

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOTECNOLOGIA

GABRIELLE FELIZARDO

**Avaliação da deleção do gene *PEP4* em *Cryptococcus neoformans*:
estudos sobre os impactos nos fatores de virulência**

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

São Paulo
2021

GABRIELLE FELIZARDO

**Avaliação da deleção do gene *PEP4* em *Cryptococcus neoformans*:
estudos sobre os impactos nos fatores de virulência**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Castiglioni Pascon

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

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)

Felizardo, Gabrielle

Avaliação da deleção do gene PEP4 em *Cryptococcus neoformans*: estudos sobre os impactos nos fatores de virulência. / Gabrielle Felizardo; orientador Renata Castiglioni Pascon. -- São Paulo, 2021.
114 p.

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

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Autofagia. 3. PEP4. 4. Fatores de virulência. I. Pascon, Renata Castiglioni , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Gabrielle Felizardo

Título da Dissertação: Avaliação da deleção do gene *PEP4* em *Cryptococcus neoformans*: estudos sobre os impactos nos fatores de virulência.

Orientadora: 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:



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 14 de outubro de 2019
CEP N 8184230718

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Gabrielle Felizardo
Depto/Disc: Ciências Biológicas
Profa. Dra. Renata Castiglioni Pascon (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da deleção do gene PEP4 em *Cryptococcus neoformans*: estudos sobre os impactos nos fatores de virulência."

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

A criptococose é uma micose sistêmica de grande importância clínica que acomete principalmente pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), transplantados e pacientes sob tratamento contra o câncer. Atualmente, duas espécies distintas se destacam como patógenos em humanos, isto é, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. No Brasil, a espécie *C. neoformans* é a mais prevalente e está presente em todas as regiões geográficas. Esta espécie possui distribuição mundial e é responsável pelas altas taxas de morbidade e mortalidade neste grupo de pacientes. Logo, novas pesquisas precisam ser efetuadas, visando o conhecimento sobre o crescimento, multiplicação e/ou sobrevivência do fungo no hospedeiro humano. A atuação das vias autofágicas em fungos pode fornecer novos entendimentos sobre a relação entre o patógeno e o hospedeiro estabelecida durante o processo de infecção. O mecanismo de autofagia é um sistema de degradação e reciclagem intracelular de macromoléculas e organelas encontrado nos organismos eucariontes. A autofagia é um processo conservado, responsável pela sobrevivência da célula frente a condições adversas como privação nutricional, hipóxia ou mudança da fonte de carbono e nitrogênio. Recentemente, o sistema de autofagia vem sendo estudado em algumas espécies de fungos, entretanto, os mecanismos envolvidos nas etapas da autofagia em *Cryptococcus neoformans* têm sido pouco explorados. Deste modo, este trabalho tem como objetivo caracterizar o impacto da deleção do gene PEP4, o qual é fundamental para a maturação pós-traducional de hidrolases vacuolares, fornece nitrogênio sob condições de estresse nutricional, e realiza a reciclagem de proteínas após a exposição ao peróxido de hidrogênio, analisando sua função na composição e modulação dos fatores de virulência do fungo.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 07/10/2019, **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

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da deleção do gene PEP4 em *Cryptococcus neoformans*: estudos sobre os impactos nos fatores de virulência.", protocolada sob o CEUA nº 3867121120 (ID 010421), sob a responsabilidade de **Renata Castiglioni Pascon e equipe; Renata Castiglioni Pascon; Gabrielle Felizardo; Grasielle Pereira Jannuzzi ; Karen Spadari Ferreira; Sandro Rogério de Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 28/01/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of PEP4 gene deletion in *Cryptococcus neoformans*: studies on the impacts on virulence factors.", utilizing 0 Isogenics mice (), protocol number CEUA 3867121120 (ID 010421), under the responsibility of **Renata Castiglioni Pascon and team; Renata Castiglioni Pascon; Gabrielle Felizardo; Grasielle Pereira Jannuzzi ; Karen Spadari Ferreira; Sandro Rogério de Almeida** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 01/28/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2021](#) a [04/2021](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Imunologia \(ICB-USP\)](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [8 a 12 semanas](#)

N: [0](#)

Linhagem: [BALB/c](#)

Peso: [20 a 21 g](#)

Local do experimento: Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas/ICAQF/UNIFESP, Campus Diadema; Faculdade de Ciências Farmacêuticas □ USP.

São Paulo, 28 de janeiro de 2021



Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo



Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Aos meus pais Francisca de Luz e Benedito Felizardo

Ao meu irmão Julio Felizardo

Por todo amor e incentivo incondicional!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisca de Luz e Benedito Felizardo, e ao meu irmão Julio Felizardo por sempre acreditarem no meu potencial, por me incentivarem incondicionalmente e serem meu alicerce nos momentos de dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Afonso Vallim pela oportunidade, confiança no meu trabalho, paciência e por todo apoio desde a iniciação científica. Esses últimos cinco anos de trabalho foram de grande contribuição para a minha formação acadêmica.

À Profa. Dr^a. Renata Castiglioni Pascon por sempre estar presente, disposta a ajudar, pelas sugestões de melhorias e enorme contribuição neste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Interações Microbianas - LIMic da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Adrián Adolfo Alvarez Padilla, Alexandre Paes dos Santos, Amanda Teixeira de Melo, Crislaine Lambiase Calvete, Geovanna Nunes Antonelli, Jeyson Pereira, João Miguel Alves Nunes, Kevin Felipe Cruz Martho, Lidiane Oliveira, Mariana Reis Meneghini, Mateus Possari de Oliveira, Rafael Jun Tomita, Ricardo Ferreira Lima, Ronaldo Silva, Sônia Ueda Purisco, Stefania Pegorin Braga, Tatiana Satiko, Thiago Nunes Roberto e Vitor Gonçalves Vital. Agradeço pela amizade, por toda ajuda e os momentos de descontração.

Ao incrível Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira que é uma figura inspiradora para todos nós do LIMic – UNIFESP.

Aos meus familiares e amigos que sempre me apoiam nas minhas decisões e vibram pelas minhas conquistas.

Às minhas queridas amigas da graduação Giovana Rodrigues e Jéssica Oliveira que acompanham esta jornada desde a iniciação científica. Obrigada por todo carinho e cumplicidade.

Aos colaboradores Prof^a. Dr^a. Karen Spadari Ferreira da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, Dr^a. Grasielle Pereira Jannuzzi e a todos do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF – USP), Daniel Valério, Isabela Godoy, José Roberto de Almeida, Larissa Monteiro, Leandro Breda e Renata Albuquerque. Por me receberem gentilmente em seus laboratórios, cedido o espaço, equipamentos e materiais de insumo para que eu realizasse os experimentos de cultura celular. Agradeço também por toda ajuda, troca de conhecimento, aconselhamentos e a contribuição de cada um neste projeto.

À Dr^a. Marcia de Souza Carvalho Melhem e funcionários do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) por terem cedido o espaço no laboratório, equipamentos, materiais de insumo para realização dos experimentos de sensibilidade aos antifúngicos.

À equipe do Núcleo de Apoio Técnico ao Ensino e Pesquisa (NATEP) da Unidade José de Alencar da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), campus Diadema, por toda atenção e auxílio.

Às secretárias Eliane e Fábiana do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP) por serem sempre solícitas e por toda ajuda ao longo da pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço a esta agência de fomento pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo apoio financeiro concedido.

“Sua história é o que você tem, o que sempre terá.

É algo para se orgulhar.”

Michelle Obama

RESUMO

FELIZARDO, G. **Avaliação da deleção do gene *PEP4* em *Cryptococcus neoformans*: estudos sobre os impactos nos fatores de virulência.** 2021. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A criptococose é uma micose sistêmica de grande importância clínica que afeta principalmente pacientes imunodeficientes. Atualmente, duas espécies distintas se destacam como patógenos em humanos, isto é, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. No Brasil, a espécie *C. neoformans* é a mais prevalente e está presente em todas as regiões geográficas, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade entre os imunodeficientes. O tratamento da criptococose é limitado a poucos fármacos e alguma resistência a eles foi relatada. Portanto, pesquisas devem ser realizadas para ampliar o conhecimento a respeito da biologia dessa levedura, visando características que possam ser novos alvos de antifúngicos. Assim, este estudo visa ampliar o conhecimento sobre o processo de autofagia em *C. neoformans*. A autofagia é um processo de degradação e reciclagem intracelular conservado entre os eucariotos, indispensável na homeostase celular. Várias proteínas participam deste processo e neste trabalho exploramos o papel da proteína Pep4 que é codificada pelo gene *PEP4*. Em *S. cerevisiae*, esta proteína é necessária nos estágios finais da autofagia, atuando na maturação e ativação de hidrolases vacuolares. Além disso, esta aspartil protease vacuolar é de grande importância para a sobrevivência celular em condições de privação nutricional e estresse. *PEP4* nunca foi estudado em *C. neoformans*, deste modo, este trabalho teve como objetivo caracterizar o impacto da deleção do gene *PEP4* em *C. neoformans* analisando sua função na composição e modulação dos fatores de virulência do fungo. Os resultados mostraram que com exceção ao aumento na produção de cápsula polissacarídica, a deleção do gene *PEP4* não impactou na expressão dos fatores de virulência, no crescimento da levedura frente a diferentes condições de estresses e na sensibilidade aos antifúngicos. Ainda, os resultados mostraram que a expressão do gene *PEP4* é modulada pela combinação da mudança na fonte de carbono, estresse térmico e nitrosativo. A ausência da proteína Pep4 resulta na atenuação da virulência do mutante *pep4* no modelo animal *Galleria mellonella* e diminuição da carga fúngica em

macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c. Concluímos que a proteína Pep4 de *C. neoformans* é importante na adaptação e sobrevivência de células de levedura a condições estressantes, bem como na interação patógeno-hospedeiro.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*. Autofagia. *PEP4*. Fatores de virulência.

ABSTRACT

FELIZARDO, G. **Evaluation of *PEP4* gene deletion in *Cryptococcus neoformans*: studies on the impacts on virulence factors.** 2021. 114 f. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

Cryptococcosis is a systemic mycosis of great clinical importance that mainly affects immunodeficient patients. Currently, two distinct species stand out as pathogens in humans, *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. In Brazil, *C. neoformans* is the most prevalent species and is present in all geographical regions, being responsible for high morbidity and mortality rates among immunodeficient patients. The treatment of cryptococcosis is limited to a few antifungal drugs and some resistance to them has been reported. Therefore, research must be carried out to expand knowledge about the biology of this yeast, aiming at characteristics that may be new targets for antifungals. Thus, this study aims to expand knowledge about the autophagy process in *C. neoformans*. Autophagy is an intracellular degradation and recycling process conserved among eukaryotes, indispensable in cellular homeostasis. Several proteins participate in this process and in this work we explore the role of the Pep4 protein that is encoded by the *PEP4* gene. In *S. cerevisiae*, Pep4 is required in the final stages of autophagy, acting in the maturation and activation of vacuolar hydrolases. Moreover, this vacuolar aspartyl protease is of great importance for cell survival under conditions of nutritional deprivation and stress. *PEP4* has never been studied in *C. neoformans*, thus, this work aimed to characterize the impact of *PEP4* gene deletion in *C. neoformans* by analyzing its function in the composition and modulation of virulence factors of the fungus. The results showed that, except for the increase in the production of polysaccharide capsule, the deletion of the *PEP4* gene did not impact the expression of virulence factors, the growth of yeast under different stress conditions and the sensitivity to antifungal agents. Furthermore, the results showed that the expression of the *PEP4* gene is modulated by the combination of change in carbon source, thermal and nitrosative stress. Absence of the Pep4 protein results in attenuated virulence of the *pep4* mutant in the *Galleria mellonella* animal model and decreased fungal burden in bone marrow-derived macrophages from BALB/c mice. We conclude that the Pep4 protein of *C. neoformans* is important in the adaptation and survival of yeast cells to stressful conditions as well as in pathogen-host interaction.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*. Autophagy. *PEP4*. Virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo da meningoencefalite criptocócica.	29
Figura 2. Representação do processo de autofagia e da via Cvt em leveduras.	36
Figura 3. Análise <i>in silico</i> do domínio conservado da superfamília das proteínases aspárticas da proteína Pep4.	67
Figura 4. Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos homólogas da proteína Pep4.	68
Figura 5. Relação filogenética da sequência de aminoácidos de membros da proteína Pep4 em diferentes espécies de fungos.	70
Figura 6. Construção de deleção do gene <i>PEP4</i> de <i>C. neoformans</i> por <i>Double- joint</i> , adaptado de Kim et al. (2009).	71
Figura 7. PCR diagnóstico da deleção do gene <i>PEP4</i>	72
Figura 8. Ensaio de Southern blot para confirmação da deleção do gene <i>PEP4</i>	73
Figura 9. Obtenção da linhagem reconstituída <i>pep4+PEP4</i>	74
Figura 10. Desafio de privação nutricional para o mutante <i>pep4</i> de <i>C. neoformans</i>	75
Figura 11. PCR diagnóstico da transformação do plasmídeo GFP-Ams1 em <i>C. neoformans</i>	76
Figura 12. Avaliação do crescimento a 37°C do mutante <i>pep4</i>	77
Figura 13. Produção de melanina e urease do mutante <i>pep4</i>	78
Figura 14. Análise da produção de fosfolipase para o mutante <i>pep4</i>	79
Figura 15. Produção de cápsula polissacarídica do mutante <i>pep4</i>	80
Figura 16. Análise do crescimento em diferentes pHs (4, 6, 7 e 8) para o mutante <i>pep4</i>	81
Figura 17. Avaliação da integridade da parede celular e membrana plasmática para o mutante <i>pep4</i>	82
Figura 18. Análise do crescimento do mutante <i>pep4</i> na condição de estresse osmótico.	83
Figura 19. Avaliação para o efeito do estresse oxidativo e nitrosativo no desenvolvimento do mutante <i>pep4</i>	84

Figura 20. Sobrevivência do mutante <i>pep4 in vivo</i>.....	85
Figura 21. Sobrevivência do mutante <i>pep4</i> após interação com macrófagos derivados de medula óssea.	86
Figura 22. Avaliação do índice de fagocitose do mutante <i>pep4</i>.	87
Figura 23. Avaliação do padrão de expressão do gene <i>PEP4</i> em alta temperatura e diferentes fontes de carbono.	89
Figura 24. O padrão de expressão do gene <i>PEP4</i> é aumentado na presença de estresse nitrosativo.	90
Figura 25. Influência da fonte de carbono e do estresse nitrosativo no padrão de expressão do gene <i>PEP4</i>.....	91
Figura 26. Efeito da fonte de carbono não preferencial e estresse nitrosativo no padrão de expressão do gene <i>PEP4</i>.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação atual das espécies de <i>Cryptococcus</i>	27
Tabela 2: Composição dos meios de indução utilizados para quantificação da expressão de <i>PEP4</i>	65
Tabela 3: Teste de sensibilidade aos antifúngicos	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Aminoácidos
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
atm	Atmosfera
B.D.	Braço direito
B.E.	Braço esquerdo
BMDM	<i>Bone Marrow-Derived Macrophages</i> / Macrófagos derivados de medula óssea
BSA	Albumina de soro bovino
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> / DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração inibitória mínima
Cvt	<i>Citoplasm to vacuole pathway</i> / via de transporte do citoplasma para o vacúolo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	<i>et alii</i> / E outros
EUCAST	<i>European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing</i> / Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana
F.D.	Fragmento direito
F.E.	Fragmento esquerdo
g	Grama
g/L	Grama por litro
G418	Geneticina
GalXM	Galactoxilomanana
gDNA	DNA genômico
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> / Proteína verde fluorescente
GXM	Glucuronoxilomanana
h	Hora
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

Hyg	Higromicina
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
L	Litro
LIMic	Laboratório de Interações Microbianas
M	Molar
M-CSF	Fator de crescimento que estimula a produção de monócitos
M.D.	Marca de resistência direita
M.E.	Marca de resistência esquerda
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NaF	Fluoreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Neo	Neomicina
ng	Nanograma
nmol	Nanomolar
NP	Nonil fenoxipolietoxietanol
OD	Densidade óptica
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenil-metano-sulfonil
P_z	Zona de fosfolipase
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em cadeia de polimerase quantitativa
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto

SD	Meio sintético definido
SG	Meio sintético definido com galactose
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TBS	Solução salina tamponada com Tris
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis fator alpha</i> / Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidades Formadoras de colônias
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
V	Volt
WT	Selvagem
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	Extrato de levedura-Peptona-Dextrose
α	Alfa
Δ	Mutante / mutação
μ	Micro
μg	Micrograma
μm	Micrómetro
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2.1 Criptococose e seu agente etiológico	26
2.2 Fatores de virulência	30
2.3 Tratamento	33
2.4 Autofagia e Cvt	35
2.5 Pep4 (Proteinase A)	37
2.6 Justificativa	38
3 OBJETIVOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Condições gerais de esterilização	41
4.2 Microrganismos e plasmídeos.....	41
4.3 Oligonucleotídeos	41
4.4 Meios de cultivo e soluções	41
4.4.1 YPD	41
4.4.2 YPG	42
4.4.3 YPD com 1 M de sorbitol.....	42
4.4.4 YPD e SD suplementado com NaCl	42
4.4.5 YPD e SD suplementado com KCl	42
4.4.6 YPD com SDS 0,03%.....	43
4.4.7 YPD suplementado com H ₂ O ₂ ou NaNO ₂	43
4.4.8 YPD suplementado com 0,5% de <i>Congo Red</i>	43
4.4.9 Ágar gema	43
4.4.10 Ágar <i>Níger Seed</i>	44
4.4.11 <i>Christensen's urea Agar</i>	44
4.4.12 Meio de indução de cápsula	45
4.4.13 Meio RPMI 1640	45
4.4.14 YNB (<i>Yeast nitrogen base</i>) (10X)	45
4.4.15 SD ou SG suplementado com H ₂ O ₂	46
4.4.16 SD ou SG suplementado com NaNO ₂	46
4.4.17 Solução de Dextrose 20%	46
4.4.18 HCl 1 M.....	46
4.4.19 PBS 10X	46
4.4.20 Ampicilina (50 mg/mL).....	47

4.4.21 Higromicina B (50 mg/mL).....	47
4.4.22 Neomicina - G418 (200 mg/mL)	47
4.4.23 Tampão de extração de DNA	47
4.4.24 Tris-EDTA (TE)	47
4.4.25 Solução de RNase (10X)	48
4.4.26 SDS 10%	48
4.4.27 Soluções para extração de proteína.....	48
4.4.27.1 Tris-HCl 1 M pH 8.....	48
4.4.27.2 Tris-HCl 1 M pH 7,4.....	48
4.4.27.3 EDTA 0,5 M pH 8	48
4.4.27.4 NaCl 5 M	49
4.4.27.5 PMSF 100 mM	49
4.4.27.6 NP-40 10%.....	49
4.4.27.7 Tampão de lavagem.....	49
4.4.27.8 Tampão de lise.....	49
4.4.28 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida.....	50
4.4.28.1 Acrilamida 30%	50
4.4.28.2 <i>Lower buffer</i> pH 8,8.....	50
4.4.28.3 <i>Upper buffer</i> pH 6,8.....	50
4.4.28.4 Persulfato de amônio (APS) 10%	50
4.4.28.5 Tampão de corrida (10X).....	51
4.4.28.6 Tampão de amostra (2X).....	51
4.4.28.7 Solução corante de <i>Coomassie blue</i>	51
4.4.28.8 Solução descorante.....	51
4.4.29 Soluções para <i>Western blot</i>	52
4.4.29.1 Solução de transferência (10X) - Tris	52
4.4.29.2 Solução de transferência (1X)	52
4.4.29.3 Solução de lavagem (10X) – TBS	52
4.4.29.4 Solução de lavagem (1X) – com Tween 0,1%	52
4.4.29.5 Solução de bloqueio (Molico 5%)	52
4.4.29.6 Albumina de soro bovino (BSA 1%)	53
4.4.30 Soluções para eletroforese em gel de agarose	53
4.4.30.1 Gel de agarose (0,8%)	53
4.4.30.2 Tampão de corrida TAE (50X).....	53

4.4.30.3 Tampão de amostra (6X).....	53
4.4.30.4 Brometo de etídeo (10 mg/mL).....	53
4.4.31 Soluções para <i>Southern blot</i>	54
4.4.31.1 Solução de desnaturação.....	54
4.4.31.2 Solução de neutralização.....	54
4.4.31.3 Solução estoque SSC 20X.....	54
4.4.31.4 Solução de lavagem (1).....	54
4.4.31.5 Solução de lavagem (2).....	54
4.5 Métodos.....	54
4.5.1 Construção de cassetes de deleção por <i>Double-joint</i>	54
4.5.2 Transformação por biolística.....	55
4.5.3 Extração de DNA genômico.....	56
4.5.4 Confirmação da deleção por <i>Southern blot</i>	57
4.5.5 GFP-Ams1 e transformação em <i>C. neoformans</i>	57
4.5.6 Extração de proteína total e <i>Western blot</i>	58
4.5.7 Avaliação do impacto da deleção do gene <i>PEP4</i> na expressão dos fatores de virulência e à múltiplas condições de estresse.....	59
4.5.7.1 Diluição seriada.....	59
4.5.7.2 Crescimento a 37°C.....	59
4.5.7.3 Crescimento em privação nutricional.....	59
4.5.7.4 Crescimento em diferentes pHs.....	60
4.5.7.5 Integridade da parede celular.....	60
4.5.7.6 Estresse osmótico, oxidativo e nitrosativo.....	60
4.5.7.7 Produção de melanina.....	60
4.5.7.8 Produção de urease.....	61
4.5.7.9 Produção de fosfolipase.....	61
4.5.7.10 Produção de cápsula polissacarídica.....	61
4.5.9 Animais.....	62
4.5.10 Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento para diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM).....	62
4.5.11 Diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea.....	63
4.5.12 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da interação de BMDM com leveduras de <i>C. neoformans</i>	63
4.5.13 Determinação do índice de fagocitose a partir da interação de BMDM com leveduras de <i>C. neoformans</i>	64

4.5.15 Ensaio de sobrevivência em <i>Galleria mellonella</i>	64
4.5.16 Extração de RNA total e qPCR	65
4.5.17 Sensibilidade aos antifúngicos	66
5 RESULTADOS	67
5.1 Análise <i>in silico</i> da proteína Pep4.....	67
5.2 Deleção do gene <i>PEP4</i>.....	70
5.3 Sensibilidade do mutante <i>pep4</i> em condição de privação nutricional.....	74
5.4 Processamento da α-manosidase 1 (Ams1) por Pep4.....	75
5.5 Avaliação do impacto da deleção do gene <i>PEP4</i> na expressão dos fatores de virulência e à múltiplas condições de estresse	77
5.6 Sobrevivência <i>in vivo</i>.....	85
5.7 Interação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com <i>C. neoformans</i>.....	85
5.8 Padrão de expressão do gene <i>PEP4</i>.....	88
5.9 Análise da sensibilidade aos antifúngicos.....	93
6 DISCUSSÃO.....	94
7 CONCLUSÕES.....	99
8 REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE A - LISTA DE MICRORGANISMOS	110
APÊNDICE B – LISTA DE PLASMÍDEOS	111
APÊNDICE C – LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	112
APÊNDICE D – Processamento de Ams1 por Pep4 em <i>C. neoformans</i>.....	113
APÊNDICE E – Homólogos da proteína Pep4 em <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99 e <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> KN99.....	114

1 INTRODUÇÃO

A frequência de infecções fúngicas invasivas e oportunistas aumentaram significativamente nas últimas duas décadas. Embora a incidência destas infecções seja muito menor que as infecções superficiais, as invasivas estão associadas a altas taxas de mortalidade atingindo cerca de um milhão e meio de indivíduos todos os anos. Mais de 90% das mortes relatadas estão relacionadas aos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*. Este aumento se deve ao uso expressivo de terapias imunossupressoras, pacientes submetidos a transplantes de órgãos, pacientes HIV/AIDS, com doenças neoplásicas e o uso crescente de dispositivos invasivos, como cateteres venosos centrais (PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2006; BROWN et al., 2012; ENOCH et al., 2017). Com o advento da epidemia de AIDS nos anos 80, estudos sobre a criptococose se intensificaram (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

A criptococose é uma doença infecciosa invasiva de distribuição mundial causada pelas leveduras encapsuladas dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, sendo a espécie *C. neoformans* (sorotipo A) responsável por causar aproximadamente 95% das infecções (MAZIARZ; PERFECT, 2016). A meningite criptocócica que é a forma mais comum da doença em imunocomprometidos, resulta em 15% da mortalidade relacionada à AIDS globalmente (RAJASINGHAM et al., 2017). Estima-se que na África Subsaariana ocorrem anualmente 720.000 casos de meningite criptocócica e na América Latina 54.400, tendo o terceiro maior número de casos globalmente (PARK et al., 2009; VIDAL et al., 2013; RAJASINGHAM et al., 2015).

O tratamento da criptococose é limitado a anfotericina B, flucitosina (5-FC) e fluconazol. Além da alta toxicidade, já foram reportados casos de resistência aos antifúngicos (KATHIRAVAN et al., 2012; LOYSE et al., 2013). Portanto, novas abordagens terapêuticas precisam ser empregadas no tratamento da criptococose. Para solucionar este problema estudos têm sido direcionados para a inibição dos fatores de virulência (COELHO; CASADEVALL, 2016), assim sendo, o estudo da via de autofagia pode auxiliar na busca de novos alvos antifúngicos. Diversos estudos apontam que a autofagia é uma das ferramentas que *C. neoformans* utiliza para

resistir a condições adversas e aos estresses ambientais tornando a sua colonização no hospedeiro bem-sucedida (QUÄSCHLING et al., 2020). O Laboratório de Interações Microbianas (LIMic) da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP tem se dedicado a encontrar características genéticas e fisiológicas que possam afetar os fatores de virulência de *C. neoformans* que contribuem para a infecção e sobrevivência no hospedeiro. Utilizando uma estratégia de mutagênese por inserção aleatória induzida por *Agrobacterium tumefaciens*, foi realizada uma pesquisa de mutantes com crescimento defeituoso a 37°C. Entre os vários mutantes termosensíveis, o *ape4* que é codificado pelo gene *APE4* foi escolhido para ser caracterizado (GONTIJO et al., 2017). Esta aspartil aminopeptidase na levedura *S. cerevisiae* está relacionada a via Cvt (*cytoplasm to vacuole targeting*), uma via da autofagia seletiva (YUGA et al., 2011). ROBERTO et al. (2020) observaram que além das proteínas Atg4 e Atg8 exercerem importantes papéis na via da autofagia, assim como o ocorre em *S. cerevisiae*, estas proteínas também desempenham papéis em eventos não autofágicos em *C. neoformans*.

Neste estudo investigamos o papel da proteína Pep4 no processo de autofagia em *C. neoformans*, bem como na expressão dos fatores de virulência, na biologia e patogênese do fungo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criptococose e seu agente etiológico

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica que acomete principalmente indivíduos imunodeficientes, que incluem os pacientes HIV/AIDS, receptores de transplante, pacientes submetidos a terapia imunossupressora e tratamentos quimioterápicos (LI; MODY, 2010; PAPPAS, 2013). É estimado que ocorram 960.000 novos casos de meningite criptocócica anualmente, resultando em mais de 620.000 mortes mundialmente (PARK et al., 2009). A doença é causada pela levedura encapsulada pertencente ao gênero *Cryptococcus* que abrange mais de 30 espécies distribuídas ubiquamente no ambiente. Dois complexos distintos se destacam como patógenos da doença em humanos, *C. neoformans* e *C. gattii*, na qual *C. neoformans* causa a doença em hospedeiros imunocomprometidos e *C. gattii* em imunocompetentes (PAPPAS, 2013; MAZIARZ; PERFECT, 2016; KWON-CHUNG et al., 2017). O patologista Otto Busse e o cirurgião Abraham Buschke descreveram o agente etiológico da criptococose pela primeira vez em 1894, a partir do isolamento do fungo de um caso de lesão na tíbia, sendo denominado como *Saccharomyces-like*. Posteriormente o fungo foi isolado a partir do suco de pêssego por Francesco Sanfelice e devido a sua forma única de colônia, o nomeou como *Saccharomyces neoformans* (MITCHELL; PERFECT, 1995; MORETTI et al., 2008; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014). Somente em 1901 o organismo foi renomeado como *Cryptococcus neoformans*, quando o micologista suíço Jean-Paul Vuillemin verificou que o fungo não produzia ascósporos, que é uma característica encontrada no gênero *Saccharomyces* (SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014).

Entre os anos de 1949 e 1950 o pesquisador Edward Evans e colaboradores através de testes de aglutinação identificaram três sorotipos das espécies de *Cryptococcus*, sendo eles A, B e C baseando-se em diferenças antigênicas no polissacarídeo capsular. Após 21 anos, um grupo pertencente ao Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, ao investigarem 106 isolados de *C. neoformans* por meio de estudos de aglutinação e absorção com soro anticriptocócico descobriram um quarto sorotipo, o D (WILSON; BENNETT; BAILEY, 1968). Por muito tempo o complexo *C. neoformans* compreendeu duas variedades, sendo elas: var. *neoformans* (sorotipos

A, D e o híbrido AD) e var. *gattii* (sorotipos B e C), mas com base em análises moleculares, *C. neoformans* var. *gattii* foi reconhecido como uma espécie distinta, *Cryptococcus gattii* (sorotipo B e C), e a espécie *C. neoformans* foi reclassificada em duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D). Além do mais, as duas espécies foram divididas em diferentes tipos moleculares, *C. neoformans* sendo designado como VNI-VNIV e *C. gattii* VGI-VGIV (Tabela 1) (LIN; HEITMAN, 2006; BARNETT, 2010; LI; MODY, 2010; SRIKANTA; SANTIAGO-TIRADO; DOERING, 2014).

Tabela 1. Classificação atual das espécies de *Cryptococcus*

Sorotipo	Espécies e Variedades	Tipos moleculares
A	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VN I, VN II
B	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III, VG IV
C	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III, VG IV
D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VN IV
AD	<i>C. neoformans</i>	VN III

Fonte: Adaptado de Maziarz e Perfect, 2016.

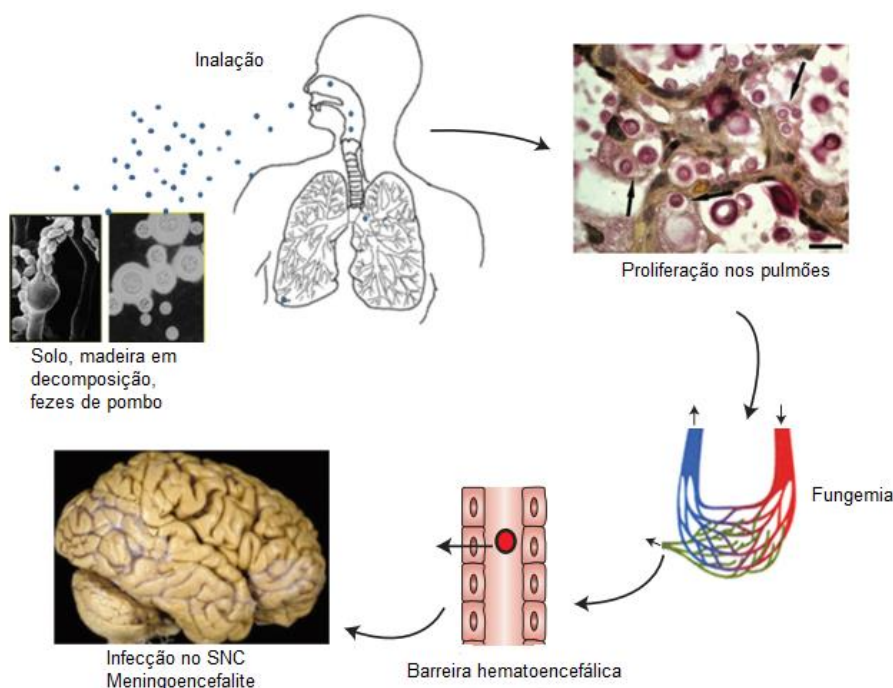
Recentemente HAGEN et al. (2015) com base em análises filogenéticas pela técnica MSLT (*Multilocus Sequence Type*) de 115 linhagens, sugeriram uma nova divisão resultando em 7 espécies, sendo a divisão da espécie *C. neoformans* em duas espécies e *C. gattii* em cinco espécies. Entretanto, esta nova proposta não foi bem aceita pela comunidade científica por se tratar de um número insuficiente de isolados estudados, baixa representação do genoma e pela complexidade das designações de espécies (KWON-CHUNG et al., 2017). Até o presente momento a classificação apresentada na Tabela 1 é a mais aceita.

Além de ser distribuído mundialmente, o nicho ecológico de *C. neoformans* inclui árvores, solo e excretas de pombos (BARNETT, 2010), em contrapartida, o habitat de *C. gattii* é comumente associado a árvores de eucalipto em regiões de climas tropicais e subtropicais. Mas recentemente, *C. gattii* se expandiu para a ilha de Vancouver e a região noroeste do Pacífico dos Estados Unidos que apresentam climas temperados (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A partir da epidemia da AIDS em meados dos anos 80, estudos sobre a criptococose se intensificaram ao redor do mundo devido à elevação das taxas de morbidade e mortalidade no grupo de pacientes imunodeficientes, onde a espécie *C. neoformans* se destacou nas últimas décadas (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). No Brasil, a criptococose causada pela espécie *C. neoformans* é a mais prevalente e está presente em todas as regiões geográficas. Além disso, o tipo molecular predominante no país é o genótipo VNI, sendo responsável por 64% das infecções (TRILLES et al., 2008). *C. neoformans* é um patógeno oportunista, haploide, de estrutura esférica com 5-10 μm de diâmetro que se reproduz por brotamento (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Em geral, a contaminação ocorre através da inalação de pequenos propágulos (blastoconídios e basidiósporos) infectantes dispersos no meio ambiente que, por sua vez, se instalam nos alvéolos pulmonares do hospedeiro, onde entram em contato com os macrófagos alveolares que conseqüentemente recrutam outras células do sistema imune através da produção de citocinas e quimiocinas. Este recrutamento estimula um padrão de resposta Th1 resultando em um processo inflamatório granulomatoso (OLSZEWSKI; ZHANG; HUFFNAGLE, 2010). Ao se depositarem nos pulmões os propágulos permanecem em estado latente e os indivíduos imunocompetentes são clinicamente assintomáticos. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, o fungo é capaz de se disseminar via hematogênica e atingir outros órgãos, podendo também comprometer o sistema nervoso central (SNC) e estabelecer a forma mais comum da doença, a meningoencefalite, sendo ela a causa mais comum de morte por criptococose (Figura 1) (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; MORETTI et al., 2008; TRILLES et al., 2008; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; KWON-CHUNG et al., 2017). Embora a meningoencefalite seja a forma clínica mais comum da criptococose, a doença pode se apresentar como pulmonar aguda ou crônica, cutânea com uma variedade de lesões de pele, afetar a próstata, ossos/articulações e pode ocasionar também a perda parcial ou total da visão (TRILLES et al., 2008; NEGRONI, 2012; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Figura 1. Ciclo da meningoencefalite criptocócica.



Os propágulos infetantes transportados pelo ar são inalados pelo hospedeiro e se instalam nos alvéolos pulmonares podendo ultrapassar a barreira hematoencefálica e migrarem para o sistema nervoso central (SNC) causando a meningoencefalite (Fonte: Adaptado de Kwon-Chung et al., 2014).

O diagnóstico da criptococose pode ser através da observação por microscopia das células das leveduras encapsuladas que são comumente coradas com tinta da China, em estudos histopatológicos (coloração de Mucicarmim de Mayer e Fontana-Masson), pela presença do antígeno capsular no sobrenadante de diversos fluidos, incluindo soro e LCR (líquido cefalorraquidiano) em ensaios imunológicos, tais como, aglutinação de látex e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (GAZZONI; PEGAS; SEVERO, 2008; MORETTI et al., 2008; NEGRONI, 2012). Recentemente desenvolveram o Ensaio de Fluxo Lateral para antígeno criptocócico (*LFA CrAg*), que é um grande aliado no contexto de recursos limitados. Este imunoenensaio detecta o antígeno capsular polissacarídico criptocócico (CrAg) em fluidos corporais que incluem soro, plasma, sangue total ou LCR para o diagnóstico da criptococose. Além de não ser necessário o preparo de amostra, é mais sensível do que os testes de aglutinação de látex mais antigos para os quatro sorotipos de *Cryptococcus* e requer pouca ou nenhuma infraestrutura laboratorial (JARVIS et al., 2011; PERCIVAL;

THORKILDSON; KOZEL, 2011; KOZEL; BAUMAN, 2012; VIDAL; BOULWARE, 2015).

2.2 Fatores de virulência

Diversos fungos patogênicos humanos como, por exemplo, *C. neoformans* utilizam estratégias sofisticadas para invadir, sobreviver, se multiplicar no hospedeiro e causar a doença. A adaptação a condições adversas e resistência ao mecanismo de defesa do sistema imune se deve pela combinação de uma série de fatores de virulência e suscetibilidade do hospedeiro (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999; CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). *C. neoformans* apresenta múltiplos fatores de virulência, em que se destaca a produção de cápsula polissacarídica. Entre outros fatores essenciais para a sobrevivência e colonização do fungo no hospedeiro incluem a capacidade de crescer a 37°C, a produção de melanina, urease e fosfolipase B (PERFECT; CASADEVALL, 2002; CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

A capacidade de crescer à temperatura corporal do hospedeiro é um requisito de grande importância para a virulência. Este atributo é fundamental para os patógenos fúngicos humanos invasivos. Dentre as mais de 30 espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, apenas *C. neoformans* e *C. gattii* são termotolerantes, ainda, algumas das demais espécies apesar de produzirem cápsula e melanização não são capazes de crescerem a 37°C, evidenciando o quanto a termotolerância propicia a patogenicidade (PETTER et al., 2001; STEEN et al., 2002; PERFECT, 2006). Alspaugh et al. (2000) verificaram que a proteína Ras1 de *C. neoformans* desempenha um papel como regulador central para diversas vias de sinalização, impactando no crescimento à alta temperatura e na patogenicidade deste fungo. Mutantes *ras1* são incapazes de crescer a 37°C, se acasalarem e, conseqüentemente, são avirulentos em modelo animal.

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência de *C. neoformans*, a qual protege da dessecação ambiental e de predadores naturais como nematoides e amebas. A cápsula promove resistência à fagocitose, modulação imunológica e evasão do sistema imune, contribuindo para que a levedura sobreviva dentro do

hospedeiro e estabeleça a doença (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; ZARAGOZA et al., 2010; CHRISMAN et al., 2011). A cápsula é composta principalmente por dois polissacarídeos fazendo com que sua estrutura seja altamente hidrofílica, sendo eles, glucuronoxilomanana (GXM) que corresponde a mais de 90% da massa de polissacarídeos da cápsula e galactoxilomanana (GalXM), além do mais, a cápsula é composta por manoproteínas (MP) em baixas quantidades (MAXSON et al., 2007; ZARAGOZA et al., 2009). Por ser antifagocítica, a cápsula interfere na ativação das células dendríticas, maturação e processamento de antígenos, prejudicando o desempenho das células T (SYME et al., 2002; VECCHIARELLI et al., 2003; DEL POETA, 2004). A GalXM, por exemplo, induz apoptose em células T em humanos (PERICOLINI et al., 2006) e GXM inibe diretamente a proliferação de células T (YAUCH; LAM; LEVITZ, 2006). Apesar destes mecanismos de escape imunológico, as manoproteínas (MP) que são os principais antígenos das células T estimulam respostas protetoras à imunidade do hospedeiro (HUANG et al., 2002). Fica evidente o quanto os componentes capsulares são determinantes na patogênese de *C. neoformans*, o que motivou diversas pesquisas para a sua utilização em vacinas e em tratamentos com anticorpos monoclonais (ZARAGOZA, 2009).

A associação da melanização com virulência não é apenas restrita a *C. neoformans*, em diversos microrganismos como bactérias, helmintos e outros fungos também ocorre (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). A síntese de melanina é catalisada pela enzima lacase na presença de determinados compostos, como orto-difenol e 3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) (WILLIAMSON; WAKAMATSU; ITO, 1998; ZHU et al., 2001). Trata-se de um pigmento hidrofóbico de alto peso molecular que é formado a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos, estes pigmentos em sua grande maioria são pretos ou marrons (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000). A capacidade de *C. neoformans* produzir melanina foi descoberta em 1962 por Staib, ao constatar que as colônias do fungo eram castanhas quando crescido em meio de cultura contendo sementes de *Guizotia abyssinica* popularmente conhecida como níger (STAIB, 1962). Devido às propriedades antioxidantes, a melanina protege *C. neoformans* contra o estresse oxidativo dos fagócitos (SABIITI; MAY, 2012). Diversos estudos *in vitro* demonstraram que as células melanizadas de *C. neoformans* apresentam uma menor susceptibilidade a

oxidantes do que as não melanizadas (WANG; CASADEVALL, 1994; EMERY et al., 1995; WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995). As células melanizadas também são resistentes às radiações UV, temperaturas extremas (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000), são menos susceptíveis à morte por peptídeos microbicidas (DOERING et al., 1999), ingestão por macrófagos (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995) e morte por macrófagos alveolares (LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999), sugerindo que a síntese de melanina pode aumentar a virulência e proteger o fungo contra as defesas do sistema imune do hospedeiro.

No hospedeiro, *C. neoformans* secreta a enzima fosfolipase B (PLB1) que desempenha um importante papel na virulência (CHEN et al., 2000). A atividade desta enzima pode provocar a desestabilização da membrana e lise na célula do hospedeiro (GHANNOUM, 2000). Diversos estudos demonstraram que a fosfolipase mantém a integridade da parede celular, fornece nutrientes que podem ser utilizados como fontes de carbono pelo fungo durante o processo de infecção, aumenta a sobrevivência de *C. neoformans* nos fagócitos, inibe a resposta imune protetora no pulmão, promovendo uma infecção pulmonar intersticial e contribui para a disseminação nos linfonodos pulmonares e o cérebro (COX et al., 2001; NOVERR et al., 2003; SIAFAKAS et al., 2007; WRIGHT et al., 2007; SABIITI; MAY, 2012; ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015). Nos hospedeiros a ureia está presente em pequenas concentrações, tem a capacidade de atravessar as membranas celulares, é distribuída de maneira uniforme no tecido adiposo subcutâneo, sistema nervoso central (SNC) e no soro sanguíneo (RONNE-ENGSTRÖM et al., 2001; SINGH et al., 2013). Osterholzer et al. (2009) demonstraram que a urease promove a polarização do sistema imunológico para uma resposta Th2 contra *C. neoformans*, embora a resposta seja intensa, não é protetora e, conseqüentemente, há um quadro de infecção persistente, sendo ineficaz na eliminação do fungo. Em *C. neoformans* o gene *URE1* é responsável por codificar a urease. Segundo COX et al. (2000), os camundongos infectados com mutantes *ure1* vivem mais que os infectados com a cepa do tipo selvagem H99 e um outro estudo demonstrou que o crescimento do fungo após inoculação direta no cérebro não é dependente da urease, entretanto, após

inoculação intravenosa, os padrões de disseminação no cérebro, baço e outros órgãos indicou que esta enzima contribui para a invasão do sistema nervoso central (SNC), melhorando o sequestro de leveduras nos leitos de microcapilares (como no cérebro) durante a disseminação hematogênica, facilitando assim a invasão de *C. neoformans* do sangue para o cérebro (OLSZEWSKI et al., 2004).

2.3 Tratamento

Já se passou meio século desde a introdução da anfotericina B e o arsenal terapêutico contra a criptococose ainda continua limitado (COELHO; CASADEVALL, 2016). Houve uma redução na incidência de doenças fúngicas com a inserção da terapia antirretroviral para pacientes infectados por HIV, entretanto, há um número crescente de receptores de transplante, pacientes recebendo medicamentos imunossupressores e novas terapias antineoplásicas, colaborando com o surgimento de uma população de risco com alta predisposição para a infecção criptocócica (MOURAD; PERFECT, 2018). As opções atuais para o tratamento da criptococose são limitadas ao grupo dos polienos (anfotericina B desoxicolato e anfotericina B lipossomal), azóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol e posaconazol) e derivados de pirimidina (5-flucitosina) (COELHO; CASADEVALL, 2016).

A anfotericina B é um metabólito secundário de *Streptomyces nodosus* descoberto em 1956 que desde então, tem sido o principal agente terapêutico da criptococose. Os polienos ligam-se ao ergosterol, causando poros e alteração diretamente na permeabilidade da membrana celular. A utilização da anfotericina B em combinação com flucitosina que é um análogo de pirimidina, tornou-se comum no início dos anos 80. A flucitosina induz a uma interrupção da síntese de ácidos nucleicos bloqueando a divisão celular e a síntese proteica. Os azóis bloqueiam a síntese do ergosterol, um componente importante presente nas membranas citoplasmáticas fúngicas. O fluconazol é utilizado nas etapas de consolidação e manutenção (PERFECT et al., 2010; KATHIRAVAN et al., 2012; KWON-CHUNG et al., 2014). O tratamento é dividido em três etapas: indução, consolidação e manutenção. Na terapia de indução é recomendada anfotericina B (incluindo os derivados lipossomais) juntamente com flucitosina (5-FC) por 2 semanas. O

monitoramento do paciente é fundamental nesta fase devido aos efeitos adversos associados à anfotericina B que incluem, toxicidade infusional, nefrotoxicidade e baixo potássio no sangue. Após as 2 semanas da etapa de indução, o tratamento segue com a etapa de consolidação, em que o fluconazol é utilizado por 8 semanas. O fluconazol também é indicado para a fase final da terapia, a etapa de manutenção, por 6 a 12 meses em pacientes não infectados por HIV e pelo menos 12 meses em pacientes infectados por HIV (PERFECT et al., 2010; MOURAD; PERFECT, 2018).

Nos últimos anos têm sido descritas cepas de *C. neoformans* que desenvolveram resistência aos antifúngicos empregados no tratamento da criptococose. O termo resistência é utilizado para descrever um microrganismo que mesmo recebendo as concentrações máximas de um determinado fármaco no local da infecção, continua causando a doença. Os fatores que estão envolvidos no desenvolvimento da resistência incluem, o local da infecção, a resposta do sistema imune do hospedeiro, a virulência da cepa, farmacocinética do fármaco e a concentração inibitória mínima (CIM) do microrganismo aos fármacos empregados (PERFECT; COX, 1999; COELHO; CASADEVALL, 2016).

São raras as cepas naturalmente resistentes a anfotericina B mesmo que possam adquirir a resistência durante o tratamento clínico, mas a flucitosina (5-FC), por exemplo, comumente apresenta resistência, impedindo que este fármaco seja utilizado como monoterapia. Em relação aos azóis, a maioria dos isolados inclui uma subpopulação intrinsecamente resistente a estes fármacos (SIONOV; CHANG; KWON-CHUNG, 2013; COELHO; CASADEVALL, 2016). Um obstáculo na descoberta de antifúngicos é a identificação de alvos presentes nos fungos que possam ser especificamente envolvidos por moléculas que não sejam tóxicas ao hospedeiro. Sendo assim, pesquisas precisam ser realizadas objetivando o desenvolvimento de novos tratamentos que acarretem na deficiência do crescimento, multiplicação e sobrevivência do fungo no hospedeiro humano. Recentemente Gontijo et al. (2017) caracterizou o gene *APE4* de *C. neoformans*, o qual em *S. cerevisiae* codifica uma aspartil aminopeptidase que está envolvida no processo de autofagia e na via de Cvt (*Cytoplasm to vacuole targeting*). A mutação deste gene resultou em uma linhagem de *C. neoformans* incapaz de crescer a 37°C, apresentou defeito na expressão de fatores de virulência, sensibilidade ao fluconazol e foi avirulenta em modelo animal.

Portanto, a via da autofagia pode ser uma grande ferramenta que pode ser aplicada na busca por novos alvos com potencial terapêutico.

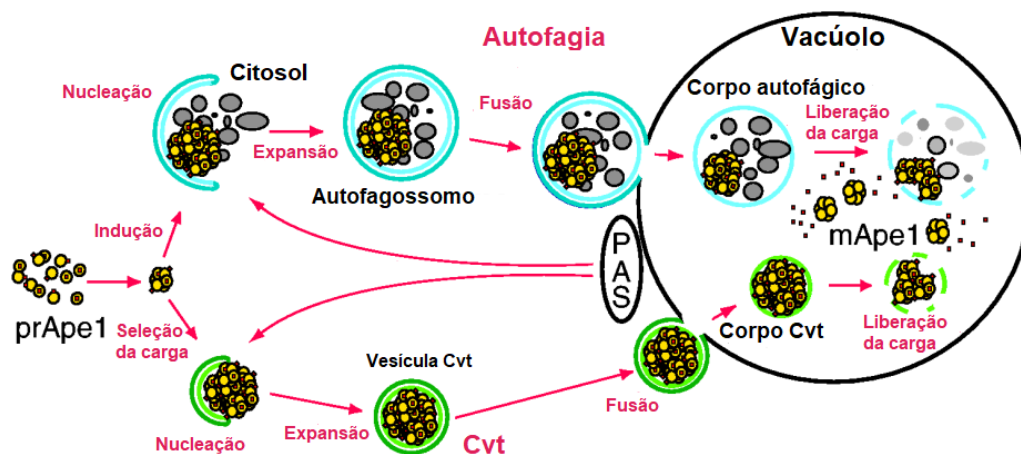
2.4 Autofagia e Cvt

A autofagia é um processo intracelular conservado entre os eucariotos que é responsável pela degradação de componentes citosólicos e organelas em resposta à privação de nutrientes. A ativação desta via desempenha um importante papel em eventos biológicos como: homeostase celular, diferenciação, desenvolvimento, morte celular programada e envelhecimento. Defeitos no processo de autofagia podem levar a inviabilidade celular e está associado a doenças graves, como distúrbios neurodegenerativos e cânceres (LEVINE; KLIONSKY, 2004; SHINTANI; KLIONSKY, 2004; LYNCH-DAY; KLIONSKY, 2010).

O mecanismo de autofagia é um processo conservado, responsável pela sobrevivência da célula frente a condições adversas como privação nutricional, hipóxia ou mudança da fonte de carbono e nitrogênio. Ainda que em condições ricas de nutrientes, o nível basal de autofagia é essencial para a homeostase da célula, pois realiza funções de “limpeza” como a remoção de proteínas danificadas, limita o acúmulo de organelas danificadas e proteínas dobradas que possam contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (JIN; KLIONSKY, 2014). Esse sistema pode ser dividido em três tipos: autofagia mediada por chaperona; microautofagia e a macroautofagia (seletiva e não-seletiva). Resumidamente, a autofagia mediada por chaperona permite a importação direta de determinadas proteínas para o lúmen lisossomal através da membrana resultando no desenrolamento das proteínas e sua degradação (PYO; NAH; JUNG, 2012; LYNCH-DAY; KLIONSKY, 2010); na microautofagia o conteúdo citoplasmático é destinado à degradação e diretamente absorvido pelo vacúolo através de invaginação da membrana lisossômica ou vacuolar (KLIONSKY, 2005); a macroautofagia é a via mais bem caracterizada dos três. Nela ocorre a formação vesículas citosólicas de membrana dupla que sequestram os componentes citoplasmáticos e os entrega ao lisossomo ou vacúolo para degradação e reciclagem do conteúdo transportado (LYNCH-DAY; KLIONSKY, 2010; WEN; KLIONSKY, 2016).

Em leveduras, além do sistema de autofagia há também um processo denominado Cvt (*cytoplasm to vacuole targeting*), no qual utiliza alguns componentes próprios da autofagia, sendo caracterizado como um tipo seletivo de autofagia (TODDE; VEENHUIS; van der KLEI, 2009; LYNCH-DAY; KLIONSKY, 2010). Até o momento esta via só foi identificada em *S. cerevisiae* e *Pichia pastoris* (TODDE, VEENHUIS e van der KLEI, 2009; FARRÉ; SUBRAMANI, 2016). As etapas envolvidas no processo de autofagia e Cvt são: (1) indução; (2) seleção e envolvimento da carga; (3) nucleação e formação da vesícula; (4) expansão da vesícula de dupla camada; (5) fusão da vesícula com o vacúolo; (6) lise vesicular no interior do lúmen do vacúolo e (7) liberação da carga para reciclagem dos constituintes macromoleculares (Figura 2) (KLIONSKY, 2005).

Figura 2. Representação do processo de autofagia e da via Cvt em leveduras.



Fonte: Adaptado de Klionsky (2005).

A via de Cvt é responsável pelo transporte das enzimas hidrolíticas: aminopeptidase 1 (Ape1), aspartil aminopeptidase 4 (Ape4) e α -manosidase 1 (Ams1) do citosol para o vacúolo. Estas enzimas hidrolíticas sintetizadas no citosol na forma de pro-peptídeos se agrupam em oligômeros, se associam a um grande complexo, o qual será envolto em uma vesícula de dupla camada mediada por Atg8 e então, essa vesícula do complexo Cvt, é transportada em associação com as proteínas Atg19 e Atg11 até a estrutura pré-autofagossomal (PAS) onde ocorre sua fusão ao vacúolo (Figura 2). No lúmen vacuolar ocorre a dissociação desse complexo promovendo a

reciclagem de macromoléculas para a célula (KRAFT; REGGIORI; PETER, 2009; TODDE; VEENHUIS; van der KLEI, 2009; LYNCH-DAY; KLIONSKY, 2010; YUGA et al., 2011).

2.5 Pep4 (Proteinase A)

Em *S. cerevisiae* o gene *PEP4* codifica uma aspartil protease vacuolar, denominada também como Proteinase A. Pep4 compartilha 46% de homologia com a catepsina D humana (CatD), que é uma protease lisossômica. Pep4 desempenha um importante papel nas etapas finais da autofagia, realizando a ativação de diversos zimogênios que estão presentes no lúmen do vacúolo (van den HAZEL; KIELLAND-BRANDT; WINTHER, 1996), incluindo proteinase B (PrB), carboxipeptidase (CPY) e aminopeptidase I (Ape1) (PARR et al., 2007). A mutação no gene *PEP4* resulta em uma redução de 90-95% na atividade das proteinases A e B, carboxipeptidase Y, RNase (s) e fosfatase alcalina (JONES et al., 1982). A atividade das hidrolases Ape1 e Ams1 (α -manosidase 1) que são transportadas pela via de Cvt até o vacúolo são dependentes de Pep4, no qual o processamento destas hidrolases ocorre em privação de glicose ou nitrogênio (LYNCH-DAY; KLIONSKY, 2010). Além de Pep4 ser responsável pela degradação de proteínas, esta protease é importante para a diferenciação e sobrevivência celular (TEICHERT et al., 1989; PEREIRA et al., 2010).

As células que apresentam deficiência desta protease apresentam um acúmulo de corpos autofágicos no vacúolo (TAKESHIGE et al., 1992) e, esta deficiência, pode causar perda na viabilidade celular em condições de privação de nitrogênio (TEICHERT et al., 1989; TSUKADA; OHSUMI, 1993). Marques et al. (2006) demonstraram que apesar de Pep4 realizar a degradação de proteínas oxidadas, a sua superexpressão não é suficiente para aumentar o tempo de vida útil da célula, pois Pep4 não impede a acumulação de outras moléculas modificadas oxidativamente, tais como, lipídeos e DNA que estão associadas com a morte celular. Assim como ao homólogo humano, sob diferentes estresses, Pep4 pode ser liberada do vacúolo. Em estudos anteriores foi relatado que durante a apoptose induzida por ácido acético ou estresse por peróxido de hidrogênio, a proteína Pep4 migra do vacúolo para o citosol para mediar a degradação das mitocôndrias e nucleoporinas

(MASON et al., 2005; PEREIRA et al., 2010). Estes estudos sugerem que Pep4 parece realizar atividades fora do vacúolo sob indução de estresse que são independentes da autofagia em *S. cerevisiae* (KERSTENS; VAN DIJCK, 2018).

2.6 Justificativa

A criptococose é uma micose sistêmica de grande importância clínica. A doença causada pela espécie *C. neoformans*, está associada principalmente a pacientes imunodeficientes. Trata-se de um patógeno oportunista que está distribuído mundialmente e é responsável pelas altas taxas de morbidade e mortalidade neste grupo de pacientes (PAPPAS, 2013; FAVALESSA et al., 2014). Sendo assim, pesquisas precisam ser efetuadas para melhor elucidar o conhecimento desta micose. Alguns aspectos que contribuem para o desencadeamento da virulência e seu impacto na patogênese já foram investigados, mas ainda não são suficientes. Diversos estudos indicam que a autofagia é uma das ferramentas que *C. neoformans* utiliza para resistir a condições adversas e estresses ambientais, fazendo com que sua colonização no hospedeiro seja bem-sucedida (PALMER; ASKEW; WILLIAMSON, 2008).

Recentemente, o sistema de autofagia tem sido estudado em diferentes espécies de fungos. Gontijo et al. (2017) reportaram que a proteína Ape4, que faz parte do processo de autofagia seletiva (via de Cvt) em *S. cerevisiae* desempenha um importante papel na virulência em modelo animal em *C. neoformans* e através de uma análise de bioinformática, foi constatado que dos 34 genes relacionados à autofagia em *S. cerevisiae*, 21 foram encontrados em *C. neoformans*, incluindo o gene *PEP4*. Contudo, os mecanismos envolvidos nas etapas da autofagia em *Cryptococcus* spp., ainda foram pouco explorados, portanto, mais estudos são necessários para a compreensão deste processo e de sua relação com a virulência, patogênese e a biologia do fungo.

O gene anotado como CNAG_00581 no genoma de *C. neoformans*, codifica 65% de aminoácidos semelhantes à Pep4 de *S. cerevisiae*. Sendo assim, com a finalidade de ampliar o conhecimento sobre o processo de autofagia em *C.*

neoformans, este estudo visa analisar o efeito da deleção do gene *PEP4*, avaliando seu papel na composição e modulação dos fatores de virulência e biologia do fungo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da deleção do gene *PEP4* em *Cryptococcus neoformans*, seu papel no processo de autofagia, expressão dos fatores de virulência e biologia do fungo.

3.2 Objetivos específicos

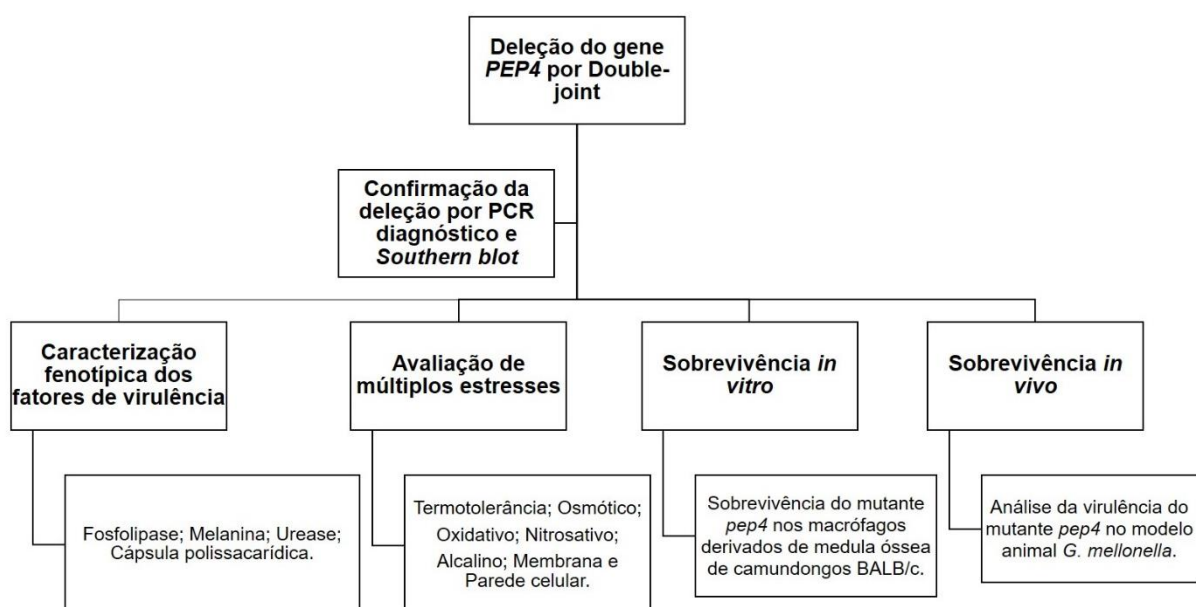
I. Obter as cepas de *C. neoformans* mutante (*pep4*) e reconstituída (*pep4+PEP4*), utilizando a metodologia de *Double-joint*;

II. Caracterizar fenotipicamente a deleção do gene *PEP4*, associando aos fatores de virulência (produção de fosfolipase, melanina, urease e cápsula polissacarídica), bem como o crescimento frente a múltiplos estresses (térmico, osmótico, oxidativo, nitrosativo e alcalino);

III. Avaliar a sobrevivência do mutante *pep4* em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c;

IV. Acessar a virulência da linhagem *pep4* em modelo animal *Galleria mellonella*.

3.3 Delineamento experimental



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições gerais de esterilização

Os meios de cultura, soluções, vidrarias foram autoclavados a 121°C e 1 atm durante 15 minutos. As esterilizações por filtração foram feitas em filtros de porosidade de 0,22 µm em frascos previamente estéreis.

Os microrganismos foram repicados em fluxo laminar nível II, previamente higienizado com álcool 70% e esterilizado por 15 minutos com luz UV. Os microrganismos foram cultivados em temperatura e tempo indicados em cada metodologia empregada.

4.2 Microrganismos e plasmídeos

A lista de microrganismos e plasmídeos utilizados neste trabalho estão presentes nos Apêndices A e B, respectivamente.

4.3 Oligonucleotídeos

Todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados no Apêndice C. Os oligonucleotídeos foram adquiridos da *Integrated DNA Technologies* (IDT) na escala de 25 nmol. As soluções estoques foram preparadas em água MilliQ estéril na concentração de 100 µM e as soluções de uso foram ajustadas para a concentração de 10 µM. Ambos os oligonucleotídeos de estoque e uso foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.4 Meios de cultivo e soluções

Os meios de cultivo sólidos (ágar) foram vertidos em fluxo laminar nível II estéril, sendo utilizados 25 mL por placa de Petri 90x15 mm ou 60 mL por placa 150x15 mm.

4.4.1 YPD

Extrato de levedura (BD)	10 g/L
Peptona Bacteriológica (BD)	20 g/L
Ágar (BD)	20 g/L
HCl 1 M (Dinâmica)	5 mL/L

Dextrose 20% (Synth)	20 g/L
Água MilliQ q.s.p	1 L

O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e logo após foi adicionada a solução estéril de dextrose 20% ao meio. Quando necessária a utilização do meio líquido, excluir o ágar da composição.

4.4.2 YPG

Extrato de levedura (BD)	10 g/L
Peptona Bacteriológica (BD)	20 g/L
Ágar (BD)	20 g/L
HCl 1 M (Dinâmica)	5 mL/L
Galactose 20% (Sigma)	20 g/L
Água MilliQ q.s.p	1 L

O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e logo após foi adicionada a solução estéril de galactose 20% ao meio. Quando necessária a utilização do meio líquido, excluir o ágar da composição.

4.4.3 YPD com 1 M de sorbitol

O meio YPD foi preparado de acordo com o item 4.4.1, acrescentado de 182,17 g/L de sorbitol conforme descrito por Toffaletti et al. (1993) e autoclavado por 15 minutos a 121°C.

4.4.4 YPD e SD suplementado com NaCl

NaCl 0,75 M (Synth)	43,84 g/L
NaCl 1 M (Synth)	58,44 g/L

O meio YPD foi preparado como descrito no item 4.4.1 e o SD conforme descrito no item 4.4.14. Ao meio de cultura foram acrescentados 0,75 M ou 1 M de NaCl de acordo com as quantidades especificadas acima (ZARAGOZA; GANCEDO, 2000). Em seguida, os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

4.4.5 YPD e SD suplementado com KCl

KCl 0,75 M (Vetec)	55,92 g/L
--------------------	-----------

KCl 1 M (Vetec) 74,56 g/L

O meio YPD foi preparado como descrito no item 4.4.1 e o SD conforme descrito no item 4.4.14. Ao meio de cultura foram acrescentados 0,75 M ou 1 M de KCl de acordo com as quantidades especificadas acima (ZARAGOZA; GANCEDO, 2000). Em seguida, os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

4.4.6 YPD com SDS 0,03%

O meio YPD foi preparado conforme descrito no item 4.4.1 e após ser autoclavado a 121°C por 15 minutos, foi adicionado SDS na concentração final de 0,03% (AN et al., 2014).

4.4.7 YPD suplementado com H₂O₂ ou NaNO₂

H₂O₂ 1 mM (Vetec) 10 mL/L

NaNO₂ 1 mM (Vetec) 10 mL/L

O preparo do meio YPD foi conforme o item 4.4.1. Em seguida, o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, para posteriormente adicionar 1 mM de H₂O₂ ou NaNO₂ a partir de uma solução estoque a 100 mM previamente esterilizada (LI et al., 2016).

4.4.8 YPD suplementado com 0,5% de *Congo Red*

Congo Red (Vetec) 5 g/L

O meio YPD foi preparado conforme o item 4.4.1. Em seguida, o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos para posteriormente ser acrescido de 0,5% de *Congo red*, de acordo com Zaragoza e Gancedo (2000).

4.4.9 Ágar gema

Sabouraud Dextrose Agar (Himedia) 65 g/L

NaCl 1 M (Synth) 68,44 g/L

Na₂HPO₄ (Synth) 14,4 g

CaCl₂ 1 M (Synth) 2,5 mL

Egg yolk Emulsion (Himedia) 80 mL

Água MilliQ q.s.p 9,17 mL

Após autoclavar o meio de cultivo a 121°C por 15 minutos e estabilização a 55°C, a gema de ovo (*Egg yolk emulsion*) estéril e o azul de metileno foram adicionados.

4.4.10 Ágar *Níger Seed*

Semente de Níger (<i>Guizotia abyssinica</i>)	75 g/L
Água MilliQ q.s.p	350 mL

Primeiramente, as sementes de níger foram trituradas e adicionadas em 350 mL de água MilliQ. A mistura foi autoclavada a 121°C por 15 minutos. Logo após, as sementes foram coadas com o auxílio de gaze ou papel filtro e o líquido contendo o óleo foi coletado.

Dextrose (Synth)	10 g/L
Ágar (BD)	20 g/L
Óleo de semente de Níger	75 g/L
Água MilliQ q.s.p	1 L

Logo após, ao óleo coletado de semente de níger foi adicionado dextrose, ágar e o volume completado para 1 L com água MilliQ. Todos os componentes foram autoclavados por 40 minutos a 121°C.

4.4.11 *Christensen's urea Agar*

Peptona (Difco)	1 g/L
Dextrose (Synth)	1 g/L
NaCl (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
Ágar (Difco)	20 g/L
Água MilliQ q.s.p	1 L

O ágar foi adicionado à 900 mL de água MilliQ e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Os seis primeiros componentes da tabela foram diluídos em 100 mL de água MilliQ, a solução foi filtrada (filtro de 0,22 µM) para esterilização e adicionada ao ágar equilibrado na temperatura de 55°C. 5 mL deste meio foram vertidos em tubos de

ensaio estéreis (13x100 mm), os quais foram inclinados até a solidificação e posteriormente foram armazenados a 4°C.

4.4.12 Meio de indução de cápsula

Para o experimento de indução de cápsula foi utilizado o meio Sabouraud Dextrose Caldo (KASVI) diluído em 1/10 no tampão MOPS (Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico) que foi ajustado para o pH de 7.3, de acordo com o protocolo descrito por Zaragoza e Casadevall (2004).

4.4.13 Meio RPMI 1640

Para o experimento de sobrevivência em macrófagos foi utilizado o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife) e gentamicina (40 mg/L) (Gibco).

4.4.14 YNB (*Yeast nitrogen base*) (10X)

YNB com aminoácidos e sulfato de amônia (Sigma)	6,75 g /100 mL
YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônia (Sigma)	6,75 g /100 mL

Será utilizada a nomenclatura SD (*Synthetic dextrose*) ou SG (adição de galactose ao meio sintético) para se referir ao YNB. As soluções do meio sintético YNB foram preparadas para uma solução estoque de 10X, esterilizadas por filtração e utilizadas após o preparo ou armazenadas a 4°C.

Neste trabalho foram utilizadas diversas combinações com o meio SD, sendo elas na presença ou ausência de sulfato de amônia (N); aminoácidos (AA) e 2% de galactose (SG), sendo elas, SD+N+AA, SG+N+AA, SD-N-AA, SD+N-AA, SG+N-AA.

YNB (10X)	100 mL
Dextrose 20% (Synth) ou Galactose 20% (Sigma)	100 mL
Ágar (Difco)	20 g/L
Água MilliQ q.s.p	1 L

Os componentes dextrose ou galactose, ágar e água foram autoclavados por 15 minutos a 121°C. Após equilíbrio de temperatura a 55°C, a solução de YNB (10X) foi adicionada à mistura dextrose, ágar e água, obtendo a concentração final de 1X (100 mL/L). Na utilização de meio líquido, excluir o ágar da composição.

4.4.15 SD ou SG suplementado com H₂O₂

H ₂ O ₂ 1 mM (Vetec)	10 mL/L
--	---------

O meio SD e/ou SG foi preparado conforme o item 4.4.14 e posteriormente se adicionou 1 mM de H₂O₂ a partir de uma solução estoque a 100 mM previamente esterilizada.

4.4.16 SD ou SG suplementado com NaNO₂

NaNO ₂ 1 mM (Dinâmica)	10 mL/L
-----------------------------------	---------

O meio SD e/ou SG foi preparado conforme o item 4.4.14 e posteriormente foi adicionado 1 mM de NaNO₂ a partir de uma solução estoque a 100 mM previamente esterilizada.

4.4.17 Solução de Dextrose 20%

Dextrose D-glicose (Synth)	200 g/L
----------------------------	---------

Água MilliQ q.s.p	1 L
-------------------	-----

A solução foi homogeneizada e autoclavada a 121°C por 15 minutos. A solução foi utilizada após o preparo ou armazenada a 4°C.

4.4.18 HCl 1 M

HCl (Dinâmica)	83 mL
----------------	-------

Água MilliQ q.s.p	1 L
-------------------	-----

A solução foi preparada e mantida a temperatura ambiente em frasco de vidro.

4.4.19 PBS 10X

NaCl (Sigma)	80 g
--------------	------

KCl (Sigma)	2 g
-------------	-----

Na ₂ HPO ₄ (Synth)	14,4 g
--	--------

KH ₂ PO ₄ (Synth)	2,4 g
---	-------

Água MilliQ q.s.p	1 L
-------------------	-----

Os componentes foram dissolvidos em água MilliQ e o pH foi ajustado para 7,4. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e mantida a temperatura ambiente.

4.4.20 Ampicilina (50 mg/mL)

Ampicilina (AppliChem)	2,5 g
Etanol 70% (diluído de etanol absoluto Merck) q.s.p.	50 mL

4.4.21 Higromicina B (50 mg/mL)

O antibiótico Higromicina B (Invitrogen) foi adquirido em solução pronto para uso. A concentração final utilizada foi de 200 µg/mL (4 µL/mL de meio).

4.4.22 Neomicina - G418 (200 mg/mL)

G418 (Life Technologies)	2,5 g
Água MilliQ q.s.p	50 mL

Após diluição em água MilliQ, a solução foi esterilizada por filtração (filtro de 0,22 µM) e armazenada a 20°C. A concentração de uso utilizada foi de 200 µg/mL (1 µL/mL de meio).

4.4.23 Tampão de extração de DNA

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

Solução foi esterilizada por filtração (filtro de 0,22 µM) e mantida à temperatura ambiente.

4.4.24 Tris-EDTA (TE)

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

A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

4.4.25 Solução de RNase (10X)

RNase (QIAGEN)	100 mg
Água MilliQ q.s.p	10 mL

A solução foi homogeneizada, esterilizada por filtração (filtro de 0,22 μ M) e, posteriormente, armazenada a -20°C.

4.4.26 SDS 10%

SDS (Biobasic Inc)	50 g
Água MilliQ q.s.p	500 mL

A solução foi aquecida a 60°C para dissolver o SDS e o pH foi ajustado com HCl para 7,2. A solução foi mantida em temperatura ambiente até o momento do uso.

4.4.27 Soluções para extração de proteína

4.4.27.1 Tris-HCl 1 M pH 8

Tris base (Dinâmica)	121,14 g
Água MilliQ q.s.p	1 L

A mistura foi homogeneizada em 800 mL de água MilliQ. Logo após, o pH foi ajustado com HCl para o valor 8,0 e o volume completado para 1 L. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e mantida em temperatura ambiente.

4.4.27.2 Tris-HCl 1 M pH 7,4

Tris base (Dinâmica)	121,14 g
Água MilliQ q.s.p	1 L

A mistura foi homogeneizada em 800 mL de água MilliQ. Logo após, o pH foi ajustado com HCl para o valor 7,4 e o volume completado para 1 L. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e mantida em temperatura ambiente.

4.4.27.3 EDTA 0,5 M pH 8

EDTA (Synth)	14,61 g
Água MilliQ q.s.p	100 mL

A mistura foi homogeneizada em 90 mL de água MilliQ. Em seguida, o pH foi ajustado com NaOH para 8,0 e o volume ajustado para 100 mL. A solução foi estocada em temperatura ambiente.

4.4.27.4 NaCl 5 M

NaCl (Dinâmica)	292,2 g
Água MilliQ q.s.p	1 L

A mistura foi homogeneizada em água MilliQ, autoclavada a 121°C por 15 minutos e mantida em temperatura ambiente.

4.4.27.5 PMSF 100 mM

PMSF (Sigma)	0,174 g
Etanol 70% (diluído de etanol absoluto Merck)	10 mL

A mistura foi homogeneizada, aliquoteada e estocada a -20°C.

4.4.27.6 NP-40 10%

NP-40 (Calbiochem)	10 mL
Água MilliQ q.s.p	100 mL

A mistura foi homogeneizada e estocada em temperatura ambiente.

4.4.27.7 Tampão de lavagem

Tris-HCl 1 M pH 8,0	1 mL
EDTA 0,5 M	2 µL
Água MilliQ q.s.p	10 mL

A solução foi preparada no momento do uso, mantendo em gelo.

4.4.27.8 Tampão de lise

Tris-HCl 1 M pH 7,4	50 µL
NaCl 5 M	20 µL
PMSF 100 mM	5 µL
NP-40 10%	50 µL
Ortovanadato (Sigma) 200 mM	50 µL
NaF 500 mM (Sigma)	100 µL
Inibidor de protease 100X (Thermo Scientific)	10 µL
Água MilliQ q.s.p	715 µL

A solução foi preparada no momento do uso, mantendo em gelo.

4.4.28 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida

4.4.28.1 Acrilamida 30%

Acrilamida (Biobasic Inc)	58 g
Bis-acrilamida (Synth)	2 g
Água MilliQ q.s.p	200 mL

A solução foi homogeneizada e mantida após o preparo a 4°C em frasco protegido da luz (envolto em papel alumínio).

4.4.28.2 Lower buffer pH 8,8

Tris base (Dinâmica)	91 g
SDS 10 % (Biobasic Inc)	20 mL
Água MilliQ q.s.p	500 mL

Primeiramente foi dissolvido Tris base em 300 mL de água, em seguida, o pH da solução foi ajustado para 8,8 com HCl. Na sequência, foram adicionados 20 mL de SDS 10% e o volume final da solução foi completado para 500 mL. A solução foi mantida a 4°C.

4.4.28.3 Upper buffer pH 6,8

Tris base (Dinâmica)	91 g
SDS 10 % (Biobasic Inc)	20 mL
Água MilliQ q.s.p	500 mL

Inicialmente foi dissolvido Tris base em 300 mL de água, em seguida, o pH da solução foi ajustado para 6,8 com HCl. Posteriormente, foram adicionados 20 mL de SDS 10% e o volume final da solução foi completado para 500 mL. A solução foi mantida a 4°C.

4.4.28.4 Persulfato de amônio (APS) 10%

Persulfato de amônio (Sigma)	1 g
Água MilliQ q.s.p	10 mL

A solução foi preparada, aliquotada em tubos do tipo Eppendorf e mantida a -20°C até o momento do uso.

4.4.28.5 Tampão de corrida (10X)

Tris base (Dinâmica)	30,3 g
Glicina (Dinâmica)	144 g
SDS (Biobasic Inc)	10 g
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi dissolvida em água MilliQ e o pH ajustado para 8,3. Em seguida, a solução foi mantida em temperatura ambiente.

4.4.28.6 Tampão de amostra (2X)

Tris base pH 6,8	100 mM
SDS (Biobasic Inc)	0,2%
Glicerol (Dinâmica)	20%
Ditiotreitol (DTT, LGC)	200 mM
Água MilliQ q.s.p	10 mL

A solução foi dissolvida em água MilliQ e estocada em tubos do tipo Eppendorf a -20°C.

4.4.28.7 Solução corante de *Coomassie blue*

<i>Coomassie blue</i> (Merck)	2,5 g
Metanol (Merck)	450 mL
Ácido acético glacial (Dinâmica)	100 mL
Água MilliQ q.s.p	10 mL

A solução foi dissolvida em água MilliQ e estocada em temperatura ambiente protegida da luz.

4.4.28.8 Solução descorante

Metanol (Merck)	450 mL
Ácido acético glacial (Dinâmica)	100 mL
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi preparada e mantida em temperatura ambiente até o momento do uso.

4.4.29 Soluções para *Western blot*

4.4.29.1 Solução de transferência (10X) - Tris

Tris base (Dinâmica)	30,3 g
Glicina (Dinâmica)	144 g
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi dissolvida em água MilliQ e o pH ajustado para 8,3. Logo após a solução foi armazenada em temperatura ambiente.

4.4.29.2 Solução de transferência (1X)

Solução de transferência (10X)	25 mL
Metanol (Merck)	50 mL
Água MilliQ q.s.p	250 mL

A solução foi preparada somente no momento do uso.

4.4.29.3 Solução de lavagem (10X) – TBS

Tris base (Dinâmica)	24,23 g
NaCl (Dinâmica)	80,06 g
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi dissolvida em água MilliQ e o pH ajustado para 7,6. A solução foi armazenada a 4°C.

4.4.29.4 Solução de lavagem (1X) – com Tween 0,1%

Solução de lavagem (10X)	100 mL
Tween 20 (Dinâmica)	1 mL
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi homogeneizada e armazenada por até duas semanas a 4°C.

4.4.29.5 Solução de bloqueio (Molico 5%)

Leite em pó desnatado (Molico, Nestlé)	2,5 g
Solução de lavagem (1X) com Tween 0,1%	50 mL

A solução foi preparada somente no momento do uso.

4.4.29.6 Albumina de soro bovino (BSA 1%)

BSA (Sigma)	1 g
Água MilliQ q.s.p	100 mL

A solução de BSA foi dissolvida em água MilliQ, alíquotada em tubos do tipo Eppendorf e armazenada a -20°C.

4.4.30 Soluções para eletroforese em gel de agarose

4.4.30.1 Gel de agarose (0,8%)

Agarose (Sigma)	8 g
Tampão TAE (10X) q.s.p.	1L

A mistura foi aquecida em micro-ondas até a agarose se dissolver completamente. Posteriormente foi adicionado o brometo de etídeo (5 µg/mL) e a solução foi vertida no molde de eletroforese.

4.4.30.2 Tampão de corrida TAE (50X)

Tris base (Dinâmica)	242 g
Ácido acético glacial (Dinâmica)	57,1 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,1 mL
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente até o momento do uso. Utilização na concentração final de 1X.

4.4.30.3 Tampão de amostra (6X)

Azul de bromofenol (Synth)	0,25 g
Glicerol (Synth)	30 mL
Xileno cianol (Sigma)	0,25 g
Água MilliQ q.s.p	100 mL

A solução foi preparada, estocada em tubos Eppendorf e mantida a 4°C.

4.4.30.4 Brometo de etídeo (10 mg/mL)

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

A solução foi homogeneizada e mantida a 4°C em frasco protegido da luz.

4.4.31 Soluções para *Southern blot*

4.4.31.1 Solução de desnaturação

NaOH 10 M	50 mL
NaCl 5 M (Dinâmica)	300 mL
Água MilliQ q.s.p	1 L

4.4.31.2 Solução de neutralização

NaCl 5 M (Dinâmica)	300 mL
Tris base 1 M (Dinâmica)	668 mL
Água MilliQ q.s.p	1 L

4.4.31.3 Solução estoque SSC 20X

NaCl 5 M (Dinâmica)	300 mL
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	88,2 g
Água MilliQ q.s.p	1 L

A solução foi homogeneizada, o pH ajustado para 7,0 e o volume completado para 1 litro.

4.4.31.4 Solução de lavagem (1)

SSC 20X	5 mL
SDS 20% (Biobasic Inc)	2,5 mL
Água MilliQ q.s.p	500 mL

4.4.31.5 Solução de lavagem (2)

SSC 20X	2,5 mL
SDS 20% (Biobasic Inc)	2,5 mL
Água MilliQ q.s.p	500 mL

4.5 Métodos

4.5.1 Construção de cassetes de deleção por *Double-joint*

A construção *pep4::Hyg^R* foi obtida de acordo com a metodologia de *Double-joint* (KIM et al., 2009). Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequência

homóloga do gene anotado como *PEP4* (CNAG_00581), acessado no banco de dados do *Broad Institute* (<http://www.broadinstitute.org>) e foram adquiridos pela *Integrated DNA Technologies* (IDT) na escala de 25 nmol. Os oligonucleotídeos estão listados no Apêndice C (Tabela 1). A estratégia proposta por Kim et al. (2009) pode ser observada na Figura 6. Na primeira etapa foi realizada a amplificação por PCR das sequências flanqueadoras do gene a ser deletado e das sequências dos marcadores (gene de resistência à higromicina). Todas as amplificações de cada fragmento foram feitas no volume final de 50 µL, adicionando-se também aos microtubos de 0,2 mL 1 Unidade de ExTaq (Takara), 5 µL de ExTaq buffer 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂), 4 µL de 2,5 mM de dNTP's (concentração final de 0,2 mM), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo. As amplificações foram realizadas no termociclador (Applied Biosystems) nas condições: 1 ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguido de anelamento (temperatura de melting específica de cada combinação de oligonucleotídeos) por 30 segundos, extensão a 72°C (por um período específico ao tamanho do fragmento – 1 min para cada 1.000 pb) e um ciclo final a 72°C por 7 minutos. Após a confirmação dos tamanhos das bandas de interesse por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 5 µg/mL com brometo de etídeo, as bandas foram purificadas utilizando kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) de acordo com as especificações do fabricante. Na segunda etapa, foi feita uma reação de PCR para a fusão de cada fragmento contendo a concentração de 50 ng de cada molde, através da sobreposição das sequências flanqueadoras com a sequência de resistência. Após eletroforese, os produtos da fusão foram purificados do gel e armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.5.2 Transformação por biolística

A transformação por biolística foi realizada seguindo o protocolo de Toffaletti et al. (1993). A linhagem KN99α de *C. neoformans* foi cultivada em 50 mL de YPD sob agitação de 150 rpm a 30°C por um período de 12-16 horas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos, lavadas 1 vez e ressuspensas em 500 µL de água destilada estéril. As células foram espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski na região central da placa de Petri contendo meio de cultura YPD suplementado com 1 M de sorbitol. Posteriormente, 50 µL de

partículas de ouro (0,6 µm) foram recobertas com 1 µg de DNA com a sequência do cassete de deleção. Utilizamos o equipamento Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad) para efetuar a transformação por biolística, em que os disparos foram realizados com disco de ruptura de 1.350 psi de pressão, onde as partículas com o DNA foram aceleradas no vácuo à uma distância de 60 mm da placa de YPD contendo 1 M de sorbitol. Após os disparos, seguiu-se com a incubação das placas por 24 horas a 30°C e, após este período adicionou-se 10 mL de água destilada nas placas para que as células fossem raspadas com o auxílio de uma espátula previamente esterilizada. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm, ressuspensas em água destilada estéril e plaqueadas em meio seletivo (YPD suplementado com 200 µg/mL de higromicina - Invitrogen). As placas foram incubadas a 30°C por 7 dias e as colônias que cresceram no meio seletivo foram utilizadas para confirmação da deleção.

4.5.3 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das linhagens selvagem e transformantes foi realizada pelo método de *Smash and Grab* (HOFFMAN; WINSTON, 1987). As culturas das linhagens alvos foram crescidas por 14-16 horas em YPD sob agitação (150 rpm) a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de tampão de extração e transferidas para tubos de rosca contendo pérolas de vidro (0,5 mm) e 0,5 mL de fenol-clorofórmio, onde foram agitadas durante 10 minutos com o auxílio de um vortex. Terminada a agitação, centrifugou-se a suspensão por 4 minutos a 8.000 rpm e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo estéril acrescido de 50 µL de NaAC 3 M e 1 mL de etanol absoluto para precipitação do DNA. Esta suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 0,5 mL de etanol 70% para lavar o precipitado. Centrifugou-se por 5 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Logo após a secagem do DNA precipitado, foi adicionado 50 µL de TE contendo 10 µg/mL de RNase e o material foi incubado na temperatura ambiente por 30 minutos. A concentração de gDNA e sua pureza foram estimados em aparelho Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc - 2000c UV-Vis Spectrophotometer). Na sequência, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 0,8%

e o gel foi visualizado em transluminador sob luz ultravioleta. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

4.5.4 Confirmação da deleção por *Southern blot*

A confirmação da deleção por *Southern blot* foi realizada conforme Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Após extração do gDNA pela metodologia de *Smash and Grab*, 10 µg do gDNA foram digeridos por enzimas de restrição por 12-16 horas a 37°C. Todo o volume da digestão foi aplicado em gel de agarose 0.8% a 100 V por aproximadamente 3 horas. Após este período, foi realizada a depuração do gel lavando 2X por 15 minutos em solução HCl 0,25 M e, posteriormente, foi feita a desnaturação por 1 hora com agitação branda em solução de desnaturação (NaOH 10 M e NaCl 5 M). Logo após, foi realizado o descarte da solução e a neutralização da membrana pela lavagem em solução de neutralização (NaCl 5 M e Tris base 1 M) pelo período de 1 hora com agitação. A transferência do DNA para a membrana de nylon (Hybond-N RPN303N) foi realizada em solução 2X SSC por 16 horas. Finalizada a transferência, foi adicionado à membrana 5 mL da solução de hibridização e 0,5 µL da sonda amplificada com o kit PCR *DIG Probe Synthesis* (Roche), seguindo as recomendações do manual do fabricante e usando os oligonucleotídeos específicos. Após a hibridização a 50°C por 12 a 16 horas realizou-se a lavagem da membrana utilizando o kit *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. A detecção dos padrões de bandas das linhagens selvagem, mutantes e reconstituída foi feita por quimioluminescência utilizando o kit de revelação *CPD-Star ready-to-use* (Roche), conforme as especificações do manual. A detecção da quimioluminescência foi realizada usando fotodocumentador UVITEC 2.7 (UVItec Limited).

4.5.5 GFP-Ams1 e transformação em *C. neoformans*

A região codificadora do gene *AMS1* de *C. neoformans* foi amplificada por PCR e clonadas entre os sítios *Bam*HI (Thermo Fischer Scientific) e *Spe*I (Thermo Fischer Scientific) do vetor pCN50 (O'MEARA et al., 2010), utilizando *E. coli* quimiocompetente DH5α, de acordo com protocolo publicado por Jacobus e Gross (2015). Os oligonucleotídeos usados para gerar os fragmentos estão indicados no Apêndice C (Tabela 2). Na sequência, a clonagem do plasmídeo contendo o gene fusionado na

região C-terminal da sequência da proteína fluorescente verde (GFP) foi confirmada por PCR diagnóstico. Os vetores clonados foram introduzidos na linhagem selvagem KN99 α e mutante *pep4* por biolística. Em seguida, a seleção dos transformantes foi realizada em ágar YPD contendo 200 μ g/mL de G418 (Life Technologies) para a linhagem selvagem e 200 μ g/mL de higromicina para o mutante, e posteriormente confirmação por PCR diagnóstico.

4.5.6 Extração de proteína total e *Western blot*

Para ser realizada a preparação do extrato total de proteína, as células de levedura foram cultivadas por 12-16 horas em caldo YPD a 30°C. O processamento da proteína Ams1 foi induzido transferindo as células para YPD líquido, SD sem sulfato de amônia e aminoácidos e SG sem sulfato de amônia e aminoácidos com suplementação de galactose. A indução em meio rico (YPD) e em privação nutricional foi realizada pelo período de 0-6 horas a 30°C em agitação de 150 rpm. Após a indução, as células de levedura foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 500 μ L do tampão de lise (50 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,5 mM PMSF, 10 mM ortovanadato, 50 mM NaF, 0,5% NP-40) contendo inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich). Pérolas de vidro foram adicionadas à suspensão celular e as células foram lisadas usando o aparelho Mini-Beadbeater-16 (BioSpec). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a análise de *Western blot*, 50 μ g de extrato total de proteína foram separados por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad), usando o equipamento de transferência semi-seca *Trans-Blot® SD* (Bio-Rad) a 15 V por 1 hora. Logo após, as membranas foram bloqueadas em solução de leite desnatado a 5% diluído em salina tamponada com Tris (TBS) contendo 0,1% de Tween 20 (Bio-Rad). As membranas foram posteriormente incubadas com anticorpo primário anti-GFP de camundongo (Thermo Fisher Scientific) em uma diluição de 1:2.000. Na sequência, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários IgG anti-camundongo (Cell Signaling) conjugados com peroxidase em uma diluição de 1:5.000. As bandas imunorreativas foram detectadas usando o substrato quimioluminescente *SuperSignal™ West Pico* (Thermo Fisher Scientific) e visualizadas usando o aparelho ImageQuant LAS (GE Healthcare). Este ensaio foi repetido três vezes de forma independente.

4.5.7 Avaliação do impacto da deleção do gene *PEP4* na expressão dos fatores de virulência e à múltiplas condições de estresse

4.5.7.1 Diluição seriada

Nos ensaios para caracterização fenotípica da deleção do gene *PEP4* frente aos fatores de virulência e múltiplas condições de estresse as culturas de KN99 α , *pep4* e *pep4+PEP4* foram crescidas em 5 mL de YPD por um período de 12-16 horas sob agitação de 150 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos, lavadas por três vezes com água milliQ estéril e ressuspendidas em 1 mL de água milliQ estéril. A concentração de células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e os inóculos foram ajustados para 2×10^6 cel/mL. A partir desta concentração inicial de 2×10^6 cel/mL, foram feitas as demais diluições seriadas, sendo elas: 2×10^5 ; 2×10^4 ; 2×10^3 e 2×10^2 cel/mL. Foram inoculados 5 μ L de cada diluição em placas contendo os meios de cultura de interesse e os ensaios foram seguidos de acordo com as especificações de cada experimento. Os registros das placas foram feitos em aparelho fotodocumentador UVITEC 2.7 (UVItec Limited).

4.5.7.2 Crescimento a 37°C

A preparação dos inóculos e diluições seriadas para a realização deste ensaio foi conforme descrito no item 4.5.7.1. Logo após o preparo, foram feitos *spots* em placas de YPD e SD (*Synthetic Dextrose*). As placas foram incubadas a 30°C e 37°C por 48 horas. As imagens das placas foram registradas e os perfis fenotípicos comparados.

4.5.7.3 Crescimento em privação nutricional

Neste ensaio as linhagens foram crescidas em meio sintético (SD) sob privação de sulfato de amônia e aminoácidos, mas com a adição de 2% de dextrose (SD-N-AA) por 20 dias. O preparo dos inóculos e diluições seriadas para a realização deste ensaio foi conforme descrito no item 4.5.7.1. Logo após o preparo, foram feitos *spots* em placa de YPD, para em seguida, ser incubada a 30°C por 48 horas.

4.5.7.4 Crescimento em diferentes pHs

Para avaliação da sensibilidade de crescimento em diferentes pHs, conduzimos o ensaio em meio YPD e em meio SD aplicando os valores de pH de 4, 6, 7 ou 8. O preparo dos inóculos e diluições seriadas para a realização deste ensaio foi conforme descrito no item 4.5.7.1. Após pipetagem de 5 μ L da suspensão celular nos respectivos meios, as placas foram incubadas a 30°C e 37°C por 48 horas.

4.5.7.5 Integridade da parede celular

Após o preparo dos inóculos e diluições seriadas para a realização deste ensaio conforme descrito no item 4.5.7.1, *spots* foram feitos em placas contendo YPD suplementado com 0,5% de vermelho congo ou 0,03% de SDS. As placas foram incubadas na estufa por 48 horas a 30°C e 37 °C.

4.5.7.6 Estresse osmótico, oxidativo e nitrosativo

O ensaio para avaliação do efeito do estresse osmótico foi feito em meio YPD e SD acrescidos de 0,75 M ou 1 M de NaCl ou KCl; estresse oxidativo nos meios YPD, SD e SG (sintético suplementado com sulfato de amônia, aminoácidos e 2% de galactose) com adição de 1 mM de H₂O₂; estresse nitrosativo nos meios YPD, SD e SG (sintético suplementado com sulfato de amônia, aminoácidos e 2% de galactose) com adição de 1 mM de NaNO₂. Os inóculos e diluições seriadas foram preparados conforme descrito no item 4.5.7.1. Após realizar *spots* de cada diluição seriada nos meios de cultivos específicos, as placas foram incubadas a 30°C e 37°C por 48 horas.

4.5.7.7 Produção de melanina

O ensaio de produção de melanina foi feito conforme Paliwal e Randhawa (1978). Após o preparo dos inóculos e diluições como descrito no item 4.5.7.1, sendo utilizada apenas a diluição 2×10^6 cel/mL, a suspensão foi inoculada em meio ágar *Níger Seed*, sendo posteriormente incubada a 30°C pelo período de 96 horas. Como controle positivo foi utilizado a linhagem selvagem de *Cryptococcus neoformans* (KN99 α) e, para o negativo a linhagem mutante *lac1*. A interpretação dos resultados foi feita mediante a análise fenotípica da pigmentação na colônia, após o período de tempo de incubação. As colônias produtoras de melanina apresentam a coloração marrom, enquanto que as não produtoras são brancas ou creme.

4.5.7.8 Produção de urease

Para avaliação da produção de urease as culturas selvagem e mutante foram crescidas em placa YPD a 30°C e uma colônia isolada foi retirada de cada cultura para que a inoculação fosse feita no meio inclinado de ureia em tubos de ensaio. Os tubos foram incubados por até 48 horas a 30°C. Como controle positivo foi utilizado a linhagem selvagem KN99α e, como negativo a linhagem da levedura *S. cerevisiae* (BY4742). Quando positivo a urease, o meio sofre a alteração de cor para avermelhado e quando negativo, se mantém amarelo.

4.5.7.9 Produção de fosfolipase

A avaliação da produção de fosfolipase foi realizada conforme Price, Wilkinson e Gentry (1982). Os inóculos e diluições foram preparados conforme descrito no item 4.5.7.1, sendo utilizada apenas a diluição 2×10^6 cel/mL em ágar gema, sendo posteriormente incubadas a 30°C pelo período de 5 dias. O mutante *ape4* foi utilizado como controle negativo. A interpretação foi feita a partir das medidas dos halos de precipitação com o auxílio de uma régua milimétrica para posteriormente aplicarmos as medidas na fórmula:

$$Pz = \frac{dc}{dpc}$$

Pz (Proporção entre colônia e halo de precipitação), dc (diâmetro da colônia) e dpc (diâmetro da colônia + halo de precipitação). Pz=1 indica produção negativa de fosfolipase e um valor de Pz = 0,63 significa que a linhagem de teste está liberando grandes quantidades de fosfolipase. Os dados foram analisados no *software Graphpad Prism 7.0* considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.5.7.10 Produção de cápsula polissacarídica

A indução da produção de cápsula foi realizada de acordo com Zaragoza e Casadevall (2004) com modificações. As linhagens selvagem, mutante e reconstituída foram cultivadas em 10 mL de meio Sabouraud a 30°C por 14-16 horas sob agitação de 150 rpm. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas com PBS estéril e incubadas em meio Sabouraud diluído 1/10 em MOPS 50 mM com pH 7,3 na

concentração de de 5×10^6 - 10^7 células/mL. As incubações foram feitas a 30°C e 37°C por 72 horas. Foram coletadas alíquotas das células nos tempos de 24, 48 e 72 horas, coradas com *BactiDrop India Ink* (Remel), analisadas no microscópio (Olympus Modelo BX51TF) com auxílio do *software cellSens* (Olympus). As medições foram feitas com o *software ImageJ* (*National Institutes of Health*) e as análises estatísticas com o *software GraphPad Prism 7.0* considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.5.9 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos, machos, com idade entre 8 e 12, da linhagem BALB/c mantidos em condições livres de patógenos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*). Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) protocolado sob o CEUA nº 3867121120.

4.5.10 Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento para diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM)

Os ensaios com os macrófagos derivados de medula óssea (BMDM, do inglês *Bone Marrow-Derived Macrophages*) foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A linhagem de células L929 consiste em fibroblastos imortalizados de camundongo, que possuem capacidade de secretar fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage colony-stimulating factor*) em seu sobrenadante. Dessa forma, o sobrenadante destas células foi utilizado como fonte de M-CSF para diferenciação de BMDM de camundongos BALB/c. Para obtenção do sobrenadante, as células foram ajustadas na concentração de 1×10^5 /mL e foram cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) por 7 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, o sobrenadante contendo M-CSF foi centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos para retirar totalmente as células presentes nele, em seguida, foi filtrado e estocado em nitrogênio líquido até o momento do uso.

4.5.11 Diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea

A diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos foi feita conforme descrito por Marim et al. 2010. Resumidamente, foram retirados os fêmures de camundongos BALB/c para em seguida serem imersos em álcool 70% por 5 minutos em placa de Petri. Os ossos foram cortados em suas extremidades, foi injetado meio RPMI (Sigma-Aldrich) com o auxílio de uma seringa de 10 mL e uma agulha de insulina no orifício do osso para lavagem e obtenção das células de medula óssea. As células obtidas do lavado foram colocadas em tubo Falcon com mais 10 mL de RPMI e, posteriormente, centrifugadas por 5 minutos a 1800 rpm. As células obtidas no precipitado foram ressuspensas em 5 mL de RPMI e, logo após, as células foram contadas na câmara de Neubauer e ajustadas para 2×10^6 por placa de Petri contendo 10 mL de meio R20/30 (RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino, 30% de sobrenadante da L929 e 40 mg/L de gentamicina). As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 4 dias. Após este período, as células foram suplementadas com o meio R20/30 fresco e incubadas por mais 3 dias. Passados os 7 dias para diferenciação das células, os macrófagos foram coletados, cultivados em meio R10/5 (RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5% de sobrenadante da L929 e 40 mg/L de gentamicina) e incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Antes de qualquer procedimento experimental, as células foram contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan (Gibco) para exclusão de células mortas, ajustadas para $2,5 \times 10^5$ células/mL e cultivadas em placas de 24 poços por 12 horas para melhor adesão.

4.5.12 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da interação de BMDM com leveduras de *C. neoformans*

As células de leveduras das linhagens selvagem, mutante e reconstituída (KN99 α , *pep4* e *pep4+PEP4*, respectivamente) foram crescidas a 30°C por 12-16 horas sob agitação de 150 rpm. As células de leveduras foram lavadas três vezes em PBS, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de $2,5 \times 10^5$ cel/mL. Em seguida, as células de leveduras foram opsonizadas com 5 μ g/mL de anticorpo monoclonal (MAb) 18B7 contra GXM por 1 hora. Em seguida, as células de levedura opsonizadas foram adicionadas às células de macrófagos derivados da medula óssea previamente diferenciadas em placas de 24 poços (Corning Costar

3526) de forma que cada poço tivesse 1 mL de volume final mantendo a proporção de 1:1 de macrófagos e levedura. As placas foram incubadas pelos períodos de 4 e 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células extracelulares de levedura foram removidas e os macrófagos foram lisados por 5-10 minutos com 1 mL de H₂O estéril gelada, para em seguida plaquear 100 µL em YPD para contagens de UFC. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. A análise estatística foi realizada através do *software GraphPad Prism 7.0*, considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os experimentos foram realizados em três réplicas independentes.

4.5.13 Determinação do índice de fagocitose a partir da interação de BMDM com leveduras de *C. neoformans*

Os BMDM foram ajustados para a concentração de $2,5 \times 10^5$ cel/mL em placas de 24 poços (Corning Costar 3526) contendo lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro, em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 12 horas para melhor adesão. Após este período, $2,5 \times 10^5$ cel/mL das linhagens selvagem, mutante e reconstituída foram adicionadas aos poços para interagirem com os BMDM e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ pelos períodos de 2 e 4 horas. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas, coradas com o Kit hematológico Instant-Prov (NewProv) e fixadas com Entellan (Merck) em lâminas para microscopia (Precision). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e o índice de fagocitose foi determinado conforme descrito por Zaragoza, Taborda e Casadevall (2003).

4.5.15 Ensaio de sobrevivência em *Galleria mellonella*

Nesta análise de sobrevivência *in vivo* foi utilizado o modelo animal *Galleria mellonella* de acordo com o protocolo publicado por Mylonakis et al. (2005). Resumidamente, as culturas das linhagens selvagem (KN99α), mutante (*pep4*) e reconstituída (*pep4+PEP4*) foram cultivadas em YPD a 30°C por 12-16 horas sob agitação a 150 rpm. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas com PBS estéril e ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL em PBS contendo ampicilina (20 mg/kg de peso corporal). Com o auxílio de uma seringa Hamilton, 10 µL dessa suspensão foram inoculadas na região da última pró-pata das larvas, sendo um grupo

de 15 lagartas com peso médio de 200 mg. O PBS foi usado como controle negativo. As lagartas foram colocadas em placas de 24 poços e incubadas a 37°C por 8 dias. A sobrevivência das lagartas foi monitorada diariamente pela observação de movimentos espontâneos ou provocados com uma pinça previamente esterilizada. O experimento foi concluído quando as larvas morreram ou quando houve a formação de casulos. Para a análise estatística foi utilizado o *software GraphPad Prism 7.0*, considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

4.5.16 Extração de RNA total e qPCR

A extração do RNA da linhagem selvagem KN99 α foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Skowrya e Doering (2012). A cultura foi crescida em 50 mL de YPD a 30°C por 12-16 horas, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos, lavadas por 3 vezes em PBS 1X e inoculadas nos meios de indução descritos na Tabela 2. Em seguida, as culturas foram incubadas sob agitação de 150 rpm por 2 horas a 30°C ou 37°C. Após esse período as células foram recuperadas por centrifugação a 4°C por 10 minutos a 4.000 rpm para, posteriormente, realizar a extração do RNA em Trizol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante.

Tabela 2. Composição dos meios de indução utilizados para quantificação da expressão de *PEP4*

Meio de indução	Abreviação
SD com sulfato de amônia sem aminoácidos	SD+N-AA
SD com sulfato de amônia sem aminoácidos suplementado com 1 mM de nitrito de sódio	SD+N-AA +1 mM NaNO ₂
SG com sulfato de amônia sem aminoácidos	SG+N-AA
SG com sulfato de amônia sem aminoácidos suplementado com 1 mM de nitrito de sódio	SG+N-AA +1 mM NaNO ₂

A síntese de cDNA foi feita com o kit RevertAid H minus First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A primeira fita foi sintetizada com Oligo dT a partir de 5 μ g de RNA total e transcriptase reversa. O PCR em tempo real foi realizado com o kit Power SYBR Green master mix (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos

utilizados estão listados no Apêndice C (Tabela 3). As concentrações dos oligonucleotídeos de *PEP4* foram padronizadas para 300 μM (*forward* MAV285) e o reverso em 600 μM (MAV286), *GPDH1* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) MAV240 e MAV241, como descrito em Gontijo et al. (2017) foram empregados na concentração de 300 μM . O método de quantificação dos transcritos foi comparativo ($2^{\Delta\Delta\text{CT}}$). O gene normalizador interno foi o *GPDH1* e o tratamento de referência foi com meio de cultura YPD (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A análise de variância foi realizada para PCR em tempo real usando o *software GraphPad Prism 7.0*, considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.5.17 Sensibilidade aos antifúngicos

Os ensaios para avaliação da sensibilidade aos antifúngicos foram executados no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

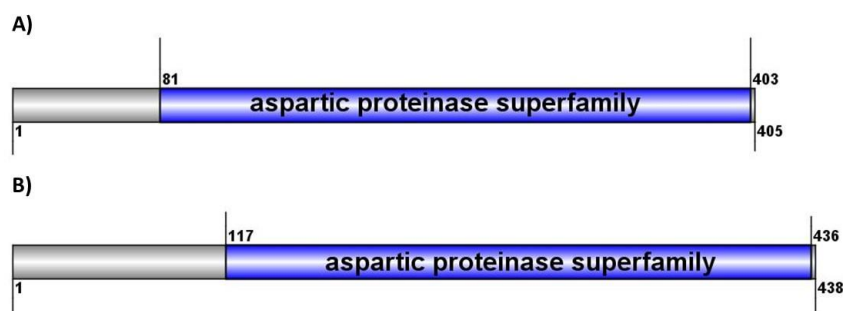
A avaliação da sensibilidade aos antifúngicos para as linhagens KN99 α , *pep4* e *pep4+PEP4* foi realizada utilizando os fármacos anfotericina-B; fluconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol seguindo as recomendações propostas pelo *European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST). As diluições de cada antifúngico foram preparadas em microplacas de 96 poços contendo o meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) com 2% glicose e ajustado no pH 7. As culturas frescas das linhagens foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl) estéril e a turbidez ajustada para a escala 1 de McFarland. Em seguida, 100 μL da cultura celular foi adicionada em cada poço contendo as variadas concentrações dos fármacos avaliados. Poços sem fármacos e as cepas controle *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), foram incluídas como controles nos ensaios. As microplacas foram incubadas a 35°C e a leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada após 72 horas.

5 RESULTADOS

5.1 Análise *in silico* da proteína Pep4

Como descrito anteriormente, a Proteinase A de *Saccharomyces cerevisiae* exerce um papel de grande relevância nas etapas finais do processo de autofagia contribuindo nas atividades de hidrolases vacuolares. Com base nesta informação e utilizando a sequência do gene *PEP4* (YPL154C) de *S. cerevisiae* disponibilizada no SGD (<http://www.yeastgenome.org>) para pesquisar o banco de dados de *C. neoformans* disponível no FungiDB (<http://fungidb.org>), encontramos o gene CNAG_00581 que codifica uma sequência de 438 aminoácidos com 65% de identidade com Pep4 de *S. cerevisiae*. A consulta utilizando a plataforma CDD (*Conserved Domain Database*) do NCBI mostrou que assim como observado em *S. cerevisiae* (Figura 3A), Pep4 de *C. neoformans* possui entre os aminoácidos 117-436 um domínio conservado da superfamília das proteinases aspárticas (Figura 3B).

Figura 3. Análise *in silico* do domínio conservado da superfamília das proteinases aspárticas da proteína Pep4.

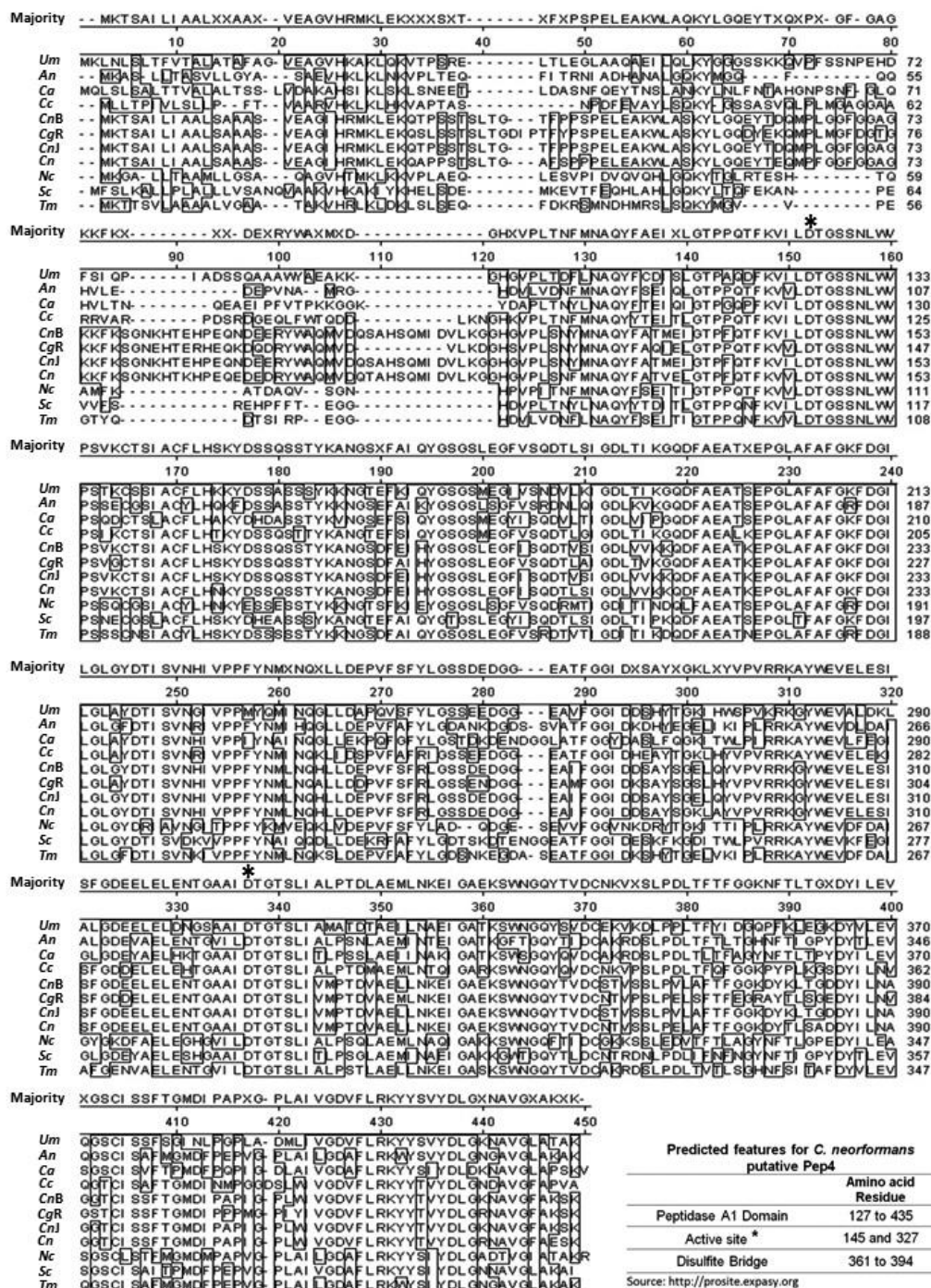


Domínios identificados através da plataforma CDD (*Conserved Domain Database*) do NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2011). **A)** Pep4 de *S. cerevisiae* (YPL154C); 405 aminoácidos. **B)** Pep4 de *C. neoformans* (CNAG_00581); 438 aminoácidos. Ilustração dos domínios das proteínas utilizando o software IBS 1.0.3 (CUCKOO Workgroup).

Ampliamos nossas análises fazendo o alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos homólogas a proteína Pep4 (*Mega Align/Core Lasergene Suite DNASTAR*[®]). Pep4 apresenta dois resíduos de ácido aspártico cataliticamente essenciais no sítio ativo, que estão conservados em todas as espécies de fungos

avaliados (Figura 4). Esta família de proteinases é classificada pelo MEROPS (*the Peptidase Database*) como família peptidase A1 (pepsina A, clã AA).

Figura 4. Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos homólogas da proteína Pep4.



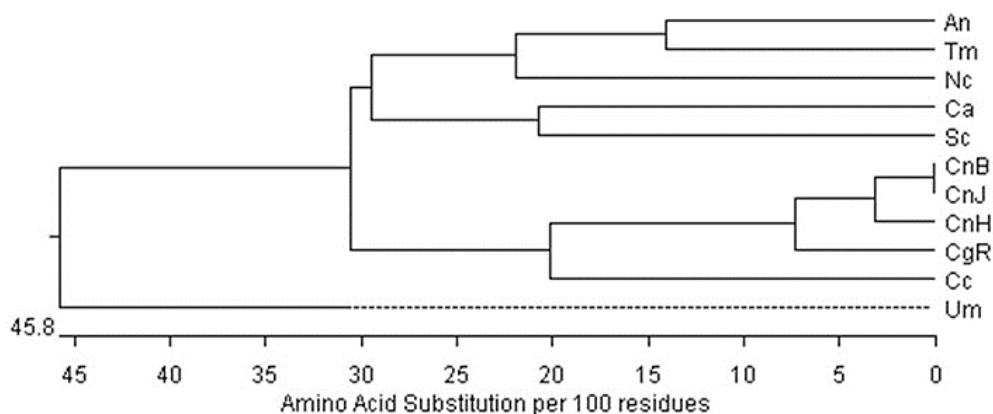
Alinhamento realizado com *MegAlign/Core Lasergene Suite* (DNASTAR®) apresentando a conservação de resíduos de aminoácidos entre a seqüência da proteína Pep4 prevista para

Saccharomyces cerevisiae (Sc) (Acc#YPL154C) e com seus ortólogos em *Cryptococcus neoformans* (CnH) (H99, Acc#CNAG_00581), *C. neoformans* var. *neoformans* (CnJ and CnB) [JEC21 (Acc#CNA05650) e B3051 (Acc#CNBA5450)], *C. gattii* (CgR) [R265, (Acc#CNBG_1355)], *Coprinopsis cinerea* (Cc) (Acc#CC1G_00332), *Ustilago maydis* (Um) (Acc#UMAG_04926), *Neurospora crassa* (Nc) (Acc#NCU02273), *Aspergillus nidulans* (An) (Acc#AN2903), *Candida albicans* (Ca) (Acc#C2_07400C_A) e *Talaromyces marneffeii* (Tm) (Acc#PMAA_019280). Os asteriscos marcam os dois resíduos de ácido aspártico previstos como domínio ativo para Pep4 de *S. cerevisiae*. A proteína Pep4 de *C. neoformans* possui um domínio previsto da Peptidase A1 a partir do aminoácido dos resíduos 127 a 435 (fonte: <http://prosite.expasy.org>).

Através da plataforma Blastp disponível no FungiDB (<http://fungidb.org>), utilizamos a sequência de aminoácidos de Pep4 de *S. cerevisiae* para localizar homólogos em *C. neoformans* var. *grubii* H99 e *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* KN99. Nesta análise observamos que em ambas as linhagens há uma maior similaridade com o grupo de endopeptidases variando de 32% a 24% (Apêndice E).

Na sequência, realizamos uma análise filogenética do alinhamento múltiplo de sequências com homologia a Pep4 de *C. neoformans* com seus ortólogos em *Coprinopsis cinerea*, *Ustilago maydis*, *C. neoformans* var. *neoformans* (JEC21 e B3501), *C. gattii* (R265), *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* (S288c), *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* e *Talaromyces marneffeii* que mostrou que a proteína Pep4 de *C. neoformans* tem como esperado alta similaridade com as outras espécies de *Cryptococcus*, variando de 86,7% a 94,1%. Nas outras espécies de basidiomicetos avaliados, foi encontrada uma maior similaridade com *C. cinerea* (68,8%), e no grupo ascomiceto foi com *T. marneffeii* (62%). Este resultado é ilustrado pela árvore filogenética apresentada na Figura 5. Estes resultados indicam que a proteína Pep4 de *C. neoformans* é altamente conservada entre as diferentes espécies de fungos analisados.

Figura 5. Relação filogenética da sequência de aminoácidos de membros da proteína Pep4 em diferentes espécies de fungos.



Árvore filogenética gerada pelo *MegaAlign/Core Lasergene Suite* (DNASTAR®) ilustrando a distância evolutiva com base na comparação de resíduos de aminoácidos entre *Cryptococcus neoformans* (CnH) (H99, Acc#CNA00581) e com seus ortólogos em *Coprinopsis cinerea* (Cc) (Acc#CC1G_00332), *Ustilago maydis* (Um) (Acc#UMAG_04926), *C. neoformans* var. *neoformans* (CnJ and CnB) [JEC21 (Acc#CNA05650) e B3051 (Acc#CNBA5450)], *C. gattii* (CgR) [R265, (Acc#CNBG_1355)], *Neurospora crassa* (Nc) (Acc#NCU02273), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (Acc#YPL154C), *Aspergillus nidulans* (An) (Acc#AN2903), *Candida albicans* (Ca) (Acc#C2_07400C_A) e *Talaromyces marneffeii* (Tm) (Acc#PMAA_019280).

5.2 Deleção do gene *PEP4*

Para avaliarmos o impacto da deleção do gene *PEP4* no desenvolvimento e patogênese de *C. neoformans*, realizamos a deleção do gene pela técnica de *Double-joint* descrita por Kim et al. (2009), onde a região codificadora do gene foi substituída por uma marca de resistência, a higromicina (Hyg^R) (Figura 6). Resumidamente, as regiões flangeadoras esquerda e direita do gene foram amplificadas por PCR, foi amplificada também a sequência de resistência à higromicina em duas etapas (marcador esquerdo e direito), contendo uma porção de sequência complementar. Logo após, foi realizada a fusão do braço esquerdo + marcador esquerdo e braço direito + marcador direito por PCR de fusão.

Após verificarmos se todos os fragmentos estavam de acordo com o tamanho esperado, os fragmentos foram introduzidos por biolística na linhagem selvagem KN99 α de acordo com Toffaletti et al. (1993).

Figura 6. Construção de deleção do gene *PEP4* de *C. neoformans* por *Double-joint*, adaptado de Kim et al. (2009).

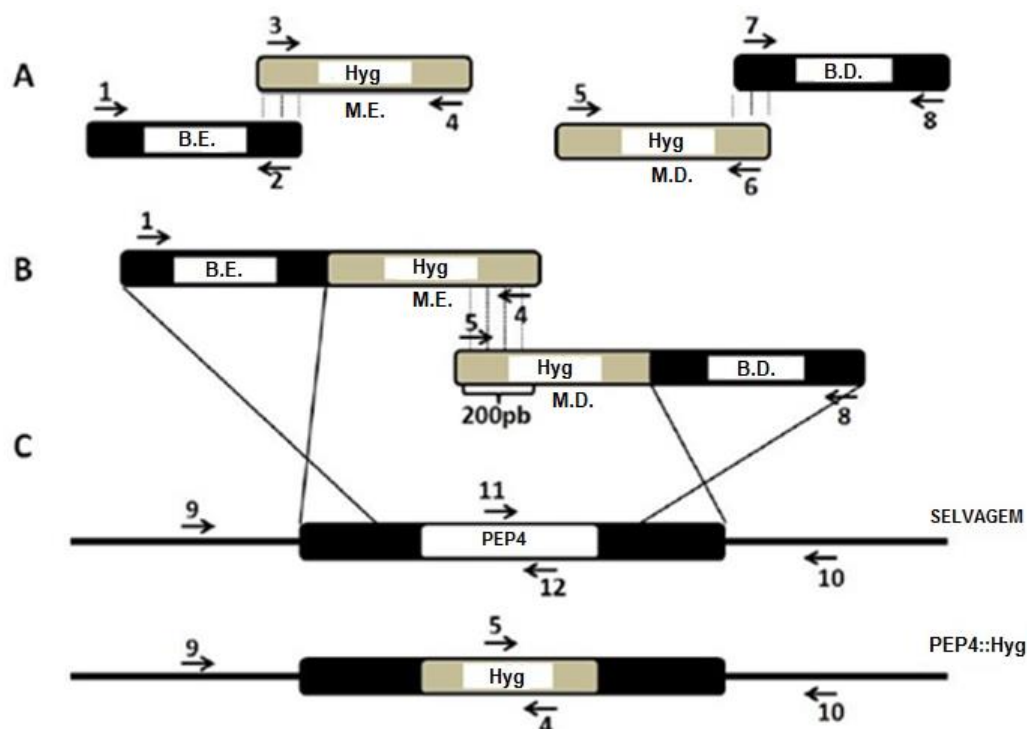
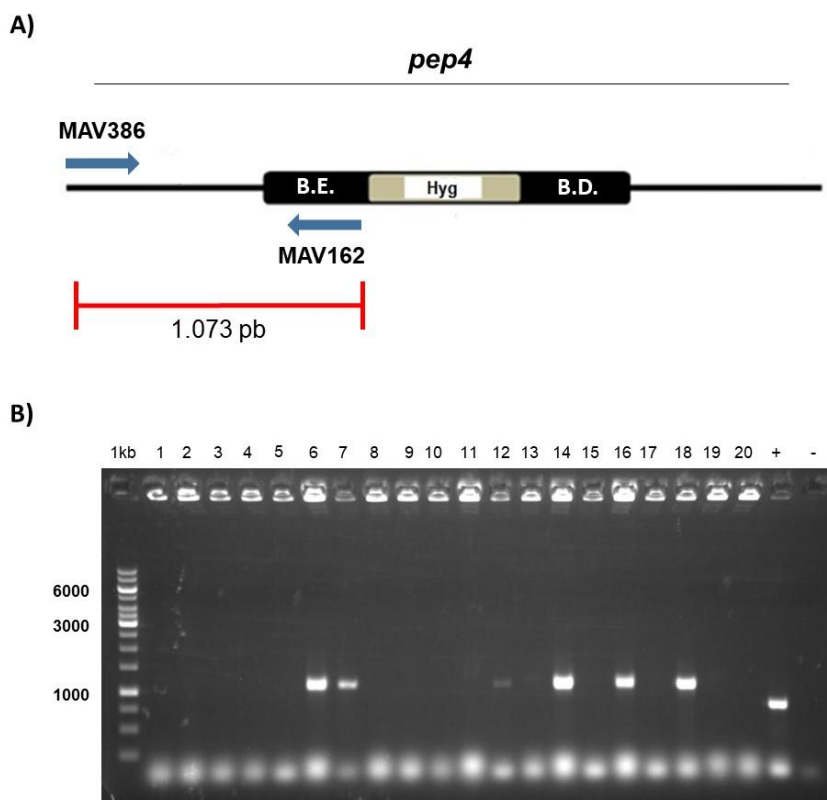


Ilustração esquemática para a deleção por *Double-joint* do gene *PEP4* (CNAG_00581), que consiste em duas etapas de PCR. **A)** primeira etapa: foram amplificadas as regiões flanqueadoras esquerda (BE) e direita (BD) do gene utilizando os oligonucleotídeos 1+2 e 7+8, respectivamente. Essas regiões permitiram o direcionamento específico da região a ser deletada. As regiões esquerda e direita do marcador de resistência higromicina (Hyg) foram amplificadas com os oligonucleotídeos 3+4 e 5+6, respectivamente. **B)** segunda etapa: busca unir os fragmentos da região flanqueadora esquerda do gene + marcador esquerdo, resultando em 2.171 pb, e os fragmentos da região flanqueadora direita do gene + marcador direito, resultando em 1.438 pb. **C)** terceira etapa: Os fragmentos obtidos na etapa anterior utilizando os oligonucleotídeos 1+4 e 5+8 foram fusionados e os mesmos foram introduzidos por biolística em *C. neoformans* de acordo com Toffaletti et al. (1993).

A seleção dos 79 transformantes obtidos foram no meio YPD com higromicina, nos quais 20 foram escolhidos aleatoriamente para realizarmos o PCR diagnóstico e verificarmos se houve a integração da sequência de resistência a higromicina ao genoma de *C. neoformans*. Após a extração do DNA genômico utilizando o método de *Smash and Grab* (HOFFMAN; WINSTON, 1987), constatamos que dos 20 transformantes selecionados apenas 6 eram positivos (Figura 7).

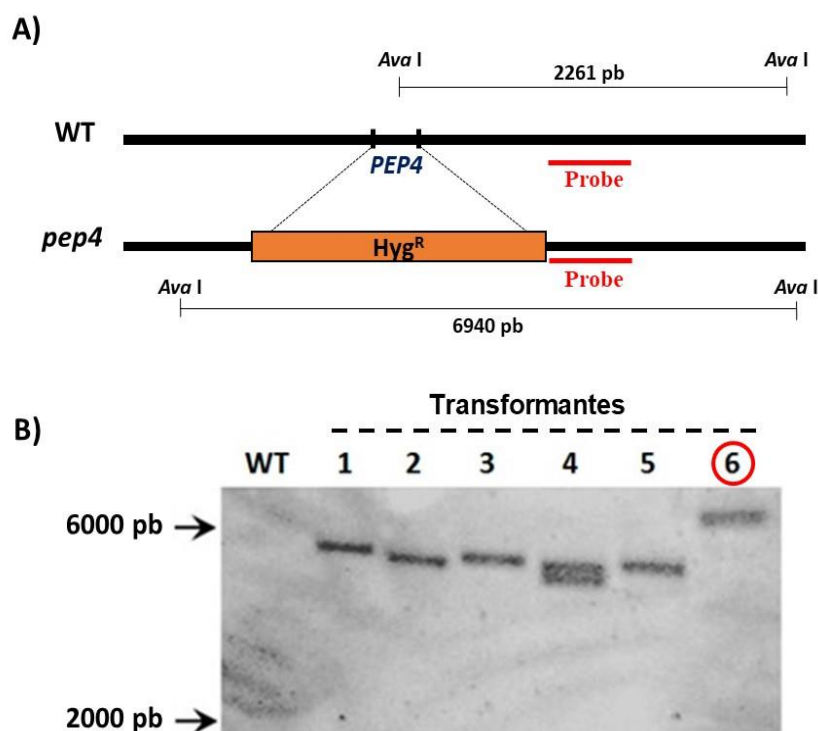
Figura 7. PCR diagnóstico da deleção do gene *PEP4*.



A) Estratégia da confirmação da deleção usando a combinação de um oligonucleotídeo na orientação direta, externo à construção (MAV386) e outro oligonucleotídeo interno, na orientação reversa (MAV162) resultando em 1.073 pb. **B)** Colônias dos transformantes selecionadas após crescimento em meio seletivo de 1-20; (+) = controle positivo da reação de PCR; (-) = controle negativo. 1 kb = peso molecular de 1 kb Ladder (Fermentas).

Em seguida, realizamos a confirmação da mutação do gene por *Southern blot* dos seis transformantes positivos no PCR diagnóstico. A Figura 8A mostra a estratégia utilizada para o *Southern blot*. O DNA genômico da linhagem selvagem KN99 α e dos transformantes foram digeridos com a enzima de restrição *Ava*I. Como esperado, observamos uma banda de 2.261 pb para a linhagem selvagem KN99 α e uma banda de 6.940 pb para o transformante 6 (Figura 8B), indicando que houve a substituição do gene *PEP4* pela marca de resistência à higromicina apenas no transformante 6. Este transformante passou a ser chamado de mutante *pep4*.

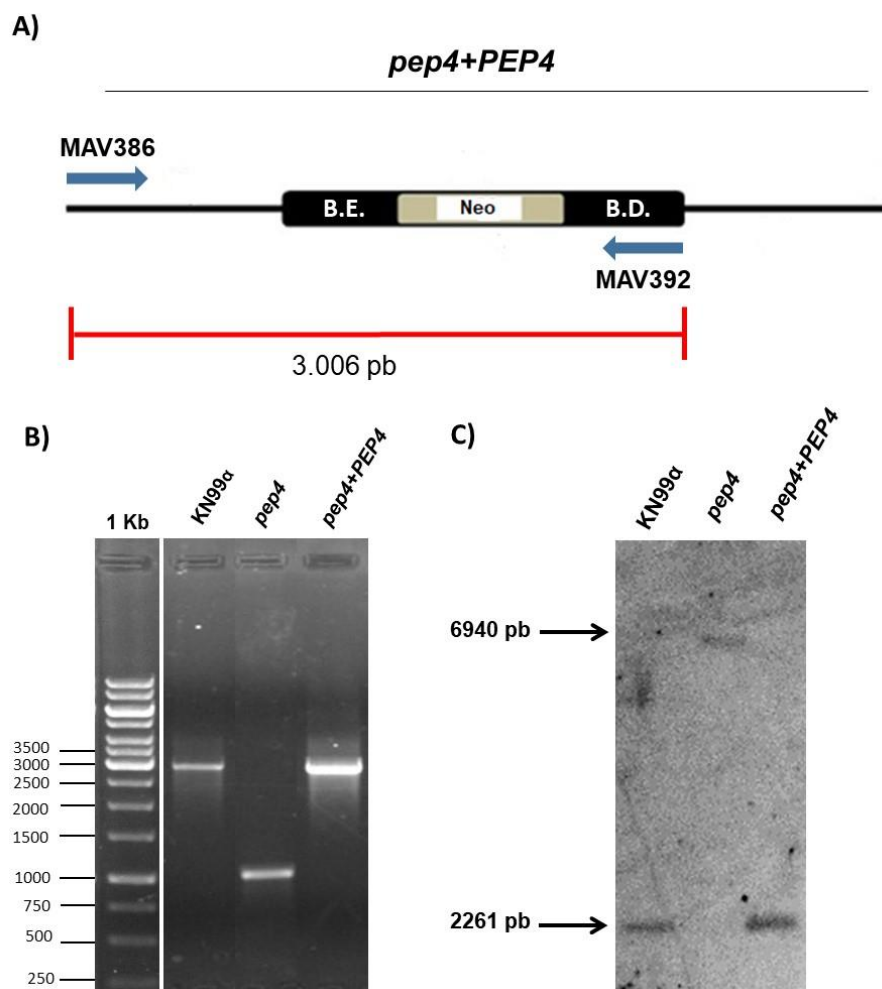
Figura 8. Ensaio de *Southern blot* para confirmação da deleção do gene *PEP4*.



A) Estratégia para confirmar a deleção por *Southern blot*. Perfil de digestão com *Ava*I do DNA genômico da linhagem selvagem (WT) com o tamanho de banda esperado de 2.261 pb e o mutante (*pep4*) com o tamanho de banda de 6.940 pb. *Hyg^R* = resistência à higromicina. **B)** Selvagem (KN99 α) e somente o transformante 6 apresentando o tamanho de banda esperado. Os marcadores de peso molecular utilizados para analisar o tamanho das bandas foram λ -HindIII (Fermentas) e 1 kb Ladder (Fermentas).

A linhagem reconstituída foi obtida através da amplificação por PCR do gene selvagem, que foi introduzido de volta ao mutante por biolística (TOFFALETTI et al. 1993), co-transformado com o plasmídeo pZP-Neo (resistência à neomicina). A Figura 9A mostra o PCR diagnóstico da linhagem reconstituída *pep4+PEP4*. Linhagens selvagem KN99 α e reconstituída *pep4+PEP4* apresentando o tamanho de banda esperado de 3.006 pb e o mutante *pep4* apresentando o tamanho de 1.073 pb. Posteriormente, realizamos a confirmação da reconstituição do gene por *Southern blot*. O DNA genômico da linhagem selvagem KN99 α , mutante *pep4* e reconstituída *pep4+PEP4* foram digeridos com a enzima de restrição *Ava*I. Conforme mostrado na Figura 9B, para as linhagens selvagem KN99 e reconstituída *pep4+PEP4* observamos o tamanho de banda esperado de 2.261 pb e 6.940 pb para o mutante *pep4*.

Figura 9. Obtenção da linhagem reconstituída *pep4+PEP4*.



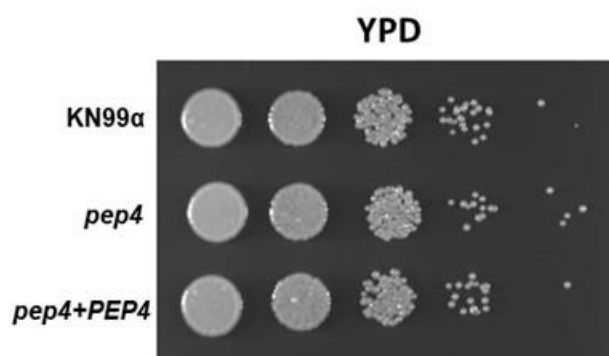
A) Estratégia da confirmação da deleção usando a combinação de um oligonucleotídeo na orientação direta, externo à construção (MAV386) e outro oligonucleotídeo interno, na orientação reversa (MAV392) resultando em 3.006 pb. **B)** PCR diagnóstico da reconstituição do gene *PEP4*. Selvagem (KN99α) e linhagem reconstituída (*pep4+PEP4*) = 3.006 pb e mutante *pep4* = 1.073 pb. 1 kb = peso molecular de 1 kb Ladder (Thermo Fisher Scientific). **C)** Ensaio de *Southern blot* para confirmação da reconstituição do gene *PEP4*. Linhagem selvagem KN99α e reconstituída *pep4+PEP4* apresentando o tamanho de banda esperado de 2.261 pb e o mutante *pep4* apresentando o tamanho de banda esperado de 6.940 pb. Os marcadores de peso molecular utilizados para analisar o tamanho das bandas foram λ -HindIII (Fermentas) e 1 kb ladder (Sinapse Inc).

5.3 Sensibilidade do mutante *pep4* em condição de privação nutricional

Tatehashi, Watanabe e Takagi (2016), demonstraram que as células mutantes *pep4* de *S. cerevisiae* não sobrevivem após cinco dias de exposição à privação de nitrogênio. Desta forma, decidimos avaliar a resposta à privação nutricional para *pep4* de *C. neoformans*. Após 20 dias de exposição ao estresse nutricional, recuperamos as células das linhagens selvagem (KN99α), mutante (*pep4*) e reconstituída

(*pep4+PEP4*) e, em seguida, foi realizada uma diluição seriada. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após o período de incubação não observamos diferenças no crescimento da linhagem mutante em comparação a linhagem selvagem. Nossos resultados sugerem que, diferentemente de *S. cerevisiae*, a proteína Pep4 de *C. neoformans* não é requerida na sobrevivência da célula frente à privação de nitrogênio (Figura 10) e que possivelmente outros mecanismos como, por exemplo, o proteassoma pode auxiliar na reciclagem de nutrientes garantindo a viabilidade. A inibição farmacológica do proteassoma leva a inviabilidade de células com mutações na via de autofagia como mostrado por Roberto et al. (2020).

Figura 10. Desafio de privação nutricional para o mutante *pep4* de *C. neoformans*.



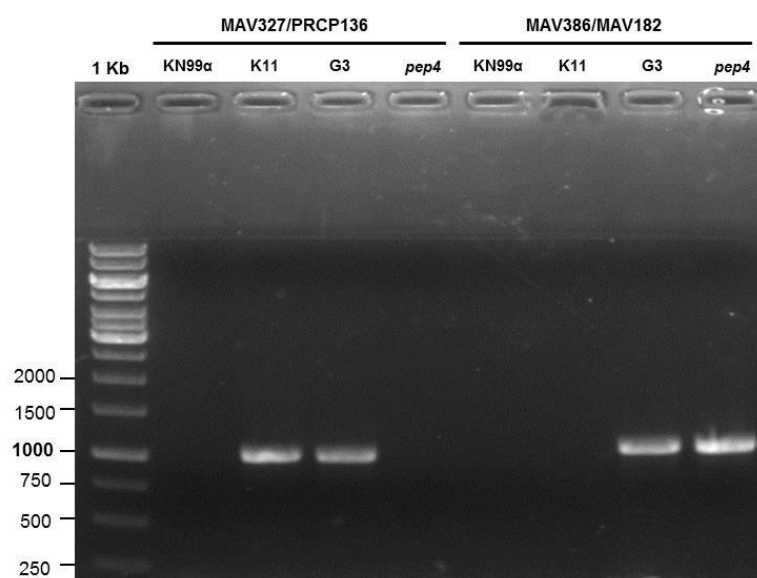
Análise do crescimento após 20 dias de incubação em caldo SD-N-AA a 30°C sob agitação de 150 rpm. Depois do período de privação nutricional, foram realizadas diluições seriadas e spots em ágar YPD. A viabilidade celular foi verificada após 48 horas de incubação a 30°C.

5.4 Processamento da α -manosidase 1 (Ams1) por Pep4

Umekawa et al. (2016) relataram que a atividade da proteína Ams1 é elevada em condição de privação de nitrogênio e, esta atividade é dependente do processamento nos vacúolos de Ams1 por Pep4. Sendo assim, decidimos verificar se esse processamento de Ams1 também ocorre pela proteína Pep4 em *C. neoformans*. A linhagem *ams1* foi obtida no banco de mutantes do Laboratório de Interações Microbianas (LIMic, UNIFESP). Para executarmos essa análise, foi necessário primeiramente obter as linhagens selvagem e mutante contendo as construções da proteína Ams1 fusionadas ao GFP (*green fluorescent protein*). A sequência codificadora do gene *AMS1* foi amplificada por PCR e clonada no plasmídeo pCN50

(Neo^R – resistência à neomicina), contendo a sequência de GFP. Em seguida, o plasmídeo foi introduzido nas cepas selvagem KN99 α e mutante *pep4* por biolística, obtendo as linhagens KN99 α +GFP-Ams1 e *pep4*+GFP-Ams1. As células foram selecionadas em YPD+Neo e YPD+Hyg, respectivamente, e os transformantes confirmados por PCR diagnóstico, ambos apresentando 1.036 pares de base (Figura 11).

Figura 11. PCR diagnóstico da transformação do plasmídeo GFP-Ams1 em *C. neoformans*.



PCR diagnóstico para KN99 α : linhagem selvagem (transformante K11); *pep4*: linhagem mutante (transformante G3). GFP-Ams1= 1.036 pb (primers MAV327 e PCRP136); *pep4*= 1.073 pb (primers MAV386 e MAV162). 1 kb = padrão de peso molecular.

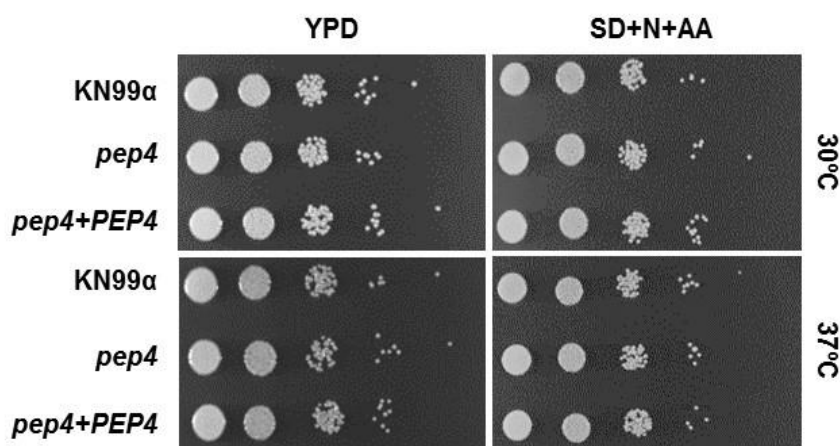
Após confirmação do PCR diagnóstico das linhagens (KN99 α e *pep4*) contendo a proteína de fusão Ams1-GFP, foi realizado ensaios de *Western blot* para acessar se a proteína Ams1 é processada por Pep4 em *C. neoformans* em diferentes condições nutricionais, como em meio rico (YPD), em privação nitrogênio (SD-N-AA) e em privação nitrogênio substituindo a fonte preferencial glicose pela não preferencial galactose (SG-N-AA) por um período de 0-6 horas (Apêndice D). Neste ensaio verificamos que tanto na linhagem selvagem KN99 α que foi utilizada como controle, como nas linhagens selvagem e mutante expressando GFP-Ams1, não observamos o tamanho de banda esperado de 155 kDa em todas as condições nutricionais e

períodos avaliados. Sugerindo que Pep4 de *C. neoformans* não processa a proteína Ams1, como ocorre em *S. cerevisiae*.

5.5 Avaliação do impacto da deleção do gene *PEP4* na expressão dos fatores de virulência e à múltiplas condições de estresse

A habilidade de crescimento em temperatura fisiológica dos mamíferos é de grande importância para a virulência. Os isolados de *C. neoformans* apresentam uma considerável termotolerância (PERFECT, 2006; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014), contribuindo para a sua sobrevivência e desenvolvimento no hospedeiro. Desta forma, decidimos avaliar o crescimento do mutante *pep4* sob estresse térmico em ensaio de diluição seriada nas condições de meio rico (YPD) e meio sintético (*Synthetic Dextrose*) suplementado com sulfato de amônia e aminoácidos (SD+N+AA). Como pode ser observado na Figura 12, não houve diferença no crescimento do mutante *pep4*, quando comparado ao selvagem KN99 α .

Figura 12. Avaliação do crescimento a 37°C do mutante *pep4*.



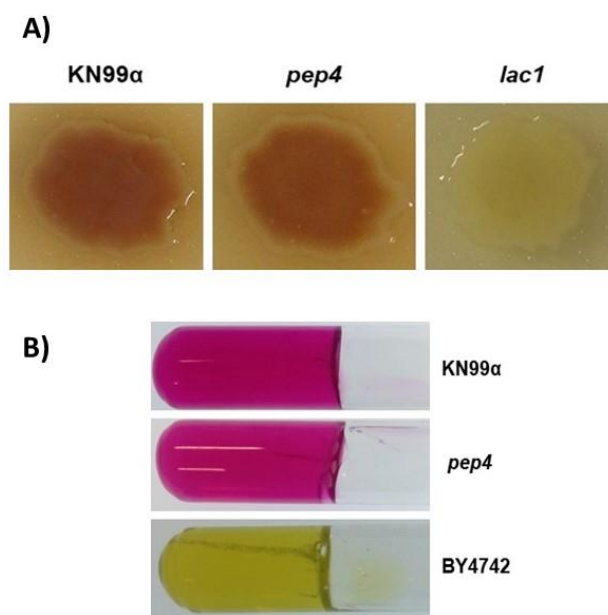
Ensaio realizado por diluição seriada em meio rico YPD e no meio definido SD+N+AA a 30°C e 37°C. Incubação por 48 horas.

A produção de melanina proporciona defesa contra radicais livres do sistema imunológico e proteção à radiação como as que provém de luz solar e reatores nucleares, as quais *C. neoformans* está sujeito no ambiente (DADACHOVA et al., 2007; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). Desta forma, resolvemos testar o

impacto da falta de Pep4 sobre este fator de virulência. Como podemos observar na Figura 13A, a deleção de *PEP4* não teve influência na produção de melanina.

A urease é fundamental para promover a disseminação fúngica no tecido cerebral (SINGH et al., 2013), linhagens deficientes para a produção de urease tem a virulência atenuada em modelo animal (COX et al., 2000). Como podemos observar na Figura 13B, o mutante *pep4* produz esta enzima assim como a linhagem selvagem, portanto, ausência da proteína Pep4 em *C. neoformans* não impactou na produção de urease.

Figura 13. Produção de melanina e urease do mutante *pep4*.

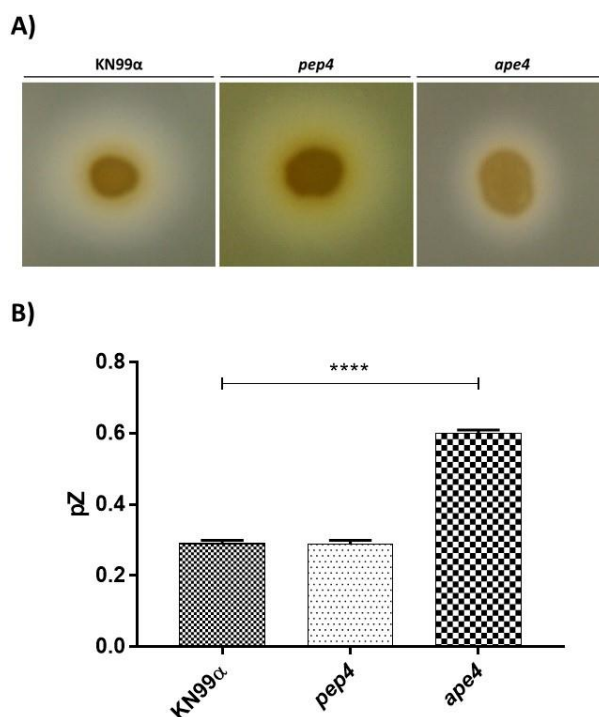


A) Ensaio de produção de melanina. Colônias isoladas das linhagens foram inoculadas em meio ágar *Níger seed* e incubadas a 30°C por 96 horas. Foi utilizado como controle positivo a linhagem KN99α e como controle negativo o mutante *lac1*. **B)** Avaliação da produção de urease. Colônias isoladas das linhagens foram inoculadas em meio *Christensen's urea* e incubadas a 30°C por 48 horas. Controle negativo: BY4742 (*S. cerevisiae*). A mudança de coloração no meio de cultura de amarelo para rosa indica a produção de urease.

A enzima fosfolipase é de grande importância para o início da infecção pulmonar e disseminação de *C. neoformans* para outros tecidos (GANENDREN et al., 2006). Linhagens com deficiência na produção de fosfolipase se mostram menos virulentas nos modelos animais de camundongo e coelho (COX et al. 2001). Para acessar a produção de fosfolipase no mutante *pep4* em comparação a linhagem selvagem, empregamos a metodologia descrita por Price, Wilkinson e Gentry (1982) baseada no halo de precipitação em meio ágar gema. Como pode ser observado na

Figura 14A, não há diferença da produção de halo entre a linhagem selvagem e o mutante *pep4*. Esta observação é confirmada quando o valor de Pz é calculado para as triplicadas biológicas (KN99 α = 0,29 e *pep4*= 0,30 e *ape4*= 0,6). A Figura 14B mostra que não houve diferença estatística entre as linhagens selvagem e mutante, confirmando que a deleção de *PEP4* não afetou na produção de fosfolipase.

Figura 14. Análise da produção de fosfolipase para o mutante *pep4*.

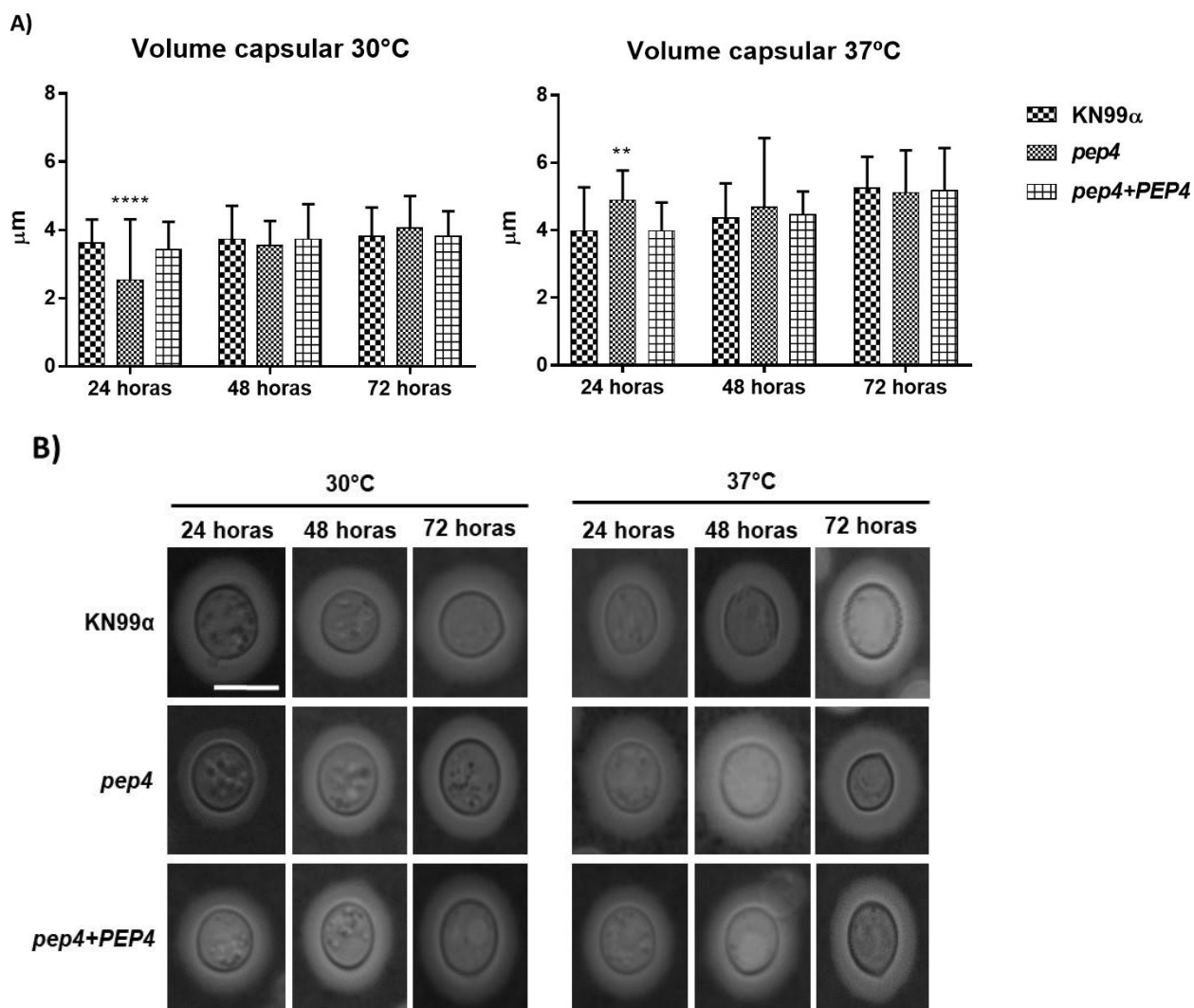


A) Formação do halo de precipitação após o crescimento em ágar Gema a 30°C por 5 dias. O mutante *ape4* foi utilizado como controle negativo. **B)** Avaliação foi através da formação do halo de precipitação conforme descrito por Price, Wilkinson e Gentry (1982), sendo: Pz = 1 indica produção negativa de fosfolipase, valores > 0,63 < 1 positivo e \leq 0,63 produção de fosfolipase fortemente positiva.

A cápsula polissacarídica é um importante atributo de *C. neoformans*, pois protege contra antioxidantes, desidratação causada pelo ambiente e reduz as respostas imunes do hospedeiro (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). Gontijo et al. (2017) mostraram que linhagens de *C. neoformans* que não produzem cápsula são incapazes de produzir a doença em modelo animal. Acessamos o impacto da deleção do gene *PEP4* sobre a produção deste fator de virulência e, como podemos observar na Figura 15A o mutante *pep4* produz significativamente menos cápsula que a linhagem selvagem nas primeiras 24 horas de indução a 30°C. Entretanto, a 37°C o comportamento do mutante *pep4* muda, e podemos observar que esta linhagem

passa a produzir significativamente mais cápsula que a linhagem selvagem em 24 horas pós indução, mas essa diferença deixa de existir a partir de 48 horas.

Figura 15. Produção de cápsula polissacarídica do mutante *pep4*.



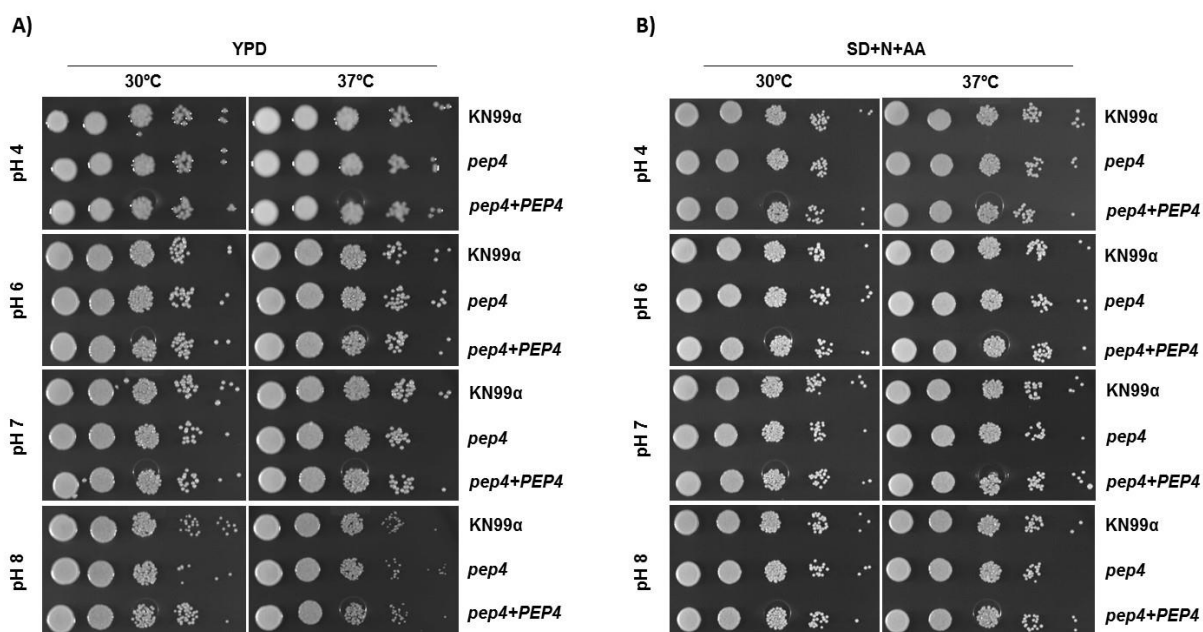
A) O ensaio foi conduzido por 72 horas a 30°C e 37°C em *Sabouraud* diluído (1/10) em tampão MOPS 50 mM (pH 7,3). Análise estatística realizada usando o teste de comparações múltiplas de Tukey: ** $p < 0,0090$, **** $p < 0,0001$. **B)** A barra no primeiro painel representa 10 μm e se aplica também aos outros painéis.

Durante o processo de infecção, *C. neoformans* encontra uma série de estresses derivados do hospedeiro (ESHER et al., 2018). Resistir e adaptar-se a condições de estresse é necessária para que haja uma colonização bem-sucedida no hospedeiro mamífero e é de extrema importância para a sobrevivência (BROWN; CAMPBELL; LODGE, 2007). Avaliamos o crescimento do mutante *pep4* sob

diferentes condições de estresse, tais como, alcalino, osmótico, oxidativo, nitrosativo e avaliamos também a integridade de parede celular e membrana plasmática.

A habilidade de crescer em pH ácido propicia a sobrevivência de *C. neoformans* nos fagossomos (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014) e sabe-se que em *Pep4* de *S. cerevisiae* o pH ácido torna a sua atividade proteolítica mais eficaz (SORENSEN et al., 1994). A partir dessas informações, nós analisamos o crescimento do mutante *pep4* em diferentes pHs (4, 6, 7 e 8) nos meios YPD (Figura 16A) e SD suplementado com sulfato de amônia e aminoácidos (Figura 16B) nas temperaturas de 30°C e 37°C. Não foram observadas diferenças fenotípicas no crescimento do mutante *pep4* nas diferentes concentrações de pH, condições nutricionais e temperaturas em comparação a linhagem selvagem.

Figura 16. Análise do crescimento em diferentes pHs (4, 6, 7 e 8) para o mutante *pep4*.

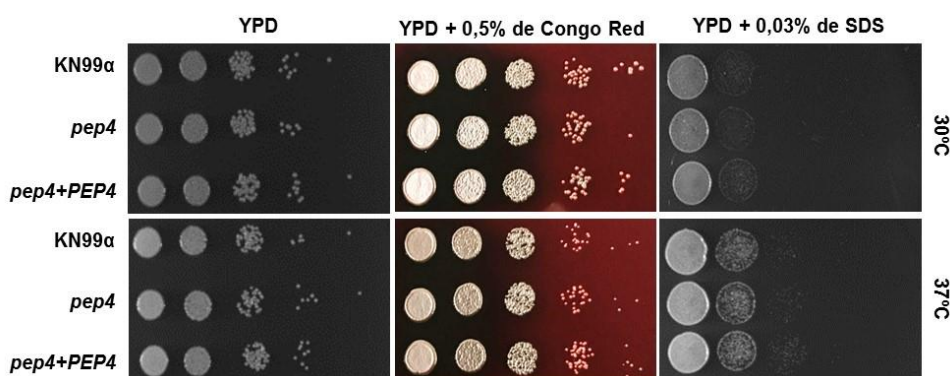


As linhagens foram inoculadas por diluição seriada nos meios YPD (A) ou SD+N+AA (B) ajustados com os pHs 4, 6, 7 e 8. Incubação por 48 horas a 30°C e 37°C.

A parede celular e membrana plasmática de *C. neoformans* desempenham um papel importante para a viabilidade celular, proteção a estresses osmóticos e na interação patógeno-hospedeiro (ALSPAUGH, 2015; BAKER et al., 2007). Para verificar se os agentes estressores vermelho congo e SDS comprometem as

estruturas da parede celular e da membrana plasmática, respectivamente do mutante *pep4*, adicionou-se 0,5% de vermelho congo ou 0,03% de SDS ao meio YPD. Os resultados mostram que estes agentes estressores não interferiram no desenvolvimento do mutante *pep4* (Figura 17).

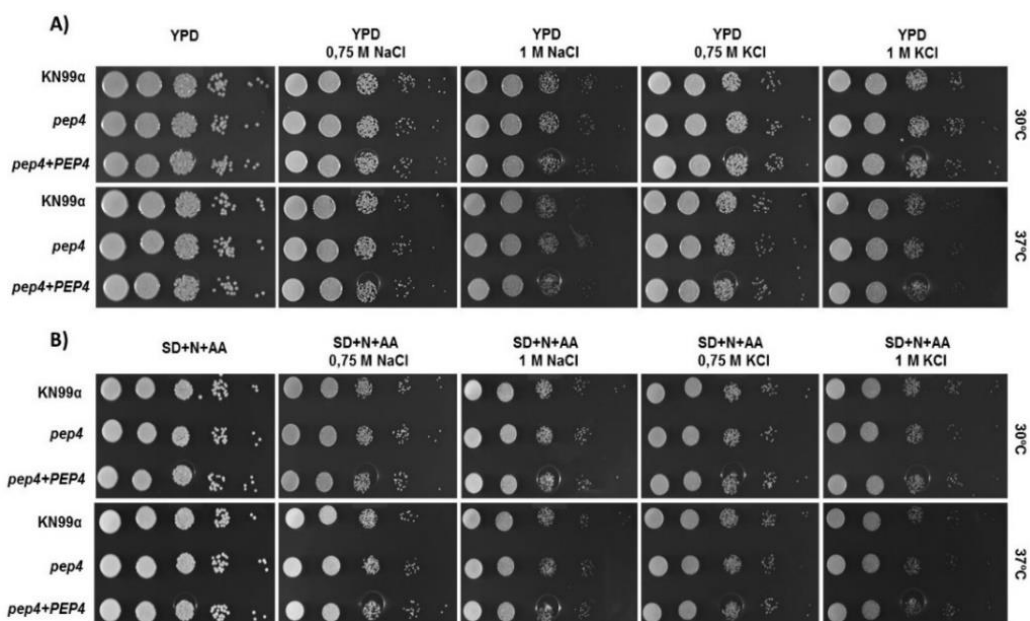
Figura 17. Avaliação da integridade da parede celular e membrana plasmática para o mutante *pep4*.



As linhagens foram inoculadas por diluição seriada no meio YPD com a adição de 0,5% de vermelho congo para avaliação da parede celular e YPD acrescido de 0,03% de SDS para avaliação da viabilidade da membrana plasmática. Incubação a 30°C e 37°C por 48 horas.

Foi avaliado também o efeito do estresse osmótico no mutante *pep4*, mas como observado nos ensaios de integridade de parede celular e de membrana plasmática, não houve também alteração no crescimento do mutante nas concentrações de 0,75 M ou 1 M de NaCl ou KCl, em ambas temperaturas e condições nutricionais testadas (Figuras 18A e 18B, respectivamente).

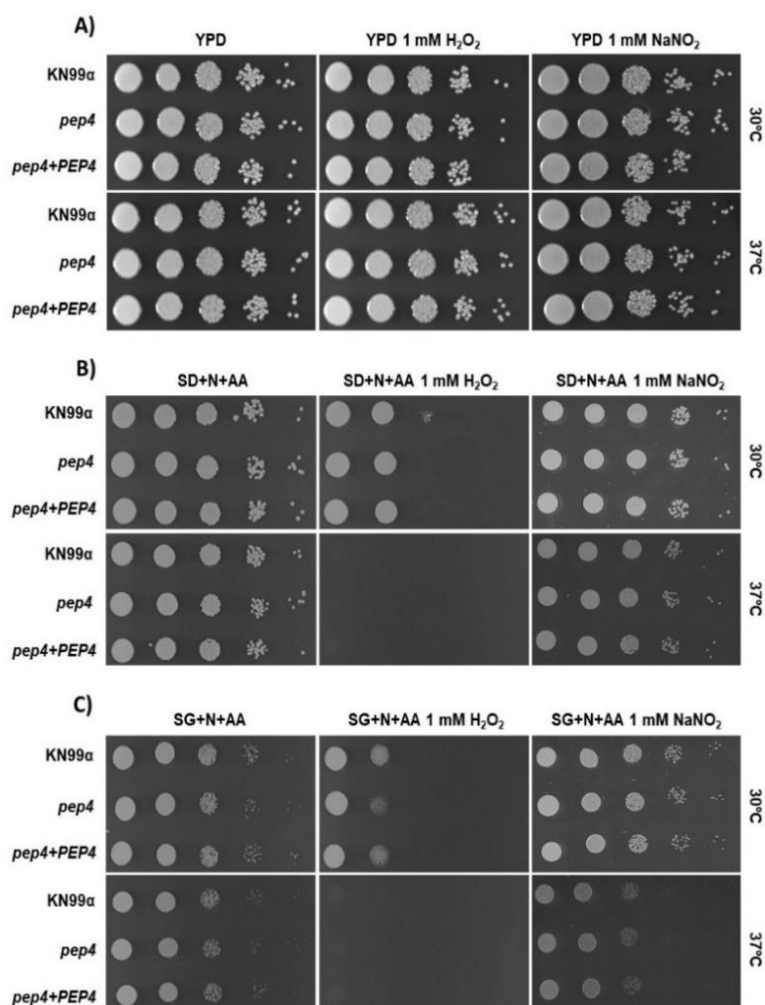
Figura 18. Análise do crescimento do mutante *pep4* na condição de estresse osmótico.



A) YPD com as concentrações de 0,75 M ou 1 M de NaCl ou KCl. **B)** SD com as concentrações de 0,75 M ou 1 M de NaCl ou KCl. Os inóculos foram feitos por diluição seriada. Incubação a 30°C e 37°C por 48 horas.

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas pelas células do sistema imune do hospedeiro contribuem para a morte de patógenos fúngicos como, *A. fumigatus*, *C. albicans* e *C. neoformans* (MISSALL; LODGE; MCEWEN, 2004; BROWN; HAYNES; QUINN, 2009). Verificamos se a deleção do gene influenciaria na resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo. Foram realizados ensaios por diluição seriada em meio YPD (Figura 19A), meio sintético (SD) suplementado com sulfato de amônia e aminoácidos (SD+N+AA) (Figura 19B) e meio definido substituindo a fonte preferencial glicose pela não preferencial galactose (SG+N+AA) (Figura 19C). Este ensaio foi realizado nas concentrações de 1 mM de H₂O₂ ou NaNO₂. Observamos que a deleção do gene não prejudicou o desenvolvimento do mutante frente a estes agentes estressores.

Figura 19. Avaliação para o efeito do estresse oxidativo e nitrosativo no desenvolvimento do mutante *pep4*.



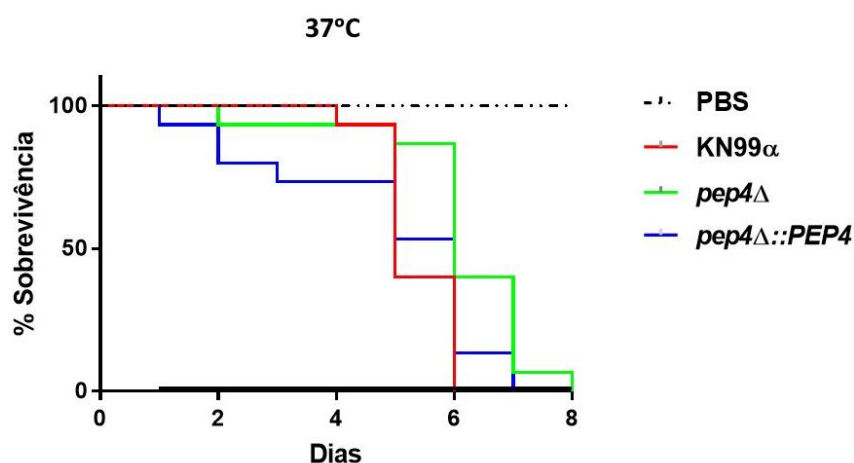
A) YPD, YPD acrescido de 1 mM de H₂O₂ ou NaNO₂. **B)** SD+N+AA, SD+N+AA acrescido de 1 mM de H₂O₂ ou NaNO₂. **C)** SG+N+AA, SG+N+AA acrescido de 1 mM de H₂O₂ ou NaNO₂. Os inóculos foram feitos por diluição seriada. Incubação por 48 horas a 30°C e 37 °C.

Nos ensaios para caracterização fenotípica da deleção do gene *PEP4* frente aos fatores de virulência, exceto no ensaio de produção de cápsula polissacarídica, os resultados não mostraram diferenças na expressão dos fatores de virulência do mutante *pep4* em comparação à linhagem selvagem KN99 α . Na análise do crescimento do mutante *pep4* à múltiplas condições de estresse, também não vimos diferenças em relação a linhagem selvagem. Dessa forma, concluímos que *Pep4* não é requerida para a levedura nestas condições avaliadas.

5.6 Sobrevivência *in vivo*

Investigamos a sobrevivência do mutante *pep4* no modelo animal invertebrado *Galleria mellonella*, que devido às semelhanças da resposta imune inata em relação aos mamíferos, este modelo nos últimos anos tornou-se uma excelente alternativa para avaliação da patogenicidade (TREVIANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2019). As larvas foram infectadas com as linhagens selvagem, mutante e reconstituída e utilizamos o PBS como controle negativo. O ensaio foi conduzido por 8 dias a 37°C com monitoramento diário. A Figura 20 mostra que as larvas inoculadas com as linhagens selvagem KN99 α e mutante *pep4* começaram a morrer entre o quarto e quinto dia, e a última larva morreu entre o sexto e oitavo dia de experimento. Houve diferença estatística significativa entre as linhagens KN99 α e *pep4* (** $p < 0,0030$) e entre *pep4* e *pep4+PEP4* (* $p < 0,0279$), demonstrando que o mutante *pep4* apresenta uma atenuação na virulência.

Figura 20. Sobrevivência do mutante *pep4* *in vivo*.



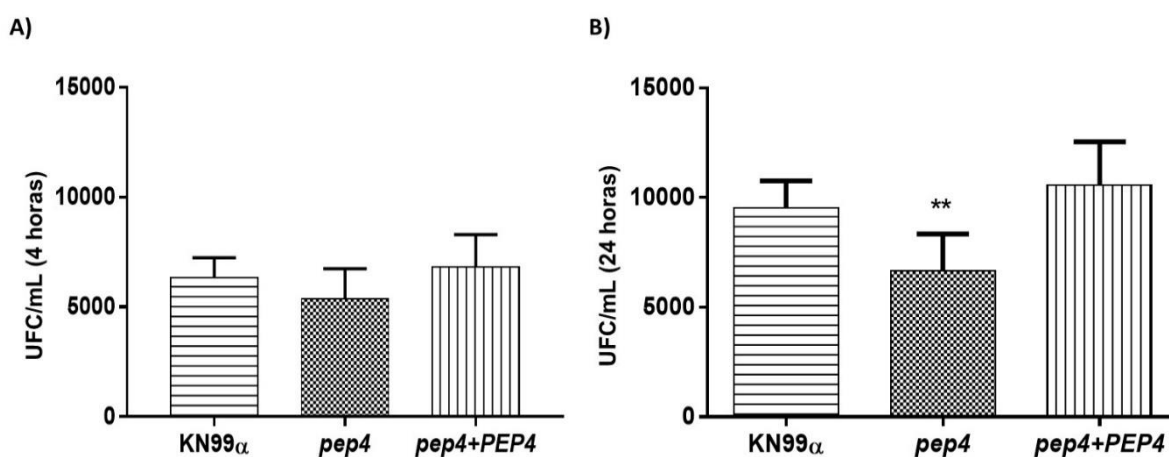
Grupos de 15 larvas foram infectadas com as linhagens selvagem (KN99 α), mutante (*pep4*) e reconstituída (*pep4+PEP4*). O PBS foi utilizado como controle negativo. O período de incubação foi de 8 dias a 37°C. As análises estatísticas foram realizadas através do software *Graphpad Prism 7.0* pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon, considerando o valor de $p < 0,05$ como significativo.

5.7 Interação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com *C. neoformans*

Os macrófagos desempenham um papel importante no sistema imunológico do hospedeiro contra diversos patógenos microbianos, portanto, a interação dos macrófagos alveolares com *Cryptococcus neoformans* é essencial para conter a infecção (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; NICOLA; CASADEVALL, 2012). Durante essa interação, os macrófagos alveolares expõem as células da levedura às tensões oxidativas e nitrosativas, sabendo dessas informações decidimos avaliar a interação do mutante *pep4* com os macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c, visto que no modelo animal *G. mellonella* o mutante *pep4* é requerido para a sobrevivência.

Interagimos os macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c com as linhagens de *C. neoformans* pelos períodos de 4 e 24 horas. Analisamos a sobrevivência das células de levedura através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após lise dos macrófagos. Como mostrado na Figura 21, no período de 4 horas os macrófagos tiveram uma maior capacidade fungicida. O mutante *pep4* neste período apresenta uma menor carga fúngica em relação a linhagem selvagem, mas não há diferenças estatísticas. Entretanto, após 24 horas de interação, observamos uma diferença estatística significativa quando comparado o mutante *pep4* com a linhagem selvagem KN99 α .

Figura 21. Sobrevivência do mutante *pep4* após interação com macrófagos derivados de medula óssea.

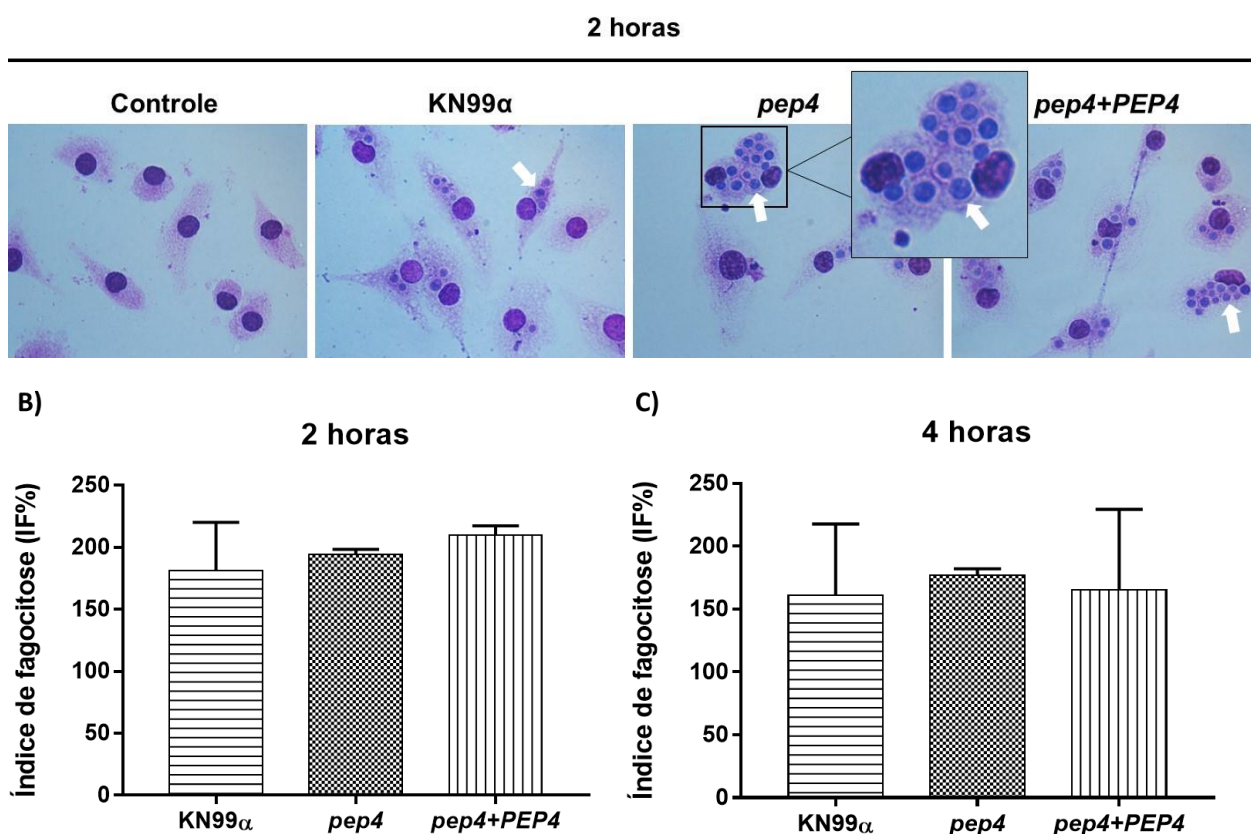


Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram incubados com as linhagens (KN99 α), mutante (*pep4*) e reconstituída (*pep4+PEP4*) previamente opsonizadas com o anticorpo anti-GXM em uma proporção de 1:1 por 4 (A) e 24 horas (B) em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após a lise dos macrófagos, as células de levedura foram semeadas em meio YPD e incubadas a 30°C por 48

horas. As análises estatísticas foram realizadas através do software *Graphpad Prism 7.0* pelo teste de comparações múltiplas de Tukey: ** $p < 0,0084$ e *** $p < 0,0005$.

Ampliando as nossas análises, realizamos a interação dos macrófagos derivados da medula óssea com as leveduras de *C. neoformans* pelos períodos de 2 e 4 horas para determinar o índice de fagocitose. Nossos resultados não mostram diferença significativa no índice de fagocitose entre as linhagens selvagem e mutante (Figura 22A-C). Embora o mutante *pep4* tenha se mostrado mais suscetível à morte mediada por macrófagos no ensaio de UFC em comparação às outras linhagens, não observamos diferenças entre elas no ensaio de fagocitose.

Figura 22. Avaliação do índice de fagocitose do mutante *pep4*.

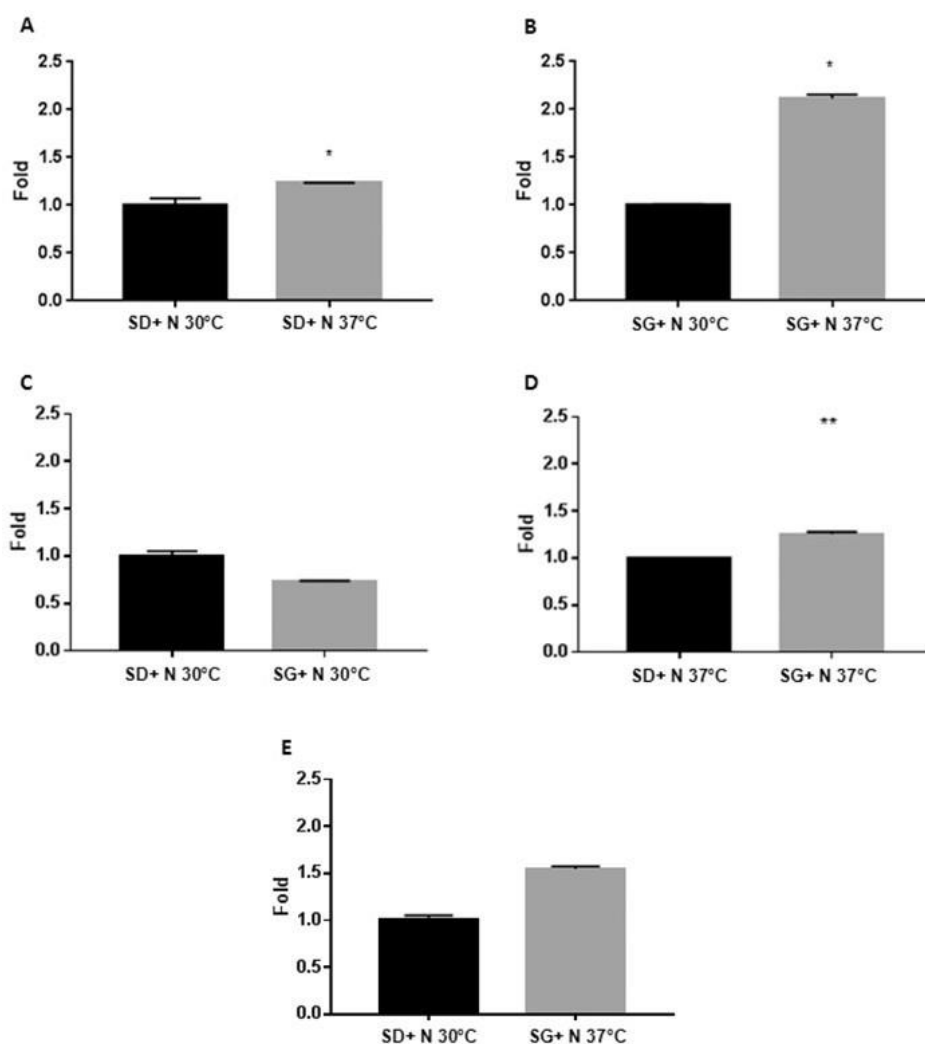


Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram incubados com as linhagens KN99 α , *pep4* e *pep4+PEP4* previamente opsonizadas com o anticorpo anti-GXM na proporção de 1:1 em lamínulas de vidro em placas de 24 poços por 2 horas (A e B) e 4 horas (C) em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as lamínulas de vidro foram coradas com coloração Giemsa, fixadas com Entellan (Merck) e analisadas em microscópio óptico. As imagens foram capturadas com lentes objetivas de 100 x. As setas brancas indicam as células de *C. neoformans* fagocitadas pelos macrófagos. A análise estatística foi realizada usando o teste de Kruskal-Wallis através do software *Graphpad Prism 7.0*.

5.8 Padrão de expressão do gene *PEP4*

Em um trabalho anteriormente publicado pelo grupo do nosso laboratório, foi relatado que o padrão de expressão do gene *PEP4* é regulado pela temperatura e pela privação de nitrogênio (GONTIJO et al., 2017). No presente estudo, decidimos explorar o padrão de expressão de *PEP4* em diferentes condições nutricionais, combinadas com tensões nitrosativas (NaNO_2) e alta temperatura. Primeiro, analisamos como a temperatura influenciaria a expressão de *PEP4* quando *C. neoformans* foi crescido em meio sintético (*Synthetic Dextrose*) suplementado apenas com sulfato de amônia e descobrimos que a expressão do gene aumenta aproximadamente 1,2 vezes a 37°C (Figura 23A). Sabe-se que em resposta a diferentes tipos de estresse, como privação nutricional ou mudança na fonte de carbono, a autofagia é regulada positivamente (JIN; KLIONSKY, 2014). A partir desta premissa, investigamos se a mudança na fonte de carbono preferencial por uma não preferencial (glicose e galactose, respectivamente) influenciaria na expressão de *PEP4*. Na Figura 23B, observamos um aumento de 2 vezes na expressão de *PEP4* a 37°C, sugerindo que a proteína Pep4 é necessária quando as células de levedura estão crescendo quando há uma mudança na fonte de carbono em associação com alta temperatura. Nas Figuras 23C-E também observamos que a mudança nas condições nutricionais associadas à alta temperatura modula o padrão de expressão do gene *PEP4*.

Figura 23. Avaliação do padrão de expressão do gene *PEP4* em alta temperatura e diferentes fontes de carbono.

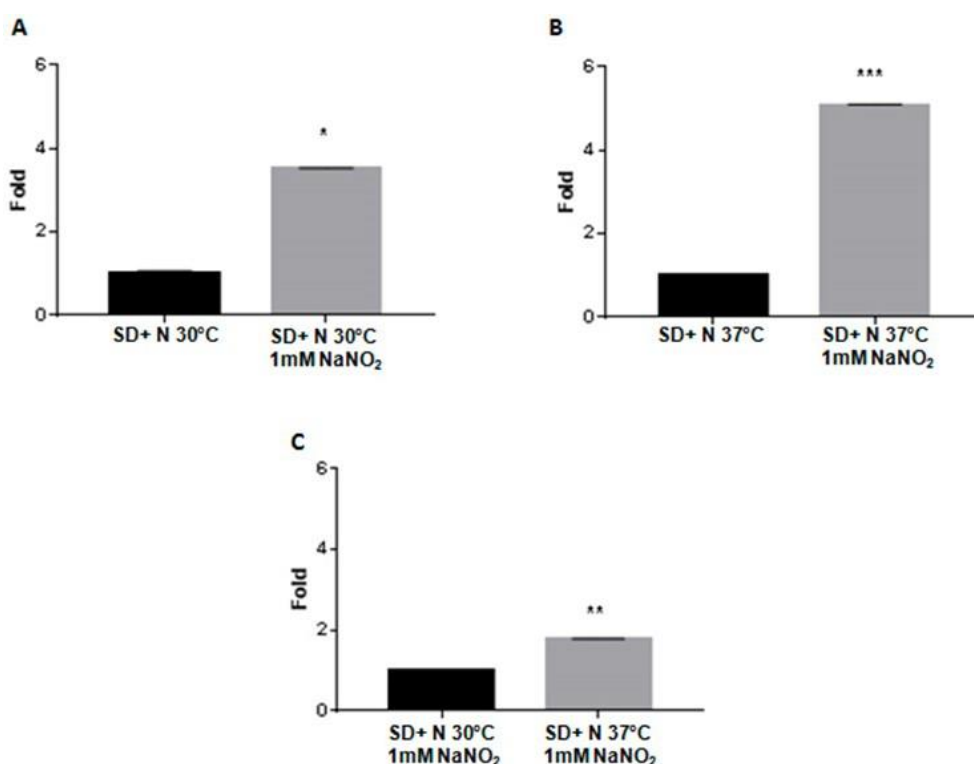


A expressão do gene *PEP4* em alta temperatura e diferentes fontes de carbono foi avaliada em meio sintético dextrose (SD) suplementado com sulfato de amônia (N) a 30°C e 37°C (**A**); meio sintético com galactose (SG) suplementado com sulfato de amônia (N) a 30°C e 37°C (**B**); SD+N a 30°C versus SG+N a 30°C (**C**); SD+N a 37°C e SG+N a 37°C (**D**); SD+N a 30°C e SG+N a 37°C (**E**). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey: (A) * $p < 0,0241$; (B) * $p < 0,0116$ e (D) ** $p < 0,0072$.

Para complementação dos dados anteriores, resolvemos explorar como o estresse nitrosativo afetaria o padrão de expressão do gene *PEP4*. O óxido nítrico (NO) é gerado quimicamente pela adição de nitrito de sódio a soluções aquosas ácidas e, dependendo de sua concentração, o NO é fungistático ou fungicida para *C. neoformans in vitro*, desempenhando um importante papel na defesa do hospedeiro (ALSPAUGH; GRANGER, 1991; MISSALL et al., 2006). Iniciamos nossa investigação acessando como a expressão do gene seria influenciada pela exposição da célula de levedura a 1 mM de NaNO_2 por 2 horas na presença de glicose e sulfato de amônia

nas temperaturas de 30°C e 37°C. A Figura 24A mostra que a expressão de *PEP4* é aumentada em 3 vezes a 30°C, enquanto que a 37°C vemos um aumento de 5 vezes (Figura 24B). Quando comparamos a expressão de *PEP4* em meio definido (SD) com glicose e sulfato de amônia suplementado com 1 mM de NaNO₂ na temperatura de 30°C versus 37°C, observamos um leve aumento no padrão de expressão em aproximadamente 1,6 vezes nesta última temperatura (Figura 24C). Este resultado indica que a presença de estresse nitrosativo, por si só, provoca a elevação da expressão de *PEP4*, sugerindo que a proteína Pep4 pode desempenhar um papel importante na adaptação celular a essa condição estressante, embora não tenhamos observado uma diferença no padrão de crescimento entre o mutante *pep4* e a linhagem selvagem na presença de NaNO₂ nos ensaios fenotípicos. Sabe-se que a habilidade de *C. neoformans* para evadir a defesa do sistema imune inato do hospedeiro e causar a doença é devido à sua capacidade de responder e sobreviver ao estresse nitrosativo (MISSALL et al., 2006).

Figura 24. O padrão de expressão do gene *PEP4* é aumentado na presença de estresse nitrosativo.

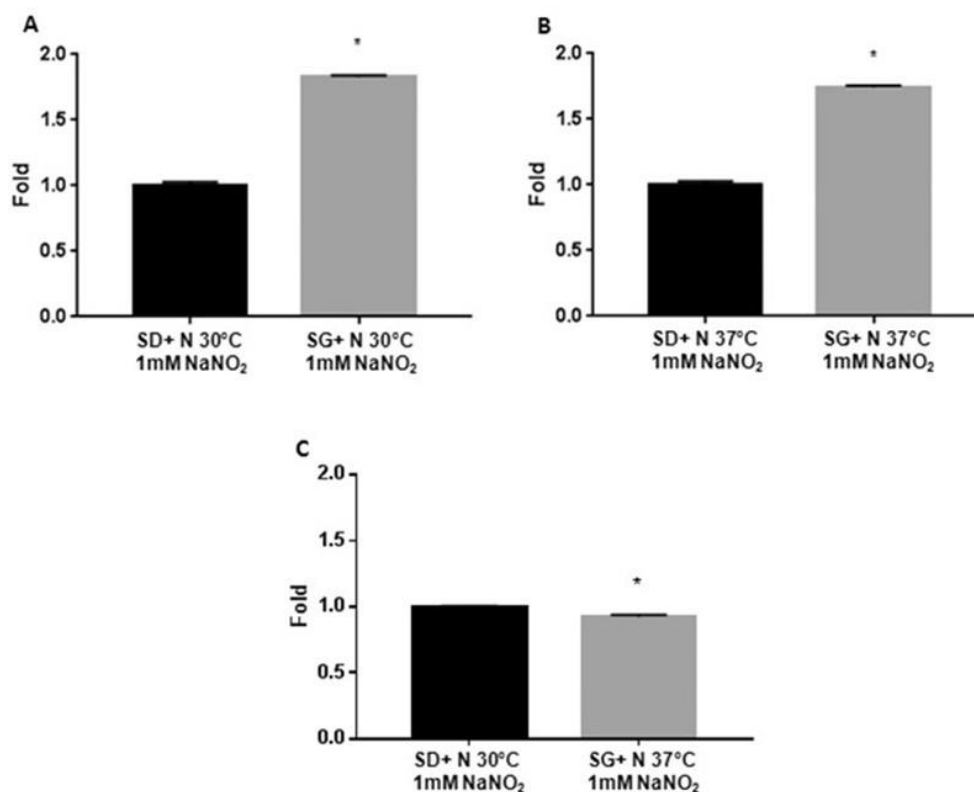


O efeito do estresse nitrosativo foi avaliado em meio sintético dextrose (SD) com sulfato de amônia (N) a 30°C e meio sintético dextrose (SD) com sulfato de amônia (N) suplementado com 1 mM de nitrito de

sódio (NaNO_2) a 30°C (**A**); SD+N a 37°C e SD+N suplementado com 1 mM de NaNO_2 a 37°C (**B**); SD+N suplementado com 1 mM de NaNO_2 a 30°C e SD+N suplementado com 1 mM de NaNO_2 a 37°C (**C**). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey: (A) * $p < 0,0229$; (B) *** $p < 0,0004$ e (C) ** $p < 0,0051$.

Em seguida, nos perguntamos como a alteração da fonte de carbono de glicose para galactose na presença de 1 mM de NaNO_2 influenciaria a resposta da expressão de *PEP4* a 30°C e 37°C. Como podemos ver nas Figuras 25A e 25B em ambas as temperaturas (30°C ou 37°C), a falta da fonte preferencial de carbono na presença do estressor nitrosativo eleva a expressão de *PEP4* em aproximadamente 1,7 vezes. A Figura 26C mostra que o padrão de expressão quando as células estão sujeitas a uma combinação de três condições de estresse (presença de 1 mM de NaNO_2 , ausência da fonte de carbono preferencial e alta temperatura) é semelhante que em SD+N 30°C acrescido de 1 mM de NaNO_2 .

Figura 25. Influência da fonte de carbono e do estresse nitrosativo no padrão de expressão do gene *PEP4*.

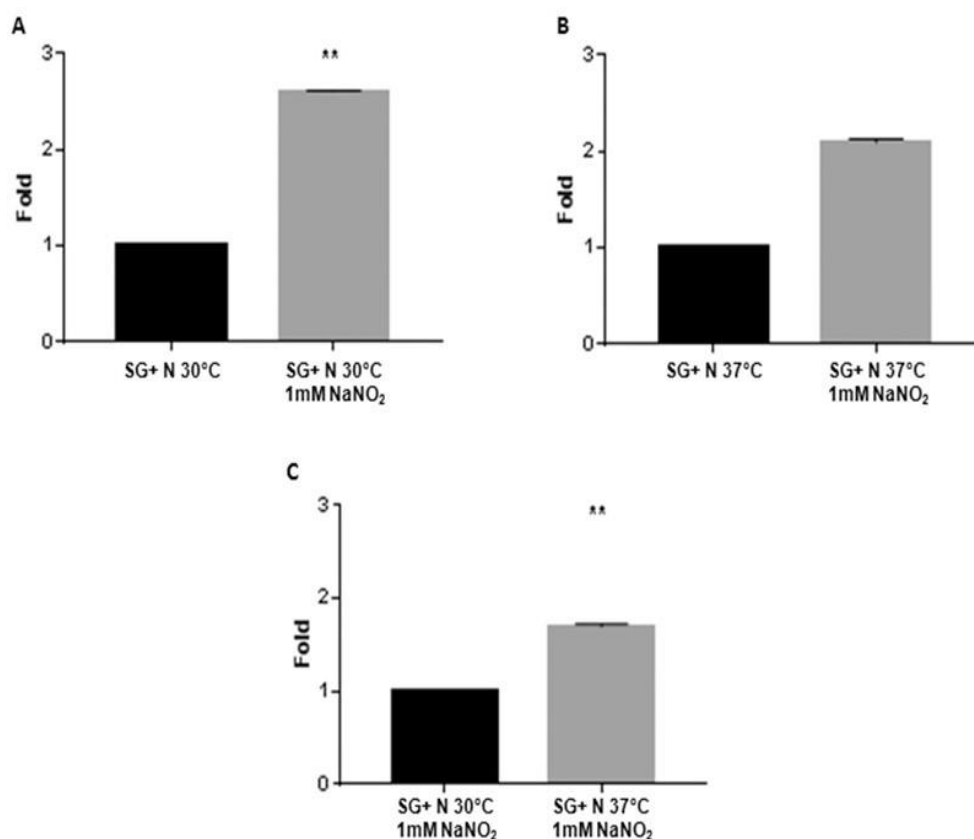


A influência da fonte de carbono e do estresse nitrosativo no padrão de expressão do gene foi avaliada em meio sintético dextrose (SD) com sulfato de amônia (N) suplementado com 1 mM de nitrito de sódio (NaNO_2) a 30°C e meio sintético galactose (SG) com sulfato de amônia (N) suplementado com 1 mM de nitrito de sódio (NaNO_2) a 30°C (**A**); SD+N suplementado com 1 mM de NaNO_2 a 37°C e SG+N suplementado com 1 mM de NaNO_2 a 37°C (**B**); SD+N suplementado com 1 mM de NaNO_2 a 30°C e

SG+N suplementado com 1 mM de NaNO_2 a 37°C (C). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey: (A) * $p < 0,0382$; (B) * $p < 0,0445$ e (C) * $p < 0,0425$.

Repetimos o mesmo experimento, mas desta vez o meio de incubação dispunha apenas de galactose como fonte de carbono, suplementada ou não com 1 mM de NaNO_2 . A incubação foi por 2 horas a 30°C ou 37°C. A Figura 26A mostra que a 30°C quando as células estão sujeitas a 1 mM de NaNO_2 , o padrão de expressão de *PEP4* é aumentado em 2,5 vezes enquanto que na mesma condição de indução, mas a 37°C a expressão é de 2 vezes (Figura 26B). Quando comparamos o padrão de expressão ao cultivar a levedura sem a fonte de carbono preferencial na presença de 1 mM de NaNO_2 a 30°C versus 37°C, observamos um aumento de aproximadamente 1,5 vezes (Figura 26C). Isso sugere que a combinação da ausência da glicose, presença de NaNO_2 e a temperatura, modula a expressão de *PEP4*, o que pode ajudar as células da levedura a responder à estas condições estressantes.

Figura 26. Efeito da fonte de carbono não preferencial e estresse nitrosativo no padrão de expressão do gene *PEP4*.



O efeito da fonte de carbono não preferencial e estresse nitrosativo no padrão de expressão do gene foi avaliada em meio sintético galactose (SG) com sulfato de amônia (N) a 30°C versus SG+N

suplementado com 1 mM de nitrito de sódio (NaNO₂) a 30°C **(A)**; SG+N a 37°C e SG+N suplementado com 1 mM de NaNO₂ a 37°C **(B)**; SG+N suplementado com 1 mM de NaNO₂ a 30°C e SG+N suplementado com 1 mM de NaNO₂ a 37°C **(C)**. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey: (A) ** p < 0,0078 e (C) ** p < 0,0041.

5.9 Análise da sensibilidade aos antifúngicos

O desenvolvimento de resistência aos antifúngicos usuais contra as micoses invasivas causadas por diversas espécies fúngicas tem sido cada vez mais relatado, e está se tornando uma crise de saúde pública. As opções terapêuticas se limitam a apenas três classes de antifúngicos, sendo eles os polienos, azóis e análogos de pirimidina (REVIE et al., 2018). Nós efetuamos os ensaios de sensibilidade aos antifúngicos para os seguintes fármacos: anfotericina-B; fluconazol; voriconazol; posaconazol e ravuconazol. Os ensaios foram realizados por diluição em caldo, seguindo a metodologia EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Conforme os valores de concentração inibitória mínima (CIM) apresentados na Tabela 3, observa-se que a deleção não resultou em sensibilidade ou resistência aos antifúngicos testados.

Tabela 3. Teste de sensibilidade aos antifúngicos. Concentração inibitória mínima (CIM) para as linhagens selvagem (KN99α) e mutante (*pep4*) e reconstituída (*pep4+PEP4*). Leitura dos valores inibitórios após incubação das microplacas por 72 horas a 35°C, seguindo a metodologia EUCAST.

LINHAGEM	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM (mg/L)				
	ANFOTERICINA-B	FLUCONAZOL	VORICONAZOL	POSACONAZOL	RAVUCONAZOL
KN99α	1	0,25	0,015	0,06	0,015
<i>pep4</i>	1	0,25	0,03	0,06	0,03
<i>pep4+PEP4</i>	1	0,25	0,015	0,06	0,015
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC)	1	0,5	0,015	0,03	0,015
<i>C. krusei</i> (ATCC)	2	16	0,06	0,06	0,06

6 DISCUSSÃO

A criptococose é uma infecção fúngica invasiva que afeta indivíduos imunodeficientes, causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans* (ZARAGOZA, 2019). Esta espécie tem distribuição global e é responsável por causar um alto número de mortes principalmente no grupo de pacientes com HIV/AIDS (FAVALESSA et al., 2014). O tratamento da criptococose é limitado a três antifúngicos usados isoladamente ou em combinação: anfotericina B, fluocitosina (5-FC) e fluconazol (WHO, 2018). Além da alta toxicidade, resistência aos antifúngicos já foram reportadas (MOURAD; PERFECT, 2018; BONGOMIN et al., 2018). Novas abordagens terapêuticas precisam ser empregadas como alternativas para o tratamento da criptococose. Para solucionar esse problema, estudos têm sido direcionados à inibição de fatores de virulência que garantem o sucesso do fungo na colonização e causar a doença (COELHO; CASADEVALL, 2016). Ampliar o conhecimento da biologia de *C. neoformans* pode trazer a luz novas informações que podem, eventualmente, serem utilizadas no desenho ou busca de terapias antifúngicas.

Recentemente, o sistema de autofagia foi estudado em algumas espécies de fungos, no entanto, os mecanismos envolvidos nas etapas de autofagia em *Cryptococcus* spp. foram pouco explorados. Estudos são importantes para a compreensão desse processo e sua relação com a virulência, a patogênese e a biologia do fungo. Diversos estudos indicam que a autofagia é uma das ferramentas que *C. neoformans* utiliza para resistir a condições adversas e estresses ambientais, tornando sua colonização no hospedeiro bem-sucedida (PALMER; ASKEW; WILLIAMSON, 2008, HU et al., 2008). Por meio de uma análise de bioinformática realizada por Gontijo et al. (2017) foi constatado que dos 34 genes relacionados à autofagia descritos em *S. cerevisiae* (YUGA et al., 2011), 21 foram encontrados em *C. neoformans*, incluindo o gene *PEP4*.

O gene *PEP4* de *S. cerevisiae* codifica uma aspartil protease vacuolar que é membro da superfamília das proteinases aspárticas e compartilha 46% de homologia com a catepsina D humana. Pep4 que também é conhecida como proteinase A, contribui para o processo de autofagia atuando na maturação e ativação de hidrolases vacuolares, incluindo a proteinase B e carboxipeptidase Y (AMMERER et al., 1986;

WOOLFORD et al., 1986; PARR et al., 2007). Estudos têm demonstrado a importância da proteína Pep4 na sobrevivência de células de *S. cerevisiae* em condições de estresse como nutricional, oxidativo e sob tratamento com ácido acético (TEICHERT et al., 1989; MARQUES et al., 2006; PEREIRA et al., 2010; 2013). Além disso, segundo Carmona-Gutiérrez et al. (2011), Pep4 possui funções antiapoptóticas e antinecróticas durante o envelhecimento cronológico. Portanto, nosso objetivo foi avaliar o papel da proteína Pep4 em *C. neoformans* na via de autofagia, na expressão dos fatores de virulência e na sobrevivência da levedura frente a diferentes condições de estresse.

Neste estudo, a análise *in silico* revelou que o gene *PEP4* de *C. neoformans* codifica uma sequência de 438 aminoácidos com 65% de identidade com a de *S. cerevisiae*. A plataforma CDD (*Conserved Domain Database*) do NCBI mostrou que, conforme observado em *S. cerevisiae*, Pep4 de *C. neoformans* tem o domínio conservado da superfamília das proteinases aspárticas. Esta família é classificada pelo MEROPS (RAWLINGS et al., 2014) como família peptidase A1 (pepsina A, clã AA). No alinhamento de sequências de aminoácidos homólogas à proteína Pep4, observamos a presença de dois resíduos de ácido aspártico no sítio ativo que desempenham importantes papéis catalíticos e são conservados em todas as espécies de fungos avaliados. Além disso, filogeneticamente a proteína Pep4 de *C. neoformans* está mais próxima de outras espécies de *Cryptococcus* do que de *S. cerevisiae*.

A combinação dos fatores de virulência de *C. neoformans* contribui para a sobrevivência da levedura no hospedeiro e no meio ambiente (ALSPAUGH, 2015). Na avaliação do impacto da deleção do gene *PEP4* na expressão dos fatores de virulência, não observamos alterações fenotípicas em relação à termotolerância, produção de melanina, fosfolipase e urease. No entanto, o mutante *pep4* nas primeiras 48 horas a 37°C produziu mais cápsula do que a linhagem selvagem. Outro ponto muito importante sobre *C. neoformans* é a habilidade de resistir e se adaptar à diferentes condições de estresse, o que é extremamente importante para o sucesso da colonização no hospedeiro mamífero e para a sobrevivência da levedura (BROWN et al., 2007). Avaliamos o comportamento do mutante *pep4* frente diferentes condições de estresse, como térmico, osmótico, oxidativo, nitrosativo, alcalino, incluindo a integridade da parede celular e da membrana plasmática, mas nenhum

comprometimento no crescimento das células de levedura de *C. neoformans* foi observado. Esses resultados sugerem que a proteína Pep4 não está envolvida na expressão dos fatores de virulência (exceto cápsula polissacarídica) e com o desenvolvimento das células de levedura sob diferentes estressores. No entanto, observamos que a deleção de *PEP4* impacta a sobrevivência de *C. neoformans* em modelo animal, bem como em macrófagos.

A deficiência de Pep4 em células de *S. cerevisiae* causa a perda na viabilidade celular quando a levedura é exposta à privação de nitrogênio, sugerindo que esta protease é essencial para a sobrevivência celular em condições de estresse nutricional (TEICHERT et al., 1989). Além disso, Pep4 demonstrou ser responsável pelo processamento de Ams1 sob privação de nitrogênio, associando-se ao aumento da atividade desta α -manosidase (UMEKAWA et al., 2016). Obtivemos a linhagem GFP-Ams1 e avaliamos se esse processamento ocorre em *C. neoformans* em diferentes condições nutricionais. Não observamos em nossa análise de *Western blot* o processamento de Ams1 por Pep4. Roberto et al. (2020) reportaram que as células dos mutantes *atg4* e *atg8* de *C. neoformans* após 20 dias expostas à privação nutricional apresentam perda da viabilidade celular, destacando a importância destas proteínas no desenvolvimento celular frente à privação de nitrogênio. Também expusemos as células do mutante *pep4* de *C. neoformans* à privação de nitrogênio por 20 dias, pois sabemos que em *S. cerevisiae*, o mutante *pep4* tem tendência a perder rapidamente a viabilidade celular nesta condição nutricional (TATEHASHI et al., 2016). Descobrimos que não houve perda na viabilidade celular na linhagem selvagem, bem como na linhagem mutante. Sugerindo que, provavelmente há outros mecanismos envolvidos na reciclagem de aminoácidos durante a privação de nitrogênio, que é diferente de *S. cerevisiae* e que em *C. neoformans*, Pep4, provavelmente desempenhe um papel diferente no processo de autofagia e outros mecanismos podem fornecer a reciclagem de nitrogênio suficiente para sustentar o crescimento. Conforme já relatado por Gontijo et al. (2017), o padrão de expressão do gene *PEP4* é regulado pela temperatura e também pela privação de nitrogênio. Neste estudo, mostramos que o padrão de expressão do gene *PEP4* é aumentado na presença de nitrito de sódio em diferentes condições nutricionais, incluindo mudanças na fonte de carbono e alta temperatura. Isso sugere que Pep4 desempenhe alguma função relacionada a adaptação celular a esse agente estressor.

O modelo animal invertebrado *Galleria mellonella* tem sido constantemente utilizado para investigar a patogenicidade de *C. neoformans* (TREVIANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2019). Após verificar que o mutante *pep4* produz mais cápsula do que a linhagem selvagem a 37°C, avaliamos a sobrevivência da levedura em *G. mellonella*, sabendo que durante a infecção a cápsula polissacarídica de *C. neoformans* contribui para a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (ZARAGOZA, 2019), ainda, O'Meara et al. (2013) mostraram que a superprodução de cápsula por *C. neoformans* leva à uma hipervirulência em modelo murino. Entretanto, observamos que a última larva infectada com o mutante *pep4* morreu no oitavo dia do experimento, enquanto todas as larvas infectadas com a linhagem selvagem morreram até o sexto dia, sugerindo que o mutante *pep4* apresentou uma atenuação na virulência. Portanto, isso pode sugerir que a proteína Pep4 está, de alguma forma, envolvida na adaptação das células às novas condições ambientais durante o processo de infecção, onde a tolerância ao estresse nitrosativo pode desempenhar um papel importante no estágio inicial da infecção e isso reflete na atenuação da virulência. Investigamos também a sobrevivência do mutante *pep4* em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c. Na interação de *C. neoformans* com os macrófagos derivados de medula óssea, observamos que o mutante *pep4* apresentou uma diminuição significativa na carga fúngica quando comparado à linhagem selvagem após 24 horas de interação com os macrófagos, demonstrando que o mutante *pep4* é mais suscetível à morte mediada por macrófagos, o que pode explicar a sua atenuação na virulência em *G. mellonella*.

A importância da protease vacuolar Pep4 na via da autofagia e sobrevivência celular em condições de privação nutricional e estresse está bem estabelecida em *S. cerevisiae*. Nossas análises do padrão de expressão do gene *PEP4* indicam que a proteína Pep4 pode desempenhar algum papel em relação à sobrevivência da levedura sob combinação de condições estressantes como alta temperatura, mudança da fonte de carbono e exposição ao estresse nitrosativo, que são condições que mimetizam o ambiente enfrentado por *C. neoformans* ao infectar o hospedeiro. Além disso, o mutante *pep4* mostrou uma atenuação na virulência no modelo *G. mellonella* e uma diminuição na carga fúngica ao interagir com macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c. Estudos demonstraram que Pep4 parece

realizar atividades fora do vacúolo sob indução de estresse que são independentes da autofagia em *S. cerevisiae* (para revisão, ver KERSTENS; VAN DIJCK, 2018).

Nosso trabalho mostrou que Pep4 desempenha um papel importante em diferentes processos biológicos no fungo patogênico *C. neoformans* que podem ir além da autofagia e devem ser mais explorados. Nosso estudo sugere que a proteína Pep4 de *C. neoformans* é importante para a adaptação e sobrevivência das células de levedura em condições estressantes, levando à atenuação da virulência *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho visou estudar o impacto da deleção do gene *PEP4* no genoma de *C. neoformans* associando ao processo de autofagia, aos efeitos causados na expressão dos fatores de virulência e sobrevivência da levedura a múltiplos estresses, com base nos resultados podemos concluir que:

- A deleção do gene *PEP4* não impactou na expressão dos fatores de virulência (exceto cápsula polissacarídica), no crescimento da levedura a múltiplos estresses, e na sensibilidade aos antifúngicos avaliados;
- O padrão de expressão do gene *PEP4* é aumentado na presença do nitrito de sódio (NaNO_2) em diversas condições, sugerindo que a proteína Pep4 é importante para as células de levedura se adaptarem a condições estressantes de sobrevivência;
- A ausência da proteína Pep4 atenua a virulência no modelo animal *G. mellonella* e ocasiona uma diminuição significativa na carga fúngica em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c.

8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-1185, 2015.
- ALSPAUGH, J. A.; GRANGER, D. L. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. **Infect Immun**, v. 59, n. 7, p. 2291-2296, 1991.
- ALSPAUGH, A.; CAVALLO, L. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Ras1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 36, n. 2, p. 352-65, 2000.
- ALSPAUGH, J. A. "Virulence Mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis". **Fungal Genet Biol**, v. 78, n. September, p. 55-58, 2015.
- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2161-5, 2006.
- AMMERER, G.; HUNTER, C. P.; ROTHMAN, J. H.; SAARI, G. C.; VALLS, L. A.; STEVENS, T. H. *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. **Mol Cell Biol**, v. 6, n. 7, p. 2490-2499, 1986.
- AN, Z.; TASSA, A.; THOMAS, C.; ZHONG, R.; XIAO, G.; FOTEDAR, R.; P TU, B.; KLIONSKY, D. J.; LEVINE, B. Autophagy is required for G₁/G₀ quiescence in response to nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Autophagy**, v. 10, n. 10, p. 1702-1711, 2014.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14:1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 875-904, 2010.
- BAKER, L. G.; SPECHT, C. A.; DONLIN, M. J.; LODGE, J. K. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 5, p. 855-856, 2007.
- BONGOMIN F, OLADELE RO, GAGO S, MOORE CB, RICHARDSON MD. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 61, n. 5, p. 290-297, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, S. M.; CAMPBELL, L. T.; LODGE, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 320-325, 2007.
- BROWN, A. J.; HAYNES, K.; QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 384-391, 2009.
- BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Medical Mycology**, v. 4, n. 165, pp. 165rv13, 2012.
- CARMONA-GUTIÉRREZ, D.; BAUER, M. A.; RING, J.; KNAUER, H.; EISENBERG, T.; BÜTTNER, S. RUCKENSTUHL, C.; REISENBICHLER, A.; MAGNES, C.; RECHBERGER, G. N.; BIRNERGRUENBERGER, R.; JUNGWIRTH, H.; FRÖHLICH, K-U.; SINNER, F.; Kroemer, G.; MADEO, F. The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis. **Cell Death Dis**, v. 2, n. 5, e161, 2011.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3703-3713, 1999.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 354-358, 2000.

- CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi — the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 332-337, 2003.
- CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 20, n. 3, p. 507-544, 2006.
- CHEN, S. C.; WRIGHT L. C.; GOLDING, J. C.; SORRELL, T. C. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochem J**, v. 347, n. Pt 2, p. 431-439, 2000.
- 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 Pathog**, v. 7, n. 5, e1002047, 2011.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p. 1-41, 2014.
- COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 6, p. 792-799, 2016.
- COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect. Immun**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.
- COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C. A.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; EIDICH, 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, 2001.
- DADACHOVA, E.; BRYAN, R. A.; HOWELL, R. C.; SCHWEITZER, A. D.; AISEN, P.; NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL A. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 2, p. 192-199, 2007.
- DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-1075, 2004.
- DIAZ, M. R.; BOEKHOUT, T.; KIESLING, T.; FELL, J. W. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 12, p. 1129-1140, 2005.
- DING, H.; CAZA, M.; DONG, Y.; ARIF, A. A.; HORIANOPOULOS, L. C.; HU, G.; JOHNSON, P.; KRONSTADA, J. W. ATG Genes Influence the Virulence of *Cryptococcus neoformans* through Contributions beyond Core Autophagy Functions. **Infect Immun**, v. 86, n. 9, e00069-18, 2018.
- DOERING, T. L.; NOSANCHUK, J. D.; ROBERTS, W. K.; CASADEVALL, A. Melanin as a potential cryptococcal defense against microbiocidal proteins. **Med Mycol**, v. 37, n. 3, p. 175-181, 1999.
- EMERY, H. S.; SHELBURNE, C. P.; BOWMAN, J. P.; FALLON, P. G.; SCHULZ, C. A.; JACOBSON, E. S. Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5694-5697, 1995.
- ENOCH, D. A.; YANG, H.; ALIYU, S. H.; MICALLEF, C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Methods Mol Biol**, v. 1508, p.17-65, 2017.
- ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 7, e180057, 2018.
- EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **Journal of immunology**, v. 64, n. 5, p. 423-430, 1950.

FARRÉ, J.-C.; SUBRAMANI, S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 537-552, 2016.

FAVALESSA, O. C.; DE PAULA, D. A.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; TADANO, T.; LAZERA, M. S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; WALDEREZ, S. M.; SILVA, D.; HAHN, R. C. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus spp* from patients in Midwest Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 8, p. 1037-1043, 2014.

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORRELL, T.; WIDMER, F.; WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes Infect**, v. 8, n. 4, p. 1006-1015, 2006.

GAZZONI, A. F.; PEGAS, K. L.; SEVERO, L. C. Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 1, p.76-78, 2008.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Micro Rev**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.

GONTIJO, F. A.; 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 autophagy. **PLoS One**, v. 12, n. 5, e0177461, 2017.

Guidelines on the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <<https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/cryptococcal-disease/en/>>. Acesso em 19 de maio de 2020.

HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B.; KOLECKA, A.; POLACHEK, I.; SIONOV, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; LUMBSCH, H. T.; BOEKHOUT, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet. Biol**, v. 78, p. 16-48, 2015.

HOFFMAN, C. S.; WINSTON F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 57, n. 2-3, p. 267-272, 1987.

HU, G.; HACHAM, M.; WATERMAN, S. R.; PANEPINTO, J.; SHIN, S.; LIU, X.; GIBBONS, J.; VALYI-NAGY, T.; OBARA, K.; JAFFE, H. A.; OHSUMI, Y.; WILLIAMSON, P. R. PI3K signaling of autophagy is required for starvation tolerance and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Invest**, v. 118, n. 3, p. 1186-1197, 2008.

HUANG, C.; NONG, S. H.; MANSOUR, M. K.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. **Infect Immun**, v. 70, n. 10, p. 5485-5493, 2002.

JACOBUS, A. P.; GROSS, J. Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 10, n. 3, e0119221, 2015.

JARVIS, J. N.; PERCIVAL, A.; BAUMAN, S.; PELFREY, J.; MEINTJES, G.; WILLIAMS, G. N.; LONGLEY, N.; HARRISON, T. S.; KOZEL, T. R. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis**, v. 53, n. 10, p. 1019-1023, 2011.

JIN, M.; KLIONSKY, D. J. Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. **FEBS Lett**, v. 588, n. 15, p. 2457-2463, 2014.

JONES, E. W.; ZUBENKO, G. S.; PARKER, R. R. *PEP4* gene function is required for expression of several vacuolar hydrolases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 102, n. 4, p. 665-677, 1982.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.

- KERSTENS, W.; VAN DIJCK, P. A Cinderella story: how the vacuolar proteases Pep4 and Prb1 do more than cleaning up the cell's mass degradation processes. **Microb Cell**, v. 5, n. 10, p. 438-443, 2018.
- 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. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 390, n. 3, p. 983-988, 2009.
- KLIONSKY, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **J Cell Sci**, v. 118, p. 7-18, 2005.
- KOZEL, T. R.; BAUMAN, S. K. CrAg Lateral Flow Assay for Cryptococcosis. **Expert Opin Med Diagn**, v. 6, n. 3, p. 245-251, 2012.
- KRAFT, C.; REGGIORI, F.; PETER, M. Selective types of autophagy in yeast. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 9, p. 1404-1412, 2009.
- KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y. S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb. Perspect. Med**, v. 4, n. 7, a019760, 2014.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; WICKES, B. L.; MEYER, W.; CUOMO, C. A.; WOLLENBURG, K. R.; BICANIC, T. A.; CASTAÑEDA, E.; CHANG, Y. C.; CHEN, J.; COGLIATI, M.; DROMER, F.; ELLIS, D.; FILLER, S. G.; FISHER, M. C.; HARRISON, T. S.; HOLLAND, S. M.; KOHNO, S.; KRONSTAD, J. W.; LAZERA, M.; LEVITZ, S. M.; LIONAKIS, M. S.; MAY, R. C.; NGAMSKULRONGROJ, P.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; RICKERTS, V.; SORRELL, T. C.; WALSH, T. J.; WILLIAMSON, P. R.; XU, J.; ZELAZNY, A. M.; CASADEVALL, A. The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, e00357-16, 2017.
- LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev Cell**, v. 6, n. 4, p. 463-477, 2004.
- LI, C.; LEV, S.; SAIARDI, A.; DESMARINI, D.; SORREL, 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. **Sci. Rep**, v. 6, n. 23927, 2016.
- LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**, v. 7, n. 3, p. 186-196, 2010.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIU, L.; TEWARI, R. P.; WILLIAMSON, P. R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 6034-6039, 1999.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOYSE, A.; THANGARAJ, H.; EASTERBROOK, P.; FORD, N.; ROY, M.; CHILLER, T.; GOVENDER, N.; HARRISON, T. S.; BICANIC, T. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **Lancet Infect Dis**, v. 13, n. 7, p. 629-637, 2013.
- LYNCH-DAY, M. A.; KLIONSKY, D. J. The Cvt pathway as a model for selective autophagy. **FEBS Lett**, v. 584, n. 7, p. 1359-1366, 2010.
- MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; DEWEESE-SCOTT, C.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; OMELCHENKO, M. V.; ROBERTSON, C. L.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHANG, N.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res**. 39: D225-229. 2011
- MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S. JR.; ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v. 5, n. 12, e15263, 2010.

- MARQUES, M.; MOJZITA, D.; AMORIM, M. A.; ALMEIDA, T.; HOHMANN, S.; MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V. The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but *PEP4* overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 152, n. 12, p. 3595-3605, 2006.
- MASON, D. A.; SHULGA, N.; UNDAVAI, S.; FERRANDO-MAY, E.; REXACH, M. F.; GOLDFARB, D. S. Increased nuclear envelope permeability and Pep4p-dependent degradation of nucleoporins during hydrogen peroxide-induced cell death. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 12, p. 1237-1251, 2005.
- MAXSON, M. E.; COOK, E.; CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Fungal Genet Biol**, v. 44, n. 3, p. 180-186, 2007.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.
- MISSALL, T. A.; LODGE, J. K.; MCEWEN, J. E. Mechanisms of Resistance to Oxidative and Nitrosative Stress: Implications for Fungal Survival in Mammalian Hosts. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 4, p. 835-846, 2004.
- MISSALL, T. A.; PUSATERI, M. E.; DONLIN, M. J.; CHAMBERS, K. T.; CORBETT, J. A.; LODGE, J. K. Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 3, p. 518-529, 2006.
- MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Ver**, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.
- MORETTI, M. L.; RESENDE, M. R.; LAZÉRA, M. S.; COLOMBO, A. L., SHIKANAI-YASUDA, M. A. Consenso em criptococose – 2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Uberaba, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.
- MOURAD, A.; PERFECT, J. R. Present and Future Therapy of *Cryptococcus* Infections. **J Fungi**, v. 4, n. 3, p. 79, 2018.
- MYLONAKIS, E.; MORENO, R.; EL KHOURY, J. B.; IDNURM, A.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B.; AUSUBEL, F. M.; DIENER, A. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.
- NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 2012.
- NICOLA, A. M.; CASADEVALL, A. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. **Methods Mol Biol**, v. 844, p. 189-197, 2012.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003.
- NOVERR, M. C.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infect. Immun**, v. 71, n. 3, p. 1538-1547, 2003.
- OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G. H.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am. J. Pathol**, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.
- OLSZEWSKI, M. A.; ZHANG, Y.; HUFFNAGLE, G. B. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. **Future Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 1269-1288, 2010.
- O'MEARA, T. R.; NORTON, D.; PRICE, M. S.; HAY, C.; CLEMENTS, M. F.; NICHOLS, C. B.; ALSPAUGH, J. A. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 2, e1000776, 2010.
- O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 3, p. 387-408, 2012.

- O'MEARA, T. R.; HOLMER, S. M.; SELVIG, K.; DIETRICH, F.; ALSPAUGH, J. A. *Cryptococcus neoformans* Rim101 Is Associated with Cell Wall Remodeling and Evasion of the Host Immune Responses. **mBio**, v. 4, n. 1, e00522-12, 2013.
- OSTERHOLZER, J. J.; SURANA, R.; MILAM, J. E.; MONTANO, G. T.; CHEN, G. H.; SONSTEIN, J.; CURTIS, J. L.; HUFFNAGLE, G. B.; TOEWS, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **Am. J. Pathol**, v. 174, n. 3, p. 932-943, 2009.
- PALIWAL, D. K.; RANDHAWA, H. S. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.** 1978; 7(4): 346-348.
- PALMER, G. E.; ASKEW, D. S.; WILLIAMSON, P. R. The diverse roles of autophagy in medically important fungi. **Autophagy**, v. 4, n. 8, p. 982-988, 2008.
- PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 299-305, 2003.
- PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc**, v. 124, p. 61-79, 2013.
- PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.
- PARR, C. L.; KEATES, R. A.; BRYKSA, B. C.; OGAWA, M.; YADA, R. Y. The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. **Yeast**, v. 24, n. 6, p. 467-480, 2007.
- PERCIVAL, A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Monoclonal antibodies specific for immunorecessive epitopes of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, reduce serotype bias in an immunoassay for cryptococcal antigen. **Clin. Vaccine Immunol**, v. 18, n. 8, p. 1292-1296, 2011.
- PEREIRA, C.; CHAVES, S.; ALVES, S.; SALIN, B.; CAMOUGRAND, N.; MANON, S.; SOUSA, M. J.; CÔRTE-REAL, M. Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: the role of Pep4 and the ADP/ATP carrier. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1398-1410, 2010.
- PEREIRA, H.; AZEVEDO, F.; REGO, A.; SOUSA, M. J.; CHAVES, S. R.; CÔRTE-REAL, M. The protective role of yeast cathepsin D in acetic acid-induced apoptosis depends on ANT (Aac2p) but not on the voltage-dependent channel (Por1p). **FEBS Lett**, v. 587, n. 2, p. 200-205, 2013.
- PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resist Updat**, v. 2, n. 4, p. 259-269, 1999.
- PERFECT, J.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 4, p. 837-874, 2002.
- PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 463-468, 2006.
- PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M. H.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin. Infect. Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.
- PERICOLINI, E.; CENCI, E.; MONARI, C.; DE JESUS, M.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A.; VECCHIARELLI, A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 267-275, 2006.

- PETTER, R.; KANG, B.S.; BOEKHOUT, T.; DAVIS, B. J.; KWON-CHUNG, K. J. A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, *CNLAC1* and *CAP59*. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 2029-2036, 2001.
- PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. S3-14, 2006.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.
- PYO, J. O.; NAH, J.; JUNG, Y. K. Molecules and their functions in autophagy. **Exp. Mol. Med**, v. 44, n. 2, p. 73-80, 2012.
- QUÄSCHLING, T.; FRIEDRICH, D.; DEEPE, G. S. JR.; RUPP, J. Crosstalk Between Autophagy and Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Antifungal Immunity. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2150, 2020.
- REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Curr Opin Microbiol**, v. 45, p. 70-76, 2018.
- RAJASINGHAM, R.; RHEIN, J.; KLAMMER, K.; MUSUBIRE, A.; NABETA, H.; AKAMPURIRA, A.; MOSSEL, E. C.; WILLIAMS, D. A.; BOXRUD, D. J.; CRABTREE, M. B.; MILLER, B. R.; ROLFES, M. A.; TENGSUPAKUL, S.; ANDAMA, A. O., MEYA, D. B.; BOULWARE, D. R. Epidemiology of meningitis in an HIV-infected Ugandan cohort. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 92, n. 2, p. 274-279, 2015.
- 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, 2017.
- RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. D1, p. D503-D509, 2014.
- ROBERTO, T. N.; LIMA, R. F.; PASCON, R. C.; IDNURM, A.; VALLIM, M. A. Biological functions of the autophagy-related proteins Atg4 and Atg8 in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 15, n. 4, e0230981, 2020.
- RONNE-ENGSTRÖM, E.; CESARINI, K. G.; ENBLAD, P.; HESSELAGER, G.; MARKLUND, N.; NILSSON, P.; SALCI, K.; PERSSON, L.; HILLERED, L. Intracerebral microdialysis in neurointensive care: the use of urea as an endogenous reference compound. **J. Neurosurg**, v. 94, n. 3, p. 397-402, 2001.
- SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infections by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future microbial**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, 2012.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual – 2. ed.** Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.546 p.
- SHINTANI, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 990-905, 2004.
- SIAFAKAS, A. R.; SORRELL, T. C.; WRIGHT, L. C.; WILSON, C.; LARSEN, M.; BOADLE, R.; WILLIAMSON, P. R.; DJORDJEVIC, J. T. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. 2007; **J Biol Chem**, v. 282, n. 52, p. 37508-37514, 2007.
- SINGH, A.; PANTING, R. J.; 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, e00220-13, 2013.
- SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 10, p. 5127-5130, 2013.

- SKOWYRA, M. L.; DOERING, T. L. RNA Interference in *Cryptococcus neoformans*. **Methods Mol Biol**, v. 845, p. 165-186, 2012.
- SØRENSEN, S. O.; VAN DEN HAZEL, H. B.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; WINTHER, J. R. pH-dependent processing of yeast procarboxypeptidase Y by proteinase A in vivo and in vitro. **Eur J Biochem**, v. 220, n. 1, p. 19-27, 1994.
- SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, 2014.
- STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G. Oleifera* D.C.). **Z Hyg**, v. 148, n. 5, p. 466-475, 1962.
- STEEN, B. R.; LIAN, T.; ZUYDERDUYN, S.; MACDONALD, W. K.; MARRA, M.; JONES, S. J.; KRONSTAD, J. W. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Genome Res**, v. 12, n. 9, p. 1386-1400, 2002.
- STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 7, p. 667-675, 2003.
- SYME, R. M.; SPURRELL, J. C.; AMANKWAH, E. K.; GREEN, F. H.; MODY, C. H. Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fc γ receptor II for presentation to T lymphocytes. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 5972-5981, 2002.
- TAKESHIGE, K.; BABA, M.; TSUBOI, S.; NODA, T.; OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, v. 119, n. 2, p. 301-311, 1992.
- TATEHASHI, Y.; WATANABE, D.; TAKAGI, H. γ -Glutamyl kinase is involved in selective autophagy of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 590, n. 17, p. 2906-2914, 2016.
- TEICHERT, U.; MECHLERE, B.; MULLER, H.; WOLF, D. H. Lysosomal (Vacuolar) Proteinases of Yeast Are Essential Catalysts for Protein Degradation, Differentiation, and Cell Survival. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 27, p. 16037-16045, 1989.
- TODDE, V.; VEENHUIS, M.; KLEI, I. J. Autophagy: principles and significance in health and disease. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1792, n. 1, p. 3-13, 2009.
- 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. **J Bacteriol**, v. 175, n. 5, p. 1405-1411, 1993.
- TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. **J Fungi (Basel)**, v. 5, n. 1, p. 3, 2019.
- TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455-462, 2008.
- TSUKADA, M.; OHSUMI, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 333, n. 1-2, p. 169-174, 1993.
- UMEKAWA, M.; UJIHARA, M.; MAKISHIMA, K.; YAMAMOTO, S.; TAKEMATSU, H.; WAKAYAMA, M. The signaling pathways underlying starvation-induced upregulation of α -mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1860, n. 6, p. 1192-1201, 2016.
- van den HAZEL, H. B.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; WINTHER, J. R. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. **Yeast**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 1996.
- VECCHIARELLI, A.; RETINI, C.; MONARI, C.; CASADEVALL, A. Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* alters human leukocyte cytokine synthesis and promotes T-cell proliferation. **Infect Immun**, v. 66, n. 3, p. 1244-1247, 1998.

- VECCHIARELLI, A.; PIETRELLA, D.; LUPO, P.; BISTONI, F.; MCFADDEN, D. C.; CASADEVALL, A. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. **J Leukoc Biol**, n. 74, v. 3, p. 370-378, 2003.
- VIDAL, J. E.; OLIVEIRA, A. C. Penalva de; DAUAR, R. F.; BOULWARE, D. R. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 17, n. 3, p. 353-362, 2013.
- VIDAL, J. E.; BOULWARE, D. R. Lateral Flow Assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 38-45, 2015.
- WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect Immun**, v. 62, n. 7, p. 3004-3007, 1994.
- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect Immun**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.
- WEN, X.; KLIONSKY, D. J. An overview of macroautophagy in yeast. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 9 Pt A, p. 1681-1699, 2016.
- WILLIAMSON, P. R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 180, n. 6, p. 1570-1572, 1998.
- WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic Grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 127, n. 3, p. 820-823, 1968.
- WOOLFORD, C. A.; DANIELS, L. B.; PARK, F. J.; JONES, E. W.; VAN ARSDELL, J. N.; INNIS, M. A. The *PEP4* gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. **Mol Cell Biol**, v. 6, n. 7, p. 2500-2510, 1986.
- WRIGHT, L. C.; SANTANGELO, R. M.; GANENDREN, R.; PAYNE, J.; DJORDJEVIC, J. T.; SORRELL, T. C. Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 1, p. 37-47, 2007.
- YAUCH, L. E.; LAM, J. S.; LEVITZ, S. M. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 11, e120, 2006.
- YUGA, M.; GOMI, K.; KLIONSKY, D. J.; SHINTANI, T. Aspartyl aminopeptidase is imported from the cytoplasm to the vacuole by selective autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem**, v. 286, n. 15, p. 13704-13713, 2011.
- ZARAGOZA, O.; GANCEDO, J. M. Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, n. 2, p. 187-194, 2000.
- ZARAGOZA, O.; TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 7, p. 1957-1967, 2003.
- ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biol. Proced. Online**, v. 6, p. 10-15, 2004.
- ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009.
- ZARAGOZA, O.; GARCÍA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J. D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CASADEVALL, A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, e1000945, 2010.
- ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490-501. 2019.

ZHU, X.; GIBBONS, J.; GARCIA-RIVERA, J.; WILLIAMSON, P. R.; CASADEVALL, A. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall associated virulence factor. **Society**, v. 69, n. 9, p. 5589-5596, 2001.

APÊNDICE A - LISTA DE MICRORGANISMOS

Microrganismo	Linhagem	Genótipo	Origem
<i>C. neoformans</i>	KN99 α	MAT α , sorotipo A	Duke University Medical Center
<i>C. neoformans</i>	<i>pep4</i>	KN99 α ; <i>pep4</i> ::Hyg ^R	Este projeto
<i>C. neoformans</i>	<i>pep4+PEP4</i>	KN99 α ; <i>pep4</i> ::PEP4	Este projeto
<i>C. neoformans</i>	<i>ape4</i>	KN99 α ; <i>ape4</i> ::Neo ^R	LIMic
<i>C. neoformans</i>	KN99 α +GFP-Ams1	KN99 α ; pCN50-AMS1	Este projeto
<i>C. neoformans</i>	<i>pep4</i> +GFP-Ams1	<i>pep4</i> ::Hyg ^R ; pCN50-AMS1	Este projeto
<i>C. neoformans</i> H86	<i>lac1</i>	<i>lac1</i> Δ	LIMic
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741	MAT α , <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0	Genetic research
<i>E. coli</i>	DH5 α	F ⁻ Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hscR</i> 17 (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA</i> <i>supE</i> 44 λ - <i>thi</i> - 1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1	Promega (Madison, EUA)

APÊNDICE B – LISTA DE PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Aplicação	Seleção	Origem
pZPHYG	Sequência da ORF de resistência à Hyg, construção do cassete de deleção do gene <i>PEP4</i> em <i>C. neoformans</i>	Higromicina	Cedido pelo Dr. Joseph Heitman (Duke University)
pZPNEO	Reconstituição do gene <i>PEP4</i>	Neomicina	Cedido pelo Dr. Joseph Heitman (Duke University)
pCN50	Sequência da ORF da proteína fluorescente verde (GFP)	Neomicina	Cedido pelo Dr. Joseph Heitman (Duke University)
pCN50-Ams1	Plasmídeo com a sequência codificadora da proteína Ams1 fusionada ao GFP	Neomicina	Este projeto

APÊNDICE C – LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos utilizados para a deleção do gene *PEP4* em *C. neoformans* por *Double-joint*.

Primer	Alvo	Sequência (5' - 3')
MAV386	Diag. Fw	5' CAATCGAACGGCGGCGTATC 3'
MAV162	Diag. Rv	5' GACTCACCTTGGGCAGTGGG 3'
MAV387	B.E. Fw	5' GCACGGAGGAAGCTAATTTC 3'
MAV388	B.E. Rv	5' CTCCAGCTCACATCCTCGCACGGTAGAGTATAGGTGAAGA 3'
MAV389	M.E	5' TCTTCACCTATACTCTACCGTGCGAGGATGTGAGCTGGAG 3'
MAV390	M.D	5' GTTTCTAGAACTGCCCTGATTGAAGAGATGTAGAAACTAGC 3'
MAV391	B.D. Fw	5' GCTAGTTTCTACATCTCTTCAATCAGGGCAGTTCTAGAAAC 3'
MAV392	B.D. Rv	5' GAGTACTACACCACGCACTG 3'

Diag. = diagnóstico; B.E. = braço esquerdo; M.E. = marcador esquerdo; M.D. = marcador direito; B.D. = braço direito; Fw = oligonucleotídeo senso; Rv = oligonucleotídeo anti-senso.

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos da fusão GFP-Ams1 no plasmídeo pCN50.

Primer	Alvo	Sequência (5' - 3')
MAV327	pCN50-AMS1 Fw.	5' CACCCGTCAGACCATGGATG 3'
PRCP136	pCN50-AMS1 Rv.	5' AGCTCGCCGACCACTACCAGC 3'

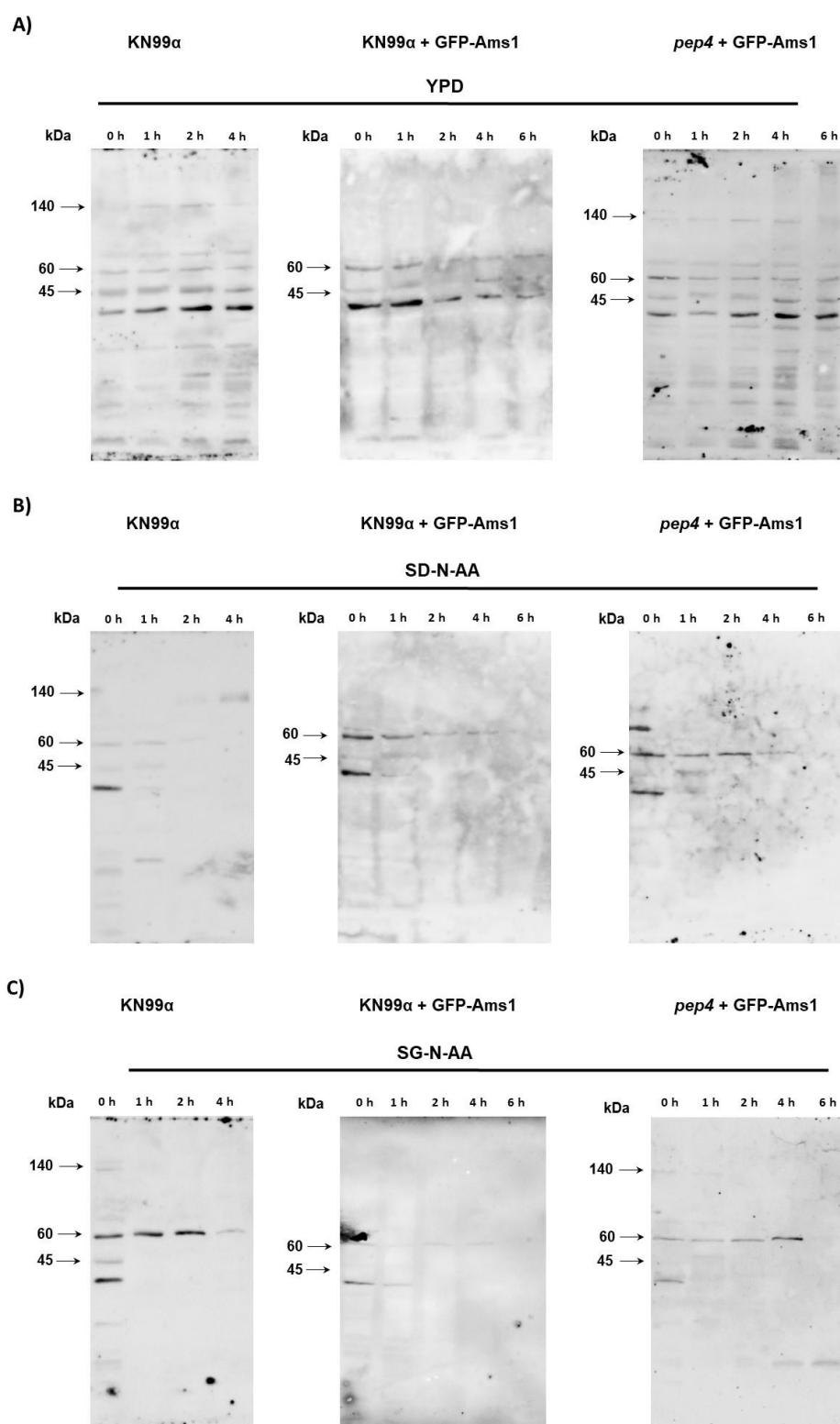
Fw = oligonucleotídeo senso; Rv = oligonucleotídeo anti-senso.

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos para o qPCR

Primer	Alvo	Sequência (5' - 3')
MAV285	<i>PEP4</i> Fw.	5' CTCAACAAGGAGATCGGTGCT 3'
MAV286	<i>PEP4</i> Rv.	5' CGCAGGAACACATCGCCAAC 3'
MAV240	GPDH1 Fw.	5' AGTATGACTCCACACATGGTCG 3'
MAV241	GPDH1 Rv.	5' AGACAAACATCGGAGCATCAGC 3'

Fw = oligonucleotídeo senso; Rv = oligonucleotídeo anti-senso.

APÊNDICE D – Processamento de Ams1 por Pep4 em *C. neoformans*.



Linhagens selvagem (KN99 α) e mutante (*pep4*) expressando GFP-Ams1 e selvagem KN99 α (controle) foram cultivadas em diferentes condições nutricionais, YPD (**A**), SD-N-AA (**B**) e SG-N-AA (**C**) por 0-6 horas a 30°C. Anticorpo primário anti-GFP (1:2.000) e anticorpo secundário anti-mouse (1:2.000). 155 kDa = proteína de fusão GFP-Ams1.

APÊNDICE E – Homólogos da proteína Pep4 em *C. neoformans* var. *grubii* H99 e *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* KN99.

<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	ID	Ident.	E-value
	CNAG_04635	32%	2e-38
	CNAG_05869	32%	6e-38
	CNAG_07520	32%	3e-28
	CNAG_05072	24%	1e-10

<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> KN99	ID	Ident.	E-value
	CKF44_04635	32%	9e-39
	CKF44_05869	32%	3e-38
	CKF44_07520	32%	1e-28
	CKF44_05072	24%	1e-10