NIELSEN et al., 2003; LI et al., 2012; FU et al., 2016; WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

Com o objetivo de avaliar se as deleções individuais e a dupla deleção poderiam gerar alteração no acasalamento e na produção de hifas, foram feitos cruzamentos entre as linhagens mutantes do tipo α (*aap6Δ, aap8Δ e aap1Δ/aap2Δ*) com a linhagem selvagem *KN99a* em meio de cultura pobre em nutrientes, temperatura ambiente (± 25 ºC) e ausência de luminosidade (item 3.2.20). Como controle experimental foi realizado o cruzamento entre as linhagens selvagens *Kn99a x Kn99α* e *Kn99a x H99*.

A avaliação a olho nu, com o uso de lupa e microscópio ocorreu semanalmente e o registro fotográfico foi feito no 6º, 11º e 34º dia. Durante o período de análise foi possível observar que todos os cruzamentos realizados apresentaram formação de hifas em toda a borda da colônia e em grandes quantidades. A linhagem contendo a dupla deleção (*aap1Δ/aap2Δ*) apresentou uma leve aceleração de crescimento na primeira avaliação (sexto dia) quando comparado aos cruzamentos entre as linhagens controle, entretanto no 11º dia o crescimento de todas as linhagens aparentemente se igualam (**Figura 26**). Estes dados sugerem que as mutações avaliadas não impactaram no acasalamento.

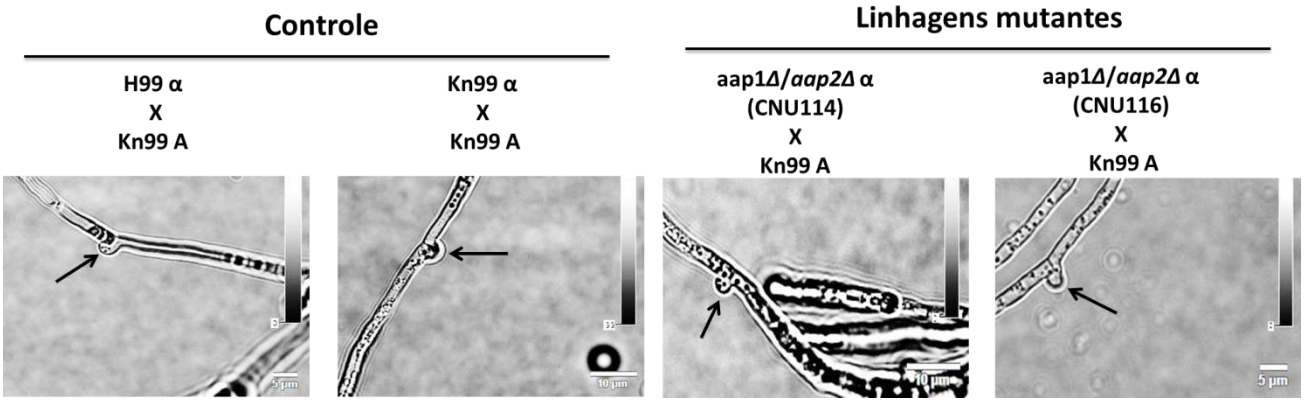
Figura 24. Acasalamento bisexual entre células MATa e MATα para avaliar a formação de hifas. Cultivo em meio Filament agar (pobre em nutrientes e água), entre linhagem selvagem Kn99a com linhagens mutantes do tipo α (***aap6Δ, aap8Δ e aap1Δ/aap2Δ***). Para controle do experimento foi utilizado o cruzamento entre linhagens selvagem Kn99a X Kn99α e Kn99a X H99. Dia 6 e 11 são imagems microscópicas com aumento de 400x. O "halo" branco ao redor das colônias no dia 34 são as formações de hifas visualizadas a olho nu.



Durante o acasalamento ocorre a fusão citoplasmática das células contendo os tipos sexuais a e α, e somente nesta união de sexos oposto que ocorre a formação de hifas dicarióticas com grampos de conexão *fusionados*. Portanto, para confirmação

dessa união foram feitas lâminas, as quais foram visualizadas em microscópio óptico (aumento de 1000x) para observar os grampos de conecção fusionados conforme (**Figura 27**).

Figura 25. Grampos de conexão fusionados (ver seta) das hifas, indicando que ocorreu a união entre dois tipos sexuais opostos. Imagens de microscopia com aumento de 1000x.



Em paralelo, foi avaliado se a deleção de outras permeases de aminoácidos (*aap1Δ, aap2Δ, aap4Δ, mup1Δ, mup3Δ e mup1Δ/mup3Δ*), produzidas por Martho *el al.* (2016) e pelo estudante de iniciação científica João Miguel Alves Nunes (2017), também poderiam influenciar no acasalamento, já que estes dados não haviam sido obtidos até então. Da mesma forma que os dados gerados para as deleções de *AAP6, AAP8 e AAP1/AAP2*, a deleção dessas outras permeases não influenciaram na formação de hifas e no acasalamento quando comparadas com a linhagem selvagem (dados não mostrados).

5 DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos que proporcionam a patogenicidade e virulência de *C. neoformans* é uma área de pesquisa cada vez mais necessária e importante em razão do crescente número de casos de criptococose em todo o mundo, e também porque esta levedura é um modelo biológico para estudo de patogênese e virulência. Uma visão mais profunda de como esse patógeno sintetiza, adquire ou recicla nutrientes dentro do hospedeiro nos permitirá compreender e encontrar uma opção de controle do seu crescimento e disseminação, bem como estes conhecimentos poderão ser aplicados para outros patógenos (KINGSBURY; MCCUSKER, 2010a; MUNSHI et al., 2015; WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017). Estudos sobre as vias de síntese e aquisição de aminoácidos têm relacionado estes processos celulares à virulência, mostrando que a falha nos mecanismos de biossíntese e captação de aminoácidos muitas vezes pode ser até letal para *C. neoformans* (YANG et al., 2002; PASCON, 2004; FERNANDES et al., 2015; MARTHO et al., 2016; OLIVE; SASSETTI, 2016; WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

Os aminoácidos fornecem a matéria prima para muitos processos celulares importantes, o principal deles é a síntese protéica, portanto, não é surpreendente que várias famílias de transportadores tenham evoluído para facilitar a aquisição dessas substâncias do meio ambiente para o compartimento intracelular (SAIER, JR, 2000; WATKINS; KING; JOHNSTON, 2017).

As proteínas de membrana pertencentes à superfamília APC transportam aminoácidos e aminas através das membranas e desempenham um papel importante na regulação dos processos celulares em situações de privação nutricional (KAUR et al., 2014), sistema esse regulado por repressão catabólica. Na ausência de nitrogênio essas permeases são requeridas para captação de aminoácidos, sendo assim um ótimo alvo para síntese de novas terapias contra o patógeno *C. neoformans*. Como desmonstrado por Chang et al., (2015) vários L- aminoácidos são boas fontes de nitrogênio para *C. neoformans* e isto está em concordância com os resultados deste trabalho.

A disponibilidade das sequências completa do genoma de fungos e seres humanos tornou possível uma visão dos transportadores entre estes reinos, e evidenciam uma infinidade de transportadores que diferem em localização, mecanismos de transporte e distribuição de tecido (WIPF et al., 2002). Através desse mecanismo foi possível averiguar, como já esperado, maior homologia das permeases de aminoácidos de *C. neoformans* (Aap1, Aap2, Aap6 e Aap8) com *S. cerevisiae*. Foi constatado que *C. neoformans, S. cerevisiae* e *H. sapiens* compartilham um domínio conservado e codificam proteínas de membrana com assinatura de *permease de aminoácidos*, entretanto essas proteínas de transporte de *C. neoformans* e *H. sapiens* possuem baixos níveis de similaridade, sugerindo que estas permeases podem ser suficientemente diferentes para serem alvos seletivos de drogas.

Através dessas observações foi possível identificar que a permease *AAP8* é requerida para o transporte dos aminoácidos treonina, metionina e glutamina em situação de estresse térmico, como mostraram as análises de assimilação de aminoácidos nos mutantes.

Os dados da assimilação de aminoácidos do duplo mutante (*aap1Δ/aap2Δ*) vão de encontro aos resultados obtidos em Martho et al. (2016), mostrando uma redução de crescimento frente ao aminoácido básico arginina como única fonte de nitrogênio. Além, a dupla deleção apontou queda no crescimento dessas linhagens quando utilizado o aminoácido glutamina a 30º C como fonte de nitrogênio, sinalizando que a combinação da dupla deleção pode afetar também a absorção deste aminoácido.

Ademais, o aumento na temperatura (37º C) confirma os dados publicados por Martho e colaboradores, pois mostram a redução de crescimentos em aminoácidos básicos assim como nos grupos amina, alifáticos, ácidos, aromáticos e levantam fortes suspeitas de redundância de permeases já que as deleções individuais das permeases 1 (*aap1Δ*) e permease 2 (*aap2Δ*) demonstram valores de crescimento menos impactantes quando comparado a dupla deleção (*aap1Δ/aap2Δ*), sugerindo que uma permease auxilia na ausência da outra, porém, na ausência das 2 permeases o crescimento é reduzido em uma gama de aminoácidos como fonte de nitrogênio.

Os resultados reafirmam a hipótese de que as permeases globais Aap4 e Aap5 são dominantes no transporte global de aminoácidos por permeases em *C. neoformans* (MARTHO et al., 2016). Além, as permeases Aap6, Aap8 e Aap1/Aap2 podem ser consideradas permeases globais de aminoácidos justamente por terem potencial de crescimento em amplo espectro de aminoácidos individuais e estruturalmente diferentes como única fonte de nitrogênio, mesmo que o crescimento deste tenha sido reduzido em relação ao selvagem.

De posse da informação de que a deleção das permeases *AAP8* e *AAP1/AAP2* afetam o crescimento em aminoácidos individuais, foi interessante avaliar, assim como nos estudos de Maurer, et al. (2015), o potencial de virulência de *C. neoformans* em modelo de estudo animal, na ausência dessas permeases. A larva de *G. mellonella* é uma ferramenta eficaz para detectar a interação patógeno- hospedeiro e esse experimento sugeriu que estas permeases de aminoácidos podem ser importantes para a virulência do patógeno (MAURER et al., 2015; MARTHO et al., 2016).

As células fúngicas com cápsula reduzida (ou acapsuladas) são rapidamente fagocitadas e destruídas pelo hospedeiro levando ao insucesso da infecção (DENHAM; BROWN, 2018). A atenuação da virulência dos mutantes *aap*1Δ/*aap*2Δ em modelo animal de *G. Mellonella* pode estar relacionada à diminuição de cápsula nestes mutantes. Entretando, a linhagem contendo a deleção da permease *AAP8* não mostrou redução de cápsula, mas foi hipovirulenta em modelo animal, indicando que a hipovirulência, neste caso, não está relacionada somente com a quantidade de cápsula produzida, mas provavelmente pela diminuição de aminoácidos disponíveis como fonte de nitrogênio.

No que se relaciona a avaliação do crescimento em diferentes condições nutricionais por diluição seriada (em placa - agar) não foi possível observar diferenças de crescimento as linhagens mutantes e o selvagem. Indicando que estas permeases não são essenciais para a sobrevivência nas diferentes condições nutricionais testadas, diferente do caso da dupla deleção das permeases *AAP4/AAP5* de Martho (2016). Porém, para a avaliação de crescimento em placa (YNB-N+AA) os aminoácidos

utilizados são L-triptofano, L- metionina e L-histidina e estão todos juntos em uma concentração de 10mM. Por mais que esses aminoácidos não sejam as fontes de nitrogênio preferencias de crescimento na linhagem selvagem, eles foram suficientes para suplementar o crescimento das linhagens mutantes (*aap1Δ/aap2Δ*) em ambas as temperaturas (30 e 37 ºC) na assimilação de aminoácidos, e consequentemente no crescimento em placa.

Neste projeto tentamos realizar o teste de frutificação haplóide (um processo estritamente mitótico e assexual) com as linhagens mutantes e selvagem, utilizando meio de cultura filament agar e temperatura de 30 ºC, porém não obtivemos exito nem mesmo com as linhagens controle. A frutificação e o acasalamento são ambos estimulados por condições ambientais similares (privação de nitrogênio, dessecação, ausência de luz e feromônios), e ambos envolvem o crescimento de hifas, produção de basídios e esporos (LIN; HULL; HEITMAN, 2005). No estudo de Fu, Morris & Wickes (2013) foi utilizado o meio de cultura filament agar (o mesmo utilizado em nossos experimentos), porém foi aplicado uma condição de *pré cultura* de células em YEPD, "*37 ºC"* por 24 horas, e posteriormente plaqueadas em meio específico. As células desse estudo resultaram em rápido crescimento e produção de hifas. As condições da cultura, ou mais precisamente, o estágio do ciclo celular parece ser uma explicação plausível para a não produção de hifas em nossos experimentos. Fu, Morris & Wickes (2013) apontaram que o mecanismo real na produção de hifas foi a parada G2 do ciclo celular, e justamente os estressores responsáveis pela parada neste ciclo são a depleção de oxigênio, fase de crescimento estacionária e a temperatura alta (37 ºC) (FU; MORRIS; WICKES, 2013).

6 CONCLUSÃO

O propósito deste trabalho foi avaliar o desempenho de *C. neoformans* na ausência de algumas permeases de aminoácidos (AAP6, AAP8 e AAP1/AAP2) em diversas situações que simulavam o ambiente hostil encontrado por ele no hospedeiro. Com esses experimentos foi possível verificar que *C. neoformans* e *H. sapiens* compartilham de um domínio conservado e codificam proteínas de membrana com assinatura de *permease de aminoácidos*, entretanto podem ser suficientemente diferentes para serem alvos seletivos de drogas. O aumento na temperatura (37º C) mostrou uma redução de crescimento do fungo na maioria dos aminoácidos testados para mutantes *aap1Δ/aap2Δ,* assim como a diminuição do volume capsular, redução da concentração de fluconazol e hipovirulência em modelo animal de invertebrados. As permeases AAP6, AAP8 e AAP1/AAP2 podem ser consideradas permeases globais de aminoácidos por terem potencial de crescimento em um amplo espectro de aminoácidos individuais e estruturalmente diferentes como única fonte de nitrogênio.

REFERÊNCIAS*

ACHESON, E. S.; GALANIS, E.; BARTLETT, K.; MAK, S.; KLINKENBERG, B. Searching for clues for eighteen years: Deciphering the ecological determinants of Cryptococcus gattii on Vancouver Island, British Columbia. **Medical Mycology**, v. 56, n. 2, p. 129–144, 1 fev. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1093/mmy/myx037>.

AGUIAR, P. A. D. F. de; PEDROSO, R. D. S.; BORGES, A. S.; MOREIRA, T. de A.; ARAÚJO, L. B. de; RÖDER, D. von D. de B. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of Cryptococcus neoformans isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. February 2016, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652017005000208&lng=en&tlng=en>.

ALBERTS BRUCE; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER., P. **Molecular Biology of the Cell**. [s.l: s.n.]

ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; ARTURO CASADEVALL. Virulence-Associated Enzymes of. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173–1185, 2015.

AN, Z.; TASSA, A.; THOMAS, C.; ZHONG, R.; XIAO, G.; FOTEDAR, R.; TU, B. P.; KLIONSKY, D. J.; LEVINE, B. Autophagy is required for G 1 /G 0 quiescence in response to nitrogen starvation in Saccharomyces cerevisiae. **Autophagy**, v. 10, n. 10, p. 1702–1711, 17 out. 2014. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.32122%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25126732%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4198356>.

ANDES, D. Optimizing antifungal choice and administration. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, n. sup4, p. 13–18, 26 abr. 2013. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1185/03007995.2012.761135>.

ANDRÉ, B. An overview of membrane transport proteins inSaccharomyces cerevisiae. **Yeast**, v. 11, n. 16, p. 1575–1611, dez. 1995. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.320111605>.

BERGIN, D.; REEVES, E. P.; RENWICK, J.; FRANS, B.; KAVANAGH, K.; WIENTJES, F. B. Superoxide Production in Galleria mellonella Hemocytes : Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils Superoxide Production in Galleria mellonella Hemocytes : Identification of Proteins Homologous to the NADPH Ox. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 4161–4170, 2005.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. **Cryptococcus neoformans**. Washington, DC, USA: ASM Press, 1998.

CHANG, Y. C.; KHANAL LAMICHHANE, A.; BRADLEY, J.; RODGERS, L.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; KWON-CHUNG, K. J. Differences between Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii in the Molecular Mechanisms Governing Utilization of D-Amino Acids as the Sole Nitrogen Source. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0131865, 1 jul. 2015. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0131865>.

CHRISMAN, C. J.; ALBUQUERQUE, P.; GUIMARAES, A. J.; NIEVES, E.; CASADEVALL, A.

Phospholipids Trigger Cryptococcus neoformans Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002047, 26 maio 2011. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002047>.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of Cryptococcus neoformans. In: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. 87p. 1–41.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C. A.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for Cryptococcus neoformans. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166–175, jan. 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x>.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443–448, 1 fev. 2000. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.68.2.443-448.2000>.

DARVISHI, E.; OMIDI, M.; BUSHEHRI, A. A. S.; GOLSHANI, A.; SMITH, M. L. The Antifungal Eugenol Perturbs Dual Aromatic and Branched-Chain Amino Acid Permeases in the Cytoplasmic Membrane of Yeast. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76028, 18 out. 2013. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076028>.

DE ASSIS GONTIJO, F.; DE MELO, A. T.; PASCON, R. C.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; ALSPAUGH, J. A.; VALLIM, M. A. The role of Aspartyl aminopeptidase (Ape4) in Cryptococcus neoformans virulence and authophagy. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–24, 2017.

DENHAM, S.; BROWN, J. Mechanisms of Pulmonary Escape and Dissemination by Cryptococcus neoformans. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 25, 17 fev. 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/1/25>.

DENHAM, S. T.; VERMA, S.; REYNOLDS, R. C.; WORNE, C. L.; DAUGHERTY, J. M.; LANE, T. E.; BROWN, J. C. S. Regulated release of cryptococcal polysaccharide drives virulence and suppresses immune cell infiltration into the central nervous system. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 3, p. 1–21, 2018.

ERB-DOWNWARD, J. R.; NOGGLE, R. M.; WILLIAMSON, P. R.; HUFFNAGLE, G. B. The role of laccase in prostaglandin production by Cryptococcus neoformans. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1428–1437, jun. 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2008.06245.x>.

FEDER, V.; KMETZSCH, L.; STAATS, C. C.; VIDAL-FIGUEIREDO, N.; LIGABUE-BRAUN, R.; CARLINI, C. R.; VAINSTEIN, M. H. Cryptococcus gattii urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **FEBS Journal**, v. 282, n. 8, p. 1406–1418, abr. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13229>.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by Cryptococcus neoformans. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 273–278, jun. 2001. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X01020352>.

FERNANDES, J. D. S.; MARTHO, K.; TOFIK, V.; VALLIM, M. A.; PASCON, R. C. The Role of Amino Acid Permeases and Tryptophan Biosynthesis in Cryptococcus neoformans Survival.

PLOS ONE, v. 10, n. 7, p. e0132369, 10 jul. 2015. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132369>.

FU, C.; SUN, S.; BILLMYRE, R. B.; ROACH, K. C.; HEITMAN, J. Unisexual versus bisexual mating in Cryptococcus neoformans: Consequences and biological impacts. **Fungal Genet Biology**, v. 78, p. 65–75, 2016.

FU, J.; MORRIS, I. R.; WICKES, B. L. The Production of Monokaryotic Hyphae by Cryptococcus neoformans Can Be Induced by High Temperature Arrest of the Cell Cycle and Is Independent of Same-Sex Mating. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 5, p. e1003335, 2 maio 2013. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003335>.

GANENDREN, R.; WIDMER, F.; SINGHAL, V.; WILSON, C.; SORRELL, T.; WRIGHT, L. In Vitro Antifungal Activities of Inhibitors of Phospholipases from the Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans In Vitro Antifungal Activities of Inhibitors of Phospholipases from the Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans. v. 48, n. 5, p. 1561–1569, 2004.

GARCIA-HERMOSO, D. E. A.; JANBON, G. Epidemiological Evidence for Dormant Cryptococcus neoformans Infection. **Society**, v. 37, n. 10, p. 3204–3209, 1999.

GOURNAS, C.; EVANGELIDIS, T.; ATHANASOPOULOS, A.; MIKROS, E.; SOPHIANOPOULOU, V. The *Aspergillus nidulans* Proline Permease as a Model for Understanding the Factors Determining Substrate Binding and Specificity of Fungal Amino Acid Transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 10, p. 6141–6155, 2015. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.612069>.

GUERRERO, A.; FRIES, B. C. Phenotypic Switching in Cryptococcus neoformans Contributes to Virulence by Changing the Immunological Host Response. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4322–4331, 1 set. 2008. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.00529-08>.

GYAWALI, R.; ZHAO, Y.; LIN, J.; FAN, Y.; XU, X.; UPADHYAY, S.; LIN, X. Pheromone independent unisexual development in Cryptococcus neoformans. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 5, p. e1006772, 3 maio 2017. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1006772>.

HOFFMAN, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformaion of Escherichia coli. **Gene**, v. 57, n. 2–3, p. 267–272, jan. 1987. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378111987901314>.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Effects of Melanin upon Susceptibility of Cryptococcus to Antifungals. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 4, p. 271–277, abr. 2003. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x>.

JANBON, G.; ORMEROD, K. L.; PAULET, D.; BYRNES, E. J.; YADAV, V.; CHATTERJEE, G.; MULLAPUDI, N.; HON, C.-C.; BILLMYRE, R. B.; BRUNEL, F.; BAHN, Y.-S.; CHEN, W.; CHEN, Y.; CHOW, E. W. L.; COPPÉE, J.-Y.; FLOYD-AVERETTE, A.; GAILLARDIN, C.; GERIK, K. J.; GOLDBERG, J.; GONZALEZ-HILARION, S.; GUJJA, S.; HAMLIN, J. L.; HSUEH, Y.-P.; IANIRI, G.; JONES, S.; KODIRA, C. D.; KOZUBOWSKI, L.; LAM, W.; MARRA, M.; MESNER, L. D.; MIECZKOWSKI, P. A.; MOYRAND, F.; NIELSEN, K.; PROUX, C.; ROSSIGNOL, T.; SCHEIN, J. E.; SUN, S.; WOLLSCHLAEGER, C.; WOOD, I. A.; ZENG, Q.; NEUVÉGLISE, C.; NEWLON, C. S.; PERFECT, J. R.; LODGE, J. K.; IDNURM, A.; STAJICH, J. E.; KRONSTAD, J. W.; SANYAL, K.; HEITMAN, J.; FRASER, J. A.; CUOMO, C. A.; DIETRICH, F. S. Analysis of the Genome and

Transcriptome of Cryptococcus neoformans var. grubii Reveals Complex RNA Expression and Microevolution Leading to Virulence Attenuation. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 4, p. e1004261, 17 abr. 2014. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004261>.

KAUR, J.; OLKHOVA, E.; MALVIYA, V. N.; GRELL, E.; MICHEL, H. A l-Lysine Transporter of High Stereoselectivity of the Amino Acid-Polyamine-Organocation (APC) Superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 3, p. 1377–1387, 17 jan. 2014. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M113.510743>.

KAVANAGH, K. **Fungi**. Ireland: British Library, 2005a.

KAVANAGH, K. **Fungi**. [s.l: s.n.]

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of Cryptococcus gattii caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 7 dez. 2004. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402981101>.

KIM, M. S.; KIM, S. Y.; YOON, J. K.; LEE, Y. W.; BAHN, Y. S. An efficient gene-disruption method in Cryptococcus neoformans by double-joint PCR with NAT-split markers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 3, p. 983–988, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.089>.

KINGSBURY, J. M. Cryptococcus neoformans Ilv2p confers resistance to sulfometuron methyl and is required for survival at 37 C and in vivo. **Microbiology**, v. 150, n. 5, p. 1547–1558, 1 maio 2004. Disponível em: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26928-0>.

KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Threonine biosynthetic genes are essential in Cryptococcus neoformans. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 9, p. 2767–2775, 2009.

KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Homoserine toxicity in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans homoserine kinase (thr1δ) mutants. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 5, p. 717–728, 2010a.

KINGSBURY, J. M.; MCCUSKER, J. H. Fungal Homoserine Kinase (thr1 Δ) Mutants Are Attenuated in Virulence and Die Rapidly upon Threonine Starvation and Serum Incubation. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 5, p. 729–737, maio 2010b. Disponível em: <http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.00045-10>.

KINGSBURY, J. M.; YANG, Z.; GANOUS, T. M.; COX, G. M.; MCCUSKER, J. H. Novel Chimeric Spermidine Synthase-Saccharopine Dehydrogenase Gene (SPE3-LYS9) in the Human Pathogen Cryptococcus neoformans Novel Chimeric Spermidine Synthase-Saccharopine Dehydrogenase Gene (SPE3-LYS9) in the Human Pathogen Cryptococcus neoformans †. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 3, p. 752–763, 2004.

KOZEL, T. R.; HERMERATH, C. A. Binding of cryptococcal polysaccharide to Cryptococcus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 43, n. 3, p. 879–886, 1984.

KOZUBOWSKI, L.; HEITMAN, J. **Profiling a killer, the development of Cryptococcus neoformansFEMS Microbiology Reviews**, 2012. .

KRONSTAD, J.; SAIKIA, S.; NIELSON, E. D.; KRETSCHMER, M.; JUNG, W.; HU, G.; GEDDES, J. M. H.; GRIFFITHS, E. J.; CHOI, J.; CADIEUX, B.; CAZA, M.; ATTARIAN, R. Adaptation of Cryptococcus neoformans to Mammalian Hosts: Integrated Regulation of Metabolism and Virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 2, p. 109–118, fev. 2012. Disponível em: <http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.05273-11>.

KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C. A.; GRIFFITHS, E. J.; GEDDES, J. M. H.; HU, G.; JUNG, W. H.; KRETSCHMER, M.; SAIKIA, S.; WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193–203, 1 mar. 2011. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2522>.

KUMAR, P.; YANG, M.; HAYNES, B. C.; SKOWYRA, M. L.; DOERING, T. L. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, n. 5, p. 597–602, 2011.

KWON-CHUNG, A. K. J. Mycological Society of America Morphogenesis of Filobasidiella neoformans , the Sexual State of Cryptococcus neoformans MORPHOGENESIS OF FILOBASIDIELLA NEOFORMANS , THE SEXUAL STATE OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. v. 68, n. 4, p. 821–833, 2014.

KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z. A.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y.-S. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760–a019760, 1 jul. 2014. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019760>.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in Cryptococccus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 218–223, 1986.

LEE, I. R.; YANG, L.; SEBETSO, G.; ALLEN, R.; DOAN, T. H. N.; BLUNDELL, R.; LUI, E. Y. L.; MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Characterization of the Complete Uric Acid Degradation Pathway in the Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64292, 7 maio 2013. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0064292>.

LENGELER, K. B.; FOX, D. S.; FRASER, J. a; FORRESTER, K.; DIETRICH, F. S.; HEITMAN, J.; ALLEN, A. Mating-Type Locus of *Cryptococcus neoformans*: a Step in the Evolution of Sex Chromosomes Mating-Type Locus of Cryptococcus neoformans : a Step in the Evolution of Sex Chromosomes. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 5, p. 704–718, 2002.

LEVITZ, S. M.; DUPONT, M. P.; SMAIL, E. H. Direct activity of human T lymphocytes and natural killer cells against Cryptococcus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 194–202, 1994.

LI, C.; LEV, S.; SAIARDI, A.; DESMARINI, D.; SORRELL, T. C.; DJORDJEVIC, J. T. Identification of a major IP5 kinase in Cryptococcus neoformans confirms that PP-IP5/IP7, not IP6, is essential for virulence. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23927, 1 jul. 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep23927>.

LI, W.; AVERETTE, A. F.; DESNOS-OLLIVIER, M.; NI, M.; DROMER, F.; HEITMAN, J. Genetic Diversity and Genomic Plasticity of Cryptococcus neoformans AD Hybrid Strains. **G3:**

Genes|Genomes|Genetics, v. 2, n. 1, p. 83–97, jan. 2012. Disponível em: <http://g3journal.org/lookup/doi/10.1534/g3.111.001255>.

LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in Cryptococcus neoformans. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 1017–1021, 21 abr. 2005. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature03448>.

LIN, X.; PATEL, S.; LITVINTSEVA, A. P.; FLOYD, A.; MITCHELL, T. G.; HEITMAN, J. Diploids in the Cryptococcus neoformans Serotype A Population Homozygous for the α Mating Type Originate via Unisexual Mating. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 1, p. e1000283, 30 jan. 2009. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000283>.

LIU, O. W.; CHUN, C. D.; CHOW, E. D.; CHEN, C.; MADHANI, H. D.; NOBLE, S. M. Systematic Genetic Analysis of Virulence in the Human Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 174–188, out. 2008. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740801012X>.

LIU, P.-Y.; YANG, Y.; SHI, Z.-Y. Cryptococcal liver abscess: a case report of successful treatment with amphotericin-B and literature review. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 62, p. 59–60, 2009.

MACDOUGALL, L.; KIDD, S. E.; GALANIS, E.; MAK, S.; LESLIE, M. J.; CIESLAK, P. R.; KRONSTAD, J. W.; MORSHED, M. G.; BARTLETT, K. H. Spread of Cryptococcus gattii in British Columbia, Canada, and Detection in the Pacific Northwest, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 42–50, jan. 2007. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/1/06-0827_article.htm>.

MARTHO, K. F. C.; DE MELO, A. T.; TAKAHASHI, J. P. F.; GUERRA, J. M.; SANTOS, D. C. da S.; PURISCO, S. U.; MELHEM, M. D. S. C.; FAZIOLI, R. dos A.; PHANORD, C.; SARTORELLI, P.; VALLIM, M. A.; PASCON, R. C. Amino Acid Permeases and Virulence in Cryptococcus neoformans. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0163919, 3 out. 2016. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0163919>.

MAURER, E.; BROWNE, N.; SURLIS, C.; JUKIC, E.; MOSER, P.; KAVANAGH, K.; LASS-FLÖRL, C.; BINDER, U. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 591–598, 2015. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2015.1045183>.

MAY, R. C.; STONE, N. R. H.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–117, 21 fev. 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2015.6>.

MCQUISTON, T.; LUBERTO, C.; DEL POETA, M. Role of sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P receptor 2 in the phagocytosis of Cryptococcus neoformans by alveolar macrophages. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1416–1427, 2011.

MEHRA, T.; KÖBERLE, M.; BRAUNSDORF, C.; MAILÄNDER-SANCHEZ, D.; BORELLI, C.; SCHALLER, M. Alternative approaches to antifungal therapies. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 10, p. 778–782, out. 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/exd.12004>.

MEYER, W.; AANENSEN, D. M.; BOEKHOUT, T.; COGLIATI, M.; DIAZ, M. R.; ESPOSTO, M.

C.; FISHER, M.; GILGADO, F.; HAGEN, F.; LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G.; SIMWAMI, S. P.; VIVIANI, M. A.; KWON-CHUNG, J. NIH Public Access. **Med Mycol.**, v. 47, n. 6, p. 561–570, 2009.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1–7, 19 fev. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000700202&lng=en&tlng=en>.

MUKAREMERA, L.; NIELSEN, K. Adaptive Immunity to Cryptococcus neoformans Infections. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 64, 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/64>.

MUNSHI, M. A.; GARDIN, J. M.; SINGH, A.; LUBERTO, C.; RIEGER, R.; BOUKLAS6, T.; FRIES1, B. C.; POETA, M. Del. The Role of Ceramide Synthases in the Pathogenicity of Cryptococcus neoformans. **Cell Rep. Author manuscript**, v. 74, n. 4, p. 1095–1102, out. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.25492>.

MYLONAKIS, E.; MORENO, R.; EL, J. B.; IDNURM, A.; HEITMAN, J.; STEPHEN, B.; AUSUBEL, F. M.; DIENER, A.; KHOURY, J. B. El; CALDERWOOD, S. B. Galleria mellonella as a Model System To Study Cryptococcus neoformans Pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842–2850, 2005.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599–609, nov. 2012. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X12000351>.

NI, M.; FERETZAKI, M.; SUN, S.; WANG, X.; HEITMAN, J. Sex in Fungi. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 405–430, 2011. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-110410-132536>.

NIELSEN, K.; COX, G. M.; WANG, P.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Sexual Cycle of Cryptococcus neoformans var. grubii and Virulence of Congenic a and α Isolates. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4831–4841, 2003.

O'MEARA, T. R.; ANDREW ALSPAUGH, J. The Cryptococcus neoformans capsule: A sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012.

OLIVE, A. J.; SASSETTI, C. M. Metabolic crosstalk between host and pathogen: sensing, adapting and competing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 221–234, 7 abr. 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.12>.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASADEVALL, A.; GALGIANI, J. N.; ODDS, F. C.; REX, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, 20 set. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3074>.

PALIWAL, D. K.; RANDHAWA, H. S. Evaluation of a simplified Guizotia abyssinica seed medium for differentiation of Cryptococcus neoformans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 346–348, 1978.

PASCON, R. C. Cryptococcus neoformans methionine synthase: expression analysis and requirement for virulence. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 3013–3023, 2004. Disponível em:

<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27235-0>.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 12 maio 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd.2017.46>.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837–874, 2002.

PK, M.; MU., A. Cryptococcus (Cryptococcosis). **StatPearls**, p. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431060/, 2017.

POPOV-ČELEKETIĆ, D.; BIANCHI, F.; RUIZ, S. J.; MEUTIAWATI, F.; POOLMAN, B. A Plasma Membrane Association Module in Yeast Amino Acid Transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 31, p. 16024–16037, 29 jul. 2016. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.706770>.

PRICE, M. F.; WILKINSON, A. N. D.; GENTRY, L. O. Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in Candida Albicans. **Sabouraudia**, v. 20, n. July 1981, p. 7–14, 1982.

RAJASINGHAM, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N.; GOVENDER, N. P.; CHILLER, T. M.; DENNING, D. W.; LOYSE, A.; BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309917302438>.

RHODES, J.; DESJARDINS, C. A.; SYKES, S. M.; BEALE, M. A.; VANHOVE, M.; SAKTHIKUMAR, S.; CHEN, Y.; GUJJA, S.; SAIF, S.; CHOWDHARY, A.; LAWSON, D. J.; PONZIO, V.; COLOMBO, A. L.; MEYER, W.; ENGELTHALER, D. M.; HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; ALANIO, A.; VREULINK, J.-M.; HEITMAN, J.; PERFECT, J. R.; LITVINTSEVA, A. P.; BICANIC, T.; HARRISON, T. S.; FISHER, M. C.; CUOMO, C. A. Tracing Genetic Exchange and Biogeography of Cryptococcus neoformans var. grubii at the Global Population Level. **Genetics**, v. 207, n. 1, p. 327 LP-346, 1 set. 2017. Disponível em: <http://www.genetics.org/content/207/1/327.abstract>.

ROBERT, V. A.; CASADEVALL, A. Vertebrate Endothermy Restricts Most Fungi as Potential Pathogens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 10, p. 1623–1626, 15 nov. 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/644642>.

RONCERO, C.; DURAN, A. Effect of Calcofluor White and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 3, p. 1180–1185, 1985.

ROSSI, S. A.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A. C.; DE OLIVEIRA, H. C.; WERTHER, K.; DE FREITAS RASO, T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ZARAGOZA, O.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Impact of Resistance to Fluconazole on Virulence and Morphological Aspects of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–14, 16 fev. 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00153/abstract>.

RUSSEL LEE, I.; CHOW, E. W. L.; MORROW, C. A.; DJORDJEVIC, J. T.; FRASER, J. A.

Nitrogen metabolite repression of metabolism and virulence in the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. **Genetics**, v. 188, n. 2, p. 309–323, 2011.

SAIER, JR, M. H. Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. **Microbiology**, v. 146, n. 8, p. 1775–1795, 1 ago. 2000. Disponível em: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-146-8-1775>.

SANTANGELO, R.; ZOELLNER, H.; SORRELL, T.; WILSON, C.; DONALD, C.; DJORDJEVIC, J.; WRIGHT, L.; SHOUNAN, Y. Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in a Murine Model Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in a Murine Model. **American Society for Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2229–2239, 2004.

SEIDER, K.; HEYKEN, A.; LÜTTICH, A.; MIRAMÓN, P.; HUBE, B. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 392–400, ago. 2010. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000627>.

SINGH, A.; PANTING, R.; VARMA, A.; SAIJO, T.; WALDRON, K. J.; JONG, A.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y. C.; RUTHERFORD, J. C.; KWON-CHUNG, K. J. Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in Cryptococcus neoformans. **mBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013. Disponível em: <http://mbio.asm.org/content/4/3/e00220-13.short>.

SMITH, K. D.; ACHAN, B.; HULLSIEK, K. H.; MCDONALD, T. R.; OKAGAKI, L. H.; ALHADAB, A. A.; AKAMPURIRA, A.; RHEIN, J. R.; MEYA, D. B.; BOULWARE, D. R.; NIELSEN, K. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of Cryptococcus neoformans in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, dez. 2015. Disponível em: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01299-15>.

SOPHIANOPOULOU, V.; DIALLINAS, G. Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 53–75, jan. 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00155.x>.

SPRINGER, D. J.; MOHAN, R.; HEITMAN, J. Plants promote mating and dispersal of the human pathogenic fungus Cryptococcus. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–21, 2017.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. Cryptococcus neoformans : historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47–60, fev. 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.2997>.

STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D.; STEPHANIE, D.; CASADEVALL, A.; MALLIARIS, S. D. Cryptococcus neoformans Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host Dictyostelium discoideum Cryptococcus neoformans Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host Dictyostelium discoideum. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4862–4872, 2003.

SUN, S.; BILLMYRE, R. B.; MIECZKOWSKI, P. A.; HEITMAN, J. Unisexual Reproduction Drives Meiotic Recombination and Phenotypic and Karyotypic Plasticity in Cryptococcus neoformans. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 12, p. e1004849, 11 dez. 2014. Disponível em:

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004849>.

TOFFALETTI, D. L.; RUDE, T. H.; JOHNSTON, S. A.; DURACK, D. T.; PERFECT, J. R. Gene transfer in Cryptococcus neoformans by use of biolistic delivery of DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 5, p. 1405–1411, 1993.

TRYPHON K. MAZU; BRICKER, B. A.; FLORES-ROZAS, H.; ABLORDEPPEY, S. Y. Molecular Mechanisms of Mitochondrial Autophagy/Mitophagy in the Heart. **Mini Rev Med Chem.**, v. 116, n. 8, p. 1477–1490, 10 abr. 2015. Disponível em: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.116.303790>.

VECCHIARELLI, a; PIETRELLA, D.; DOTTORINI, M.; MONARI, C.; RETINI, C.; TODISCO, T.; BISTONI, F. Encapsulation of Cryptococcus neoformans regulates fungicidal activity and the antigen presentation process in human alveolar macrophages. **Clinical and experimental immunology**, v. 98, n. 2, p. 217–223, 1994.

VÉLEZ, N.; ESCANDÓN, P. [RETRACTED ARTICLE]: Distribution and association between environmental and clinical isolates of Cryptococcus neoformans in Bogotá-Colombia, 2012-2015. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 642–648, 3 out. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016001000642&lng=en&tlng=en>.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 6, p. 835–846, jun. 2010. Disponível em: <http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.00039-10>.

WANG, L.; LIN, X. Mechanisms of unisexual mating in Cryptococcus neoformans. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 7, p. 651–660, jul. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2011.02.001>.

WATKINS, R.; KING, J.; JOHNSTON, S. Nutritional Requirements and Their Importance for Virulence of Pathogenic Cryptococcus Species. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 65, 30 set. 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-2607/5/4/65>.

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of Cryptococcus neoformans: identification as a laccase. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 3, p. 656–664, fev. 1994. Disponível em: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/jb.176.3.656-664.1994>.

WIPF, D.; LOQUÉ, D.; LALONDE, S.; FROMMER, W. B. Amino Acid Transporter Inventory of the Selaginella Genome. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. April, p. 1–6, 2012. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2012.00036/abstract>.

WIPF, D.; LUDEWIG, U.; TEGEDER, M.; RENTSCH, D.; KOCH, W.; FROMMER, W. B. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 3, p. 139–147, mar. 2002. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000401020540>.

YANG, Z.; PASCON, R. C.; ALSPAUGH, J. A.; COX, G. M.; MCCUSKER, J. H. Molecular and genetic analysis of the *Cryptococcus neoformans MET3* gene and *met3* mutant. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 8, p. 2617–2625, 2002.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in Cryptococcus neoformans. **Biological Procedures Online**, v. 6, n. 1, p. 10–15, jan. 2004. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/10.1251/bpo68>.

ZARAGOZA, O.; GANCEDO, J. M. Pseudohyphal growth is induced in Saccharomyces cerevisiae by a combination of stress and cAMP signalling. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 187–194, 2000.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen Cryptococcus neoformans. In: **Adv Appl Microbiol**. [s.l: s.n.]68p. 133–216.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002a. 24 p.

ANEXOS

A. Lista de microrganismos utilizados neste trabalho.

	GENÓTIPO	CARACTERÍSTICAS	ORIGEM
H99	MATalpha	Selvagem	Duke University Medical Center
Kn99α	MATalpha	Selvagem	Duke University Medical Center
Kn99a	MATa	Selvagem	Duke University Medical Center
CNU92/093	ΔAap6 ::NeoR	Deleção do gene responsável por codificar a permease 6	TCC* da aluna Camila Oliveira Ferreira
CNU099/100	ΔAap8::HygR	Deleção do gene responsável por codificar a permease 6	TCC da aluna Camila Oliveira Ferreira
CNU114/116/118	ΔAap1/Aap2::NeoR	Deleção dos genes responsáveis por codificar as permeases 1 e 2	Construído neste trabalho
CNU103	ΔAap1::HygR	Deleção do gene responsável por codificar a permease 1	IC** do aluno João Miguel Nunes
CNU037	ΔAap2::NeoR	Deleção do gene responsável por codificar a permease 2	Martho et al ., 2016
CNU038	ΔAap4::NeoR	Deleção do gene responsável por codificar a permease 4	Martho et al ., 2016
CNU050	Δaap5::NeoR	Deleção do gene responsável por codificar a permease 5	
CNU069	ΔMup1::NeoR	Deleção do gene responsável por codificar a permease mup1	Martho et al ., 2016
CNU059	ΔMup3::HygR	Deleção do gene responsável por codificar a permease mup3	Martho et al ., 2016
CNU078	ΔMup1::NeoR /Mup3::HygR	Deleção dos genes responsáveis por codificar as permeases mup 1 e 3	Martho et al ., 2016
MCV101	ΔApe4	Deleção do gene responsável por codificar Aspetil aminopeptidase – baixa produção de fosfolipase B	Gontijo et al ., 2017
H99	H86	Deficiência na produção da enzima lacase para síntese de melanina	
BY 4742 Sacaromices cerevisiae		Não produtora de urease	GR****

*Trabalho de conclusão de curso; **Iniciação científica Genetic Research; ***American Type Culture Collection; ****Genetic Research Company.;

B. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Oligonucleotídeos utilizados na deleção das permeases Aap1, Aap2, Aap6, Aap8 e Aap1/Aap2.

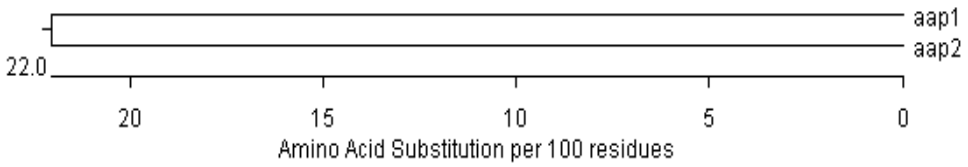
Primers	Sequências (5' - 3')	Alvo
PRCP329	GCAGTTCTCACCATCAGGTG	BE- F Aap1
PRCP330	CTCCAGCTCACATCCTCGCACTTTGCTGTTATGCGCGCTT	BE –R Aap1
PRCP331	AAGCGCGCATAACAGCAAAGTGCGAGGATGTGAGCTGGAG	Promotor de ac – F Aap1
PRCP211	CCCGAACATCGCCTCGCTC	Promotor de actina – R Aap1
PRCP212	ATCCCCATGTGTATCACTGGC	Hyg – F Aap1
PRCP333	GGAAGCTAGTTTCTACATCTCTTCGGTGGTTTGATGAAGCTTTG	Trp – R Aap1
PRCP332	CAAAGCTTCATCAAACCACCGAAGAGATGTAGAAACTAGCTTCC	BD – F Aap1
PRCP334	GGGTTGAACCTGTACTTTTTG	BD – R Aap1
PRCP329	GCAGTTCTCACCATCAGGTG	Aap1-BE - F
PRCP330	CTCCAGCTCACATCCTCGCACTTTGCTGTTATGCGCGCTT	Aap1-M1 -F
PRCP331	AAGCGCGCATAACAGCAAAGTGCGAGGATGTGAGCTGGAG	Aap1 – M1 - R
PRCP211	AAGCGCGCATAACAGCAAAGTGCGAGGATGTGAGCTGGAG	Aap1 – M1 - F
PRCP212	CCCGAACATCGCCTCGCTC	Aap1 – M2 – F
PRCP332	ATCCCCATGTGTATCACTGGC	Aap1 – M2 – R
PRCP333	CAAAGCTTCATCAAACCACCGAAGAGATGTAGAAACTAGCTTCC	Aap1 – BD - F
PRCP334	GGAAGCTAGTTTCTACATCTCTTCGGTGGTTTGATGAAGCTTTG	Aap1 – BD - R
PRCP335	GGGTTGAACCTGTACTTTTTG	confirmatório
PRCP315	GATGGAGGAATCCAGATACG	BE – aap6
PRCP317	CTCCAGCTCACATCCTCGCACTTCTCTCAGCTGTTATGTATG	BE – aap6
PRCP316	CATACATAACAGCTGAGAGAAGTGCGAGGATGTGAGCTGGAG	ME – aap6
PRCP214	TCGCTTGGTGGTCGAATGGG	ME – aap6
PRCP213	ACGACGGGCGTTCCTTGCG	MD – aap6
PRCP319	CCACCGCCCGTATTTCAATCTCAGAAGAGATGTAGAAACTAGCTTCC	MD – aap6
PRCP318	GGAAGCTAGTTTCTACATCTCTTCTGAGATTGAAATACGGGCGGTGG	BD – aap6
PRCP320	CGTCGATAGTTAGATAAAGC	BD – aap6
PRCP323	TCGTCGTTGTTCTTATCGG	BE – aap8
PRCP325	CTCCAGCTCACATCCTCGCAGGCCAAGATGGTAAAAAATTGGG	BE – aap8
PRCP324	CCCAATTTTTTACCATCTTGGCCTGCGAGGATGTGAGCTGGAG	ME – aap8
PRCP211	CCCGAACATCGCCTCGCTC	ME – aap8
PRCP212	ATCCCCATGTGTATCACTGGC	MD – aap8
PRCP327	GATTCGAACATCCACTTGACTTGAAGAGATGTAGAAACTAGCTTCC	MD – aap8
PRCP326	GGAAGCTAGTTTCTACATCTCTTCAAGTCAAGTGGATGTTCGAATC	BD – aap8
PRCP328	TCCGGTGGTGCATAGTCCAG	BD – aap8

C. Alinhamento entre permeases AAP1 e AAP2.

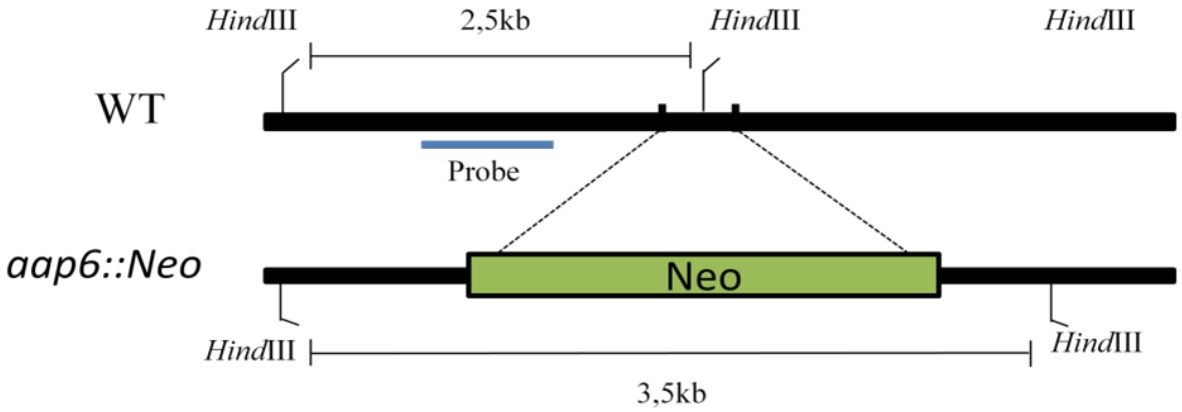
Alinhamento de aminoácidos (Clustel W) com identidade em 80,9% entre as permeases AAP1 e AAP2.

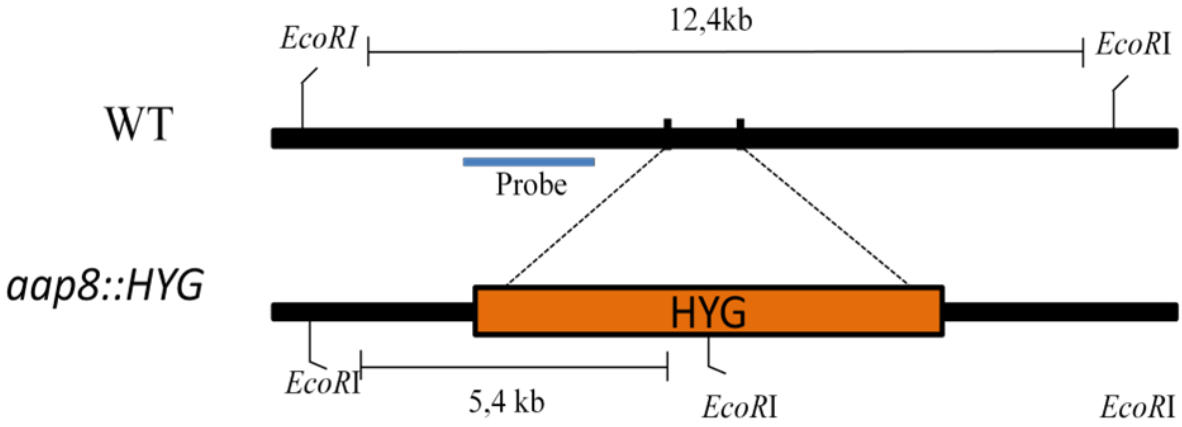
```
Majority   MSXXXEXEXXXXXXXXXXXXXXXXXPXXXXXGXXXXVTXAXXEKGGXEGXGXXXGEGTVHRXLKQRHMXMI ALGGAI GTG
                     10        20        30        40        50        60        70        80
aap1       MSI PYETE- - - KDKSI SGGSQGAMTPI NGKSGNEVLVTPALGEKGGFEGSGGNPGEGTVHRSLKQRHMSMI ALGGAI GTG  77
aap2       MSSAI EKEGSI RGRTSQEVVSAGYDPKKSGDGVDTVVTAAHAEKGGYEGEGI HLGEGTVHRQLKQRHMAMI ALGGAI GTG  80

Majority   LFVGSGSALAXGGPVGXWLGYXFMXXMVYXMMVALGEMAXLYPVXGAFTHYAXRFVDPXLGFAXGXNYWYSYAXTI PTEX
                    90       100       110       120       130       140       150       160
aap1       LFVGSGSALATGGPVGFWLGYVFMGLMVYSMMVALGEMASLYPVAGAFTHYAARFVDPALGFATGI NYWYSYAI TI PTEI  157
aap2       LFVGSGSALASGGPVGVWLGYI FMASMVYAMMVALGEMAALYPVSGAFTHYASRFVDPSLGFALGF NYWYSYAVTI PTEV  160

Majority   VAAXI VI SYWDXTTNXAXYI TVCXVXI XXI NFXGARAYGEAEFWFXSXKXXTI VGLI I LGI VLMCGGGPNHDXI GFRYWR
                   170       180       190       200       210       220       230       240
aap1       VAATI VI SYWDSTTNAAVYI TVCFVSI I AI NFLGARAYGEAEFWFCSVKI VTI VGLI I LGI VLMCGGGPNHDAI GFRYWR  237
aap2       VAASI VI SYWDTTTNVAI YI TVCLVLI WFI NFWGARAYGEAEFWFSSI KVI TI VGLI I LGI VLMCGGGPNHDPI GFRYWR  240

Majority   XPGPFAQI TI XNGXGVXPGRWGQFLAFWNVFVQAAFSFI GTEI I ATTLGEAENPRKTVPRAI KXVFFRXLFFYVXGXFXI
                   250       260       270       280       290       300       310       320
aap1       DPGPFAQI TI ENGAGVVPGRWGQFLAFWNVFVQAAFSFI GTEI I ATTLGEAENPRKTVPRAI KQVFFRI LFFYVMGTFVI  317
aap2       NPGPFAQI TI NNGDGVI PGRWGQFLAFWNVFVQAAFSFI GTEI I ATTLGEAENPRKTVPRAI KRVFFRLLFFYVFGI FI I  320

Majority   SVLVPYTEPNLLNGSGTAAASPFVI AI XNAGI KALPSI VNAVLLI XAWGAGNSDLYAXSRTLYALALERQXPRXXRRCTK
                   330       340       350       360       370       380       390       400
aap1       SVLVPYTEPNLLNGSGTAAASPFVI AI NNAGI KALPSI VNAVLLI AAWGAGNSDLYAASRTLYALALERQLPRI FRRCTK  397
aap2       SVLVPYTEPNLLNGSGTAAASPFVI AI ENAGI KALPSI VNAVLLI SAWGAGNSDLYASSRTLYALALERQMPRFLRRCTK  400

Majority   RGLPI WCVXXTXLFGXXXYXNTGGEAAEXAFXWLYNLSAI TGI I TWWAI LLSYLRFYYGLKKQGXSRDDFPYRAPXQPXL
                   410       420       430       440       450       460       470       480
aap1       RGLPI WCVTVTALFGAFAYLNTGGEAAEEAFNWLYNLSAI TGI I TWWAI LLSYLRFYYGLKKQGI SRDDFPYRAPLQPYL  477
aap2       RGLPI WCVVI TGLFGFLSYMNTGGEAAEKAFDWLYNLSAI TGI I TWWAI LLSYLRFYYGLKKQGLSRDDFPYRAPFQPWL  480

Majority   SWKGFI FFTLXXXFXGFTVFLXGNWDTSSFXAXYI TXPI FAXCWI GWKXVKKTKI VPLXXI DFXXGRRELDELEALDAEX
                   490       500       510       520       530       540       550       560
aap1       SWLGFI FFTLVTMFSGFTVFLKGNWDTSSFFATYI TI PI FACCWI GWKVVKKTKI VPLEHI DFTTGRRELDELEALDAEK  557
aap2       SWYGFI FFTLI I LFNGFTVFLEGNWDTSSFVAAYI TLPI FAVCWI GWKLVKKTKI VPLAEI DFHSGRRELDELEALDAER  560

Majority   FKXETKYQKI I SI LF
                   570
aap1       FKPETKYQKI I SI LF                                                                       572
aap2       FKAETKYQKI I SI LF                                                                       575
```

Decoration 'Decoration #1': Box residues that match the Consensus exactly.



D. Estratégia de deleção AAP6 e AAP8.

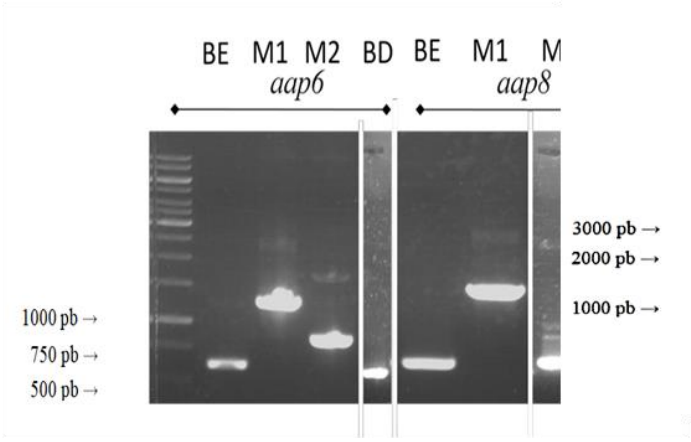




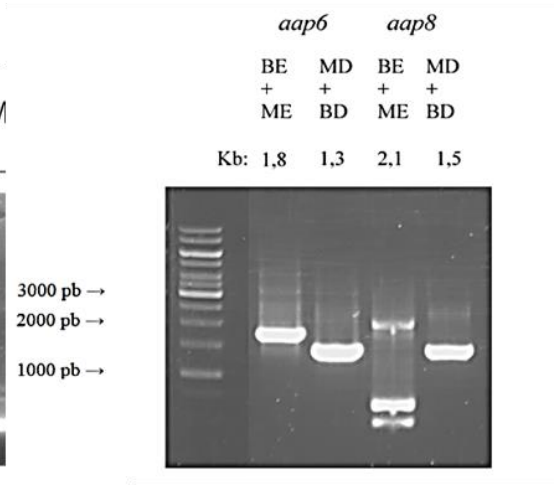
E. Dados das permeases AAP6 e AAP8 para deleção individual.

A) Gel de Agarose 0.8% com brometo de Etídeo mostrando os fragmentos gerados por PCR para as construções de deleção das permeases AAP6 e AAP8. B) Produtos da fusão dos braços com os marcadores seletivos por PCR das construções de deleção das permeases Aap6 e Aap8. C) Confirmação da deleção de AAP6 e AAP8 por Southern Blot.

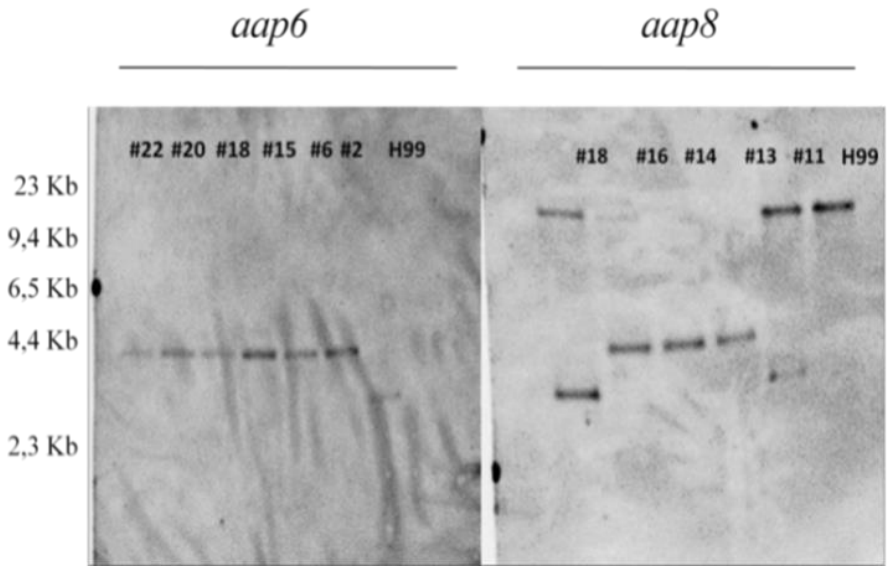
A)



B)



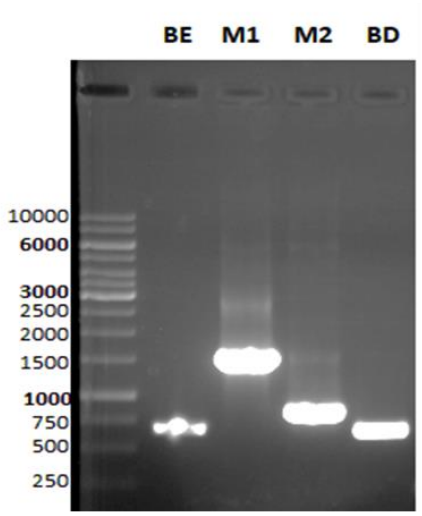
C)



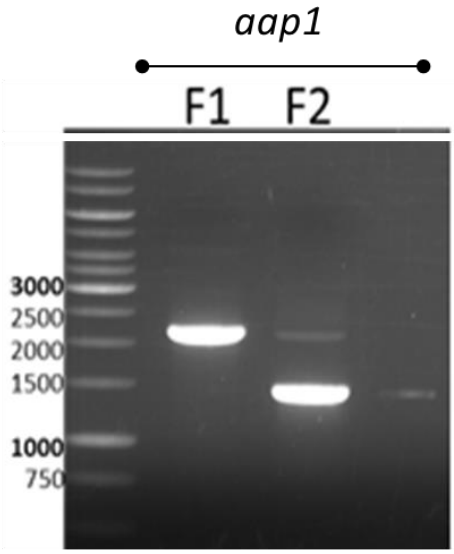
F. Dados das permeases AAP1 para deleção individual.

A) Gel de Agarose 0.8% com brometo de Etídeo mostrando os fragmentos gerados por PCR para as construções de deleção das permeases AAP1. B) Produtos da fusão dos braços com os marcadores seletivos por PCR das construções de deleção das permeases Aap1. C) Confirmação da deleção de por Southern Blot.

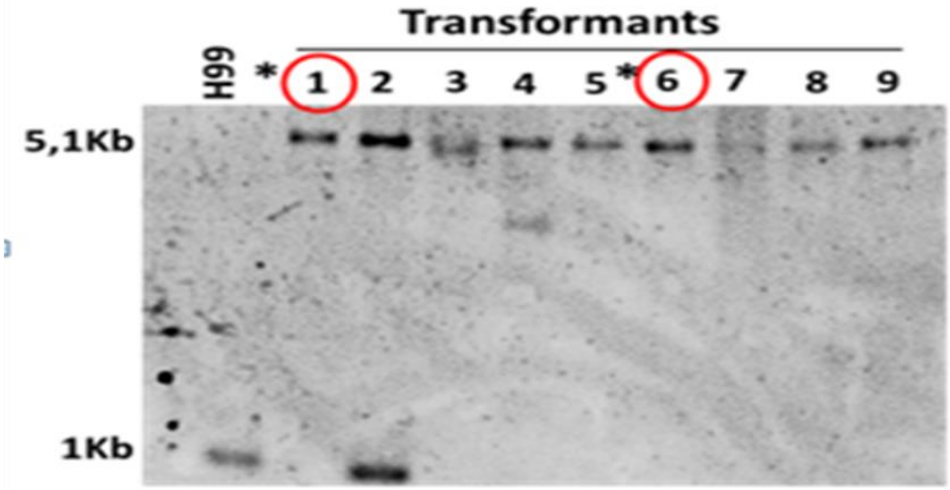
A)



B)



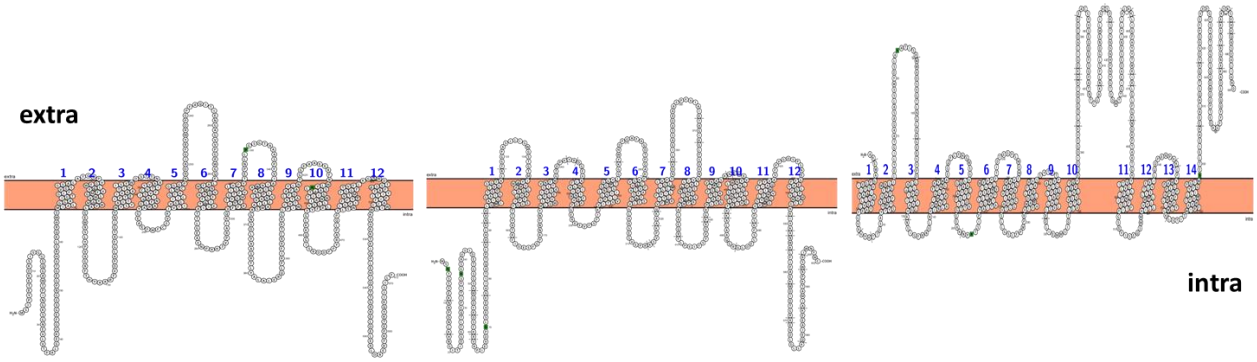
C)



G. Alinhamento de permeases de *C. neoformans, S. cerevisiae e H. sapiens*

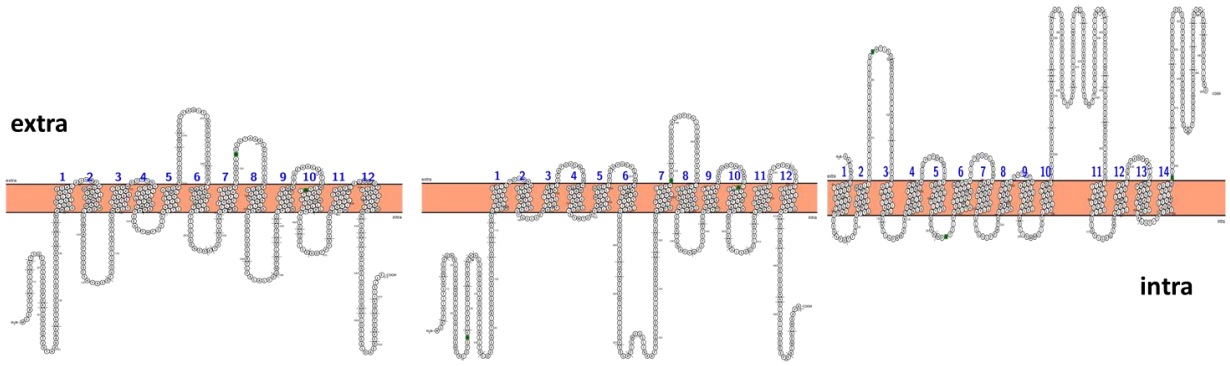
S. cerevisiae (designado com Saccharomyces) e *H. sapiens* (designado como Homo) mostrando as regiões conservadas e também uma idéia da estrutura proteica de cada umas das proteínas identificadas. (Protter - visualize proteoforms Omasits et al., Bioinformatics. 2013 Nov 21).

```
AAP1            1   ---------GEGTVHRSLKQRHMSMIALGGAIGTGLFVGSGSALATGGPVGFWLGYVFMG     51
Saccharomyces   1   EAEKVAIITAQTPLKHHLKNRHLQMIAIGGAIGTGLLVGSGTALRTGGPASLLIGWGSTG     60
Homo            1   --------------------------------GPGVIV------------SFIIAAV---     13
                                                    * *::*            .: :.

AAP1           52   LMVYSMMVALGEMASLYPV-AGAFTHYAARFVDPALGFATGINYWYSYAITIPTEIVA--    108
Saccharomyces  61   TMIYAMVMALGELAVIFPI-SGGFTTYATRFIDESFGYANNFNYMLQWLVVLPLEIVS--    117
Homo           14   -ASILSGVCYAEFGVRVPKTTGSAYTYSYVTVGEFVAFFIGWNLILEYLIGTAAGASALS     72
                          :. .*:.   *  :*.   *:   :.  ..:  . *   .: :       :

AAP1          109   ------ATIVISYWDSTTN------------A-AVYITVCFVSIIAINFLGARAYGEAEF    149
Saccharomyces 118   ------ASITVNFWGTDPK------------YRDGFVALFWLAIVIINMFGVKGYGEAEF    159
Homo           73   SMFDSLANHTISRWMADSVGTLNGLGKGEESYPDLLALLIAVIVTIIVALGVKNSIGF--    130
                         *. .:. * :                          :  : :  *  :*.:

AAP1          150   WFCSVKIVTIVGLIILGIVLMCGGGPNHDAIGFRYWRDPGPFAQITIENGAGVVPGRWGQ    209
Saccharomyces 160   VFSFIKVITVVGFIILGIILNCGGGPTGGYIGGKYWHDPGAFAGDTPG----------AK    209
Homo          131   ----NNVLNVLNLAVWVFIMI----AGLFFINGKYWAEGQFL------------PHGWS-    169
                         :::.::.: :  :::          *. :** :   :                .

AAP1          210   FLAFWNVFVQAAFSFIGTEIIATTLGEAENPRKTVPRAIKQVFFRILFFYVMGTFVISVL    269
Saccharomyces 210   FKGVCSVFVTAAFSFAGSELVGLAASESVEPRKSVPKAAKQVFWRITLFYILSLLMIGLL    269
Homo          170   --GVLQGAATCFYAFIGFDIIATTGEEAKNPNTSIPYAITASLVICLTAYVSVSVILTLM    227
                      .. .  . . ::* * :::. :  *: :*..::* * .  :      *:   .:: ::

AAP1          270   VPYTEPNLLNGSG-TAAASPFVIAINNAGIKALPSIVNAVLLIAAWSAGNSDLYAASRTL    328
Saccharomyces 270   VPYNDKSLIGASSVDAAASPFVIAIKTHGIKGLPSVVNVVILIAVLSVGNSAIYACSRTM    329
Homo          228   VPYYTIDT---------ESPLMEMFVAHGFYAAKFVVAIGSVAGLTVSLLGSLFPMPRVI    278
                    ***   .          **::  :   *: .   :*    : .      . ::   *.:

AAP1          329   YALALERQLPRIFRRCTKR-GLPIWCVTVTALFGA-FAYLNTGGEAAEEAFNWLYNLSAI    386
Saccharomyces 330   VALAEQRFLPEIFSYVDRK-GRPLVGIAVTSAFGL-IAFVAAS-KKEGEVFNWLLALSGL    386
Homo          279   YAMAGDGLLFRFLAHVSSYTETPVVACIVSGFLAALLALLVS--------LRDLIEMMSI    330
                     *:* :  * .::         *:    *:. :.  :* : :        :. *  : .:

AAP1          387   TGIITWWAILLSYLRFYYGLKKQGISRDDFPYRAPLQPYLSWLGFIFFTLVTMFSGF--T    444
Saccharomyces 387   SSLFTWGGICICHIRFRKALAAQGRGLDELSFKSPTGVWGSYWGLFMVIIMFI-AQFYVA    445
Homo          331   GTLLAYTLVSVCVLLLRYQP----------------------------------------    350
                      ::::  : :. : :

AAP1          445   VFL-KGNWDTSSFFATYITIPIFACCWIGWKVVKKT--KIVPLEHIDFTTGRRELDELE-    500
Saccharomyces 446   VFPVGDSPSAEGFFEAYLSFPLVMVMYIGHKIYKRNWKLFIPAEKMDIDTGRREVDLDLL    505
Homo          351   ------------------------------------------------------------    350

AAP1          501   ---                                                             500
Saccharomyces 506   KQE                                                             508
Homo          351   ---                                                             350
```



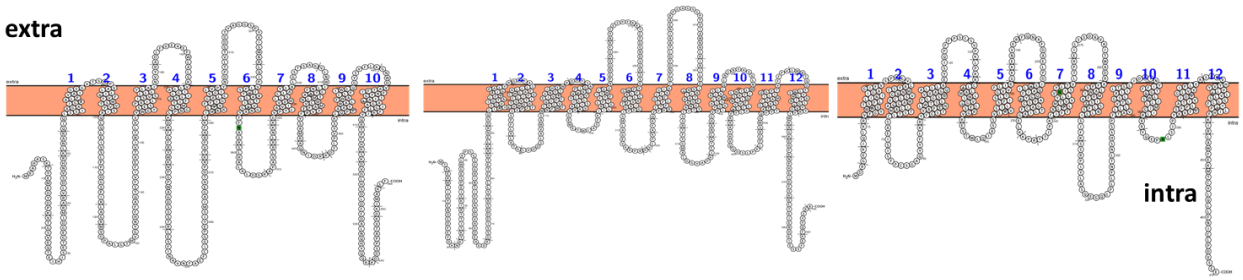
Aap1 *C. neoformans* | Gap1 *S. cerevisiae* | Kiaa1613 *H. sapiens*

```
AAP2            1   -------------------IHLGEGTVHRQLKQRHMAMIALGGAIGTGLFVGSGSALASG   41
Saccharomyces   1   LTRLQVVSHETDINEDEEEAHYEDKHVKRALKQRHIGMIALGGTIGTGLFVGISTPLSNA   60
Homo            1   ----------------------------------------------GPG------------    3
                                                                  * *

AAP2           42   GPVGVWLGYIFMASMVYAMMVALGEMAALYPVS-GAFTHYASRFVDPSLGFALGFNYWYS  100
Saccharomyces  61   GPVGSLIAYIFMGTIVYFVTQSLGEMATFIPVT-SSITVFSKRFLSPAFGVSNGYMYWFN  119
Homo            4   ----VIVSFIIAAVASILSGVCYAEFGVRVPKTTGSAYTYSYVTVGEFVAFFIGWNLILE   59
                          :.:*: .        . .*:..  * : .:   ::   :.  ...  *:    .

AAP2          101   YAVTIPTEVVAAS--------IVISYWDTTT----------------NVAIYITVCLVLI  136
Saccharomyces 120   WAITYAVEVSVIG--------QVIEYWTDKV----------------PLAAWIAIFWVII  155
Homo           60   YLIGTAAGASALSSMFDSLANHTISRWMADSVGTLNGLGKGEESYPDLLALLIAV---IV  116
                    : :   . . . .         .*. *                    :*  *::   ::

AAP2          137   WFINFWGARAYGEAEFWFSSIKVITIVGLIILGIVLMCGGGPNHDPIGFRYWRNPGPFAQ  196
Saccharomyces 156   TLMNFFPVKVYGEFEFWVASVKVLAIMGYLIYALIIVCGG-SHQGPIGFRYWRNPGAWGP  214
Homo          117   TIIVALGVKNSIGFN------NVLNVLNLAVWVFIMIAGL----FFINGKYWAEG-----  161
                     ::    .:     :      :*: ::.  :  ::::.*       *. :** :

AAP2          197   ITINNGDGVIPGRWGQFLAFWNVFVQAAFSFIGTEIIATTLGEAENPRKTVPRAIKRVFF  256
Saccharomyces 215   GIISSD-----KSEGRFLGWVSSLINAAFTYQGTELVGITAGEAANPRKTVPRAINKVVF  269
Homo          162   -------QFLPHGWSGVL---QGAATCFYAFIGFDIIATTGEEAKNPNTSIPYAITASLV  211
                                  . .*   .    . ::: * :::. *  ** **..::* **.  ..

AAP2          257   RLLFFYVFGIFIISVLVPYTEPNLLNGSGTAAASPFVIAIENAGIKALPSIVNAVLLISA  316
Saccharomyces 270   RIVLFYIMSLFFIGLLVPYNDSRLSASSAVIASSPFVISIQNAGTYALPDIFNAVVLITV  329
Homo          212   ICLTAYVSVSVILTLMVPYYTIDT--------ESPLMEMFVAHGFYAAKFVVAIGSVAGL  263
                      :  *:   .:: ::***              **::  :   *  *   :.    :

AAP2          317   WSAGNSDLYASSRTLYALALERQMPRFLRRCTKR-GLPIWCVVITGLFG-FLSYMNTGGE  374
Saccharomyces 330   VSAANSNVYVGSRVLYSLARTGNAPKQFGYVTRQ-GVPYLGVVCTAALG-LLAFLVVN-N  386
Homo          264   TVSLLGSLFPMPRVIYAMAGDGLLFRFLAHVSSYTETPVVACIVSGFLAALLALLVSL--  321
                      :  ..::   *.:*::*      : :   :     *    : :. :. :*: :

AAP2          375   AAEKAFDWLYNLSAITGIITWWAILLSYLRFYYGLKKQGLSRDDFPYRAPFQPWLSWYGF  434
Saccharomyces 387   NANTAFNWLINISTLAGLCAWLFISLAHIRFMQALKHRGISRDDLPFKAKLMPYGAYYAA  446
Homo          322   ------RDLIEMMSIGTLLAYTLVSVCVLLLRY------------------QP-------  350
                            * :: ::  : ::  : :. : :                        *

AAP2          435   IFFTLIILFNGFTVFLEGNWDTSSFVAAYITLPIFAVCWIGWKLVKKTK-IVPLAEIDFH  493
Saccharomyces 447   FFVTVIIFIQGFQAFCP--FKVSEFFTSYISLILLAVVFIGCQIYYKCRFIWKLEDIDID  504
Homo          351   ------------------------------------------------------------  350

AAP2          494   SGRRELDEL---                                                  502
Saccharomyces 505   SDRREIEAIIWE                                                 516
Homo          351   ------------                                                  350
```



Aap2 *C. neoformans* | Lyp1 *S. cerevisiae* | Kiaa1613 *H. sapiens*

```
AAP6          1   ---------GDIMRARVLDSVNHRKLNARQIQLSSIAGAIGAALFVAIGSGVT-SGPVAL   50
Saccharomyces 1   HEDRGSSIDDDSRTYLLYFTETRRKLENRHVQLIAISGVIGTALFVAIGKALYRGGPASL   60
Homo          1   -------------------------WWGTS---FLLINIIGAGIFVSPKGVLA-YSCMNV   31
                                                   : . **:.:**:    :   .   :

AAP6         51   LIGFVFWS---TVVYSIAQCQLEIVSLFPLDGSFIRLAGRMVDPALGTMVGYNHFFAQTS  107
Saccharomyces 61  LLAFALWC---VPILCITVSTAEMVCFFPVSSPFLRLATKCVDDSLAVMASWNFWFLECV  117
Homo         32   GVSLCVWAGCAILAMTSTLCSAEISISFPCSGAQYYFLKRYFGSTVAFLNLWTSLFLGSG   91
                   :.: .*.         : .  *:   ** ..    :  : .. ::. :  :.  *

AAP6        108   FVIFEATVIN--TLVSYWGYSESPAILISVSLLL-YLAINVYRADLFGEAEFWLALGKVL  164
Saccharomyces 118 QIPFEIVSVN--TIIHYWRDDYSAGIPLAVQVVL-YLLISICAVKYYGEMEFWLASFKII  174
Homo         92   VVAGQALLLAEYSIQPFFPSCSVPKLPKKCLALAMLWIVGILTSRG-VKEVTWLQIASSV  150
                   :  :   :   ::  ::       :      :     :.:       :   **   . :

AAP6        165   LAIGLILYTFIT-----MVGGNPLKDRFGFRYWKNPGP-------WAGDSSSTRLESFIN  212
Saccharomyces 175 LALGLFTFTFIT-----MLGGNPEHDRYGFRNYGESPFKKYFPDGNDVGKSSGYFQGFLA  229
Homo        151   LKVSILSFISLTGVVFLIRGKKENVERFQ----------------NAFDAELPDISHLIQ  194
                  * :.:: :  :*     : * :   :*:                    . .   :. ::

AAP6        213   AVNTAGFCIGGPEYISMIAGEATDPRKTVPRAFKTIMARLVVFFIGGALCVGILVPYNDP  272
Saccharomyces 230 CLIQASFTIAGGEYISMLAGEVKRPRKVLPKAFKQVFVRLTFLFLGSCLCVGIVCSPNDP  289
Homo        195   AIFQGYFAYSGGACFTLIAGELKKPRTTIPKCIFTALPLMTVVYLLVNISYLTVLTPRE-  253
                  .:  . *  .*   ::::*** . **..:*:.:   :  :...::   :.   :   .:

AAP6        273   TLVTG---DGTYAGGSPYVISMNRLQIPVLPSIVTAALLTCIVSGGNAYTFNASRSLHAL  329
Saccharomyces 290 DLTAAINEARPGAGSSPYVIAMNNLKIRILPDIVNIALITAAFSAGNAYTYCSSRTFYGM  349
Homo        254   -----------ILSSDAVAITWADRAFPSLAWIMPFAISTSLFSNLLISIFKSSRPIYLA  302
                              ...  .*:     :  *  *:  *: *. .*      : :** ::

AAP6        330   ALDGKAPAVLRRLNKKGVPYLAVIVVMLLSCLAYLALGSTSAKVLNWILNFCTAATMLNW  389
Saccharomyces 350 ALDGYAPKIFTRCNRHGVPIYSVAISLVWALVSLLQLNSNSAVVLNWLINLITASQLINF  409
Homo        303   SQEGQLPLLFNTLNSHSSPFTAVLLLVTLGSLAIILTS--LIDLINYIFF--TG---SLW  355
                  : :*  * ::   * :. *  :* : :  . :: :  .     ::*:::   *.     :

AAP6        390   CVMAFTYVRFYSAMRAQNIDRKDFLPVYSKLQPFAAYWALFWACLFIWLQGYSVFLKGNW  449
Saccharomyces 410 VVLCIVYLFFRRAYHVQQ-DSLPKLPFRSWGQPYTAIIGLVSCSAMILIQGYTVFFPKLW  468
Homo        356   SILLMI-GILRRRYQEPNL----S-------IPYKVFLSFPLATIVI--D----------  391
                   :: :    :    :  :              *: .  .:  .  .*  :

AAP6        450   DVATFIFNYGIIALAGAIGLFFK-IYQR--TPFHKSKDVDLHSDLDFFD             495
Saccharomyces 469 NTQDFLFSYLMVFINIGIYVGYKFIWKRGKDHFKNPHEIDFSKELTEI-             516
Homo        392   ------------------------------------------------             391
```

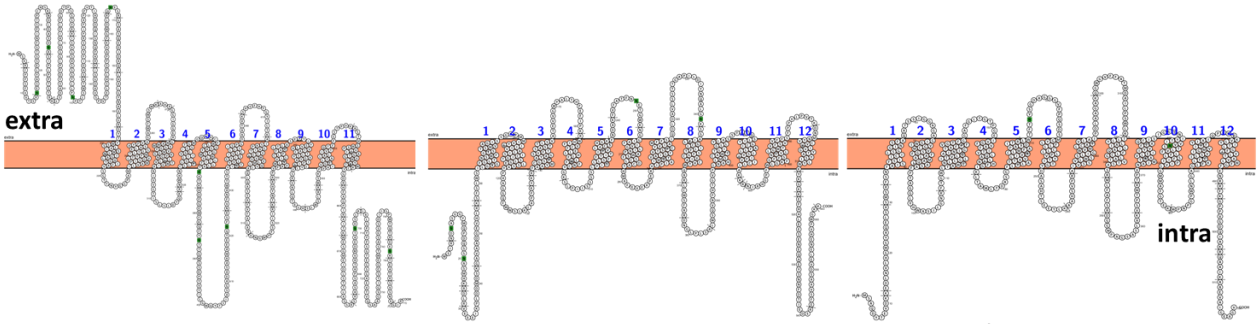


Aap6 — *C. neoformans*

Agp2 — *S. cerevisiae*

Unnamed protein product BAB71021.1 — *H. sapiens*

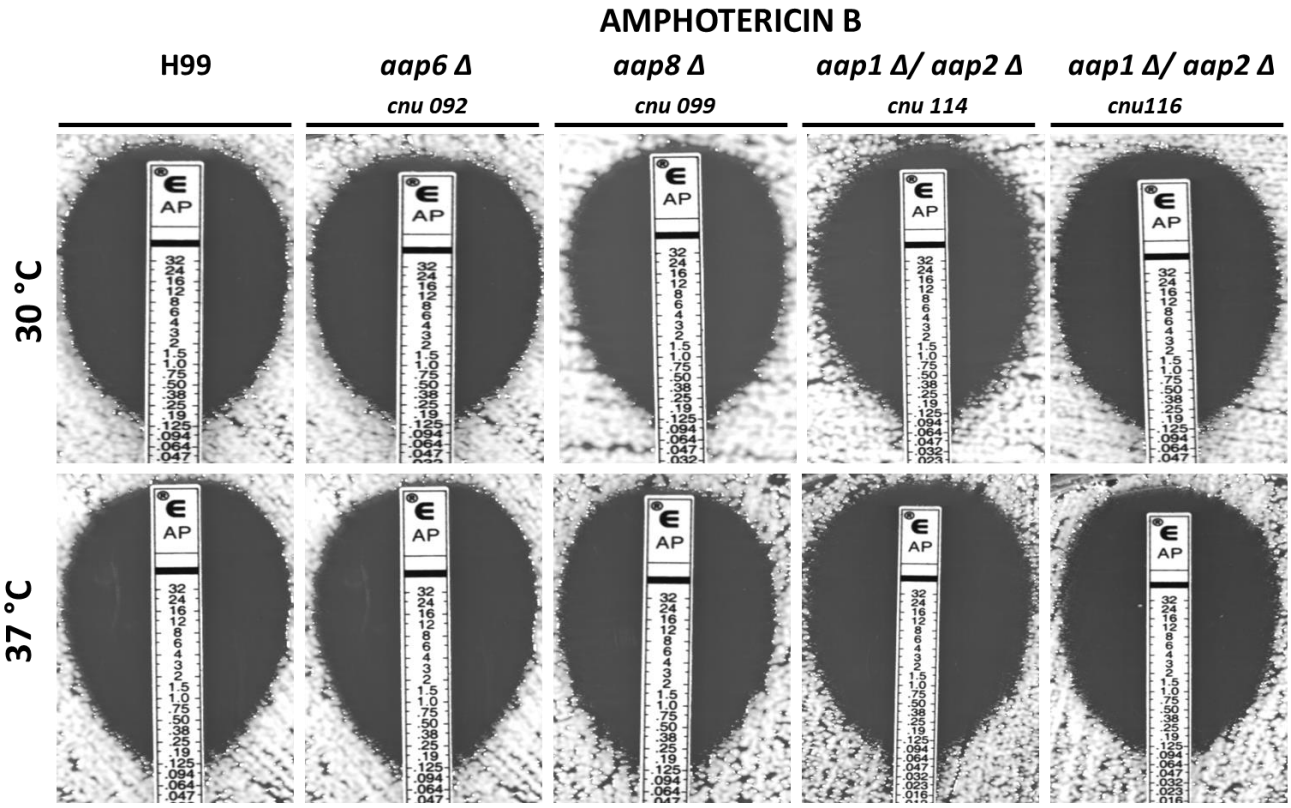
```
AAP8          1   --------------SWLNIGALQGTIFAVSGTYNYGGPAMILVAWPISGVLTYFMTLTLS   46
Saccharomyces 1   SLWSILGVGFGLTNSWFGIST------SMVAGISSGGPMMIVYGIIIVALISICIGTSLG   54
Homo          1   -RFSNFA------ISFSIICILSGGINSFAQATSSIGGAGAGIGWIVGCMVSGFFALAMA   53
                               *:  *        :.    .  *      .  :  :::  :  ::.

AAP8         47   ELASAYPVAGAMFSWSWKAARGGIGGERGWAWMVSGFVMGGHVGNLLLVTWEIANIVVGT  106
Saccharomyces 55  ELSSAYPHAGGQFWWSLKLAPPKYKR--FAAYMCGSFAYAGSVFTSASTTLSVATEVVGM  112
Homo         54   QIASAFPTAGGLYHWASILG------NRFTGWLTAWLNLLGLITVLGAINIGTAFFFVGT  107
                  :::**:* **. : *:   .          .:: . :   * :      .   *  .**

AAP8        107   ISL--SLDYQKRNWHNCLLFLGILIIVGLIGSTGWGQSHCFWLCSG-AFGFSMWLVLCIT  163
Saccharomyces 113 YALT-HPEFIPKRWHIFVCFELLHLFLMFFN--CYGKSLPIISSSSLYISLLSFFTITIT  169
Homo        108   FGGAFGLTGTPGEIVGFVAFITV--LQALLN--HFGIKLTAMLTD--ASGFLILATTAVL  161
                   .         .    : *  :  :  ::.   :* .      .    .:    .  :

AAP8        164   LLA-TNAT---KHDPGEMFKQFYNTT------GWSSKPYVYILGWQYTSI-ASGADASAH  212
Saccharomyces 170 VLACSHGK---FNDAKFVFATFNNET------GWKNGGIAFIVGLINPAWSFSCLDCATH  220
Homo        162   IVACLMFAPAIDITRLWTFTNYSGDAGGGVFPQSDSMGYLFLLCLLLPVYTITGYDASAH  221
                  ::*               *  : . :        ..    :::         :  *.::*

AAP8        213   MAEETQNPSRNVPNAMTTSVIGTYVLGYISIVLLLLSISPGDAATVKSHSFAFGYIL-TK  271
Saccharomyces 221 MAFEVEKPERVIPIAIMGTVAIGFVTSFCYVIAMFFSIQDLDAVLSSTTGAPILDIYNQA  280
Homo        222   TSEETLKAAHSVPRAIVSSVLWSSLIGWVMLCAIVLAIPDLAAGAKQGWGVFFATMD--A  279
                   : *. :  : :* *:  :*    : .:  :  :.::*    *   .  .  :  :

AAP8        272   AISKPGAITVCCLMVVVLMLQVLAQLQASSRFVFALARENGMPFSSI-IRKTNYHRRPV-  329
Saccharomyces 281 LGNKSGAIFLGCLILFTSFGCVIACHTWQARLCWSFARDNGLPLSRL-WSQVNPHTGVP-  338
Homo        280   ILPSWLKTLLYLAILIAQFLCGLATVTSASRMLFAFSRDGGMPAGSASLAKVSPTWRTPV  339
                     .     :   ::.. :   :*     :*: ::::*:.*:* .     :..

AAP8        330   FAVWLVVI---LCLPFACLTLASESTLYSVLAVTACTLSYVGYAIPISLYLVSRVNLQTE  386
Saccharomyces 339 LNAHLMSC---AWITLIGLLYLASSTAFQSLITGCIAFLLLSYIIPVICLLAKKRNIAHG  395
Homo        340   NAIWTAAVLEIIYVFLAQFISIGGTNIYTIVVNSTLVFLFLSFIIPIVLGMMAFGTEKWP  399
                                : :  :   . :. :  :     .:  :.: **:   :    .

AAP8        387   GRSLWSLRRWSK--PVAIVGLLYALALIVTQTFPGSTPVKASTMSWSPVIIA-         436
Saccharomyces 396 --PFWL-GKFGF--FSNIVLLGWTVFSVVFFSFPPVLPVTKDNMNYVCVVIVG          443
Homo        400   NPGPWNLGAGLFKLFCILSVIGMVIIF-YIAIQPPNDKVLYITLGFIVLTA--         449
                     *            :  :  .:        *    *   .:.:  :
```



Aap8 — *C. neoformans*

Hnm1p — *S. cerevisiae*

Amino acid / Metabolite permease — *H. sapiens*

H. E-test de Anfotericina B.

Teste de sensibilidade das linhagens mutantes e selvagem frente ao antifúngico. A formação da zona de inibição corresponde à concentração necessária para inibição do crescimento das linhagens testadas.