

LUÍSA DEFRANCO FERREIRA PECONICK

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DO GENE VOSA DE
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

BRASÍLIA, 2013.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

LUÍSA DEFRANCO FERREIRA PECONICK

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DO GENE VOSA DE
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Brasília

2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

Luísa Defranco Ferreira Peconick

Caracterização Molecular e Funcional do gene VOSA de *Cryptococcus neoformans*

Brasília, 29 de julho de 2013.

Banca Examinadora:

Orientadora: Larissa Fernandes Matos - UnB

Examinador interno: Vicente de Paulo Martins - UnB

Examinador externo: Renata Castiglioni Pascon - UNIFESP

Suplente: Lorena da Silveira Derengowski - UnB

*Dedico este trabalho aos meus pais Mário e Josefina, e à
minha irmã Laura, pela compreensão, apoio e incentivo
em todas as minhas escolhas e decisões.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mário e Josefina, pelo apoio incondicional, paciência e incentivo durante todas as etapas de minha “jovem” carreira acadêmica.

À minha irmã, melhor amiga e confidente, que sempre me encorajou a seguir meus sonhos.

À Universidade de Brasília, instituição que me acolheu desde a graduação, fornecendo além de conhecimento, apoio estrutural para a realização de meu trabalho.

À minha orientadora Larissa Fernandes, pela dedicação e confiança há tanto depositada, por todos os ensinamentos pacientemente dados e, acima de tudo, pela amizade.

À minha co-orientadora Maria Sueli, pelo incentivo, confiança e por disponibilizar as instalações de seu laboratório.

Aos meus amigos e colaboradores Hugo Paes, Fabiana de Oliveira, Amanda Lira, Tayná Santos, Lorena Derengowski e André Nicola por todo apoio, auxílio e contribuição em processos tão importantes para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pela convivência sempre tão agradável, certamente fundamental para o bom andamento deste trabalho.

Às minhas amigas e amigos queridos que, desde os tempos de escola, ou não, estão ao meu lado me apoiando e participando de todas as importantes etapas de minha vida sempre. Pela compreensão durante minhas várias ausências e alegria em todos os momentos.

Ao Programa de Pós- Graduação em Ciências e Tecnologias da Saúde pela oportunidade e estrutura a mim oferecidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade e apoio financeiro.

Enfim, à todos que de alguma forma me ajudaram para que a conclusão deste trabalho fosse possível, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA	1
1.2 DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	4
1.3 AS PROTEÍNAS <i>VELVET</i> EM FUNGOS	10
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 LINHAGENS E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	17
3.1.1 Linhagens celulares	17
3.1.2 Meios de cultura	17
3.1.2.1 Meio YPD: para cultivo de <i>C. neoformans</i>	17
3.1.2.2 Meios de cultura para testes fenotípicos	17
a) Meios Congo Red, Cloreto de Sódio (NaCl), Cloreto de potássio (KCl), Sorbitol, Cafeína, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Nitrito de Sódio (NaNO ₂), Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	17
b) Meio Sabouraud Ácido Líquido	17
c) Meio Niger Seed	17
d) <i>Christiansen's Urea Agar</i> – Meio para teste de urease	18
e) Meio emulsão gema de ovo – Meio para teste de fosfolipase	18
3.1.2.3 Meios de cultura indutores de acasalamento em <i>C. neoformans</i>	18
a) Meio V8	18
b) Meio Agar Filament	18
c) Meio Comercial Murashige e Skoog (MS)	19
d) Meio Core	19
e) Meio SLAD (<i>Synthetic Low Ammonium Dextrose</i>)	19
f) Meio SMAD (<i>Synthetic Medium Ammonium Dextrose</i>)	19
g) Meio SHAD (<i>Synthetic High Ammonium Dextrose</i>)	19
3.2 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO GENE <i>VOSA</i> DE <i>C. NEOFORMANS</i> UTILIZANDO O BANCO GENÔMICO DISPONÍVEL	20

3.3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO GÊNICA DE VOSA ATRAVÉS DA DELEÇÃO GÊNICA NO MODELO <i>C. NEOFORMANS</i>	21
3.3.1 Construção do cassete de deleção do gene VOSA em <i>C. neoformans</i>	21
3.3.2 Transformação por biobalística de <i>C. neoformans</i> para obtenção de mutantes <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	24
3.3.3 Extração do DNA genômico de <i>C. neoformans</i>	25
3.3.4 Confirmação da deleção de VOSA	26
3.3.5 Confirmação dos mutantes <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i> por Southern Blot	26
3.3.5.1 Digestão do DNA genômico e o Southern Blot	27
3.4 RECONSTITUIÇÃO DO LOCUS DE VOSA	29
3.5 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA <i>IN VITRO</i> DE <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	30
3.5.1 Capacidade de crescimento a 37 °C	31
3.5.2 Síntese de melanina	31
3.5.3 Produção de cápsula	31
3.5.4 Produção de urease	31
3.5.5 Produção de fosfolipase	31
3.5.6 Integridade da parede celular	32
3.5.7 Estresse oxidativo	32
3.5.8 Estresse osmótico	32
3.5.9 Estresse térmico	32
3.5.10 Acasalamento	32
3.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA DA MORFOLOGIA DE LEVEDURAS E HIFAS MUTANTES <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	33
3.7 CURVA DE CRESCIMENTO EM MEIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO	33
3.8 AVALIAÇÃO DE VIRULÊNCIA <i>IN VITRO</i> DE <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	34
3.9 INVESTIGAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DA EXPRESSÃO DE GENES <i>VELVET</i> NOS MUTANTES <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	35
3.9.1 Extração de RNA total para PCR em tempo real	35
3.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) para PCR em tempo real	36

3.10 INVESTIGAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM RESPOSTA A MEIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DESSE METABÓLITO em <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO GENE VOSA DE <i>C. NEOFORMANS</i> UTILIZANDO O BANCO GENÔMICO DISPONÍVEL	38
4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO GÊNICA DE VOSA ATRAVÉS DA DELEÇÃO GÊNICA NO MODELO <i>C. NEOFORMANS</i>	43
4.3 OBTENÇÃO DO RECONSTITUÍDO <i>vosAaΔ::VOSAa</i>	47
4.4 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA <i>IN VITRO</i> DOS MUTANTES <i>vosAΔ</i>	49
4.4.1 Capacidade de crescimento a 37 °C	49
4.4.2 Síntese de melanina	50
4.4.3 Produção de cápsula	50
4.4.4 Produção de urease	51
4.4.5 Produção de fosfolipase	52
4.4.6 Integridade da parede celular	53
4.4.7 Estresse oxidativo	54
4.4.8 Estresse osmótico	55
4.4.9 Estresse térmico	56
4.4.10 Acasalamento	56
4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA DA MORFOLOGIA DE LEVEDURAS E HIFAS MUTANTES DE <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	61
4.6 AVALIAÇÃO DE VIRULÊNCIA <i>IN VITRO</i> DO MUTANTE <i>vosAaΔ</i>	65
4.7 CURVA DE CRESCIMENTO EM MEIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO NOS MUTANTES <i>vosAaΔ</i>	66
4.8 INVESTIGAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>VELVET</i> NO MUTANTE <i>vosAaΔ</i>	69
4.9 INVESTIGAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO NOS MUTANTES <i>vosAaΔ</i>	71
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
6 PERSPECTIVAS	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo infeccioso de <i>Cryptococcus</i> (ambiente e hospedeiro)	2
Figura 2. Fases do ciclo de vida de <i>C. neoformans</i>	5
Figura 3. Arquitetura das proteínas <i>velvet</i> em <i>Aspergillus nidulans</i>	11
Figura 4. Representação da técnica PCR <i>Double joint</i>	24
Figura 5. Alinhamento múltiplo comparativo da sequência protéica de VosA com as de diferentes fungos patogênicos	39
Figura 6. Cladograma esquemático do parentesco da proteína VosA de <i>C. neoformans</i> com a dos diferentes fungos selecionados	40
Figura 7. Predição estrutural da proteína VosA em <i>C. neoformans</i>	41
Figura 8. Alinhamento das sequências dos domínios da família de proteínas <i>Velvet</i> (VeA, VelC, VosA, VelB, respectivamente) em <i>C. neoformans</i> (continua)	41
Figura 8. (continuação)	42
Figura 9. Cladograma comparativo dos domínios <i>velvet</i> de proteínas VeA, VelB, VelC e VosA de <i>C. neoformans</i>	42
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose para confirmação dos produtos obtidos na 1ª etapa da PCR <i>Double joint</i>	44
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose para confirmação dos produtos obtidos na 2ª etapa da PCR <i>Double joint</i>	44
Figura 12. Esquema para conferência da deleção de VOSA em <i>C. neoformans</i>	45
Figura 13. Eletroforese em gel para confirmação da deleção de VOSA na linhagem a de <i>C. neoformans</i>	45
Figura 14. Eletroforese em gel para confirmação da deleção de VOSA na linhagem α de <i>C. neoformans</i>	46
Figura 15. Confirmação por Southern Blot da deleção de VOSA nos mutantes 62.vosAaΔ e 52.vosAαΔ	47
Figura 16. Esquema representativo da PCR confirmatória de reconstituição do locus VOSA	48
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose para confirmação dos produtos obtidos da amplificação da região 5' de VOSA de possíveis cepas reconstituídas vosAaΔ::VOSAa	49

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose para confirmação dos produtos obtidos na PCR da amplificação da região 3' de VOSA de possíveis cepas reconstituídas <i>vosAaΔ::VOSAa</i>	48
Figura 19. Teste de crescimento a 30 e 37 °C	49
Figura 20. Ensaio de produção de melanina	50
Figura 21. Análise da produção de cápsula polissacarídica em <i>C. neoformans</i>	51
Figura 22. Análise da produção de urease em cepas selvagem e mutante <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i> de <i>C. neoformans</i> a 30°C	51
Figura 23. Ensaio de fosfolipase	52
Figura 24. Análise de sensibilidade a <i>Congo Red</i>	53
Figura 25. Teste de sensibilidade ao estresse oxidativo	54
Figura 26. Teste de sensibilidade ao estresse osmótico	55
Figura 27. Teste de sensibilidade ao estresse térmico	56
Figura 28. Teste de acasalamento entre cepas selvagens	57
Figuras 29 e 30. Teste de acasalamento entre cepas selvagens e mutantes <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	58
Figura 31. Teste de acasalamento entre <i>vosAaΔ</i> e <i>vosAαΔ</i>	59
Figura 32. Teste de acasalamento da cepa reconstituída <i>vosAaΔ::VOSAa</i>	61
Figura 33. Morfologia de leveduras de <i>C. neoformans</i>	62
Figura 34. Diâmetro médio das células leveduriformes de diferentes cepas de <i>C. neoformans</i>	63
Figura 35. Morfologia de hifas de <i>C. neoformans</i>	64
Figura 36. Diâmetro médio de hifas de <i>C. neoformans</i>	65
Figura 37. Ensaio de sobrevivência em macrófagos peritoniais	66
Figura 38. Curvas de crescimento de <i>C. neoformans</i>	68
Figura 39. Diluição seriada de <i>C. neoformans</i> em meios compostos de fontes de nitrogênio	69
Figura 40. Padrão de expressão da família <i>velvet</i> em <i>vosAaΔ</i>	70
Figura 41. Padrão de expressão de GAT1 em mutantes <i>vosAaΔ</i>	71
Tabela 1. Lista de microrganismos utilizados para comparação de sequências de aminoácidos	20

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados no estudo de VOSA em <i>C. neoformans</i> (continua)	22
Tabela 2. (continuação)	23

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

AMP – Monofosfato cíclico de adenosina

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

GalXM – Galactoxilomananas

GXM – Glucuronoxilomananas

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPH – Higromicina fosfotransferase

M – molar

MAP – Proteína ativada por mitógeno

Min. - minutos

ORF - Open Reading Frame

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PLB – Fosfolipase B

PLC – Fosfolipase C

RPM – Rotações por minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

UV – Ultravioleta

Vs. - *versus*

RESUMO

O basidiomiceto *Cryptococcus neoformans*, é um fungo oportunista, que comumente infecta pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e imunocomprometidos em geral. É o agente etiológico da criptococose, doença potencialmente fatal e cosmopolita cuja incidência mundial vem se aproximando da de doenças como a tuberculose. O gene VOSA pertence à família *velvet*, exclusiva de fungos e primeiramente descrita em *Aspergillus*, e está envolvido na viabilidade dos esporos e na regulação das fases assexuada e sexuada. Proteínas dessa família são fatores transcricionais altamente conservados entre ascomicetos e basidiomicetos que regulam diferentes processos em resposta a estímulos ambientais. A análise *in silico* do gene VOSA de *C. neoformans* mostrou sua conservação entre os fungos. Construiu-se um cassete de deleção do gene VOSA contendo o gene de resistência à higromicina B por PCR *double joint*. O cassete foi transformado por biobalística nas linhagens selvagens KN99a/ α (soroA) que permitiu a obtenção de mutantes *vosAa* Δ e *vosA α* Δ . Da mesma forma, o fragmento contendo o locus VOSA foi transformado para obtenção do reconstituído tipo *a* (*vosAa* Δ ::VOSA). Confirmou-se a deleção e a reconstituição de VOSA por PCR comum. Os mutantes *vosAa* Δ e *vosA α* Δ foram submetidos aos testes de fenótipo: crescimento a 30°C e 37°C, formação de cápsula, produção de urease e fosfolipase, alterações de parede celular e produção de melanina, no entanto não foram observadas quaisquer alterações no fenótipo quando comparados com a linhagem selvagem. Quanto à capacidade de realizar acasalamento, os mutantes *vosAa* Δ e *vosA α* Δ foram submetidos a acasalamento com linhagem selvagem de tipo sexual oposto e apresentaram diminuição na formação de hifas e alteração morfológica significativa de sua estrutura. Mutantes de tipo sexual opostos (*vosAa* Δ vs. *vosA α* Δ) também foram submetidos a acasalamento e não apresentaram qualquer formação de hifas. Acredita-se que VOSA seja um regulador positivo da reprodução sexuada, e que controle a formação de estruturas sexuais. A expressão de genes *velvet* foi analisada no mutante *vosAa* Δ em comparação à cepa selvagem sem indicação de qualquer alteração transcricional. Os resultados até agora obtidos em *C. neoformans* colaboram para um melhor entendimento do papel de VOSA na patobiologia deste patógeno. Pretende-se identificar em detalhe o papel deste gene no ciclo de vida de *C. neoformans*, em especial na produção de esporos, que são as formas infectivas e

de disseminação deste patógeno. Os dados moleculares gerados neste trabalho servem como ponto de partida para elucidar a complexa regulação do ciclo sexual de *C. neoformans* e pela primeira vez descreve o envolvimento de um gene *velvet* na biologia de um basidiomiceto.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, proteínas *velvet*, VOSA, morfogênese, acasalamento.

ABSTRACT

The basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans* is an opportunistic organism which commonly infects HIV and immunocompromised patients. It is the etiological agent of cryptococcosis, a potentially fatal and cosmopolitan disease, whose world's incidence is approaching from diseases such as tuberculosis. VOSA gene belongs to the velvet family, fungal exclusive and primarily described in *Aspergillus*, involved in the regulation of sexual and asexual development as well as in the viability of the spores. Proteins of this family are transcriptional factors highly conserved among ascomycetes and basidiomycetes regulating different process in response to environmental stimuli. *In silico* analysis of VOSA gene showed its conservation among the fungi. A VOSA disruption cassette containing the hygromycin resistance gene was assembled by Double Joint PCR. The cassette was transformed by biolistic in KN99 α/α (soroA) wild type strains that allowed obtaining the *vosAa* Δ and *vosA α* Δ mutants. Likewise, the fragment containing the VOSA locus was transformed to obtain a mating type *a* reconstituted strain (*vosAa* Δ ::VOSA α). Both disruption and reconstitution were confirmed by traditional PCR. The mutants *vosA α* Δ and *vosAa* Δ were tested for various phenotypes: growth at 30 and 37°C, capsule formation, urease and phospholipase production, changes in cell wall and melanin production, however no phenotypic changes were observed compared to the wild type strains. Regarding the ability to mate, *vosAa* Δ and *vosA α* Δ mutants were crossed with wild type strain of opposite mating type and the crosses showed decreased hyphae formation and significant morphological alteration of its structure. Mutants of opposite mating type (*vosAa* Δ vs. *vosA α* Δ) were subjected to mating and showed no formation of hyphae. VOSA is believed to be a positive regulator of sexual reproduction, and that controlling the formation of sexual structures. Expression of velvet genes was analyzed in *vosAa* Δ mutant in comparison with wild type strain and any significant transcriptional changes were noticed. The results obtained so far in *C. neoformans* collaborate for a better understanding of its role in the pathobiology of this pathogen. It is intended to identify in detail the role of VOSA in *C. neoformans* life cycle, in particular spore production, the infective and dissemination form of the pathogen. The molecular data generated in this study are starting point for a research to elucidate the molecular mechanism of the sexual cycle regulation on *C. neoformans* and for the first time describe a velvet gene involved in the biology of a basidiomycete.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, velvet proteins, VOSA, morphogenesis, mating.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus neoformans* e seus fatores de virulência

Cryptococcus neoformans foi identificado como patógeno humano há mais de 100 anos, após ser isolado, de forma independente, de uma paciente com infecção na tíbia e de um suco de pêsego (Ballou et al., 2012).

C. neoformans foi considerada uma espécie homogênea até 1949 quando a existência de quatro sorotipos (A, B, C e D) foi revelada a partir de propriedades antigênicas de sua cápsula polissacarídica. No entanto, essa heterogeneidade das espécies permaneceu obscura até a identificação de duas fases teleomorfas morfologicamente distintas em meados de 1970. A teleomorfa *Filobasidiella neoformans* produzida pelos sorotipos A e D e *F. bacillispora* pelas linhagens de sorotipo B e C. Estudos subsequentes revelaram várias diferenças entre as duas formas de *Filobasidiella* no que diz respeito a sua ecologia, epidemiologia, patobiologia, bioquímica e genética (Meyer et al., 2009).

Atualmente, *Cryptococcus* é classificado em duas espécies: *C. neoformans*, com duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), além do híbrido AD, e *C. gattii* (sorotipos B e C) (Meyer et al., 2009). Entre as trinta e sete espécies de *Cryptococcus*, apenas *C. neoformans* e *C. gattii* foram descritas como causadoras de doenças (Li & Mody, 2010).

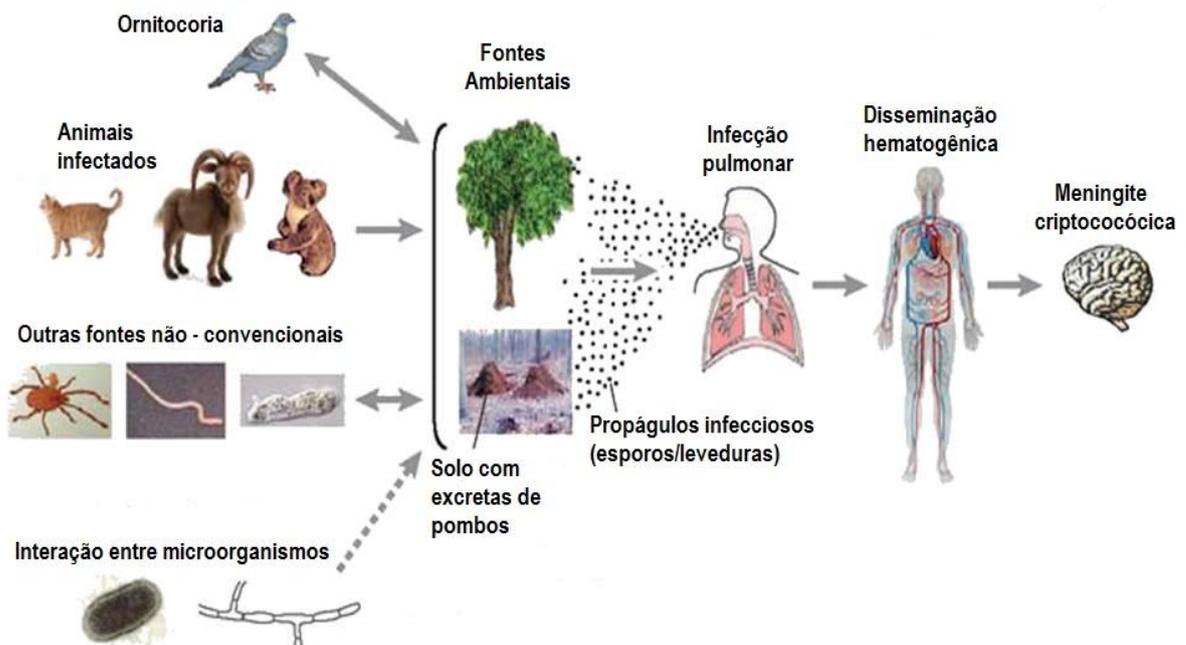
C. neoformans é o agente etiológico da criptococose, uma doença fúngica potencialmente fatal e cosmopolita. No Brasil, predomina nas regiões Sul e Sudeste, sendo os estados de São Paulo e Rio de Janeiro os que apresentam maior índice de mortalidade associado a essa infecção (Prado et al., 2009). Não existem dados epidemiológicos para o Distrito Federal. Esse fungo encapsulado pode causar infecções em pacientes imunocompetentes bem como em pacientes imunocomprometidos (maior incidência). Aproximadamente 6-8% dos pacientes com infecção avançada de HIV apresentam infecção também por *C. neoformans*, o que a caracteriza como oportunista (Kozubowski et al., 2009). Um número significativo de pacientes submetidos a terapias imunossupressoras, como é o caso dos transplantados, também apresenta infecção por *C. neoformans*. Estudos recentes têm mostrado que as taxas mundiais de infecção por *C. neoformans* vêm se aproximando das taxas de doenças como a tuberculose (Adler et al., 2011).

Esse fungo é encontrado mundialmente, sendo seus principais habitats excretas e debris de pombos, solo e algumas árvores. *C. neoformans* não faz parte

da microbiota normal de humanos, sendo isolado apenas em pacientes com características patológicas (Buchanan & Murphy, 1998).

A via de infecção da criptococose se dá pela inalação de propágulos fúngicos, células leveduriformes secas ou esporos, os basidiósporos ou clamidósporos, aerossolizados do solo ou de árvores contaminadas com excrementos de pombos (Idnurm *et al.*, 2005; Lin & Heitman, 2005). Ao inalar esses propágulos, o hospedeiro pode permanecer com a doença latente ou desenvolvê-la, o que varia de acordo com suas condições imunológicas (**Figura 1**). Hospedeiros que desenvolvem a doença podem apresentar quadros de infecções crônicas ou de resposta inflamatória com formação de granuloma (Idnurm *et al.*, 2005). Os principais órgãos infectados pela criptococose são pulmões e cérebro, embora qualquer outro órgão do corpo humano possa ser afetado, tais como: fígado, pênis, pele, próstata, trato urinário, olhos, ossos e articulações (Li & Mody, 2010).

Figura 1 - Ciclo infeccioso de *Cryptococcus* (ambiente e hospedeiro). O fungo é capaz de sobreviver no solo, associado às excretas de aves (sendo o pombo um dos principais responsáveis por sua dispersão) ou outros animais, em árvores, ou ainda em hospedeiros animais como gatos, cabras e coalas. *C. neoformans* também é capaz de sobreviver em associação com predadores ambientais como insetos, minhocas e amebas, além de poder interagir com bactérias ou outros fungos. O fungo estabelece a infecção pulmonar em humanos através da inalação de seus esporos ou de células de levedura dissecadas. Quando o hospedeiro se torna imunocomprometido, o fungo é capaz de se reativar da forma latente, e se disseminar na corrente sanguínea até infectar o sistema nervoso central (SNC). A infecção do SNC é a forma mais severa de criptococose humana.



Fonte: Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

A exposição e a infecção são comuns em indivíduos saudáveis. Segundo Chen *et al.* (1999), praticamente todos os adultos de Nova Iorque possuem anticorpos reativos à *C. neoformans*. Todos os soros humanos testados, incluindo o de doadores não infectados, apresentaram anticorpos reativos a proteínas do fungo.

Além de infectar humanos, *C. neoformans* pode causar infecção em animais domésticos e selvagens como cachorros, gatos, porcos, cavalos, coelhos, cabras, raposas, entre outros, mas com manifestações clínicas diferentes daquelas descritas em humanos (Lin & Heitman, 2006). Apesar disso, não há nenhum caso de transmissão direta entre animais e humanos registrado (<http://www.cdc.gov/>).

A patogênese de *C. neoformans* ainda não é completamente compreendida, mas seus principais fatores de virulência já foram descritos. Sua cápsula polissacarídica é composta principalmente por glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) (Bhattacharjee *et al.*, 1984), que a tornam altamente hidratada devido a sua alta capacidade hidrofílica. Em sua composição também são encontradas manoproteínas, que agem como poderosas moduladoras da resposta imunológica (Murphy, 1998). A cápsula também é característica que o distingue de outros fungos patogênicos, variando de tamanho conforme seu estado de desenvolvimento, aumentando consideravelmente durante a infecção de mamíferos (Haynes *et al.*, 2011). Está relacionada à proteção do fungo, seja no meio ambiente, protegendo-o de amebas e outros predadores nematodas, ou durante a infecção de um hospedeiro, burlando o sistema imune devido à sua propriedade antifagocítica conferida pela acetilação de resíduos de manose.

Outra importante característica para sua virulência é a capacidade de sintetizar melanina. A melanina confere ao fungo estabilidade de sua parede celular, proteção contra radiação (UV, solar e gama), resistência ao calor e ao frio e a metais pesados, além de proteção contra o estresse oxidativo no interior de células fagocíticas, bem como maior resistência à anfotericina B (Wang *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 2003). Mutantes deficientes na produção de melanina foram gerados por radiação ultravioleta (UV) e testados em modelos murinos de infecção, nos quais se mostraram avirulentos. Em contrapartida, a reversão da capacidade de virulência foi obtida com a retomada da síntese de melanina (Kwon-Chung *et al.*, 1982).

A lacase é a enzima responsável pela síntese de melanina em *C. neoformans*, a partir dos mais diversos substratos, incluindo difenóis (como L-Dopa) e compostos indólicos. Duas são as enzimas envolvidas no processo de biossíntese

em *C. neoformans*: Lac1, localizada na parede celular, e Lac2, citoplasmática. Apesar de ambas participarem do processo, apenas a deleção de LAC1 acarreta em perda da melanização (Trofa *et al.*, 2011).

A capacidade de *C. neoformans* de crescer a 37° C é outro fator de virulência fundamental para qualquer patógeno invasivo de mamíferos. As primeiras investigações moleculares relacionadas ao crescimento em altas temperaturas demonstraram que mutantes de calcineurina A (*cnaA*) eram capazes de crescer normalmente a 30° C, mas não eram viáveis a 37° C, sendo avirulentos em vários modelos de infecção de mamíferos (Odom *et al.*, 1997). Vários outros genes também foram caracterizados como importantes para o crescimento em altas temperaturas e diretamente relacionados à virulência como VPH1, ATPase vacuolar, (Erickson *et al.*, 2001) e CCN1, envolvido na replicação e *splicing* (Chung *et al.*, 2003), além de diversos outros componentes de cascatas de sinalização como RAS1, CNB1, MPK1 e CTS1 (Alspaugh *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2003; Kraus *et al.*, 2003).

Mutantes dos genes TPS1 e TPS2, envolvidos na biossíntese de trealose, açúcar que atua como protetor da célula em condições de estresse, também apresentam fenótipo de crescimento a 30° C, mas inviabilidade e morte a 37° C (Wills *et al.*, 2003).

Chen e colaboradores (1997) descreveram a atividade da fosfolipase em *C. neoformans* e a relacionaram à capacidade de virulência. Linhagens capazes de secretar grandes quantidades de fosfolipase estavam associadas a uma maior disseminação em modelos murinos de infecção quando comparadas a outras que produzem baixas quantidades de fosfolipase.

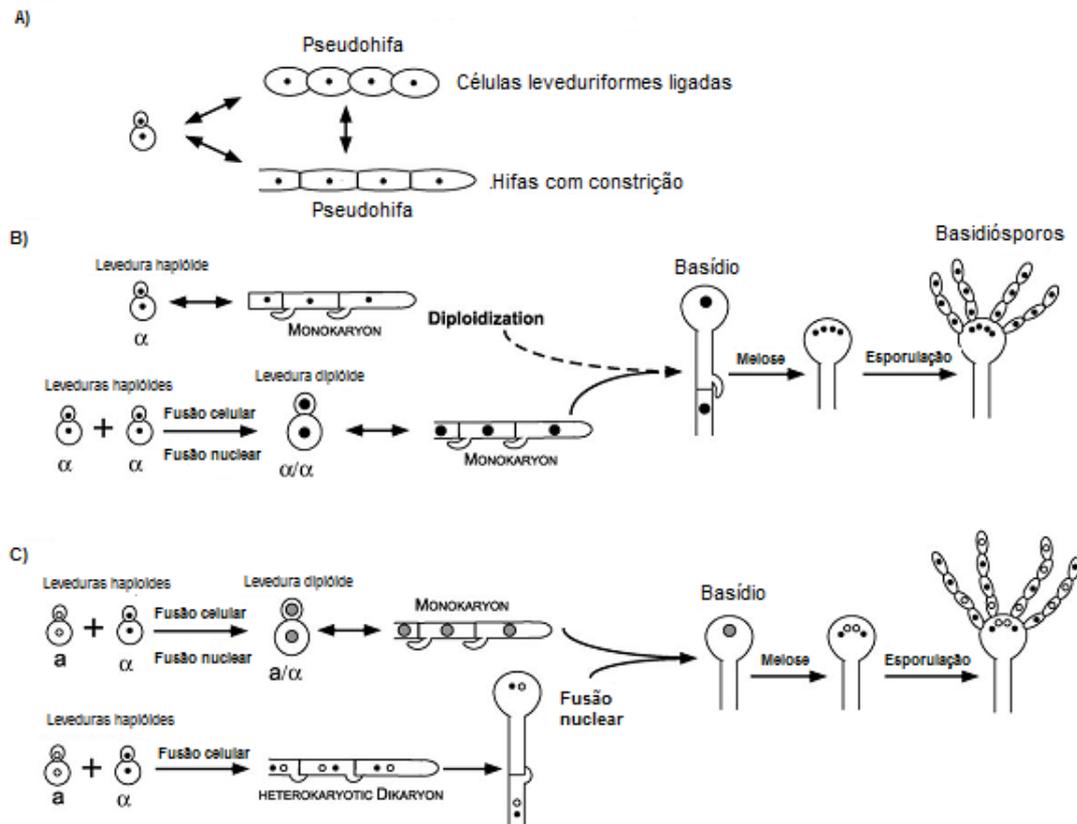
Por fim, a urease também é considerada um importante fator de virulência para *C. neoformans*. A produção dessa enzima extracelular é fundamental para a disseminação do fungo e invasão do sistema nervoso central do hospedeiro (Olszewski *et al.*, 2004).

1.2 Diferenciação morfológica de *C. neoformans*

C. neoformans geralmente cresce como uma levedura haplóide, capaz de diferenciar em hifas em condições ambientais severas ou na presença de um parceiro sexual oposto (Tschärke *et al.*, 2003). Este fungo pode variar sua morfologia de acordo com as fases de seu ciclo de vida, sendo que na fase

vegetativa ou assexuada, encontram-se leveduras que se reproduzem por brotamento ou ainda podem produzir pseudo-hifas ou gerar frutificação haploide com produção de hifas enquanto que na fase sexuada, ocorre acasalamento com formação de hifas. (**Figura 2**).

Figura 2 - Fases do ciclo de vida de *C. neoformans*. Fase vegetativa ou assexuada: (a) diferenciação em pseudohifas e (b) frutificação haploide, fase sexuada: (c) acasalamento.



Fonte: Adaptado de Lin, 2009.

A pseudohifa é uma forma intermediária de *C. neoformans* entre a célula leveduriforme e a hifa. Essa morfologia pode variar entre uma sequência de células leveduriformes alongadas e associadas umas as outras em forma de cadeia linear, e uma estrutura similar à hifa verdadeira com alguns septos (**Figura 2a**). As primeiras pseudohifas foram isoladas de co-culturas de *C. neoformans* com uma ameba típica de solo, *Acanthamoeba polyphaga* (Lin, 2009).

Em *Saccharomyces cerevisiae* acredita-se que as pseudohifas se formem em condições de limitação nutricional como uma forma de buscar por nutrientes devido à expansão de sua superfície de contato com o meio ambiente (Gimeno *et al.*, 1992). Em *C. neoformans*, a mesma hipótese não é descartada. Porém, sabe-se que

o microorganismo sob essa forma é capaz de resistir à fagocitose de amebas de solo, sugerindo que essa forma permita um mecanismo de escape natural de seus predadores (Lin, 2009).

Em 1975, Kwon-Chung identificou, pela primeira vez, o estado sexual de *C. neoformans* através da co-cultura de diferentes isolados clínicos em vários meios indutores de esporulação e quantificação da formação de hifas. Um trabalho de sua autoria também caracterizou os eventos morfológicos associados à formação de basidiósporos revelando um sistema de acasalamento bipolar, com dois tipos sexuais **a** e **α**, no qual uma recombinação meiótica ocorre entre as cepas (Hull & Heitman, 2002).

Células leveduriformes **a** e **α** secretam feromônios que desencadeiam fusão celular quando em limitação de nutrientes. A célula dicariótica resultante inicia seu crescimento filamentosos, enquanto os dois núcleos celulares parentais migram através da hifa. Septos se formam para separar as células, e um núcleo é transferido para a última célula da hifa através de uma conexão em forma de grampo e, em seguida, esta se funde a outra hifa. Os núcleos sofrem fusão celular formando um basídio que sofre meiose formando quatro produtos que dão origem a cadeias de basidiósporos através de mitoses. Outra possibilidade ocorre com a secreção de feromônios de células de tipos sexuais opostos que sofrem simultaneamente, fusão celular e nuclear que dão origem a uma levedura diplóide que é capaz de permanecer latente sob essa configuração até que seja possível o crescimento filamentosos. Assim, forma-se uma célula monocariótica septada que dá origem a um basídio que passa pelas mesmas etapas anteriormente mencionadas para formar basidiósporos (**Figura 2**).

A reprodução sexuada nos fungos é geneticamente regulada pelo locus de tipo sexual ou *mating-type locus* (*MAT*), uma região do genoma especializada e diferenciada entre os tipos sexuais. Sua estrutura foi primeiramente descrita em *S. cerevisiae* (Herskowitz & Oshima, 1981), sendo que em *C. neoformans*, o locus *MAT* é responsável pela codificação de mais de 20 genes precursores de proteínas como *Sxi1α* e *Sxi2a*, incumbidos de estabelecer a identidade sexual das células (Hull *et al.*, 2005).

C. neoformans é encontrado na natureza predominantemente na forma haplóide, e a reprodução sexuada (acasalamento e meiose) ocorre em resposta à limitação nutricional (deprivação de nitrogênio) ou a sinais específicos. Outros

estímulos ambientais também exercem influência sobre sua reprodução: extrato de vegetais, íons de cobre, excretas de pombo, limitação de nitrogênio, suco V8, ácido indolacético (IAA) e mio-inositol são componentes e condições que promovem o acasalamento; enquanto que luz, altas temperaturas, altos níveis de CO₂ e água são fatores inibidores de acasalamento (Hsueh *et al.*, 2011).

Segundo Xue e colaboradores (2007), nenhuma evidência de acasalamento ocorrendo na natureza ou em *Eucalyptus* foi encontrada. Porém, a interação de *C. neoformans* com plantas poderia estimular o acasalamento. Esses autores demonstraram em laboratório o acasalamento na superfície de plantas e em meios de cultura apropriados para cultivo de vegetais, sob a influência de dois componentes: mio-inositol e ácido indolacético.

A descoberta do suco V8 como meio de cultura para acasalamento em laboratório foi crucial para a investigação dos compostos envolvidos nesse processo. O meio de cultura V8 é derivado de um suco de oito vegetais e contém mio-inositol e íons de cobre, responsáveis pelo estímulo do acasalamento e pela indução da expressão de genes envolvidos na produção de ferormônios, respectivamente (Kent *et al.*, 2008).

Outra condição favorável ao acasalamento é a limitação de nitrogênio. Meios de cultura como o *super-low-ammonium dextrose* (SLAD), que contém apenas 50µM de (NH₄)₂SO₄ e agar *filament*, sem qualquer adição de fonte de nitrogênio, favorecem o acasalamento bem como permitem a filamentação haplóide de células de linhagens selvagens de *C. neoformans*. A capacidade de detectar nitrogênio é mediada por um transportador de amônio, Amt2, cujos mutantes são incapazes de desenvolver seu ciclo sexuado em condições de baixa oferta de amônio, enquanto essa capacidade não sofre qualquer alteração em outros meios indutores de acasalamento sem privação de nitrogênio como Murashige e Skoog, MS (Rutherford *et al.*, 2008). O acasalamento em excretas de pombo, ricas em ácido úrico, é bastante robusto em comparação a outros meios de cultura, o que sugere que este seja o nicho ecológico de *C. neoformans* (Nielsen *et al.*, 2007).

O meio Murashige e Skoog (MS), amplamente utilizado em culturas de tecidos vegetais, é extremamente eficaz na indução de esporulação em *C. neoformans*. Acredita-se que o composto responsável por essa indução também seja o mio-inositol (Xue *et al.*, 2007).

Além dos sinais nutricionais, outros fatores ambientais são capazes de influenciar a reprodução sexuada. A temperatura é um fator crucial visto que altas temperaturas inibem a transição de levedura para hifa, e assim, o acasalamento e a frutificação não ocorrem a 37° C (Sia *et al.*, 2000). No entanto, o mecanismo molecular ainda não é bem compreendido.

A luz é outro fator ambiental capaz de regular vários processos fisiológicos, como: ciclo circadiano, pigmentação e reprodução sexuada e assexuada em fungos. Em *C. neoformans*, a resposta à luz foi evidenciada em um experimento onde placas de acasalamento protegidas da luz apresentaram taxa de acasalamento elevada, enquanto placas expostas à luz contínua sofreram inibição desse processo. Os genes BWC1 e BWC2 são responsáveis por codificar fotoreceptores que regulam a resposta à luz (Idnurm & Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005).

Água e gás carbônico (CO₂) são outros dois sinais que influenciam no acasalamento de *C. neoformans*. Esse processo só foi observado em meios sólidos, nunca em meio líquido, o que indica uma preferência por condições secas. O gás carbônico tem diferentes participações no processo de acasalamento de acordo com sua disponibilidade. Altas concentrações bloqueiam a fusão celular durante o início do cruzamento devido a uma inibição na indução de genes que codificam feromônios, ao mesmo tempo concentrações mínimas de CO₂ são necessárias para a formação de basidiósporos, fundamental para o estágio final do desenvolvimento sexuado (Bahn *et al.*, 2005).

Algumas das cascatas de sinalização envolvidas na regulação da reprodução sexuada de *C. neoformans* são conservadas nos fungos em geral. Entre elas estão a cascata MAP kinase ativada por ferormônios e a via do AMP cíclico de sensoreamento de nutrientes.

A via de sinalização de ferormônio é conservada em Ascomicetos e Basidiomicetos. Estudos demonstraram homologia entre vários genes desta via de *S. cerevisiae* e *C. neoformans*. Esses genes incluem homólogos de GPA1 (Alspaugh *et al.*, 1997), STE12 (Wickes *et al.*, 1997), GPB1 (Wang *et al.*, 2000), STE11 (Clarke *et al.*, 2001), STE20 (Lengeler *et al.*, 2000), entre outros.

Em *C. neoformans* os genes codificadores de receptores de ferormônio de tipo sexual específico STE3 α e STE3 β são fundamentais para o sensoreamento de feromônios e desenvolvimento sexuado (Chang *et al.*, 2003). A expressão dos receptores de ferormônio ocorre principalmente nos estágios iniciais do

acasalamento (4-10 horas) e vai se reduzindo ao longo do tempo até seu nível basal (Chang *et al.*, 2003). Esses receptores são ligados às proteínas G heterotriméricas responsáveis pela transdução de sinal no interior da célula até a ativação da cascata de MAP kinase, responsável pelo acasalamento e necessária no processo de frutificação haploide, o que sugere o controle dessa via em ambos os processos de desenvolvimento de *C. neoformans* (Davidson *et al.*, 2003).

Outra via de sinalização envolvida no controle do acasalamento é a do AMP cíclico e PKA, envolvida também na síntese de dois importantes fatores de virulência: melanina e cápsula (Hull & Heitman, 2002). Mutações nos principais componentes dessa via como na subunidade *a* da proteína G Gpa1 ou na adenilciclase Cac1 causam defeitos severos no acasalamento de *C. neoformans* (Alspaugh *et al.*, 1997; Alspaugh *et al.*, 2002).

Há ainda outras cascatas que parecem estar envolvidas no processo de acasalamento, mas que precisam ser melhor investigadas a nível molecular, como a via de resposta ao estresse Hog1 que antagoniza a síntese de feromônio e o desenvolvimento sexuado. A deleção do gene HOG1 aumenta a filamentação e a produção de feromônio no sorotipo A (Bahn *et al.*, 2005).

A via de sinalização da calcineurina, essencial para o crescimento a 37° C, também atua no desenvolvimento sexual. Mutantes das subunidades catalítica (CNA1) ou regulatória (CNB1) apresentam fenótipo de acasalamento comprometido, incapaz de produzir hifas, apesar de sofrerem fusão celular entre as células haplóides, quando do cruzamento bilateral entre si (Cruz *et al.*, 2001).

Além do acasalamento, *C. neoformans* sofre diferenciação em filamentos para realizar a frutificação haplóide. Esse processo foi inicialmente investigado devido à predominância do fungo de tipo sexual α na população (>99%), o que aumentou as suspeitas de um tipo de reprodução originário de uma população unisexual (Kwon-Chung & Bennett, 1978). Trata-se de uma etapa assexuada que envolve a produção de esporos via mitose e que não ocorre exclusivamente em cepas de tipo sexual α . Experimentos realizados por Tschärke e colaboradores (2003) demonstraram a capacidade de cepas de tipo sexual *a* realizarem frutificação haploide quando em meio indutor favorável, bem como a relação de STE12*a* com esse processo ao ser super expresso em cepas incapazes de frutificar (cepa B-4476).

Células leveduriformes de mesmo tipo sexual se transformam em uma levedura diplóide por meio de fusão celular e nuclear ou endoduplicação. Uma hifa

diplóide monocariótica se forma com algumas conexões do tipo grampo rudimentares, que não chegam a se fundir com a hifa adjacente, e após a formação do basídio ocorre um processo de meiose que dá origem à cadeia de basidiósporos (**Figura 2**).

Acredita-se que a frutificação haplóide funcione como um mecanismo pelo qual *C. neoformans* busque nutrientes de forma análoga aos filamentos de pseudohifas, formados por *S. cerevisiae* em resposta à limitação de nitrogênio (Gimeno *et al.*, 1992). Esse processo também parece contribuir para a sobrevivência do microorganismo, pois produz esporos capazes de sobreviver a condições adversas devido a uma maior resiliência à desidratação e a outros estresses ambientais como mudanças de temperatura (Hull & Heitman, 2002; Bulmer, 1990).

Várias vias de sinalização estão relacionadas à frutificação haplóide, incluindo a via de sensores de feromônios. A deleção de alguns dos componentes dessa via como *Ste20 α* , o precursor de feromônio *MF α* , o receptor *Ste3 α* e até o fator de transcrição *Mat2* acarretam defeitos tanto na frutificação quanto no acasalamento (Lin *et al.*, 2010).

1.3 As proteínas *velvet* em fungos

Proteínas da família *Velvet* (*VeA*, *VelB*, *VosA* e *VelC*) foram primeiramente descritas por Käfer (1965) durante experimentos com mutantes gerados via raio X e radiação UV para investigação da origem de translocações em *Aspergillus*.

Essas proteínas são responsáveis pelo controle da ativação do desenvolvimento sexual, bem como pela inibição do desenvolvimento assexuado em *Aspergillus* (Champe *et al.*, 1981). As proteínas reguladoras dessa família são fatores transcricionais altamente conservados entre ascomicetos e basidiomicetos, e que regulam diferentes vias de sinalização em resposta a estímulos ambientais (Calvo, 2008; Bayram & Braus, 2012).

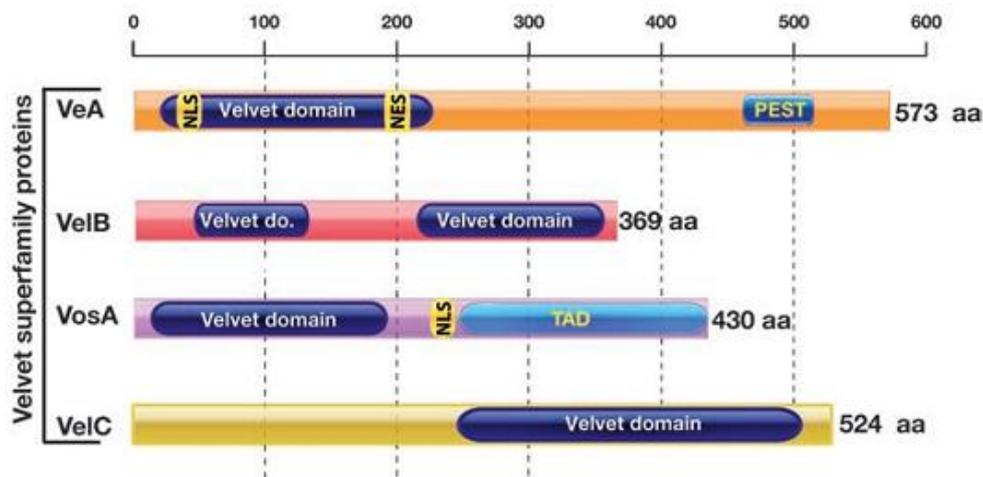
Bayram e Braus (2012) caracterizaram essa família de proteínas como fundamentais na coordenação do metabolismo secundário e em processos de diferenciação como esporulação assexuada e sexuada além da formação da esclera e corpo de frutificação de *Aspergillus*.

Genes ortólogos aos da família *Velvet* foram descritos também em *Histoplasma capsulatum*, um fungo patogênico dimórfico dependente de temperatura. *Ryp2* (homólogo de *VosA*) e *Ryp3* (homólogo de *VelB*) são cruciais

para a transição da fase filamentosa para a fase leveduriforme deste fungo (Webster & Sil, 2008).

Os quatro membros da família *velvet* dividem um domínio comum (*velvet domain*) presente em muitos organismos fúngicos, desde os quitrídeos até os basidiomicetos (**Figura 3**). Esse domínio compreende aproximadamente 150 aminoácidos onde dificilmente encontra-se algum motivo conhecido (Bayram & Braus, 2012).

Figura 3 - Arquitetura das proteínas *velvet* (VeA, VelB, VosA e VelC) em *Aspergillus nidulans*. TAD, domínio de ativação de transcrição; PEST, sequência rica em (P) prolina, (E) ácido glutâmico, (S) serina e (T) treonina; NLS, sinal de localização nuclear bipartite; NES, sinal de exportação nuclear; *Velvet domain*, domínio *velvet*.



Fonte: Adaptado de Bayram & Braus, 2012.

A proteína VeA de *A. nidulans* é composta de 573 aminoácidos e apresenta em seu domínio *velvet* um sinal de localização nuclear bipartite (NLS) e um sinal de exportação nuclear na porção N-terminal. Uma região PEST, rica em prolina, comum em proteínas instáveis, está localizada na região C-terminal de VeA (Bayram & Braus, 2012).

VeA foi caracterizado em *A. nidulans* como um regulador positivo do desenvolvimento sexuado, bem como um regulador negativo do desenvolvimento assexuado. Mutantes *veA* apresentam atraso e redução no desenvolvimento sexuado e na formação de estruturas típicas das formas sexuadas, enquanto observa-se aumento no desenvolvimento assexuado (Kim *et al.*, 2002). Sabe-se que a regulação do desenvolvimento é dependente de luz (Calvo, 2008). Esse gene também está envolvido na produção de metabólitos secundários de algumas

espécies de *Aspergillus*. A deleção de *veA* em *Aspergillus flavus* está relacionada ao defeito na produção de aflatoxina (Amaike & Keller, 2009). Além disso, experimentos com mutantes *veA* demonstraram a formação de conídios na ausência de luz, ao contrário de cepas selvagens de fungos que dependem da luz vermelha para induzir a conidiação (Mooney & Yager, 1990).

O mutante *veA* do patógeno humano oportunista *Aspergillus fumigatus* leva a uma alteração no metabolismo secundário e na formação de esporos assexuados, resultando em um processo de esporulação dependente da disponibilidade de nitrogênio (Krappmann *et al.*, 2005).

Outros ascomicetos possuem genes homólogos a *veA* que desempenham os mais variados papéis. O mutante do homólogo FvVE1 de *Fusarium verticilloides* resulta em um aumento dos macroconídios, em relação aos microconídeos além de uma perda de integridade da parede celular. Esses mutantes também são incapazes de sintetizar as micotoxinas fumonisina e fusarina (Myung *et al.*, 2009). O mutante *veA* de *Neurospora crassa* aumenta sua taxa de esporulação assexuada enquanto reduz a biosíntese de carotenoides (Bayram *et al.*, 2008).

A proteína VelB é a menor entre todas da família *velvet*, com apenas 369 aminoácidos em *A. nidulans*. Ao contrário de *VeA*, *VelB* não possui nenhum dos sinais NLS ou NES e sua importação para o núcleo é dependente de *VeA*. Essa proteína carrega dois domínios *velvet*, um na porção N-terminal e outro na porção C-terminal (Bayram & Braus, 2012).

VelB é uma proteína relacionada à regulação dependente de luz no desenvolvimento de fungos e ao metabolismo secundário de *A. nidulans*. Nesse fungo, *VelB* interage com outras proteínas *velvet*, *VeA* e *VosA*. O complexo dimérico *VelB-VosA* está presente em hifas vegetativas e atua assim que o desenvolvimento sexuado é iniciado. Além disso, esse complexo está intimamente relacionado à produção de trealose, importante açúcar envolvido na viabilidade de esporos (Bayram *et al.*, 2008).

Estudos recentes de *VelB* em *A. nidulans* descreveram sua participação como regulador positivo do desenvolvimento assexuado, bem como uma atuação na maturação de esporos e biogênese de trealose. A interação no complexo *VelB-VosA* também acontece nesse fungo, agindo não só na biossíntese de trealose como no processo de germinação de conídios. Mutantes *velB* apresentam acúmulo elevado de pigmentos marrons e a diminuição de conídios (Park *et al.*, 2012).

VelC é uma das maiores proteínas da família, com 524 aminoácidos e apresenta um domínio velvet em sua porção C-terminal (Bayram & Braus, 2012). VelC é também necessária para o correto desenvolvimento de *A. nidulans*. Dentre a família de proteínas velvet, VelC é a mais recente descoberta e ainda não tem sua função muito bem caracterizada, sendo que a sua deleção resulta em um leve aumento na formação de corpos de frutificação sexuais (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010).

VosA, proteína de viabilidade de esporos A (*viability of spores A*) em *A. nidulans*, é uma proteína composta por 430 aminoácidos e, assim como VeA, carrega o domínio velvet em sua porção N-terminal. Apesar de possuir o sinal NLS de localização nuclear, não está ligada ao transporte de VelB para o núcleo (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). VosA está localizada principalmente no núcleo de conídios maduros e possui um domínio potencial de ativação transcricional em sua porção C-terminal, o que o torna um provável fator transcricional que controla o fim do processo de esporogênese, incluindo a biosíntese de trealose (Yu, 2010).

A proteína VosA, expressa nas métulas e nas fiáides de *A. nidulans*, possui duas funções principais: ativação de genes envolvidos na maturação de esporos e regulação negativa do gene *brlA* e de outros genes específicos envolvidos no desenvolvimento sexual do fungo (Yu, 2010).

VosA foi caracterizada como um forte repressor do desenvolvimento assexuado em *A. nidulans* (Bayram & Braus, 2012). Mutantes *vosA* de *A. nidulans* apresentam ativação incontrolada da fase assexuada e corpos de frutificação sexuada (cleistotécio) defeituosos contendo esporos inviáveis com redução drástica da tolerância ao calor e a H₂O₂. Além disto, VosA é necessário para regulação dos genes da biosíntese de trealose e para seu acúmulo tanto em esporos sexuais quanto assexuais (Ni & Yu, 2007). A diminuição da quantidade de trealose resulta em uma rápida diminuição do citoplasma, desintegração de organelas e, a longo prazo, perda da viabilidade (Yu, 2010).

O mutante de *ryp2*, órtologo de *vosA* em *H. capsulatum*, está envolvido na transição dimórfica, na resposta a elevadas temperaturas, na regulação da esporulação e na viabilidade de esporos e (Webster & Sil, 2008). Apesar dos estímulos de ativação, luz e temperatura, nas vias regulatórias de *A. nidulans* e *H. capsulatum* serem diferentes, os resultados finais são bem similares nos mutantes

vosA/ryp2: regulação do desenvolvimento celular durante o ciclo sexual e morfogênese.

A trealose, um dissacarídeo produzido por diversos organismos tais como bactérias, fungos, plantas e invertebrados, está diretamente ligada à esporulação em fungos. Esse açúcar é capaz de aumentar a resistência ao calor, desidratação e dissecação, além de outros estresses, impedindo a desnaturação de importantes proteínas para a sobrevivência da célula. Além disso, a trealose também pode atuar como uma capa protetora durante condições de estresse (Petzold *et al.*, 2006).

Estudos realizados com a levedura *S. cerevisiae* mostraram que a via de trealose é composta por um complexo de sete proteínas. A trealose é sintetizada em duas etapas por meio de duas enzimas T6P sintase, codificada pelo gene TPS1 (tralose-6-fosfato sintase) e pela T6P fosfatase, codificada pelo gene TPS2, capaz de converter glucose-6-fosfato via T6P em trealose. Assim, a trealose é transportada para o local onde for necessária na célula. A trealase neutra, codificada pelo gene NTH1, hidrolisa a trealose utilizada em duas moléculas de glicose após ser transportada de volta ao citosol (Petzold *et al.*, 2006; Ngamskulrungraj *et al.*, 2009).

Em *C. neoformans* sabe-se que, assim como em *S. cerevisiae*, T6P sintase e T6P fosfatase possuem funções distintas, porém sobrepostas na termotolerância, glicólise e virulência. Mutantes *tps1* de *C. neoformans* tiveram a expressão de alguns fatores determinantes de virulência como cápsula e melanina alterados, bem como foram observadas alterações no acasalamento, na integridade da parede celular e na secreção de proteínas. Em contrapartida, mutantes *nyh1* não tiveram qualquer alteração em seu fenótipo ou virulência em relação às cepas selvagens (Chaturvedi & Chaturvedi, 2011).

Devido à ausência de ortólogos envolvidos na biossíntese de trealose em mamíferos e à importância desse dissacarídeo na patogênese fúngica, proteínas associadas a esse processo vêm sendo consideradas potenciais alvos para antifúngicos (Park *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, uma crescente demanda vem promovendo a busca por novos alvos para uma terapia antifúngica mais eficaz. Essa demanda é consequência da problemática mundial de resistência aos antifúngicos comercialmente disponíveis, da incapacidade desses antifúngicos atuarem em alguns fungos patogênicos ou ainda do grave problema de toxicidade/efeitos colaterais causados pelas drogas existentes. Assim, esses estudos recentes têm

como ponto de partida os resultados de pesquisa básica para a busca de alvos, genes que codificam proteínas presentes nos patógenos e ausentes em humanos, a fim de que se tenha uma intervenção antifúngica mais eficaz, com menos efeitos colaterais no hospedeiro.

Utilizando-se de ferramentas de bioinformática, foi realizada uma comparação (Blastp) das seqüências preditas das proteínas *velvet*, dentre elas VosA, utilizando o banco de dados de humanos no NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (*Homo sapiens*). Essas proteínas muito conservadas e específicas de fungos não foram identificadas em humanos. Os dados moleculares experimentais gerados nesse trabalho, visam entender o papel de VOSA na morfogênese, viabilidade e patogenicidade de *C. neoformans*, e são um excelente ponto de partida para o estudo desta família gênica para uma melhor caracterização da biologia deste microorganismo.

2 OBJETIVOS

- Elucidar a função do gene VOSA na virulência, morfogênese e patogenicidade do fungo *C. neoformans* por meio de deleção gênica;
- Avaliar os padrões de expressão de genes envolvidos em diferentes processos biológicos do fungo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens e meios de cultura utilizados

3.1.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens de *C. neoformans* variedade *grubii* KN99a e KN99α sorotipo A. Experimentos de virulência em macrófagos utilizaram a linhagem de macrófagos peritoniais J774.A1 (ATCC TIB-67).

3.1.2 Meios de cultura

3.1.2.1 Meio YPD: para cultivo de *C. neoformans*

Extrato de levedura	1 %
Glicose	2 %
Peptona	2%

O potencial hidrogeniônico (pH) utilizado foi 5,6 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

3.1.2.2 Meios de cultura para testes fenotípicos

a) Meios Congo Red, Cloreto de sódio (NaCl), Cloreto de potássio (KCl), Sorbitol, Cafeína, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Nitrito de Sódio (NaNO₂), Peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Meio YPD adicionado de 0,5% e 1% de Congo Red; 1,5 M NaCl; 1,5 M KCl; 2 M de Sorbitol; 0,5 mg/mL e 1 mg/mL de Cafeína; 0,1 %, 0,01 % e 0,05 % de SDS; 2 mg/mL e 4 mg/mL de NaNO₂; 1,5 mM e 5 mM de H₂O₂.

O pH utilizado foi 5,6 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

b) Meio Sabouraud ácido líquido

Extrato de carne	0,5 %
Peptona	0,5 %
Glicose	4 %

O pH utilizado foi 5,6 - Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

c) Meio Niger Seed

Semente de Niger	5 %
Glicose	0,1 %
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,1 %

Creatinina 0,1 %
 Agar bacteriológico 1,5 %
 Autoclavagem a 120 °C por 20 minutos.

d) *Christiansen's Urea Agar* – Meio para teste de urease

Peptona 1 %
 Cloreto de Sódio 5 %
 KH₂PO₄ 2 %
Phenol Red 0,2% 8 mL
 Uréia 20 %
 Dextrose 1 %

O pH utilizado foi 5,6 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

e) Meio emulsão gema de ovo – Meio para teste de fosfolipase

Peptona 1 %
 Glicose 2 %
 Cloreto de sódio 1 M
 Cloreto de cálcio 0,005 M
 Agar bacteriológico 2%

Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos. Em seguida, resfriado a 55 °C para adição da emulsão gema de ovo (50 % gema de ovo, 50 % salina).

3.1.2.3 Meios de cultura indutores de acasalamento em *C. neoformans*

a) Meio V8

Suco V8 0,5 %
 KH₂PO₄ 0,05 %
 Agar bacteriológico 4 %

Os pHs utilizados foram 5 e 7 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

b) Meio Agar Filament

YNB 0,67 %
 Agar bacteriológico 4 %

Os pHs utilizados foram 5 e 7 – Autoclavagem a 120 °C por 40 minutos.

Após autoclavagem adição 2,5 % de glicose 20 %.

c) Meio comercial Murashige e Skoog (MS) – Xue *et al.*, 2007.

Meio MS 0,44 %

Agar bacteriológico 4 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

d) Meio Core – Kent *et al.*, 2008.

Fosfato de potássio (pH 6,5) 4 mM

Dextrose 0,7 %

Frutose 0,7 %

Agar bacteriológico 4 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

e) Meio SLAD (*Synthetic Low Ammonium Dextrose*)

YNB 0,17 %

Sulfato de amônio 5 µM

Agar bacteriológico 2 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 40 minutos.

Após autoclavagem, adição de glicose na concentração final de 2 %.

f) Meio SMAD (*Synthetic Medium Ammonium Dextrose*)

YNB 0,17 %

Sulfato de amônio 500 µM

Agar bacteriológico 2 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 40 minutos.

g) Meio SHAD (*Synthetic High Ammonium Dextrose*)

YNB 0,17 %

Sulfato de amônio 5 mM

Agar bacteriológico 2 %

O pH utilizado foi 5 – Autoclavagem a 120 °C por 40 minutos.

3.2 Análise *in silico* do gene VOSA de *C. neoformans* utilizando o banco genômico disponível

As seqüências genômica e protéica de VOSA (CNAG_06580.2) de *C. neoformans*, disponíveis no banco de dados Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html), foram identificadas através da comparação da sequência de VosA de *A. nidulans* (número de acesso do NCBI: ABI51618), utilizando a ferramenta BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e posteriormente confirmadas com a anotação do gene do próprio banco genômico. Para comparação com outros homólogos da família dos genes *velvet* de vários fungos selecionados (**Tabela 1**), fez-se o alinhamento múltiplo das seqüências proteicas por meio da ferramenta *CLUSTALW algorithm* (www.ebi.ac.uk/clustalw/) e buscou-se por domínios conservados utilizando-se a ferramenta *BLASTp* conforme informações listadas na **Tabela 1**. O alinhamento permitiu a construção de árvores filogenéticas via software MrBayes 3.1 para estabelecimento da relação filogenética entre os organismos testados.

Tabela 1 - Lista de microrganismos utilizados para comparação de seqüências de aminoácidos.

Organismo	Número de acesso NCBI
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	ACB59236
<i>Ajellomyces dermatitides</i>	XP_002626302
<i>Aspergillus flavus</i>	ADE45325
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ABQ18268
<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001247759
<i>Coccidioides posadasii</i>	XP_003065699
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_001833919
<i>Cryptococcus gattii</i>	XP_003194572
<i>Cryptococcus neoformans H99</i>	CNAG_06580.2
<i>Cryptococcus neoformans JEC21</i>	XP_571398
<i>Emericella nidulans</i>	ABI51618
<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001266895
<i>Neurospora crassa</i>	XP_957154
<i>Penicillium marneffeii</i>	XP_002151266
<i>Ustilago maydis</i>	XP_757040 XP_398508

Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foi realizada uma investigação mais detalhada na estrutura e composição da proteína VosA de *C. neoformans*. Seus domínios foram estabelecidos e posteriormente analisados e comparados com aqueles já conhecidos na proteína homóloga de *Aspergillus* (Park *et al.*, 2012; Bayram e Braus, 2012).

A presença e localização de domínios *velvet* na proteína VosA de *C. neoformans* foi obtida através do *software* Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/> - Punta *et al.*, 2012), enquanto a investigação da presença do domínio TAD foi realizada pelo *software* *9aaTAD* *Prediction* *Tool* (www.es.embl.org/Services/EMBNAT/htdoc/9aatad/). A predição do fator NLS foi obtida através do *software* *NLS Predictor* (mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi). O motivo PEST de VosA foi buscado com auxílio do *software* *EPestfind* (emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind) e o sinal de exportação nuclear foi varrido pelo *software* *NetNES* (www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/ - La Cour *et al.*, 2004).

Por fim, as sequências dos domínios *velvets* de todas as proteínas desta família de *C. neoformans* foram alinhadas via *ClustalW*, comparadas e checadas manualmente. Em seguida, construiu-se um cladograma comparativo entre estas proteínas através do *software* *Phylogeny.fr* (<http://www.phylogeny.fr/version2.cgi/index.cgi>) para que fosse possível relacioná-las evolutivamente.

3.3 Avaliação da função gênica de VOSA através de deleção gênica no modelo *C. neoformans*.

3.3.1 Construção do cassete de deleção do gene VOSA de *C. neoformans*

O cassete de deleção gênica para obtenção dos mutantes *knock out* foi construído via PCR *double-joint* segundo Kim *et al.*, 2009. Selecionou-se a sequência do gene VOSA a partir do banco de dados do Broad Institute (CNAG_06580) para que fosse possível a construção do cassete. As sequências iniciadoras e terminadoras foram definidas delimitando a região a ser deletada, 1kb acima e abaixo da localização da ORF.

Foram utilizados oito oligonucleotídeos para que fosse possível a amplificação dos fragmentos através de PCR (**Tabela 2**). A posterior transformação do cassete foi realizada por biobalística em células leveduriformes haplóides KN99 α .

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados no estudo de VOSA em *C. neoformans* (continua).

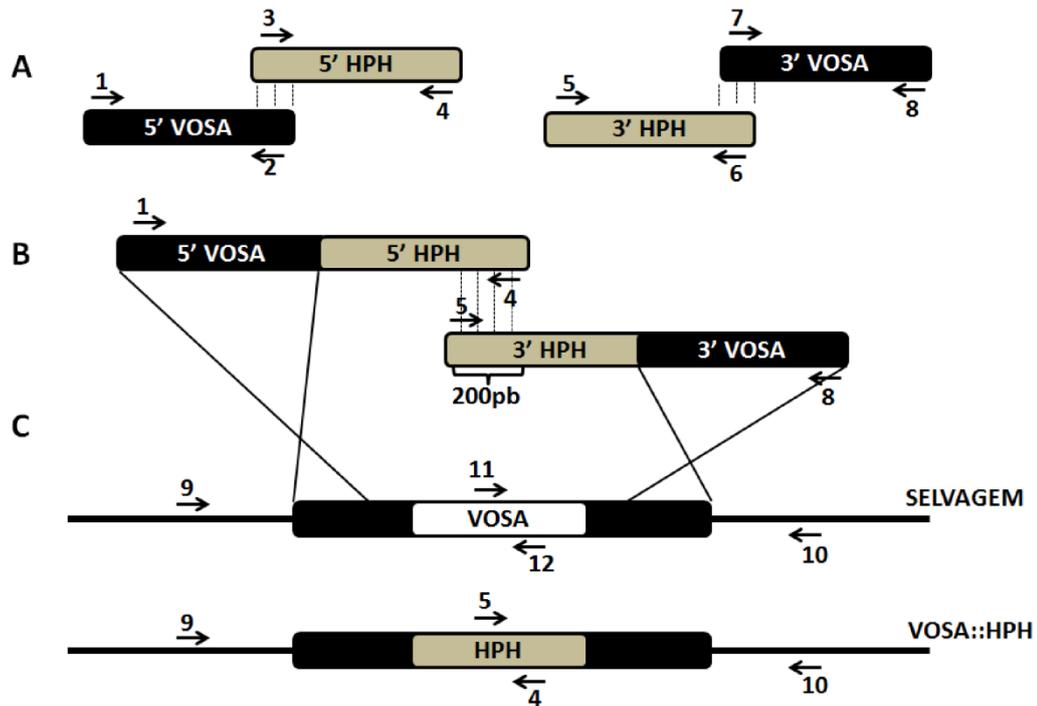
Primer	Template	Sequência	TM (°C)	Uso
LF020	M13Re	CAGGAAACAGCTATGACATGAT	58	Double Joint PCR
LF021	M13Fen	GTAAAACGACGGCCAGTGC	60	Double Joint PCR
LF028	NSLhph	GCGGGAGATGCAATAGGTCAG	66	Double Joint PCR
LF029	NSRhph	AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT	66	Double Joint PCR
LF038	CnACTR	CGGCAGAAGTGGTGAAGAGG	64	PCR em tempo real
LF039	CnACTF	CCACGCTATCCTCCGTATCG	64	PCR em tempo real
LF060	CnVosA_7	GCTGTGAGGTCTCTCCCTCTT	66	Overlap/ Double Joint PCR
LF061	CnVosA_10	CACAGGCAACGGTCTAGTTTG	66	Overlap/ Double Joint PCR
LF062	5'vosAF	GAAGAGACGATGGGGTAATGG	64	Double Joint PCR
LF064	M13Rec/5'vosAR	ATCATGTCATAGCTGTTTCCTGGAG GATAAGGGTTGGAAGGTG	64	Double Joint PCR
LF067	M13Fenc/3'vosAF	GCACTGGCCGTCGTTTTACCCT CATTGTACCGAACCCAG	64	Double Joint PCR
LF068	3'vosAR	GGGCAGCAGGTAGATGACATA	64	Double Joint PCR
LF087	VOSARTR	CGCAGCTGTTGACATTCC	56	PCR em tempo real
LF088	VOSARTF	TTGAGATTGTCGATCAAGAAGTG	64	PCR em tempo real
LF225	VOSARTnR	TGCATTGGGTATGGTGGGTAA	62	PCR em tempo real
LF232	VOSARTnF	TCTGCCTCCTCCAGGGTATGT	66	PCR em tempo real
LF257	CnGAT_F	GGACTTTTCTATAAATTGCACGG	64	PCR em tempo real
LF258	CnGAT1_R	CCGCTCGGTTTCTTTTCTTAATA	64	PCR em tempo real
LF259	CnVeART_F	GAAAACGAGACTATTGACCGACG	68	PCR em tempo real
LF260	CnVeART_R	CCAAAAGTTGCTCTGGGGTG	62	PCR em tempo real
LF265	CnVelCF_RT	GCCTCGACAGATCCCCATTT	62	PCR em tempo real
LF266	CnVelCR_RT	TTGCGCTGCTCTATCGTTCTT	62	PCR em tempo real
LF273	CnVelBRT_F	GTTTGCTTAGAACGTATCGCATCAC	66	PCR em tempo real
LF274	CnVelBRT_R	GGGGAAAGTGGTAACCGAGAG	66	PCR em tempo real

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para que a construção do cassete de deleção fosse possível, a reação de amplificação ocorreu em duas etapas (**Figura 4**). Na primeira etapa (**Figura 4a**), utilizou-se a Enzima Fast DNA Polimerase, a partir da qual foi preparado um mix contendo: 1 X da enzima Fast Polimerase (Fermentas); 0,5 μM de cada oligonucleotídeo A e B 10 μM ; 10 ng de molde (DNA genômico de *C. neoformans* KN99 α) para amplificação dos fragmentos 1 + 2 (região 5' flanqueadora de VOSA) e 7 + 8 (região 3' flanqueadora de VOSA) e pPZPhyg para amplificação dos fragmentos 3 + 4 (região 5' do marcador seletivo HPH, controlado por promotor de actina e terminador de TrpC ambos de *C. neoformans* e 5 + 6 (região 3' do marcador seletivo HPH) e água *milliQ* suficiente para completar o volume final de 50 μL . Nesta etapa ocorreu a amplificação dos fragmentos 1 + 2 (LF062/LF064), 3 + 4 (LF020/LF028), 5 + 6 (LF029/L021) e 7 + 8 (LF068/LF067) representados na **Figura 4a**. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na **Tabela 2**. O ciclo utilizado foi: 95 °C – 1 min – 1 vez, 95 °C – 5 seg, 58 °C – 5 seg, 72 °C – 1 min, repetidos 40 vezes, 72 °C – min – 1 vez e, 4 °C até o fim da reação.

Na segunda etapa (**Figura 4b**) foi realizada a amplificação para fusão dos fragmentos 1 + 2 / 3 + 4 e 5 + 6 / 7 + 8 em duas reações distintas. Nesta etapa foi feita uma PCR *Overlap* para obtenção dos fragmentos 1 + 4 (1 + 4 – equivalente a região flanqueadora 5' de VOSA fusionada à região 5' do marcador seletivo HPH) e 5 + 8 (5 + 8 – equivalente à região flanqueadora 3' de VOSA fusionada à região 3' do marcador seletivo HPH), que deveriam ter tamanhos de 2.116 pb e 2.128 pb, respectivamente. Todas as reações foram checadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % Para amplificação dos fragmentos citados foram utilizados os oligonucleotídeos LF062 + LF028 e LF068 + LF029 de acordo com a **Tabela 2**. Para tais reações utilizou-se Enzima Platinum (Invitrogen) 1 U/ reação; 0,5 μM de cada oligonucleotídeo, Concentrações variáveis MgSO_4 de 2,4 e 6 mM, 0,2 mM de dNTPs; e tampão 1 X, Volume final de 50 μL . O ciclo foi de: 94 °C - 1 min – 1 vez, 94 °C – 15 segundos, 56 °C – 15 segundos, 68 °C – 4:20 minutos, repetidos 40 vezes, 68 °C – 5 minutos – 1 vez e por último a etapa de 4 °C para finalizar. Os fragmentos 1 + 4 e 5 + 8 foram purificados do gel (GFX purification kit), seguindo as recomendações do fabricante e utilizados para a transformação por biobalística.

Figura 4. Representação da técnica de PCR *Double joint*. (A) Os oligonucleotídeos 1 e 2 amplificaram a região 5' do gene VOSA enquanto o par 7 e 8 foi utilizado para amplificação da região 3' de VOSA, ambas reações utilizando DNA genômico de KN99alpha como molde. As regiões 5' e 3' de HPH foram amplificadas usando os pares 3 e 4 e 5 e 6, respectivamente e como molde o plasmídeo pPZPHYG. (B) Amplificação da região 5' de VOSA fusionada a região 5' de HPH, utilizando os oligonucleotídeos 1 e 4, sendo os molde os fragmentos 1 + 2 e 3 + 4 obtidos na etapa anterior e da região 3' de VOSA fusionada a região 3' de HPH utilizando os oligonucleotídeos 5 e 8, sendo os molde os fragmentos 5 + 6 e 7 + 8 obtidos na etapa anterior. (C) Os fragmentos 1 + 4 e 5 + 8 foram co-transformados em leveduras de *C. neoformans*. Existe uma região de 200 pb de sobreposição entre os fragmentos de HPH que recombinará *in vivo* após a transformação do fungo.



Fonte: Modificado de Kim *et al.*, 2009.

3.3.2 Transformação de *C. neoformans* por biobalística para obtenção dos mutantes *vosAaΔ* e *vosAαΔ*

Colônias isoladas das linhagens KN99a e KN99α de *C. neoformans* foram inoculadas em YPD líquido *overnight* e lavadas com solução salina para serem inoculadas em placas de YPD+ Sorbitol 1 M a serem transformadas.

Para preparação das partículas (tungstênio M10, diâmetro de 0,7 μm, Biorad), com DNA a ser transformado, realizou-se as seguintes etapas: 1. Esterilização das partículas: pesou-se 30 mg de partículas e adicionou-se 1 mL de etanol 70%. A mistura foi agitada em vortex por 20 minutos, velocidade máxima e centrifugada à velocidade máxima por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 mL de água milliQ estéril. O precipitado foi ressuspendido e centrifugado à velocidade máxima por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o processo de lavagem foi repetido outras duas vezes. Após a última lavagem, o

sobrenadante foi descartado e as partículas ressuspensas em 500 µL de glicerol 50% estéril. 2. Precipitação do DNA a ser transformado nas partículas: as partículas estéreis foram sonicadas por 7 minutos para que desgrumassem e em seguida foram agitadas (velocidade máxima) em vortex por 2 minutos. Acrescentou-se na seguinte ordem: 50 µL de partículas estéreis, 5 µL de DNA (quantidade total variou de 0,5 a 1 µg), 50 µL de CaCl₂ (2,5 M) estéril, 20 µL de espermidina (0,1 M, Sigma) estéril. Essa mistura foi levada ao vortex por 10 minutos, agitação branda e, em seguida, centrifugada por 10 segundos à velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 150 µL de etanol absoluto às partículas. Centrifugou-se por 10 segundos à velocidade máxima e esse processo foi repetido mais duas vezes. Ao final da última lavagem, adicionou-se uma quantidade de etanol absoluto em volume múltiplo de 4 µL de acordo com a quantidade de placas a serem bombardeadas (por exemplo, 3 tiros, 12 µL de etanol absoluto; 4 tiros, 16 µL de etanol absoluto; e assim por diante). As partículas foram sonicadas por 3 segundos, e 4 µL foram imediatamente distribuídos nas membranas carreadoras estéreis já encaixadas nos discos carreadores que, em seguida, foram incubados em sílica, onde permaneceram por pelo menos 30 minutos até o momento do bombardeamento.

Os parâmetros utilizados para a transformação foram: distância de 6 cm do alvo, pressão do gás Hélio a 1.200 psi (são utilizadas 4 membranas de 300 psi para cada tiro) e pressão de vácuo a 27 mmHg. Após o bombardeamento, as placas foram embaladas em papel alumínio e incubadas a 30 °C por 48 h. Após esse período, foram lavadas com YPD líquido e as células inoculadas em placas com meio seletivo, Higromicina B (200 µg/ml, Invitrogen). Após 72 h de incubação a 30 °C os transformantes foram transferidos para uma nova placa de YPD contendo Higromicina B para confirmação da estabilidade. O DNA genômico dos possíveis transformantes foi extraído conforme protocolo para posterior confirmação via PCR tradicional.

3.3.3 Extração do DNA genômico (DNAg) de *C. neoformans*

Para a extração do DNAg de *C. neoformans*, células foram cultivadas *overnight* em 5 mL de YPD líquido a 30 °C. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 6 minutos a 4000 rpm. O precipitado foi ressuspensado em 1,5 mL de água estéril e centrifugado à velocidade máxima durante 5 minutos e seu

sobrenadante descartado. Adicionou-se 0,5 mL de fenol:clorofórmio (Bioagency), 0,5 mL de tampão TENTS (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 % Triton X-100, 1 % SDS) e pérolas de vidro (diâmetro:400-600 µm, Sigma). Os tubos foram agitados em vortex por 10 minutos e logo em seguida submetidos à centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima. A fase aquosa obtida foi transferida para um novo tubo onde adicionou-se 50 µL NaOAc 3 M e 1 mL de etanol absoluto para precipitar o DNA. Agitou-se o tubo e centrifugou-se em velocidade máxima por 15 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µL de etanol 70 % (v/v) e agitou-se novamente antes de centrifugar novamente por 5 minutos à velocidade máxima. Em seguida, o excesso de álcool foi removido com auxílio de uma pipeta e os tubos foram secados a temperatura ambiente por 5 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL H₂O MilliQ, acrescida de RNase A (150 µg/mL) e incubou-se os tubos a 37 °C por 1 h e depois todos foram armazenados no freezer (-20 °C).

3.3.4 Confirmação da deleção de VOSA

Para confirmação da integração do cassete de deleção VOSA::HPH no locus de VOSA foram utilizados oligonucleotídeos desenhados externamente às regiões de VOSA escolhidas para construção do cassete de deleção, e combinados com oligonucleotídeos que reconhecem a região do marcador seletivo HPH, conforme listados na **Tabela 2**. Para as amplificações utilizou-se a Enzima Fidelity Taq 2X (Fermentas) (1 X), 0,25 µM de cada oligonucleotídeo (variável de acordo com cada par de cada reação, LF061 + LF029 para região 5' e LF028 + LF060 para região 3'; 10 ng de molde (DNA genômico dos transformantes escolhidos aleatoriamente, que tornaram-se resistentes a Higromicina B), e água suficiente para volume final de 20 µL. O ciclo utilizado foi: 94 °C – 1 min – 1 X , 94 °C – 30 seg, 57 °C – 30 s, 68 °C – 3 min, repetidos por 40 X e como últimas etapas do ciclo 68 °C – 5 min – 1X e 4 °C – até que a reação estivesse completa.

3.3.5 Confirmação dos mutantes *vosAαΔ* e *vosAαΔ* por Southern Blot

Após a confirmação da deleção da ORF de VOSA nos mutantes, via PCR, realizou-se a confirmação com a técnica de Southern Blot. Realizou-se a extração de DNA de alta qualidade e em grande quantidade, por liofilização, conforme Pitkin *et al.*, 1996. Resumidamente, células foram cultivadas *overnight*, sob agitação em

culturas de 50 mL de YPD líquido a 30 °C. Após a incubação, as células foram centrifugadas à temperatura ambiente por 10 minutos, a uma velocidade de 2000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi congelado a -80 °C, *overnight*. As amostras foram liofilizadas por cerca de 10 h, até que adquirisse uma forma bem seca e vaporizada. Após a liofilização, adicionou-se de 3 a 5 mL de pérolas de vidro (3 mm; VWR #3000) aos tubos e agitou-se em vortex vigorosamente até que se formasse um pó bem fino. Foram adicionados 10 mL de tampão CTAB (Tris 100 mM, NaCl 0,7 M, EDTA 10 mM, Brometo de hexadecilmetilamônio 1 % (m/v), 2-mercaptoetanol 1 % (v/v), pH= 7,5), misturou-se gentilmente até que a solução se tornasse uniforme e levemente viscosa. Incubou-se a 65 °C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em água corrente e adicionou-se igual volume de clorofórmio. Mais uma vez, misturou-se gentilmente. Os tubos foram centrifugados à velocidade máxima por 10 minutos à temperatura ambiente e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se igual volume de isopropanol ao sobrenadante e agitou-se gentilmente e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70 % (v/v). Após esse procedimento, ressuspendeu-se o DNA com água *milliQ RNase free* acrescida de RNaseA 20 µg/mL. Incubou-se por meia hora a 37 °C e o DNA foi congelado para posterior conferência de integridade via eletroforese em gel de agarose.

3.3.5.1 Digestão do DNAg e o Southern blot

O DNA genômico extraído dos mutantes *vosAaΔ* e *vosAαΔ* confirmados por PCR foi quantificado e diluído para 2 µg/µL, sendo utilizado o total de 20 µg de DNA para cada digestão com a enzima selecionada ClaI: 20 µL de DNA (2 µg/µL), 5 µL de tampão NEB 4 10 X, 8 µL de enzima ClaI 5 U/µL (Biolabs) e 17 µL de água *milliQ*.

A eletroforese foi realizada em TAE 1X (40 mM de tris-acetato, 1 mM EDTA), 0,8 % de agarose e 10 µg de DNA genômico digerido. A sonda também foi aplicada no gel, na quantidade de 10 ng. A voltagem da cuba foi ajustada de acordo com o padrão de 1-5 V por cm² da área total do gel. Ao final da corrida, o gel foi fotografado e depurinado (250 mM de HCl) por 10 minutos sob agitação leve. Após este período, a solução foi descartada e uma nova lavagem com tampão de denaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) foi realizada sob agitação leve por 30 minutos. Por fim, foi

realizada a lavagem para neutralização do gel com tampão apropriado (NaCl 1,5 M, Trisma Base 0,5 M pH 7,5), por 30 minutos.

Após o tratamento, foi montado um aparato de transferência por capilaridade com recipientes de vidro, papel filtro, SSC 20 X (Citrato de sódio dihidratado 0,3 M, Cloreto de sódio 3 M, pH 7). O gel foi colocado sobre o papel filtro imerso em SSC 20 X e, sobre ele, foram colocados uma membrana de nylon e várias folhas de papel filtro, de tamanho exatamente igual ao do gel, de mais uma tampa de vidro e de um peso. Assim, o tampão SSC foi capaz de subir por capilaridade pelo papel filtro, passar pelo gel e transferir o DNA para a membrana. A transferência ocorreu *overnight*.

No dia seguinte, aparato foi desmontado e o gel utilizado como molde para marcação de poços na membrana e levado ao transiluminador para que fosse possível conferir a eficiência da transferência. A membrana foi levada ao forno de *cross-link* de modo que a superfície com as amostras ficasse voltada para a luz UV. A membrana foi submetida a 3 pulsos de 1200 J/cm².

A membrana foi hibridizada por meio do kit *Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* da GE Healthcare. O tampão de hibridização (NaCl 0,5 M, Reagente bloqueador 4 % - 0,125-0,5 mL de tampão por cm² de gel) foi preparado conforme protocolo e levado ao agitador magnético por 1-2 horas. Antes de ser utilizado o tampão foi aquecido a 55 °C.

A marcação da sonda foi realizada logo antes do processo de hibridização em quantidade proporcional ao volume do tampão de hibridização. O fragmento de DNA correspondente (10 ng/μL) foi desnaturado em água fervente separadamente enquanto a solução *cross-linker* do kit foi diluída para 20 % em um volume também proporcional à quantidade de tampão de hibridização em novo tubo. O DNA foi incubado em gelo por 5 minutos e levado a uma centrífuga por 30 segundos. Em seguida, foi adicionado mesmo volume de tampão de reação ao DNA resfriado. Adicionou-se então o reagente de marcação 20 % seguido da diluição da solução *cross-linker*. A mistura foi agitada gentilmente e incubada por 1 hora a 37 °C.

Após esse período foi realizada a pré-hibridização e a hibridização *overnight* com o auxílio de um forno que mantém o movimento contínuo da solução sobre a membrana impedindo a formação de bolhas. A membrana foi colocada dentro do tubo de hibridização, seguida pelo tampão e o tubo foi levado para o forno por 10 minutos a 55 °C para pré-hibridização, assim como o *ependorf* com a sonda

marcada. Em seguida, a sonda foi adicionada cuidadosamente ao tampão e a membrana e foram incubados *overnight*.

No dia seguinte o tampão com a sonda marcada foi retirado do tubo e a membrana foi submetida a uma lavagem com tampão primário (Ureia 2 M, SDS 0,1 %, Fosfato de sódio 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, Cloreto de magnésio 1 mM, Reagente bloqueador 0,2 %) por 10 minutos a 55 °C. Após esse período o tampão foi descartado e o processo repetido. A membrana foi então retirada do tubo e levada a um recipiente com tampão de lavagem secundário 1X (Tris base 1 M, NaCl 2 M, pH 10, diluído 1:20 e adicionado de Cloreto de magnésio 2 mM) onde foi agitada, manualmente, à temperatura ambiente, por 5 minutos. Essa etapa também foi repetida.

Após as lavagens, a membrana foi preparada com detector do kit (30-40 µL de detector/cm²) por 5 minutos e embalada em papel filme. Em seguida, foi colocada no cassete de revelação. O processo de revelação foi realizado em ausência de luz, com exceção de uma luz infravermelha. O filme de revelação foi colocado no cassete e deixado para sensibilização *overnight*. Finalmente, o filme foi retirado do cassete e imerso em solução reveladora e fixadora, respectivamente, até que o resultado estivesse satisfatório. Ao final, a membrana foi lavada em água destilada e submetida à análise.

3.4 Reconstituição do locus de VOSA

Alguns dos procedimentos utilizados nessa etapa são os mesmos descritos anteriormente para obtenção dos mutantes *vosAaΔ* e *vosAαΔ*. Inicialmente, amplificou-se o locus VOSA (3,8 kb) via PCR utilizando-se os oligonucleotídeos LF062 e LF068 (**Tabela 2**) com a enzima FideIITaq (Fermentas) no volume final de 50 µL (FideIITaq Mix 2 X, 10 µM de cada oligonucleotídeo LF062 e LF068, 10 ng DNA genômico de KN99a e água *milliQ*). O ciclo utilizado para a amplificação foi: 94 °C – 1 minuto – 1 X, 94 °C – 30 segundos, 60 °C – 30 segundos, 68 °C – 4 minutos, repetidas 35 X, 68 °C – 5 minutos – 1 X, 4 °C até o fim da reação. O fragmento correspondente foi eluído do gel de agarose 0,8 % com auxílio do *kit GFX Purification Kit (GE)* e, em seguida, quantificados no Genequant®. Em seguida, a 3 µg do fragmento foi adicionado 1,5 µg do plasmídeo pJAF (5,8 kb, marca de seleção, resistência à Neomicina), na proporção molar de 3:1 (fragmentos: plasmídeo) para serem co-transformados nos mutantes *vosAaΔ* de *C. neoformans*.

A preparação de partículas e o procedimento de biobalística ocorreram conforme descrito anteriormente. O vetor pJAF possui a marca de seleção para neomicina/geneticina, assim a seleção dos transformantes foi realizada em YPD + geneticina 200 µg/mL.

O DNA genômico das colônias obtidas foi extraído conforme descrito anteriormente. A confirmação da reconstituição do locus de VOSA foi realizada por meio de amplificação da região 5'VOSA e da região 3'VOSA das cepas que foram capazes de crescer em geneticina e incapazes de crescer na presença de Higromicina B. Os fragmentos obtidos dos PCRs confirmatórios apresentaram os tamanhos respectivamente de 2,7 Kb (oligonucleotídeos LF060 + LF225) e 1,9 Kb (oligonucleotídeos LF061 + LF232) (**Tabela 2**).

Para amplificação da região 5' foram feitas reações de volume final 25 µL com a enzima Fidelity Taq (Fermentas) (10 ng DNA genômico, Fidelity Taq mix 2 X, 10 µM de cada oligonucleotídeo (*forward* e reverso) e água *milliQ* até o volume final de 50 µL). O ciclo utilizado foi 94 °C – 1 minuto – 1 X, 94 °C – 30 segundos, 58 °C – 30 segundos, 68 °C – 3 minutos, repetidos 40 X, 68 °C – 5 minutos – 1 X e 4 °C até o fim da reação.

As cepas que tiveram amplificação confirmada da região 5' de VOSA foram submetidas à amplificação da região 3' com a seguinte reação: 25 µL de volume final em cada reação, com a mesma composição da primeira etapa. O ciclo utilizado foi 94 °C – 1 minuto – 1 X, 94°C – 30 segundos, 60 °C – 30 segundos, 68 °C – 2:15 minutos, repetidos 40 X, 68 °C – 5 minutos – 1 X e 4 °C até o fim da reação.

Após a confirmação por PCR, os transformantes positivos foram testados em cruzamentos de acasalamento para que se pudesse avaliar a capacidade de recuperação de fenótipo.

3.5 Avaliação fenotípica *in vitro* dos mutantes *vosAa*Δ e *vosAα*Δ

Mutantes *vosAa*Δ e *vosAα*Δ foram inoculados em 5 mL de meio YPD e incubados *overnight* a 30 °C sob agitação para crescimento. Após o crescimento as células foram centrifugadas e lavadas com solução salina e ressuspensas em 1 mL de água estéril. As amostras foram diluídas 1:100 para contagem na Câmara de Neubauer. Para a realização dos testes fenotípicos estabeleceu-se a concentração inicial padrão de 1x10⁵ células/mL. A partir da concentração padrão foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 1x10¹ células/mL. Para a visualização de

defeitos na parede e produção de cápsula e melanina, alíquotas de 10 µL de cada uma das diluições foram plaqueadas nos diferentes meios de cultura. Todos os testes fenotípicos foram realizados em triplicata. Os testes de fenótipo em condições de estresse osmótico, térmico e oxidativo foram realizados conforme experimentos prévios de Al-Bader *et al.*, 2010.

3.5.1 Capacidade de crescimento a 37 °C

As leveduras foram plaqueadas em meio YPD sólido (acrescido de 1,5 % de ágar bacteriológico) em conjunto com linhagens selvagens para controle e incubadas a 30 e 37 °C por 48-72 h.

3.5.2 Síntese de melanina

A produção de melanina foi avaliada por meio do inóculo de leveduras em meio Agar Níger (5 % de extrato de semente de Niger, 0,1 % de glicose, 0,1 % de KH₂PO₄, 0,1 % de creatinina, 1,5 % ágar bacteriológico) e submetidas a crescimento a 30 e 37 °C por aproximadamente 7 dias.

3.5.3 Produção de cápsula

A produção de cápsula foi avaliada após crescimento das leveduras em meio Sabouraud ácido (0,5 % de peptona de caseína, 0,5 % de extrato de carne, 4 % de glicose – pH 5.6) diluído 10 X em MOPS (50 mM) e incubadas em alta atmosfera de CO₂, posteriormente foi realizada a visualização das células microscopicamente com tinta nanquim (Granger *et al.*, 1985).

3.5.4 Produção de urease

A produção de urease foi avaliada após incubação de 1x10⁵ células de levedura em meio *Christiansen's Urea Agar* (1 % de peptona, 5 % NaCl, 2 % KH₂PO₄, 8 mL de *Phenol Red* 0,2 %, 20 % de ureia, 1 % de dextrose) a 30 °C por 48-72 h.

3.5.5 Produção de fosfolipase

A capacidade de sintetizar fosfolipase foi avaliada após incubação de 1x10⁷ células de levedura em meio de emulsão de gema a 35 °C por 48 horas. Em seguida, os halos formados pelas colônias foram aferidos com auxílio de uma régua

e a razão diâmetro da colônia/diâmetro da colônia e halo, de cada uma das cepas, foi comparada (Chen *et al.*, 1997).

3.5.6 Integridade da Parede celular

A determinação de possíveis defeitos na síntese de parede celular dos mutantes *vosAaΔ* e *vosAαΔ* foi realizada após o inóculo de leveduras crescidas em YPD ágar, acrescido de 0,5 % e 1 % de *Congo Red* e incubadas a 30 e 37 °C durante 48-72 h, visto que linhagens que apresentam defeito na constituição e organização da parede celular apresentam dificuldade de crescimento nesse meio de cultura (Roncero & Durán, 1985).

Testes fenotípicos com estressores de parede também foram realizados adicionando-se ao meio YPD sólido: NaCl (1,5 M), KCl (1,5 M), Sorbitol (2 M), SDS (0,1 %, 0,05 % e 0,01 %) ou cafeína (0,5 mg/mL e 1 mg/mL). As placas foram incubadas a 30 e 37 °C durante 48-72 h.

3.5.7 Estresse oxidativo

O efeito de agentes oxidativos sobre os mutantes *vosAaΔ* e *vosAαΔ* foi testado em meio YPD, acrescido peróxido de hidrogênio, H₂O₂ (0,5 mM e 1 mM) e NaNO₂ (2 mg/mL e 4 mg/mL). Em ambos os testes as placas foram incubadas a 30 e 37 °C durante 48-72 h.

3.5.8 Estresse osmótico

O efeito de agentes osmóticos sobre os mutantes *vosAaΔ* e *vosAαΔ* foi testado em meio YPD, acrescido de NaCl e KCl 1,5 M. Em ambos os testes as placas foram incubadas a 30 e 37 °C durante 48-72 h.

3.5.9 Estresse térmico

O efeito de altas temperaturas sobre os mutantes *vosAaΔ* e *vosAαΔ* foi testado em meio YPD. Em ambos os testes as placas foram incubadas a 30, 37 e 39 °C durante 48-72 h.

3.5.10 Acasalamento

Foi avaliada a capacidade das leveduras haplóides de realizarem acasalamento (quando em contato com o tipo sexual oposto) em meio Agar V8, Agar

Filament, meio Murashige and Skoog, meio Core e meio SLAD (Kent *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2007).

As leveduras cresceram *overnight* a 30 °C sob agitação e, no dia seguinte, foi feito o co-cultivo de acordo com os cruzamentos desejados a partir de um estoque padrão de 1×10^7 células/mL. Para cada cruzamento foi plaqueado um *spot* de 5 μ L. As placas foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro, por cerca de 21 dias e observadas em lupa e microscópio para o aparecimento de hifas indicativas de acasalamento.

3.6 Análise microscópica da morfologia de leveduras e hifas de mutantes *vosA α* Δ e *vosA α* Δ

As cepas selvagem, mutante e reconstituída foram inoculadas *overnight* em YPD líquido, sob agitação, a 30 °C e lavadas com salina estéril. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de salina estéril e alíquotas de 10 μ L foram distribuídas em lâminas para que fosse possível avaliar microscopicamente a morfologia e o diâmetro das leveduras. Utilizou-se microscópio Zeiss Axio Observer Z1, sendo que as imagens foram captadas em campo claro e DIC. Com o auxílio do software do próprio microscópio, Zen Pro 2011, o diâmetro das células de cada uma das cepas foi medido, de forma aleatória, sendo $n = 50$. Os valores obtidos foram plotados em um gráfico utilizando o software GraphPad Prism 5.

Da mesma forma, co-cultivos de cruzamentos KN99 α vs. KN99 α , KN99 α X *vosA α* Δ e KN99 α X *vosA α* Δ mantidos por 3 semanas, no escuro e em meio Filament, tiveram suas hifas cuidadosamente extraídas com auxílio de um bisturi e colocadas em lâminas para análise no microscópio. As hifas também foram fotografadas em campo claro e DIC. Com o auxílio do software do microscópio, o diâmetro central das hifas foi medido para posterior comparação, $n = 30$, os valores também foram plotados em gráfico do GraphPad Prism 5.

3.7 Curva de crescimento em meios com diferentes concentrações de nitrogênio

Analisou-se a capacidade de crescimento das cepas selvagem, mutante e reconstituída em diferentes meios de cultura: YPD, Filament, SLAD, SMAD e SHAD, cujas concentrações de nitrogênio são variáveis.

O crescimento foi avaliado através dos valores de turbidez a 600 nm a partir de um inóculo inicial de 1×10^6 células/mL, crescidas previamente *overnight* em meio YPD líquido, a 30 °C, sob agitação. As amostras foram incubadas sob agitação a 30 °C, sob agitação, e a leitura da turbidez foi realizada nos tempos: 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

3.8 Avaliação de virulência *in vitro* de mutante *vosAaΔ*

A partir de uma cultura saudável de macrófagos J774.A1 (não confluentes e de número de passagem inferior a dez), as células foram descoladas da garrafa com auxílio da solução Cell Dissociation Solution (SIGMA) e a suspensão de células foi centrifugada a 200 x g por 5 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado e os macrófagos foram ressuspensos em 1,5 mL de DMEM + SFB 10 %. Uma alíquota de macrófagos foi diluída 1:10 em PBS contendo azul de tripano (estoque 10 X) e as células não coradas foram contadas em um hematócrito de modo a abranger apenas as células viáveis.

Ajustou-se a concentração de macrófagos para 5×10^5 células/mL em meio DMEM + SFB 10 % contendo ampicilina a 50 µg/mL e estreptomicina a 100 µg/mL. O volume final da suspensão foi calculado de acordo com o número de poços usados.

Em uma placa de 96 poços estéril, foi aplicado 100 µL da suspensão por poço. Fez-se três replicatas para cada condição e cepa, além de três poços para o controle negativo que não receberam células fúngicas. A placa foi incubada *overnight* a 37 °C e CO₂ a 5 %. Nesse mesmo dia, as cepas de interesse de *C. neoformans* foram inoculadas em meio YPD e incubadas sob agitação, 200 rpm, *overnight*, a 30 °C.

No dia seguinte, as células fúngicas foram lavadas com PBS estéril, contadas e diluídas em meio DMEM, em uma concentração de 1×10^6 células/mL. O anticorpo anti-GXM 18B7 foi adicionado à suspensão fúngica em uma concentração final de 10 µg/mL, de modo a opsonizá-las

A placa com macrófagos foi inspecionada em um microscópio e levada para o fluxo onde o meio velho foi retirado. A suspensão de células fúngicas e anticorpo foram distribuídos em cada um dos poços em novas alíquotas de 100 µL.

Em seguida, a placa foi centrifugada por 10 minutos, 200 x g e incubada a 37 °C, 5 % CO₂ por 2 horas, para permitir que ocorresse o processo de fagocitose. Em

seguida, o meio foi retirado da placa e cada um dos poços foi lavado cuidadosamente com PBS estéril. Novas alíquotas de 100 µL de meio DMEM + SFB 10 % foram distribuídas entre os poços e a placa foi incubada *overnight* na estufa a 37 °C, 5 % de CO₂. No dia seguinte, a placa foi inspecionada quanto à presença de contaminantes e o meio de cultura contendo *C. neoformans* não-fagocitados foi recolhido e armazenado em um *ependorf* estéril. Os macrófagos remanescentes na placa foram lisados com auxílio de uma solução de SDS 0,5 %. A suspensão da lise foi recolhida. O lisado celular foi diluído 1:100 em PBS estéril e inoculado, para cada replicata, 100 µL da diluição em meio YPD sólido. As placas foram incubadas a 30 °C por um período de até 48 horas. As UFCs (Unidades formadoras de colônias) de cada replicata foram contadas para avaliar a taxa de sobrevivência das cepas no interior dos macrófagos. Esse experimento foi realizado em replicatas experimentais e biológicas. Os resultados foram analisados com auxílio do software GraphPad Prism 5.

3.9 *Investigação por PCR em tempo real da expressão de genes velvet nos mutantes vosAaΔ*

As linhagens: selvagem (KN99a), mutante (*vosAaΔ*) e reconstituída (*vosAaΔ::VOSAa*) foram inoculadas individualmente, em diferentes meios de cultura (YPD, Filament, V8, Core, MS, SLAD, SMAD e SHAD) por 48 h, no escuro, à temperatura ambiente, e o RNA total de cada uma das cepas foi extraído após raspagem das colônias nas placas para avaliação da resposta transcricional dos genes VOSA (LF225/LF232), VEA (LF259/LF260), VELB (LF273/LF274) e VELC (LF265/LF266). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados nessa investigação estão listados na **Tabela 2**.

3.9.1 Extração de RNA total para PCR em tempo real

Todo o procedimento foi realizado utilizando materiais RNase *free*. As células crescidas nas condições acima descritas foram ressuspensas em 1 mL de solução de TRI Reagent® RNase *free*, aproximadamente 5×10^6 células. Adicionaram-se pérolas de vidro (425-600 µm – Sigma) até aproximadamente a marca de 0,5 mL de um *ependorf* de 2 mL. Os *ependorfs* foram agitados em vortex por 10 minutos, também em velocidade máxima e, em seguida, foram centrifugados por 5 minutos, velocidade máxima, à temperatura ambiente. Colheu-se o sobrenadante e incubou-

se por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRI Reagent® e misturou-se, sem auxílio de vortex. A mistura foi incubada por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 12000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo *ependorf* onde foi adicionado 500 µL de isopropanol para cada 1 mL de TRI Reagent®, agitado em vortex por 10 segundos e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. A amostra foi centrifugada por 8 minutos, a 4 °C, 12000 x g. O sobrenadante foi removido com muito cuidado para que não se perturbasse o precipitado. O precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) e centriugado por 5 minutos, a 4 °C, 7500 x g. O sobrenadante foi descartado e o excesso de álcool removido com o auxílio de uma pipeta. Os *ependorfs* foram deixados no fluxo, abertos, para que os pellets pudessem secar. Por fim, os pellets de RNA foram ressuspendidos em 30 µL de água *milliQ RNase free*, incubados por 5 minutos a 60 °C para que houvesse a diluição total e congelados para posterior avaliação de sua integridade através de eletroforese em gel de agarose 1 % em TAE 1 X e quantificação a 260 nm.

3.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) para PCR em tempo real

O cDNA foi gerado a partir dos RNAs obtidos na extração. Não foi necessário o tratamento com DNase pois os oligonucleotídeos utilizados no experimento de Real Time foram desenhados na junção éxon-éxon. Para a transcrição reversa utilizou-se o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription®* (Applied Biosystems) e o procedimento foi conduzido conforme instruções do fabricante. Para transcrição reversa, foram utilizados 400 ng de RNA (em 10 µL – 0,4 µg/µL) para cada reação cujo volume final foi de 20 µL (0,8 µL de 25 X dNTPs mix, 2 µL de 10 X RT Buffer, 2 µL de RT Random Primers, 1 µL de Multiscribe Reverse Transcriptase, 1 µL de Inibidor de RNase, 3,2 µL de água *milliQ RNase free*). O programa utilizado foi: 25 °C – 10 minutos, 37 °C – 120 minutos, 85 °C – 5 segundos, 4 °C até o fim da reação. Cada uma das amostras foi diluída na proporção 1:3 em água *milliQ RNase free* para que pudessem ser utilizadas na reação de PCR em tempo real.

Os materiais utilizados nos experimentos de Real Time são específicos para o aparelho (Applied Biosystems – 7500 Fast Real-Time PCR System): *MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode* (0,1mL), *Microamp® Optical Adhesive Film*. O kit utilizado foi o *Fast SYBR® Green Master Mix* (Invitrogen). Cada

uma das amostras foi preparada segundo a reação (2 μ L de cDNA diluído 1:3, 0,4 μ M do oligonucleotídeo 1, 0,4 μ M do oligonucleotídeo 2, 5 μ L de *Fast SYBR Green PCR Master Mix 2 X*). Todos os oligonucleotídeos utilizados estão listados na **Tabela 2**, incluindo os oligonucleotídeos, utilizados para amplificação do gene da actina (LF38/LF39), gene constitutivo escolhido como controle. Os resultados obtidos foram processados pelo programa 7500 Software V2.0.3, e a análise dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism 5.

3.10 Investigação por PCR em tempo real da expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em resposta a meios de diferentes concentrações desse metabólito no mutante vosAa Δ

As linhagens: selvagem (KN99a), mutante (vosAa Δ) e reconstituída (vosAa Δ ::VOSAa) foram inoculadas individualmente, em diferentes meios de cultura com variadas concentrações de nitrogênio (YPD, Filament, SLAD, SMAD e SHAD) por 48 h, no escuro, à temperatura ambiente, e o RNA total de cada uma das cepas foi extraído após raspagem das colônias nas placas para avaliação da resposta transcricional do gene GAT1 (LF257/LF258). Os oligonucleotídeos utilizados nessa investigação estão listados na **Tabela 2**.

Os procedimentos de extração de RNA total, síntese de cDNA e processamento por PCR em tempo real foram realizados como descrito anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise *in silico* do gene VOSA de *C. neoformans* utilizando o banco genômico disponível

As seqüências genômica e protéica de VOSA (CNAG_06580.2) de *C. neoformans*, disponíveis no banco de dados Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html), foram utilizadas para comparação com outros homólogos da família dos genes *velvet* de alguns fungos selecionados, utilizando-se a ferramenta BLASTp. A determinação de regiões e domínios conservados foi realizada por alinhamento das seqüências obtidas por meio da ferramenta CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) e checadas manualmente para determinação de domínios e regiões conservadas (**Figura 5**). O alinhamento permitiu a construção de árvores filogenéticas via software MrBayes 3.1 para estabelecimento da relação filogenética entre esses genes e os organismos testados.

O alinhamento múltiplo das seqüências proteicas de diferentes fungos patogênicos revelou um alto grau de conservação dentro deste grupo. Em contrapartida esse gene não foi identificado no genoma humano (Lobsanov *et al.*, 2004). O alinhamento revelou alta conservação na região N-terminal das seqüências (**Figura 5**).

Figura 5. Alinhamento múltiplo comparativo da sequência protéica de VosA com as de diferentes fungos patogênicos (% de identidade com a sequência de *C. neoformans*). A. c = *Ajellomyces capsulatus* (37 %); A. d = *Ajellomyces dermatitides* (34 %); C.i = *Coccidioides immitis* (39 %); C. p = *Coccidioides posadasii* (39 %); A. f = *Aspergillus fumigatus* (39 %); N. f = *Neosartorya fischeri* (39 %); A. fl = *Aspergillus flavus* (39 %); E. n = *Emericella nidulans* (37 %); P. m = *Penicillium marneffei* (35 %); C. c = *Coprinopsis cinerea* (49 %) Cn = *Cryptococcus neoformans* H99; C.n = *Cryptococcus neoformans* JEC21 (80 %); C.g = *Cryptococcus gattii* (89 %); N.c = *Neurospora crassa* (33 %); *Ustilago maydis* (39 %). A região N-terminal, altamente conservada, está em destaque em vermelho.

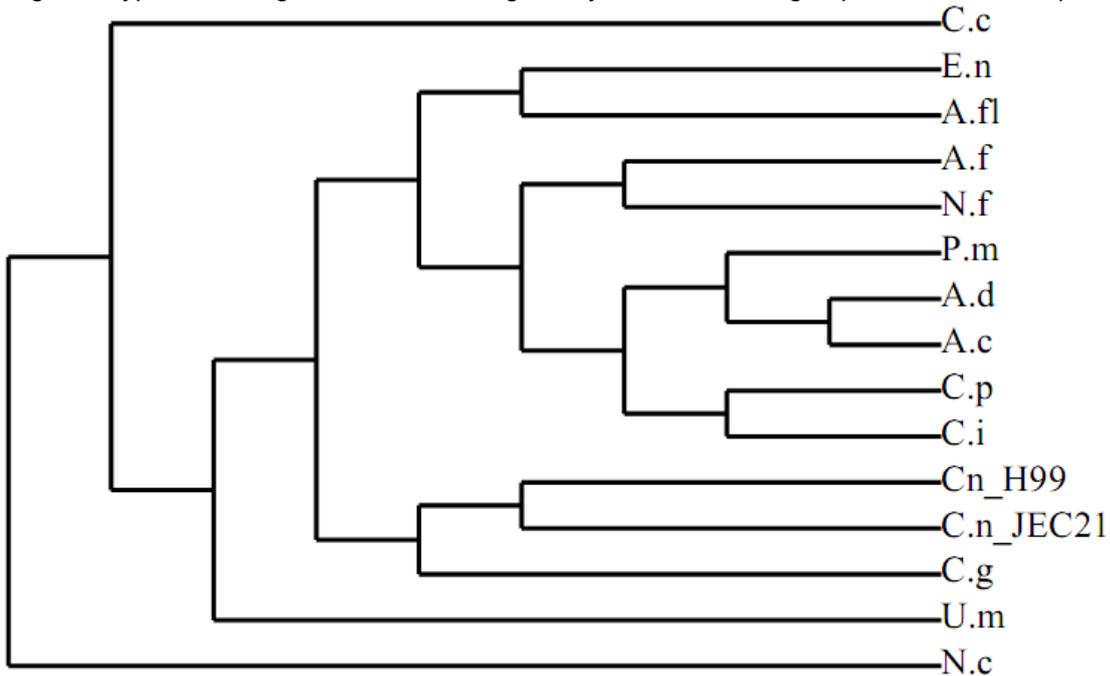
A. c	PERARVAGGK---EKERKAVDPPPIIQLKIDES-KDPGQN-----	65
A. d	PERARVAGGK---EKERKVPDPPPIIQLKIDET-KDPGQN-----	65
C. i	PERARVAGGK---EKERKVPDPPPIIQLRVRDE-SDPSHN-----	64
C. p	PERARVAGGK---EKERKVPDPPPIIQLRVRDE-SDPSHN-----	64
A. f	PNRARVAGGK---EKERKVPDPPPIVQLRVREEGSYLAQH-----	64
N. f	PNRARVAGGK---EKERKVPDPPPIVQLRVREEGSYLAQH-----	53
A. fl	PTRARVAGGK---EKERKVPDPPPIVQIRVREDGTYLAQH-----	64
E. n	PNRARVAGGK---EKERKVPDPPPIVQIRVREEGTYLAQH-----	64
P. m	PEQARVAGGK---EKERKVPDPPPIVQLKVLPESSYLAQH-----	55
C. c	PKQARMCGVGG---KADRRPIDPPPIVQLRVIDPAANERRRRNEANGSPAPNADDDSLDNS	84
Cn	PVQARMCGIGD---KSDRRPVDPTPIIQLKVIDP----QGDDITSIDPQTKQQIRRPSSGS	57
C. n	PVQARMCGIGD---KSDRRPVDPTPIIQLKVIDP----QGDDITSIDPQTRQQIRRPSSGS	57
C. g	PVQARMCGIGD---KSDRRPVDPTPIIQLKVIDP----QGDDITSIDPQTKQQIRRPSSGS	57
U. m	PKQSRMCGVGE---KADRRPIDPAPIVQLRVVTHDRPIRQSDPVGSASVAPPVERRPQGQA	123
N. c	PLRARACGSGPKSSADRRPVDPPPVLRLRIFEGESFEMAQERD-----	86
A. c	-----YLQSPFYFMCCTLYN--ATEDTPATTA---QST	93
A. d	-----YLQSPFYFMCCTLYN--ATEDTPATTA---QST	93
C. i	-----YLQSPYYFMC CGLHH--PTEDRPAPVP---AST	92
C. p	-----YLQSPYYFMC CGLHH--PTEDRPAPVP---AST	92
A. f	-----YLQSPYYFMC CSLYD--ANEDQPVVPV---PAT	92
N. f	-----YLQSPYYFMC CSLYD--ANEDQPVVPV---PAT	81
A. fl	-----YLQSPYYFMC CSLFD--PSDDVPVPV---PST	92
E. n	-----YLQSPYYFMC CSLYD--AQEDAPASIP---PST	92
P. m	-----YLQSPYYFMC CNLYH--ATEDHPVHSSQ---PST	84
C. c	YA-----QSFLQNPYYFMFASLAK--PDDDAELHHLKDGRT	119
Cn	EG-----MTYMQNPYYFLFACLVGG--EEQEDELHVIDDGKTR	93
C. n	EG-----MTYMQNPYYFLFACLVGG--EEQEDELHVIDDGKTR	209
C. g	EG-----MTYMQNPYYFLFACLVGG--DEQEDELHVIDDGKTR	93
U. m	AAPQTPGVRRLPVTTALGDGVEDKAWYLENPYYFMYAMLCN--ADTDEELHLLNDGKTR	181
N. c	-----VTFQYNANFFLYATLEHARVMAQGRLLQTPSANTPP	121
A. c	ALAGTLVSSLHRLKDTDNM--EGGFFVFGDLSVKIEGEFRLKFNLFEMREVKRCGGSRDE	151
A. d	ALAGTLVSSLHRLKDTDNM--EGGFFVFGDLSVKIEGEFRLKFNLFEMREVKRCGGTRDE	151
C. i	ALAGTLVSSLHRLKIDNS--DGGFFVFGDLSVRVEGEFRLKFNLFEMR-----KDE	142
C. p	ALAGTLVSSLHRLKIDNS--DGGFFVFGDLSVRVEGEFRLKFNLFEMR-----KDE	142
A. f	ALAGTLVSSLHRLKVDNN--DGGFFVFGDLSVKIEGEFRLKFTLFEMR-----KDV	142
N. f	ALAGTLVSSLHRLKVDNN--DGGFFVFGDLSVKIEGEFRLKFTLFEMR-----KDV	131
A. fl	ALTGTLVSSLHRLKVDNN--DGGFFVFGDLSVKVEGDFRLKFTLFEMR-----KDM	142
E. n	ALTGTLVSSLHRLKVDNT--DGGFFVFGDLSIKVEGDFRLKFSLFEMR-----KTD	142
P. m	ALAGTLVSSLHRLKDTDNM--DGGFFVFGDLSIKVEGEFRLQFTLFEMQ-----KDN	134
C. c	CTTGSVSSLYHLKDPQNNNEDAGFFVPDLSVRTEGSRYLKLSLFVVG-----NN	171
Cn	FLTGTVPVSSLYHLKDLDNS--DAAFFVFPDLGVRKEGRYKLLTLFEIVD-----QE	143
C. n	FLTGTVPVSSLYHLKDLDNS--DAAFFVFPDLGVRKEGRYKLLTLFEIVE-----SI	259
C. g	FLTGTVPVSSLYHLKDLDNS--DAAFFVFPDLGVRKEGRYKLLTLFEIVD-----QE	143
U. m	YTSGSCVSLYHLKIDGS--HQGFFVFPDLSIRVEGRYRLKLCFETIG-----HS	231
N. c	VLTGMPVSGMAYLDRPKLA---GYFLFPDLSVRHEGRYKLLTFNLYEETKEDKDKDPEEP	177

Fonte: Produção do próprio autor.

Observaram-se vários aminoácidos conservados e grande quantidade de substituições conservativas e semiconservativas de aminoácidos. Proteínas da família *velvet* são geralmente muito conservadas em Ascomicetos e Basidiomicetos (Ni & Yu, 2007). A partir dos dados obtidos no alinhamento de sequências foi possível gerar um cladograma (**Figura 6**) que mostrou maior conservação de VosA entre as espécies de *Cryptococcus* e *Ustilago maydis*, também basidiomiceto, em relação aos demais fungos. Em contrapartida, foi possível observar uma origem

evolutiva comum entre as proteínas das espécies de *Cryptococcus* e de *Aspergillus*.

Figura 6- Cladograma esquemático do parentesco da proteína VosA de *C. neoformans* com as dos diferentes fungos selecionados. A. c = *Ajellomyces capsulatus*; A. d = *Ajellomyces dermatitides*; C.i = *Coccidioides immitis*; C. p = *Coccidioides posadasii*; A.f = *Aspergillus fumigatus*; N. f = *Neosartorya fischeri*; A. fl = *Aspergillus flavus*; E.n = *Emericella nidulans*; P. m = *Penicillium marneffeii*; C.c = *Coprinopsis cinérea*; Cn = *Cryptococcus neoformans* H99; C.n = *Cryptococcus neoformans* JEC21; C.g = *Cryptococcus gattii*; U.m= *Ustilago maydis*, sendo outgroup: N.c = *Neurospora crassa*;



Fonte: Produção do próprio autor.

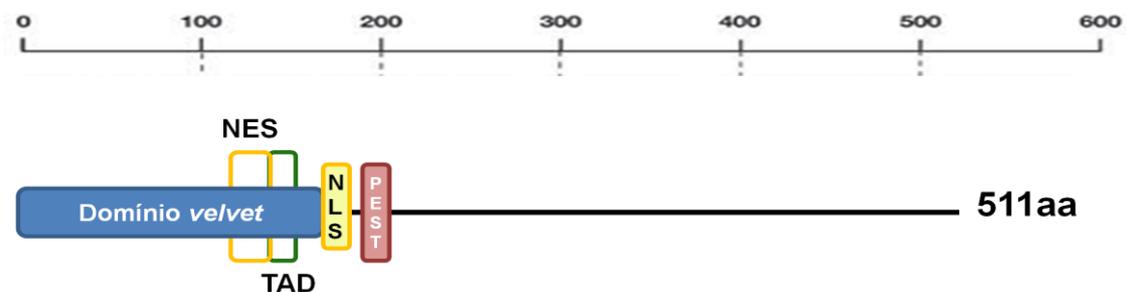
O gene VOSA de *C. neoformans* apresenta aproximadamente 1,9 kb e é composto de 5 éxons e 4 íntrons. A proteína codificada é composta de 511 aminoácidos. Além da identificação via banco de dados e comparação de sequências com proteínas homólogas, foi realizada uma análise estrutural dessa proteína.

Utilizando-se o software Pfam foi possível identificar a presença de um domínio *velvet* na sequência testada (CNAG_06580.2 VosA – Broad Institute) na porção N-terminal entre os aminoácidos 1 e 178. Um sinal de exportação nuclear (NES) foi identificado no interior do domínio *velvet*, entre os aminoácidos 132-136, com auxílio do software NetNES.

Predições realizadas com *softwares* específicos forneceram informações sobre a presença de um sinal de localização nuclear (NLS) bipartido na posição 180, bem como a presença dos domínios PEST, composto de 12 aminoácidos e

localizado entre os aminoácidos 187 e 200, e TAD, composto de 9 aminoácidos entre as posições 138 e 146. A partir dessas informações foi possível inferir uma arquitetura geral para a proteína VosA de *C. neoformans* (**Figura 7**).

Figura 7 - Predição estrutural da proteína VosA de *C. neoformans*. NES = sinal de exportação nuclear; TAD = domínio de ativação transcricional; NLS = sinal de localização nuclear bipartido; PEST = região rica em prolina.



Fonte: Produção do próprio autor.

A análise da predição estrutural da proteína VosA de *C. neoformans* evidenciou muitas semelhanças com a estrutura da proteína homóloga de *A. nidulans* (**Figura 3**) e *A. fumigatus* (Park *et al.*, 2012). Em todos os casos foi observada a presença de um domínio *velvet*, localizado na região N-terminal, um domínio TAD e uma região NLS. Há diferença na localização do domínio TAD e da região NLS entre as espécies, sendo que em *C. neoformans* está na região N-terminal e nas espécies de *Aspergillus* localiza-se na região C-terminal. Além disso, o domínio PEST está presente apenas em VosA de *C. neoformans*. Essas observações permitiram confirmar a sequência obtida via BLASTp, CNAG_06850, como aquela que codifica o gene VOSA de *C. neoformans*.

Foi realizada a comparação das sequências de proteínas *velvet* em *C. neoformans* por alinhamento, para análise de possíveis conservações dentro do grupo (**Figura 8**).

Figura 8 - Alinhamento das sequências dos domínios da família de proteínas *velvet* (VeA, CNAG_02387; VelC, CNAG_02697; VosA, CNAG_06580; VelB, CNAG_00564 [partes 1 e 2]; respectivamente) em *C. neoformans*. Destaque para a região N-terminal, em vermelho, com maior nível de conservação entre as sequências, asteriscos (*) marcam aminoácidos conservados (continua).

VosA	-----MRQQPVQARMCGIGDKS---DRRPVDPTPII	28
VelB1	-----GWTYHLEILQEPPLRARACGFGNK---DRRPLTPPPII	34
VeA	-----SSSYALVVRQQPERARLCSYKEENETIDRRPVDPPPVV	38
VelC	-----KMRFALSVEQEPVLGRRKTEK---DRRPLGPAPIV	32
VelB2	PSMDHYSWSKHYSDDSDRTTPGWTYQDTFASSPRIAGTHPSIARR---VRTPTRPSTAP	57
	* * * *	

Figura 8 - Alinhamento das sequências dos domínios da família de proteínas *velvet* (VeA, CNAG_02387; VelC, CNAG_02697; VosA, CNAG_06580; VelB, CNAG_00564 [partes 1 e 2]; respectivamente) em *C. neoformans* (continuação).

```

VosA      QLKVID-PQGDDIT----- 41
VelB1     RLWIQD-ALGN----- 44
VeA       ELRVGSGREVTPEQ----- 52
VelC      RLRAVECRSVEDDTGVIEEVDAGTLDVAVNIVCAADLCAPTQTQHSATIEETNEAKLLPES 92
VelB2     SLRPPAWSVDVSRPLYDEALPP----- 80
          *

VosA      -----SIDPQTKQIIRPSPGSEGMTYMQNPYYFLFACLVGGEEQ 80
VelB1     -----QVDPN-----IVDSNAIILQVD-----LCSADG--- 67
VeA       -----LLESTSFIRATTVADPLTASATSFTPSLFSSEPLTH 91
VelC      EHRPYGEHDTSLVNFAGVTSSSEQASSGSPTPARKARDQAVTSEVDPTSLGDAPLAADVVR 152
VelB2     -----ISALAEDIRDPSPGRSSFPDPHSNMQRPTSSSSLSRSPHTSY 121

VosA      EDELHVIDDGKT--RFLTGTVPSSLYHLK-----DLDN 111
VelB1     -----LEGRNV----- 73
VeA       TGPTYAPVKTPLGADATTGEVIQTPEKLR-----LLDG 124
VelC      EEKAAKKWKRQKSSGEVSSGSATEIERARRSGAGHGAAPERNLYGNLHVGGVKVPDLEG 212
VelB2     STDLSTAPTLDYSFGRPTTSSSTASWHLSADSEYKGFALLESQAARSKPGHRPKSNDSKVP 181

VosA      SDAAFFVFPDLGVRKEGRYKCLKLTLFEIVDQE----VYICTMF-TSTFSVYSAKKFPFG 165
VelB1     ----- 165
VeA       RMAVLCIFAKISVRVPGIFRLKFTLFEITTEHG----IVELAQTV-SEPFVEVSPKLFKG 178
VelC      KMGVWFLFTDLCVRQEGSYSLRFRCYDITAVEEGGLPVAQLAECR-SQPFRIYSPRQIPI 271
VelB2     MLSAETQTTPGSFLPASFSDFRTLHDSPLPHSYHNCHYRSNVASVKDWDSLHIPPDLDT 241

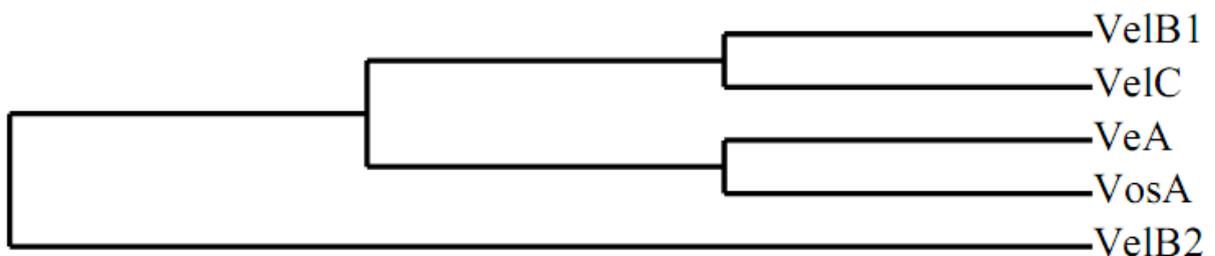
VosA      MSTAARATASSSG----- 178
VelB1     ----- 178
VeA       MHSTPLTRHLAAQGLKVKLRDTT----- 203
VelC      LPKLTLELAEHFAKLGFKLNTRKNDRAAQSPPLP 304
VelB2     MKETRYVAPASAASTLVLVGRH----- 264

```

Fonte: Produção do próprio autor.

Observou-se maior conservação na região N-terminal dos domínios das proteínas analisadas. Dentre as sequências, as que possuem maior identidade são VeA e VosA (25 %) e VelB1 e VelC (24 %), enquanto a sequência da segunda parte do domínio de VelB, VelB2 mostrou-se a mais divergente em relação às demais (Figura 9).

Figura 9 - Cladograma comparativo dos domínios Velvet de proteínas VeA, VelB, VelC e VosA de *C. neoformans*.



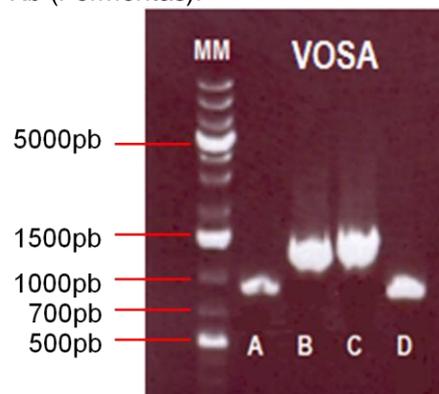
Fonte: produção do próprio autor.

4.2 Avaliação da função gênica de VOSA através de deleção gênica no modelo *C. neoformans*

O gene VOSA de *C. neoformans* foi deletado por meio da integração homóloga do cassete VOSA::HPH, com a marca de seleção do gene de resistência à Higromicina B, em seu lócus.

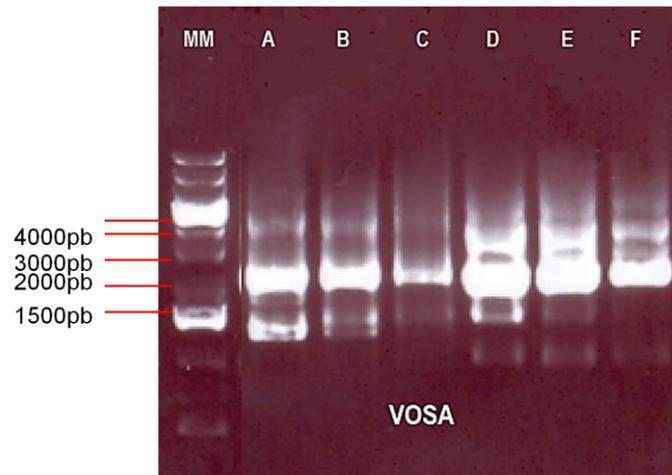
O cassete foi obtido *in vitro* por PCR *Double Joint*, que consistiu em duas etapas de PCR, já descritas anteriormente na metodologia. Os tamanhos obtidos dos produtos da reação foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (**Figuras 10 e 11**) e, assim, os fragmentos foram co-transformados em células leveduriformes haplóides KN99 α e KN99 α (sorotipo A) de *C. neoformans* via biobalística.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % em TBE 0,5 X para confirmação dos produtos obtidos na 1ª etapa da técnica de PCR *Double Joint*. Os produtos A, B, C e D representam respectivamente: 1 + 2 (881 pb), 3 + 4 (1.235 pb), 5 + 6 (1.295 pb) e 7 + 8 (833 pb). MM: Marcador molecular DNA Ladder Plus 1 Kb (Fermentas).



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

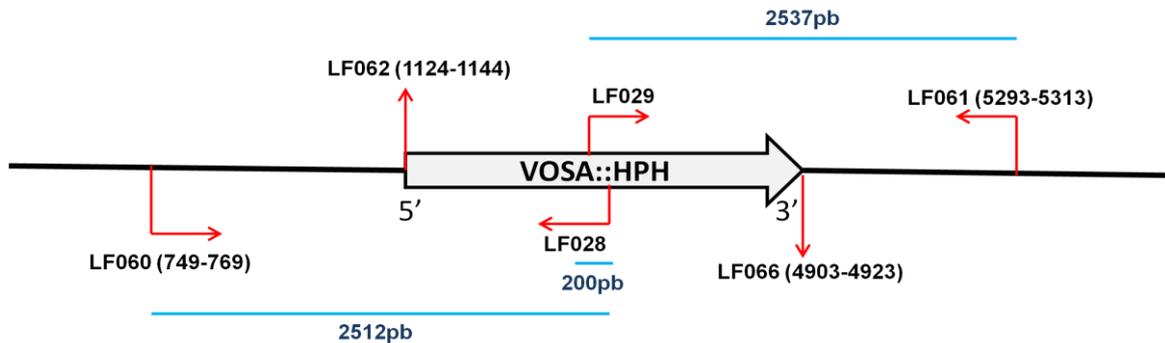
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % em TBE 0,5 X para confirmação dos produtos obtidos na 2ª etapa da técnica de PCR Double Joint. A, B, C correspondem ao fragmento 1 + 4 (2.116 pb) com diferentes concentrações do íons Mg^{2+} (2, 4 e 6 mM, respectivamente), D, E e F correspondem a 5 + 8 (2.128 pb) com as concentrações de 2, 4 e 6 mM de Mg^{2+} . MM: marcador molecular DNA Ladder Plus 1 Kb (Fermentas).



Fonte: Produção do próprio autor.

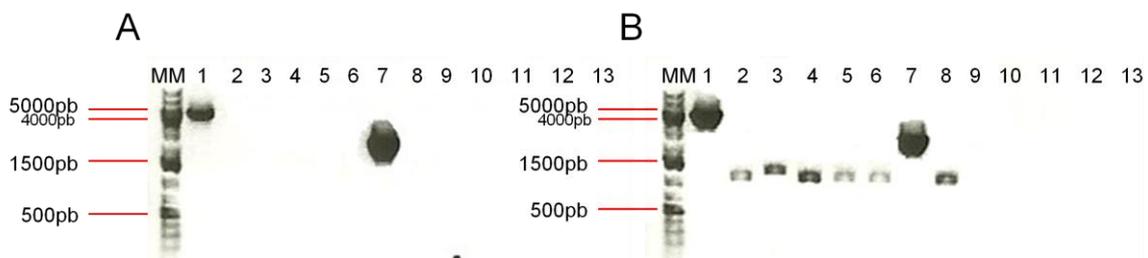
Após a transformação, os transformantes que cresceram em meio YPD, suplementado com Higromicina B, foram selecionados e tiveram seu DNA extraído segundo protocolo descrito. Foram selecionados 11 transformantes, sendo seis **MAT α** e cinco **MAT α** de maneira aleatória a partir das placas transformadas por biobalística. Os DNAs genômicos extraídos foram utilizados para confirmação da deleção da ORF de VOSA por PCR comum (**Figura 12**). Foram feitas duas reações para confirmar a deleção. A primeira reação (**Figura 13a**) consistiu na amplificação da região 3' de VOSA e 3' HPH com oligonucleotídeos LF029 + LF061, sendo que o tamanho esperado para os mutantes era de 2.537 pb e o controle (KN99 α/α) não deveria amplificar, já que a linhagem selvagem não apresenta a região recombinada 3'HPH do cassete que confere resistência a Higromicina B (HPH). O controle negativo (água) para contaminação foi utilizado em todas as reações, não apresentando qualquer traço de amplificação. A segunda PCR (**Figura 13b**) consistiu na amplificação da região 5' do gene VOSA e 5' HPH pelos oligonucleotídeos LF060 + LF028, sendo o tamanho esperado dos mutantes de 2.512 pb. Foi possível detectar apenas um mutante positivo após a conferência, 62.vosA $\alpha\Delta$.

Figura 12 - Esquema para conferência da deleção de VOSA em *C. neoformans*. Esquema representativo de reações de confirmação da deleção gênica realizadas para cepas **MAT α** e **MAT α** evidenciando o tamanho dos fragmentos obtidos na amplificação de cada uma das regiões: 5' (LF060 + LF028) – 2.512 pb e 3' (LF029 + LF061) – 2.537 pb.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

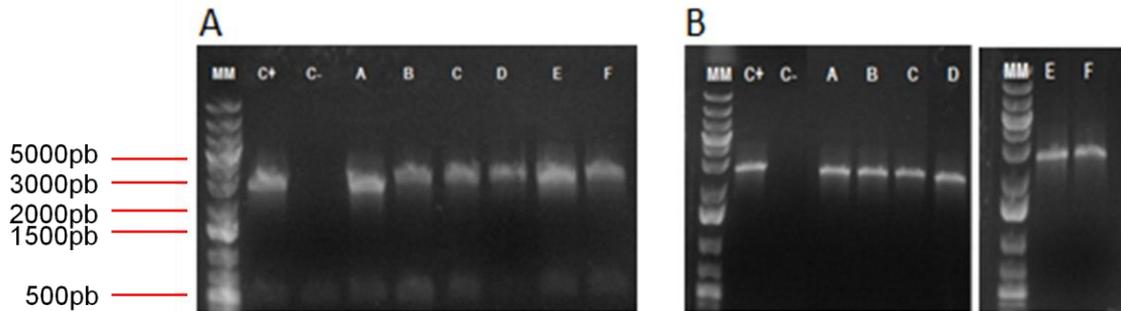
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % em TBE 0,5 X para confirmação da deleção de VOSA na linhagem α de *C. neoformans*. (A) Amplificação da região 3' de VOSA::HPH cujo produto esperado foi 2.537 pb (oligonucleotídeos LF029 + LF061) (B) Amplificação da região 5' de VOSA::HPH cujo produto esperado foi 2.512 pb (oligonucleotídeos LF060 + LF028). Detalhe para o mutante positivo presente em ambos os resultados 62.vosA $\alpha\Delta$. MM: marcador molecular DNA Ladder Plus 1 kb (Fermentas), 1- KN99 α (Amplificado com oligonucleotídeos LF62 + LF68, fragmento de 3.799 pb) , 2- H₂O, 3- 4.vosA $\alpha\Delta$, 4- 10.vosA $\alpha\Delta$, 5- 31.vosA $\alpha\Delta$, 6- 57.vosA $\alpha\Delta$, 7- 62.vosA $\alpha\Delta$, 8- 104.vosA $\alpha\Delta$, 9- 1.vosA $\alpha\Delta$, 10- 7.vosA $\alpha\Delta$, 11- 41.vosA $\alpha\Delta$, 12- 49.vosA $\alpha\Delta$, 13- 138.vosA $\alpha\Delta$.



Fonte: Produção do próprio autor.

Para confirmação da deleção de VOSA nos mutantes do tipo sexual oposto, α , foram escolhidos 10 transformantes que tiveram DNA genômico extraído para amplificação das regiões 5' e 3' do locus, como descrito anteriormente. As últimas reações de PCR consistiram na amplificação da região 3' de VOSA e 3' HPH pelos oligonucleotídeos LF029 + LF061, feitas após a amplificação da região 5' apenas para confirmação (**Figura 14a**) e 5' de VOSA e 5' HPH pelos oligonucleotídeos LF060 + LF028 (**Figura 14b**). Foi possível confirmar a deleção em vários transformantes: 39.vosA $\alpha\Delta$, 40.vosA $\alpha\Delta$, 42.vosA $\alpha\Delta$, 51.vosA $\alpha\Delta$, 52.vosA $\alpha\Delta$, e 56.vosA $\alpha\Delta$.

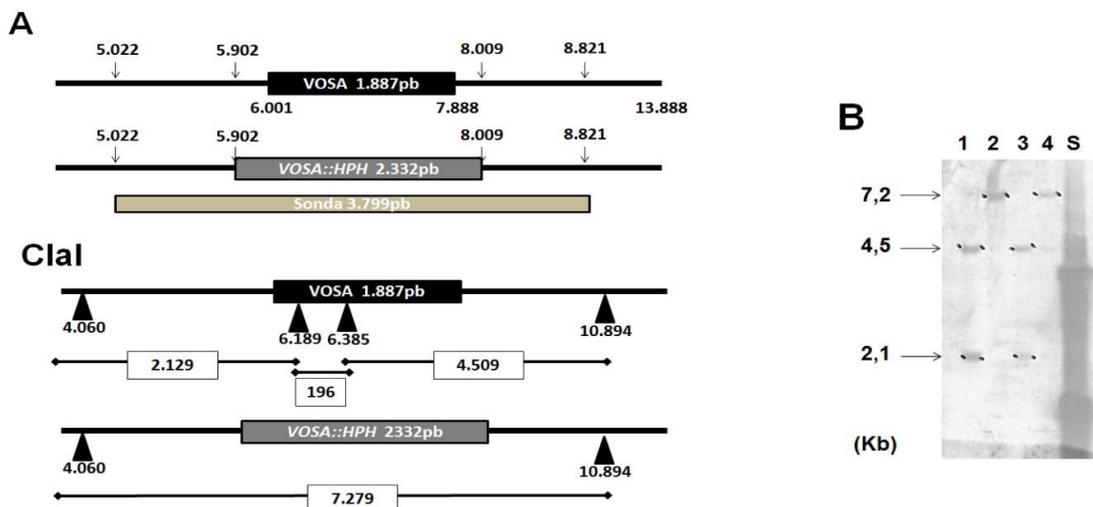
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % em TBE 0,5 X para confirmação da deleção de VOSA nas linhagens **MAT α** de *C. neoformans*. (A) Amplificação da região 3' de VOSA::HPH cujo produto esperado foi 2.537 pb (oligonucleotídeos LF029 + LF061) (B) Amplificação da região 5' de VOSA e HPH cujo produto esperado foi 2.512 pb (oligonucleotídeos LF060 + LF028). Detalhe para os mutantes positivos A: 39.vosA $\alpha\Delta$, B: 40.vosA $\alpha\Delta$, C: 42.vosA $\alpha\Delta$, D: 51.vosA $\alpha\Delta$, E: 52.vosA $\alpha\Delta$, e F: 56.vosA $\alpha\Delta$. MM- marcador molecular DNA Ladder 1 kb Plus (Fermentas), C(+)- 62.vosA $\alpha\Delta$, C(-) - H₂O.



Fonte: Produção do próprio autor.

Após a PCR confirmatória, os mutantes foram submetidos ao Southern Blot, sendo que dois tiveram seus genótipos confirmados segundo o perfil de restrição obtido com a enzima *Clal* (**Figura 15a**): tipo sexual **MAT α** , 62.vosA $\alpha\Delta$, e **MAT α** , 52.vosA $\alpha\Delta$. As digestões feitas com *Clal* deveriam apresentar bandas de 2,1 Kb e 4,5 Kb para cepa selvagem (KN99) e 7,2 Kb para cepa mutante (vosA Δ)(**Figura 15b**).

Figura 15 - Confirmação por Southern Blot da deleção de VOSA (VOSA::HPH) nos mutantes 62.vosA $\alpha\Delta$ e 52.vosA $\alpha\Delta$. 10 μ g de DNA total digerido com a enzimas *Clal* (1-4) foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com a sonda de VOSA (3.799 pb amplificação com oligonucleotídeos LF062 + LF068) marcada quimicamente com fosfatase alcalina (*Gene Images Alkphos direct labelling and detection system, Amersham Biosciences*). (A) Perfil de restrição para *Clal* do locus de VOSA. (B) Resultado do Southern blot após hibridização com sonda de VOSA. Os tamanhos em kilobases (Kb) dos fragmentos obtidos estão indicados no painel. 1: KN99a, 2: 62.vosA $\alpha\Delta$, 3: KN99 α , 4: 52.vosA $\alpha\Delta$, S: sonda.



Fonte: Produção do próprio autor.

4.3 Obtenção do reconstituído *vosA*Δ::*VOSA*

O processo inverso ao de obtenção de mutantes foi realizado visando reintegrar a sequência do gene *VOSA* a *C. neoformans* para confirmar que os defeitos observados no mutante são decorrentes da ausência do gene. As técnicas de preparo de amostras e transformação por biobalística foram as mesmas utilizadas na obtenção de mutantes. A diferença se dá apenas na sequência que foi introduzida no fungo: a sequência do gene de interesse (*VOSA*). A obtenção de transformantes foi possível através da técnica de co-transformação, na qual foi realizada a transformação por biobalística do fragmento de interesse juntamente com um plasmídeo (pJAF).

Foram selecionadas 8 amostras para teste, negativas para a marca de seleção dos mutantes (Higromicina B) e positivas para a marca de seleção do plasmídeo, acrescentado à transformação (Neomicina): 5.62.*vosAa*Δ::*VOSAa*, 30.62.*vosAa*Δ::*VOSAa*, 44.62.*vosAa*Δ::*VOSAa*, 48.62.*vosAa*Δ::*VOSAa*, 50.62.*vosAa*Δ::*VOSAa*, 46.52.*vosAα*Δ::*VOSAα*, 51.52.*vosAα*Δ::*VOSAα* e 53.52.*vosAα*Δ::*VOSAα*. Após a transformação, foi realizada a confirmação via PCR (**Figura 16**). Inicialmente, fez-se a confirmação da região 5' do gene, de tamanho esperado 2.761 pb. Observou-se a presença da banda esperada em 3 amostras (**Figura 17**).

Figura 16 – Esquema representativo da PCR confirmatória de reconstituição do locus *VOSA*. Reações de confirmação da reconstituição gênica realizada, evidenciando o tamanho dos fragmentos obtidos na amplificação de cada uma das regiões: 5' (LF060 + LF225) – 2.761 pb e 3' (LF232 + LF061) – 1.917 pb.

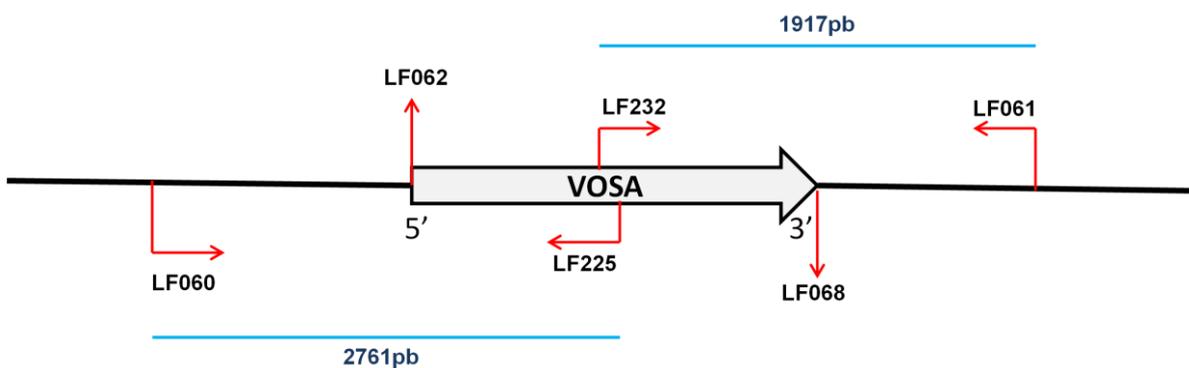
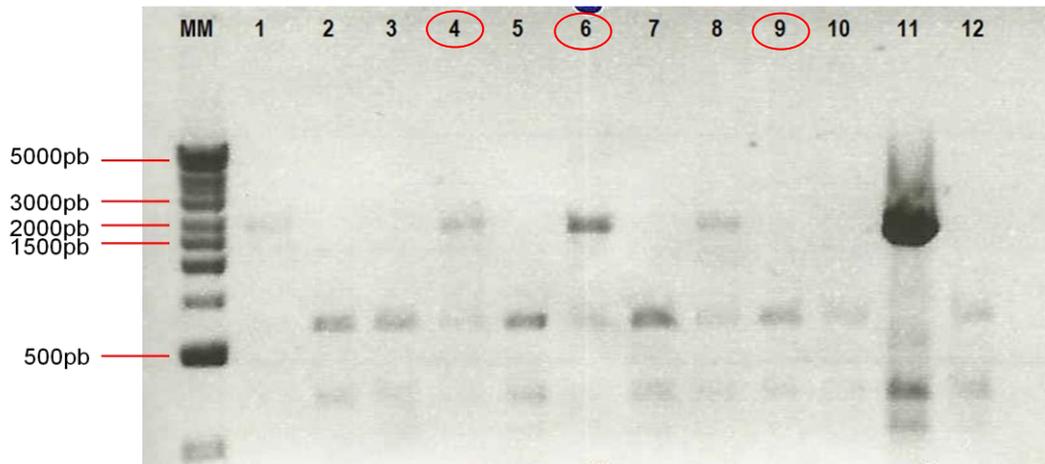


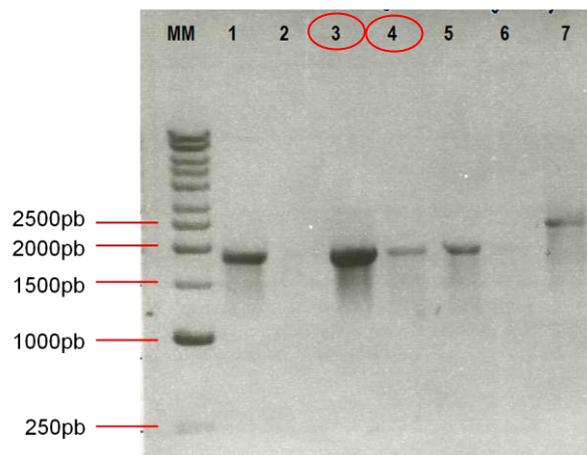
Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose 0,8 % dos produtos obtidos na PCR para amplificação da região 5' de VOSA de possíveis cepas reconstituídas *vosAΔ::VOSA*. MM= marcador 1 Kb Ladder Plus (Fermentas); 1- KN99 α ; 2- 62.*vosAaΔ*; 3- 5.62.*vosAaΔ::VOSAa*; 4- 30.62.*vosAaΔ::VOSAa*; 5- 44.62.*vosAaΔ::VOSAa*; 6- 48.62.*vosAaΔ::VOSAa*; 7- 50.62.*vosAaΔ::VOSAa*; 8- KN99 α ; 9- 52.*vosAaΔ*; 10- 46.52.*vosAaΔ::VOSAa*; 11- 51.52.*vosAaΔ::VOSAa*; 12- 53. 52.*vosAaΔ::VOSAa*. Detalhe para as amostras positivas circulasdas em vermelho.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

As amostras que tiveram a região 5' confirmada foram submetidas a nova PCR para amplificação da região 3'. O fragmento esperado foi de 1.917 pb. Apenas amostras reconstituídas do mutante 62.*vosAaΔ* foram confirmadas, 30.62.*vosAaΔ::VOSAa* e 48.62.*vosAaΔ::VOSAa* (**Figura 18**).

Figura 18- Eletroforese em gel de agarose 0,8 % dos produtos obtidos na PCR para amplificação da região 3' de VOSA de possíveis cepas reconstituídas *vosAΔ::VOSA*. MM= marcador 1 Kb Ladder Plus (Fermentas); 1- KN99 α ; 2- 62.*vosAaΔ*; 3- 30.62.*vosAaΔ::VOSAa*; 4- 48.62.*vosAaΔ::VOSAa*; 5- KN99 α ; 6- 52.*vosAaΔ*; 7- 51.52.*vosAaΔ::VOSAa*. Detalhe para as amostras positivas circulasdas em vermelho.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

As cepas positivas: 30.62.vosAa Δ ::VOSAa e 48.62.vosAa Δ ::VOSAa foram submetidas a testes de acasalamento para que se pudesse observar a recuperação de fenótipo selvagem (**Figura 32**).

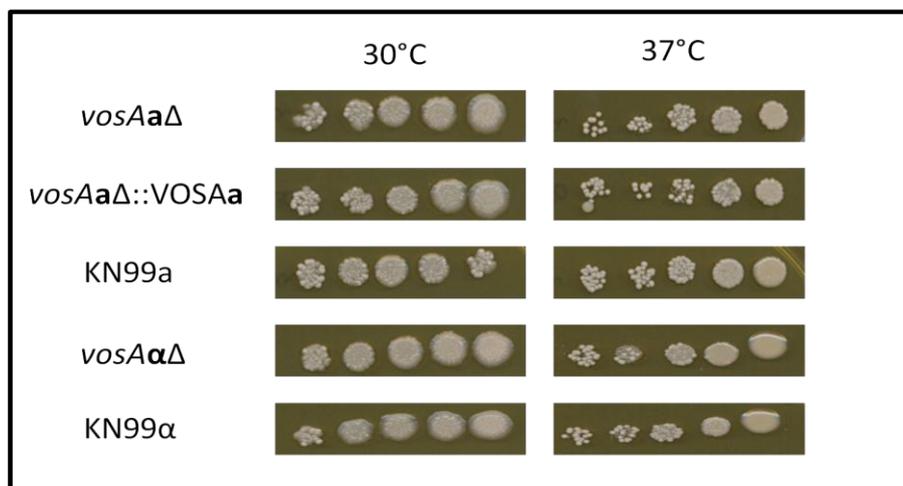
4.4 Avaliação fenotípica *in vitro* dos mutantes vosA Δ

Os mutantes confirmados foram submetidos aos mais variados testes fenotípicos e de virulência de modo a analisar o papel de VOSA em *C.neoformans*.

4.4.1 Capacidade de crescimento a 37°C

A capacidade de crescimento a 37 °C é característica fundamental para garantir a sobrevivência de um patógeno durante a infecção em um hospedeiro. As cepas selvagens, mutantes e reconstituída foram avaliadas quanto à sua capacidade de crescimento à 30 °C e 37 °C (**Figura 19**).

Figura 19 - Teste de crescimento a 30 °C e 37 °C das cepas selvagens (KN99a e KN99 α), mutantes (62.vosAa Δ e 52.vosA α Δ) e reconstituído 30.62.vosAa Δ ::VOSAa de *C. neoformans* em meio YPD (48-72 h).



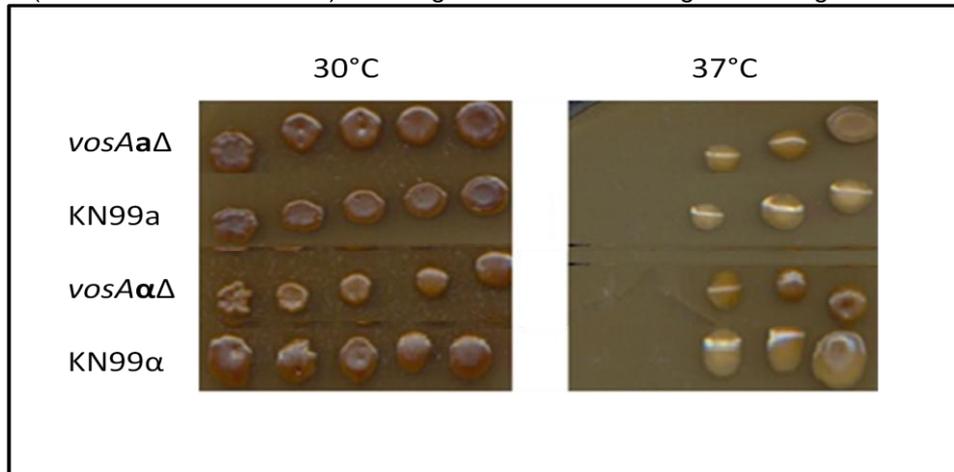
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Nenhuma alteração foi observada no padrão de crescimento ou no tempo de crescimento dos mutantes vosA Δ em relação às cepas selvagens. Apesar da temperatura ótima de crescimento de *C. neoformans* ser 30 °C, sua capacidade de crescimento a 37 °C é fundamental para a manutenção da virulência, o que descarta qualquer perda de virulência dependente de temperatura em mutantes vosA Δ . É possível, também, excluir o envolvimento desse gene de qualquer via responsável pela resistência a altas temperaturas.

4.4.2 Síntese de melanina

As cepas mutantes e selvagens foram avaliadas quanto a capacidade de sintetizar melanina em meio Niger Seed (**Figura 20**).

Figura 20 – Ensaio de produção de melanina. Diluições seriadas (10^5 células – 10^1 células) de mutantes (62.vosAa Δ e 52.vosA $\alpha\Delta$) e selvagens KN99a/ α em Niger Seed Agar a 30 °C e 37 °C.



Fonte: Produção do próprio autor.

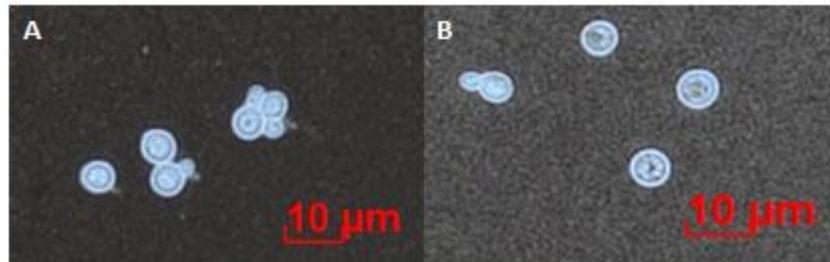
Uma das principais características de *C. neoformans* é sua habilidade de sintetizar melanina na presença de compostos fenólicos. Acredita-se que esse processo seja semelhante à via da tirosinase de produção de melanina em mamíferos, com algumas modificações: substratos exógenos são oxidados e sofrem diversas polimerizações, seguidas de um processo de auto-oxidação para que se forme melanocromo e, por fim, melanina (Torres-Guerrero & Edman, 1994). Uma mutação em qualquer dos componentes ou enzimas dessa via pode acarretar em defeito na produção de melanina e, em última instância, diminuição da virulência do fungo que perde sua resistência e proteção à fagocitose.

Por meio desse experimento foi possível concluir que não há participação de VOSA na biossíntese de melanina de *C. neoformans*.

4.4.3 Produção de cápsula

Cepas selvagem e mutante foram incubadas em meio Saboraud ácido diluído em MOPS para indução de cápsula e em seguida foram analisadas por microscopia de luz invertida (**Figura 21**).

Figura 21 - Análise da produção de cápsula polissacarídica em *C. neoformans*. Lâminas coradas com tinta nanquin para observação de produção de cápsula das cepas selvagem KN99a (a) e mutante 62.vosAaΔ (b). As células foram observadas em microscópio ótico.



Fonte: Produção do próprio autor.

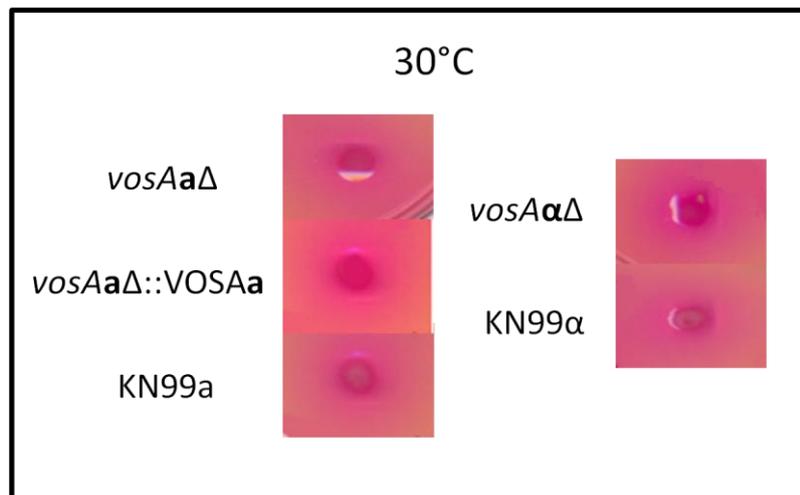
Importante fator de virulência, a cápsula polissacarídica é a superfície de contato entre *C. neoformans* e o hospedeiro. Qualquer alteração em sua composição, conformação ou regulação pode modificar essas interações e alterar significativamente a capacidade de virulência do fungo (Janbon & Doering, 2011).

Não foi detectada qualquer alteração quanto a tamanho ou morfologia na cápsula produzida pela cepa mutante em relação à linhagem selvagem. O gene VOSA não tem qualquer envolvimento na síntese da cápsula polissacarídica em *C. neoformans*.

4.4.4 Produção de urease

A capacidade de produzir urease foi analisada nas cepas selvagens e mutantes pelo do plaqueamento em meio *Christiansen's Urea Agar* (**Figura 22**).

Figura 22 - Análise da produção de urease em cepas selvagens KN99a/α, mutantes vosAΔ e reconstituída 30.62.vosAaΔ::VOSAa de *C. neoformans* a 30 °C. Cepas foram incubadas em meio *Christiansen's Urea Agar* a 30 °C por 48-72 h para observação da formação de halos de atividade enzimática.



Fonte: Produção do próprio autor.

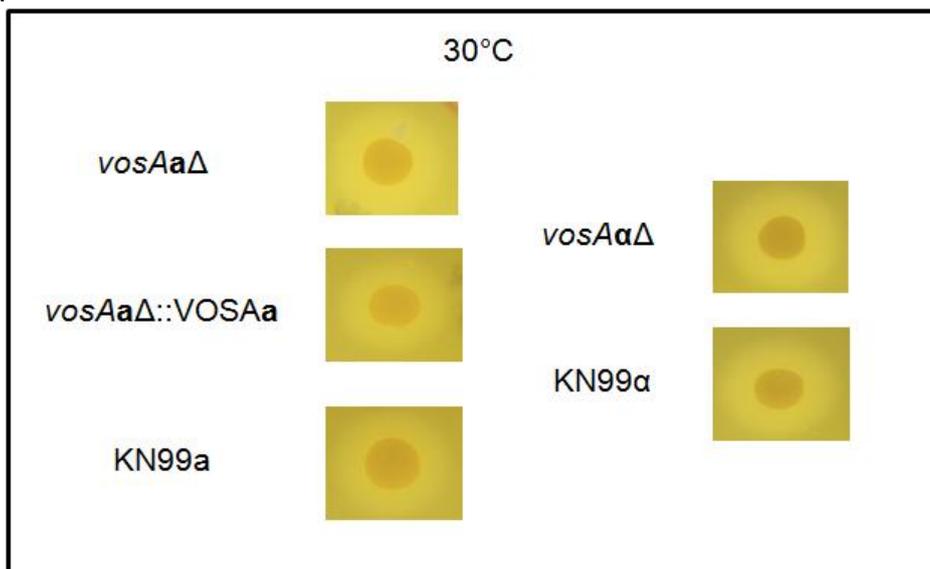
A urease é um fator de virulência diretamente relacionado à capacidade de *C. neoformans* transpassar a barreira hematoencefálica. Essa enzima aumenta o sequestro de células fúngicas através dos capilares durante a invasão sistêmica (Olszewski *et al.*, 2004).

Esse meio de cultura avalia a capacidade dos microrganismos de utilizar uréia como fonte de nitrogênio. Aqueles que a utilizam são capazes de sintetizar urease, que metaboliza uréia em NH_3 e que aumenta o pH do meio à medida em que é produzida, alterando a cor do meio para rosa ou vermelho. A formação de halos em torno das colônias comprovou a capacidade de todas as cepas produzirem urease. A perda do gene VOSA em nada influencia a produção de urease.

4.4.5 Produção de fosfolipase

A capacidade de biosíntese de fosfolipase das cepas selvagens KN99, mutante *vosA* Δ e reconstituída *vosAa* Δ ::*VOSAa* de *C. neoformans* foi testada através de incubação em meio de emulsão de gema de ovo (**Figura 23**). Esse teste, no entanto, não permite avaliar qual fosfolipase está ativada ou, no caso de formação de halo defeituoso, qual teve sua produção afetada.

Figura 23 – Ensaio de fosfolipase. Análise da produção de fosfolipase por cepas KN99 α , mutantes *vosA* Δ e reconstituído *vosAa* Δ ::*VOSAa* de *C. neoformans* em meio de emulsão de gema de ovo a 30 °C/48-72 h. A atividade da fosfolipase é responsável pela formação do halo ao redor da cultura fúngica.



Fonte: Produção do próprio autor.

Existem cinco grupos de fosfolipase: A1, A2, B, C e D, classificados de acordo com a localização da ligação éster hidrolisada. As fosfolipases conhecidamente relacionadas à patogênese são as do grupo B (PLB) e C (PLC) (Djordjevic, 2010).

Mutantes de fosfolipase B em *C. neoformans* possuem crescimento defeituoso quando em contato com macrófagos, bem como redução de sua virulência em modelos *in vivo* de infecção animal (Cox *et al.*, 2001).

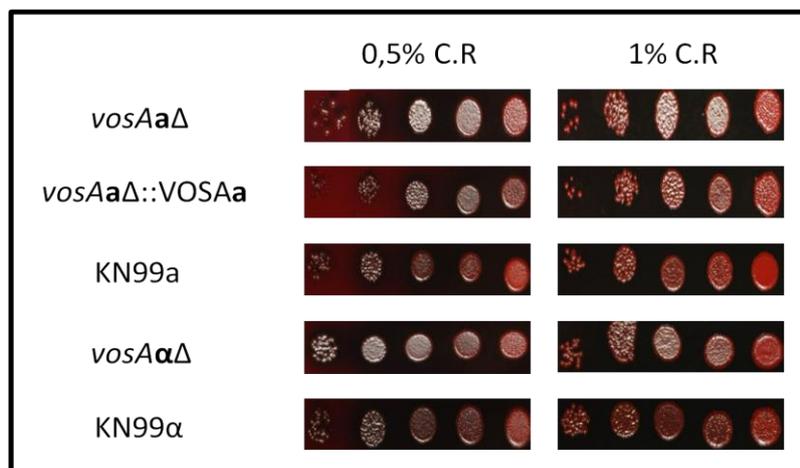
Não foi possível identificar qualquer alteração do mutante *vosA* em relação à cepa selvagem e até mesmo à cepa reconstituída. A função de VOSA em *C. neoformans* não está relacionada à produção de fosfolipase ou à capacidade de virulência dependente de fosfolipase.

4.4.6 Integridade da parede celular

Foram utilizados vários meios indicadores de defeitos na estrutura da parede celular para a análise das cepas selvagem, mutante e reconstituída, sem qualquer alteração fenotípica, que caracterizasse a participação de VOSA em vias responsáveis pela manutenção e integridade da parede celular.

Não foram observadas quaisquer alterações no crescimento dos mutantes *vosA* Δ na presença de Congo Red (**Figura 24**). Cepas selvagem, mutante e reconstituído se comportam da mesma forma, excluindo qualquer possibilidade de controle de VOSA nessa via.

Figura 24 - Análise de sensibilidade a *Congo Red*. Teste realizado em diferentes concentrações (0,5 % e 1 %) do estressor nas cepas selvagens (KN99a e KN99 α), mutantes (62.*vosAa* Δ e 52.*vosA α* Δ) e reconstituído 30.62.*vosAa* Δ ::*VOSAa* de *C. neoformans* incubadas a 30 °C por 48-72 h.



Fonte: Produção do próprio autor.

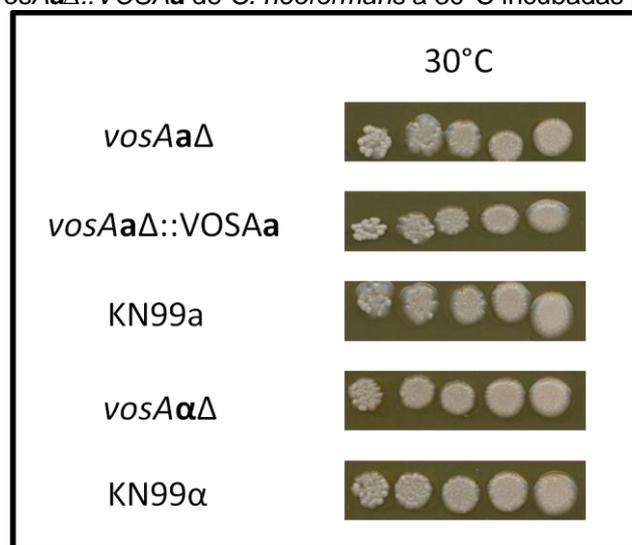
Outros agentes estressores de parede, NaCl, KCl, sorbitol, SDS e cafeína, foram testados para que o gene VOSA tivesse sua participação na estrutura e manutenção da integridade da parede celular descartada.

Este tipo de defeito está intimamente relacionado a genes que codificam polissacarídeos constituintes da parede celular e quitina, substâncias pelas quais o agente estressor Congo Red exhibe alta afinidade (Roncero & Durán, 1985).

4.4.7 Estresse oxidativo

O efeito do estresse oxidativo sobre as linhagens selvagens, mutantes e reconstituída foi avaliado com auxílio de alguns estressores em diferentes concentrações. A incubação das cepas em diferentes temperaturas na presença de peróxido de hidrogênio não provocou qualquer alteração ou retardo do crescimento de células mutantes em relação às selvagens e reconstituída (**Figura 25**).

Figura 25 – Teste de sensibilidade ao estresse oxidativo. Análise de sensibilidade a peróxido de hidrogênio 1 mM das cepas selvagem (KN99a e KN99α), mutantes (62.vosAaΔ e 52.vosAαΔ) e reconstituída 30.62.vosAaΔ::VOSAa de *C. neoformans* a 30°C incubadas por 48-72 h.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

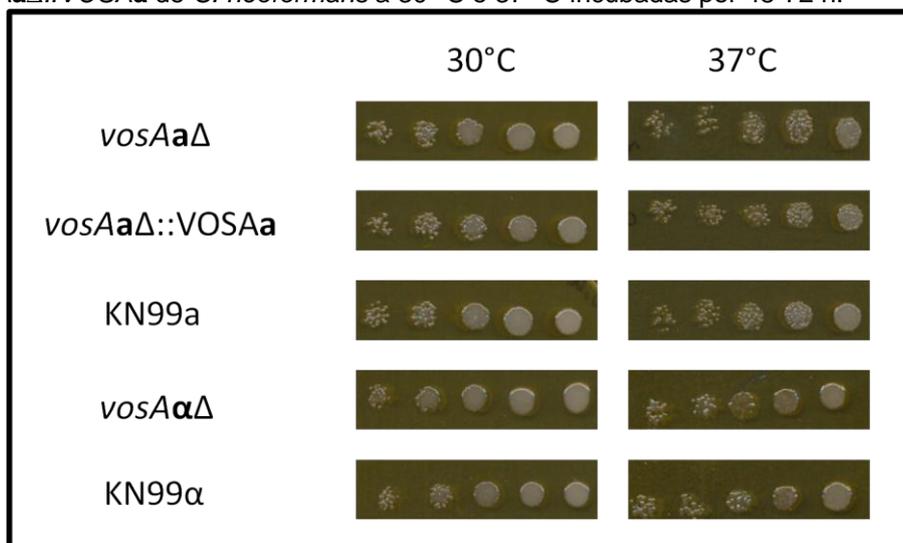
Experimentos realizados com peróxido de hidrogênio em *S. cerevisiae* demonstram a relação da permeabilidade da membrana fúngica à resposta ao estresse oxidativo, protegendo a célula fúngica do efeito de H₂O₂ (Branco *et al.*, 2004). Cepas selvagens expostas a esse agente estressor sofreram alterações em suas propriedades biofísicas e na permeabilidade de sua membrana (Folmer *et al.*, 2008).

As alterações de gradiente, promovidas pelo acréscimo de peróxido de hidrogênio ao meio YPD, não foram suficientes para provocar qualquer perturbação na capacidade homeostática dos mutantes *vosAΔ* de *C. neoformans*, de modo a descartar qualquer participação do gene na manutenção da integridade celular em condições de estresse oxidativo.

4.4.8 Estresse osmótico

O efeito do estresse osmótico sobre as linhagens selvagens, mutantes e reconstituída foi avaliado com auxílio de alguns estressores em diferentes concentrações. A incubação das linhagens em diferentes temperaturas na presença de cloreto de sódio não provocou qualquer alteração ou retardo do crescimento de células mutantes em relação às linhagens selvagens e reconstituída (**Figura 26**).

Figura 26 – Teste de sensibilidade ao estresse osmótico. Análise de sensibilidade a cloreto de sódio 1,5 M das cepas selvagem (KN99a e KN99α), mutantes (62.*vosAaΔ* e 52.*vosAαΔ*) e reconstituída 30.62.*vosAaΔ::VOSAa* de *C. neoformans* a 30 °C e 37 °C incubadas por 48-72 h.



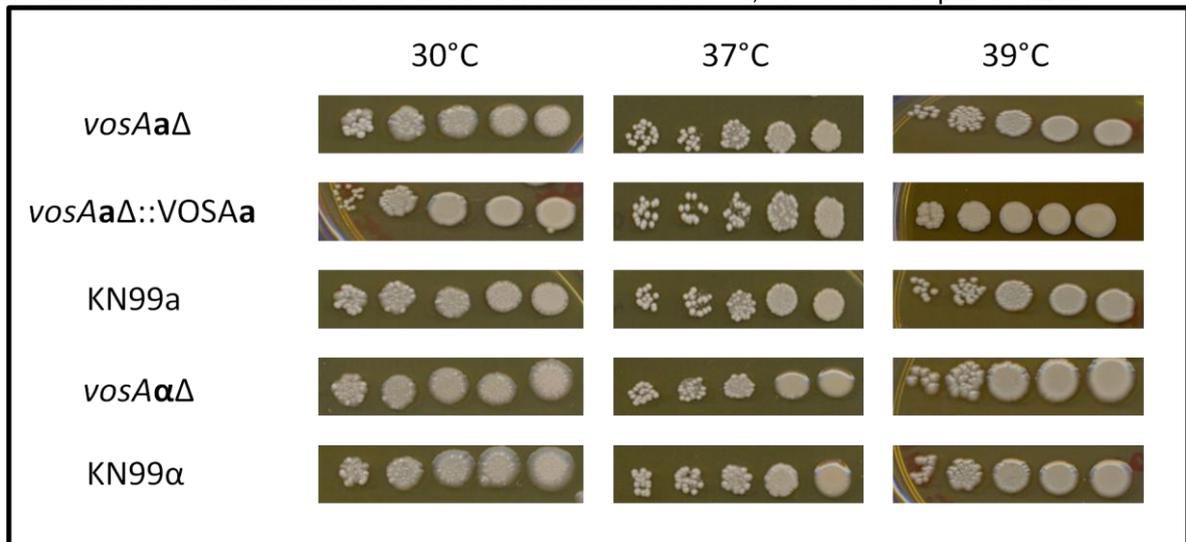
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

A ausência de perturbação das colônias mutantes indica que não houve qualquer desestabilização da fluidez e permeabilidade da membrana celular por influência do sal utilizado. A perda da tolerância ao estresse osmótico está relacionada principalmente a alterações em componentes da membrana como manitol e ergosterol. Mutantes de *C. neoformans* com produção reduzida de manitol (*Cnmlp*) não resistem à incubação em altas concentrações de NaCl (Chatuverdi *et al.*, 1996).

4.4.9 Estresse térmico

O efeito de altas temperaturas sobre os mutantes *vosAaΔ* e *vosAαΔ* em relação às cepas selvagem e reconstituída foi testado em meio YPD (**Figura 27**).

Figura 27 – Teste de sensibilidade a altas temperaturas. Análise de sensibilidade a incubação em altas temperaturas das cepas selvagem (KN99a e KN99α), mutantes (62.*vosAaΔ* e 52.*vosAαΔ*) e reconstituída 30.62.*vosAaΔ::VOSAa* de *C. neoformans* a 30 °C, 37 °C e 39 °C por 48-72 h.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Não foram observadas quaisquer alterações fenotípicas das linhagens mutantes em relação às selvagens descartando a participação de VOSA na termotolerância de *C. neoformans*.

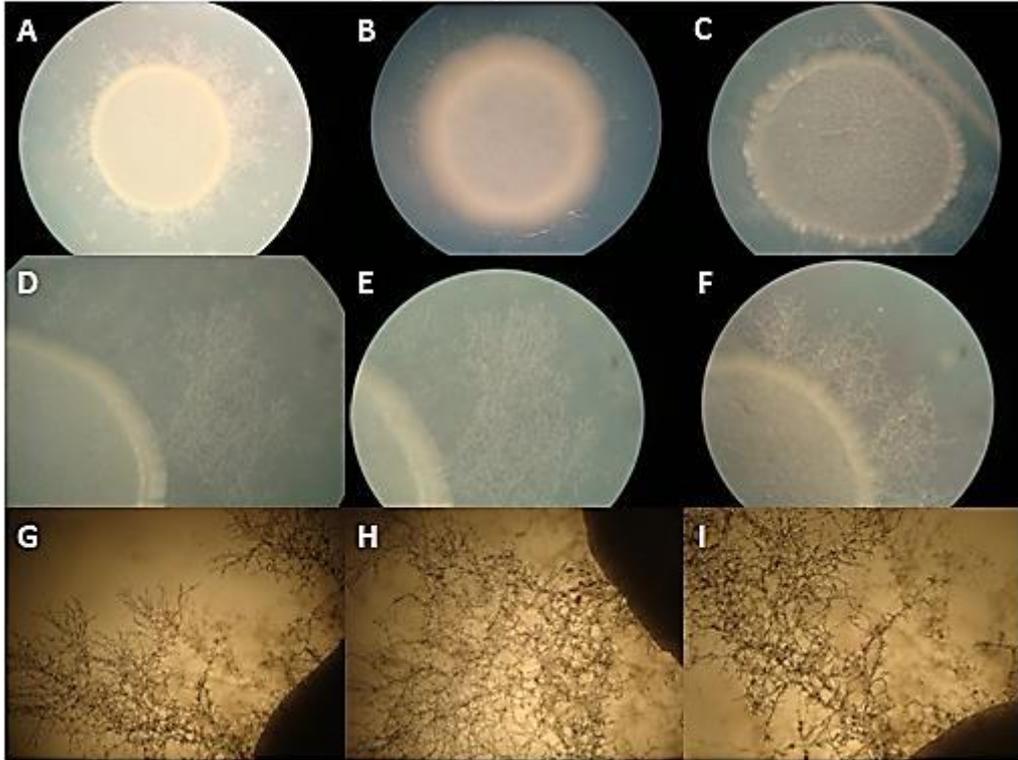
A capacidade de sobreviver e crescer à temperatura do hospedeiro é característica essencial para que o fungo possa estabelecer uma infecção. Para que isso se torne possível para *C. neoformans* é imprescindível que sua integridade celular seja mantida através da ativação da via de sinalização da proteína quinase C1 (PKC1), ativada em resposta ao estresse térmico (Lam *et al.*, 2013). Esses resultados excluem a participação de VOSA na via de resposta ao estresse térmico.

4.4.10 Acasalamento

Na natureza, *C. neoformans* ocorre predominantemente na forma haplóide enquanto realiza reprodução sexuada em resposta à limitação nutricional ou a sinais ambientais específicos. Foi avaliada a capacidade das leveduras haploides de realizarem acasalamento em diferentes meios de cultura, inclusive em meios que mimetizam condições precárias de nitrogênio. Vários cruzamentos foram testados:

KN99a vs. KN99 α , KN99a vs. 52.vosA $\alpha\Delta$, KN99 α vs. 62.vosAa Δ , 62.vosAa Δ vs. 52.vosA $\alpha\Delta$ e KN99 α vs. 30.62.vosAa Δ ::VOSAa (**Figuras 28-32**).

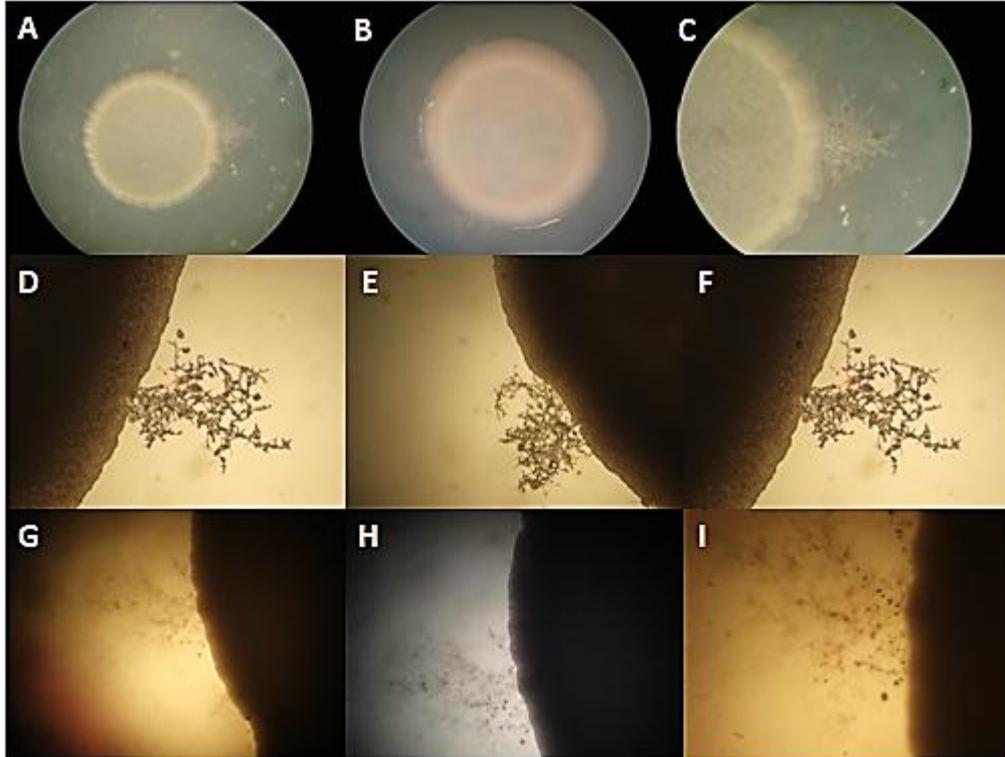
Figura 28 – Teste de acasalamento entre cepas selvagens KN99a vs. KN99 α . Painel ilustrativo do cruzamento em meio ágar filament após 3 semanas de incubação no escuro, à temperatura ambiente. (a-c) Fotografia em detalhe do cruzamento selvagem, zoom lupa 2,5 X – Escala foto original: 400 $\mu\text{m}/\text{cm}$; (d-e) Fotografia em detalhe das hifas do cruzamento selvagem, zoom lupa 3,2 X – Escala foto original: 312,5 $\mu\text{m}/\text{cm}$; (g-i) Fotografia em detalhe das hifas do cruzamento selvagem, zoom microscópio 4 X – Escala foto original: 250 $\mu\text{m}/\text{cm}$.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

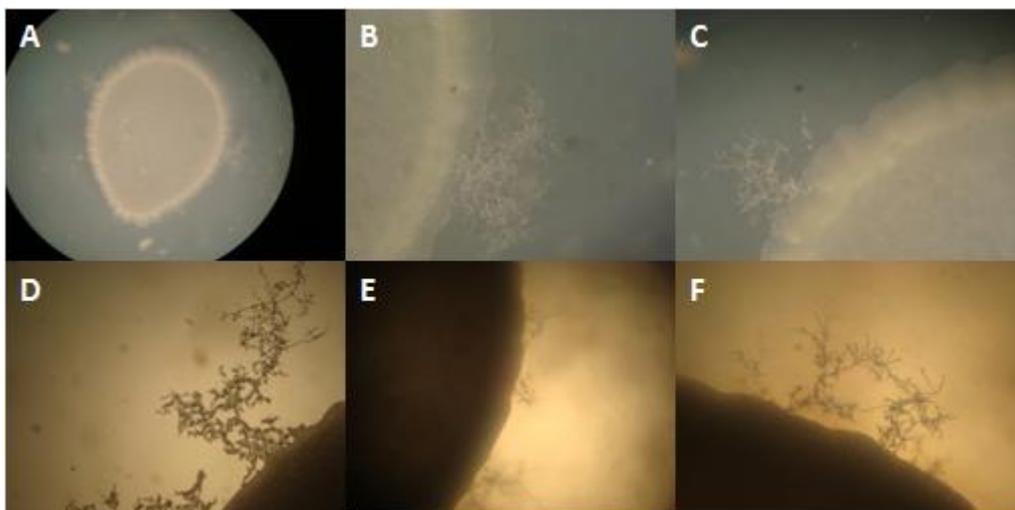
Ao entrarem em contato, células de tipos sexuais opostos secretam feromônios responsáveis por desencadear uma fusão de células **MATa- α** , que resultará na formação de hifas e produção de esporos. Sabe-se que em *C. neoformans* várias são as vias envolvidas no desenvolvimento sexuado, entre elas a cascata de proteína MAPK, desencadeada pela ação de feromônios, e a via de AMP cíclico sensível a nutrientes. A fim de se investigar a possibilidade de participação do gene VOSA na regulação do desenvolvimento sexuado, cepas mutantes foram introduzidas nos cruzamentos (**Figuras 29 e 30**).

Figura 29 – Teste de acasalamento entre cepas KN99 α vs. 62.vosA $\alpha\Delta$. Painel ilustrativo do cruzamento em meio ágar filament após 3 semanas de incubação no escuro, à temperatura ambiente. (a-b) Fotografia em detalhe do cruzamento selvagem vs. mutante, zoom lupa 2,5 X – Escala foto original: 400 $\mu\text{m}/\text{cm}$; (c-e) Fotografia em detalhe do cruzamento selvagem vs. mutante, zoom lupa 3,2 X – Escala foto original: 312,5 $\mu\text{m}/\text{cm}$; (g-i) Fotografia em detalhe das hifas do cruzamento selvagem vs. mutante, zoom microscópio 4 X – Escala foto original: 250 $\mu\text{m}/\text{cm}$.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Figura 30 – Teste de acasalamento entre cepas KN99 α vs. 52.vosA $\alpha\Delta$. Painel ilustrativo do cruzamento em meio ágar filament após 3 semanas de incubação no escuro, à temperatura ambiente. (a) Fotografia em detalhe do cruzamento selvagem vs mutante, zoom lupa 2,5 X – Escala foto original: 400 $\mu\text{m}/\text{cm}$; (b-c) Fotografia em detalhe do cruzamento selvagem vs. mutante, zoom lupa 3,2 X – Escala foto original: 312,5 $\mu\text{m}/\text{cm}$; (d-f) Fotografia em detalhe das hifas do cruzamento selvagem vs. mutante, zoom microscópio 4 X – Escala foto original: 250 $\mu\text{m}/\text{cm}$.

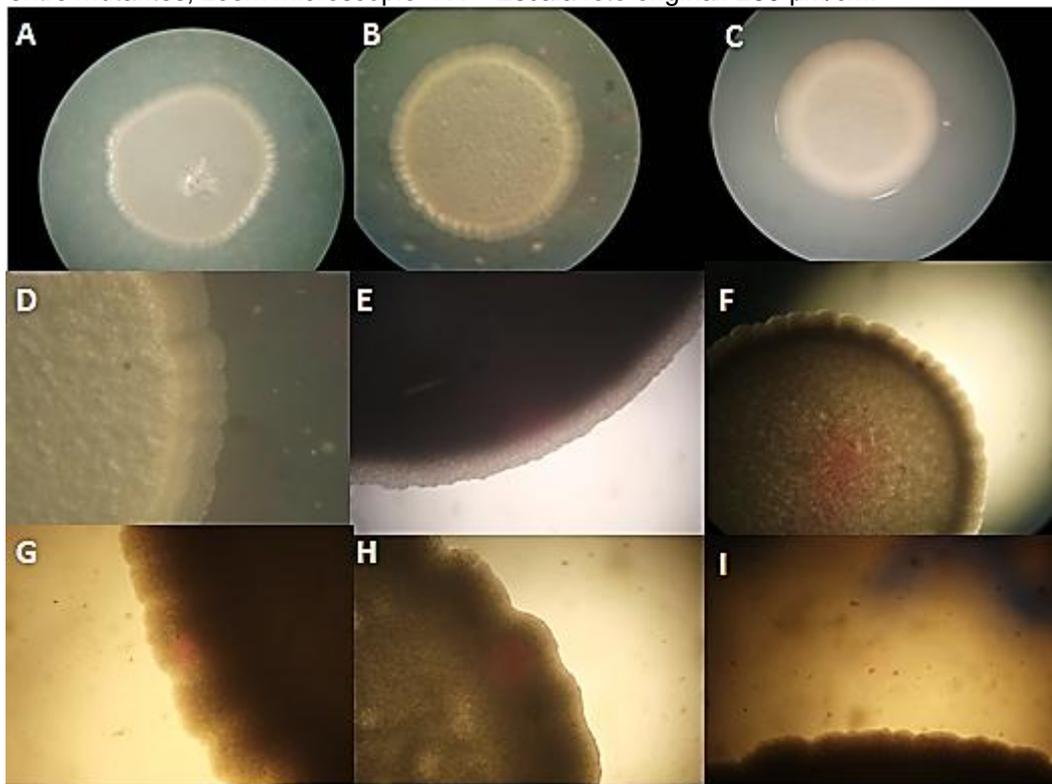


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

A observação de cruzamentos híbridos selvagem vs. mutante indicou diminuição considerável na formação de hifas em relação aos cruzamentos entre linhagens selvagens.

Cruzamentos entre mutantes foram realizados para se definir o grau de participação de VOSA nessa alteração fenotípica (**Figura 31**).

Figura 31 – Teste de acasalamento entre cepas mutantes: 62.vosAaΔ vs. 52.vosAαΔ. Painel ilustrativo do cruzamento em meio ágar filament após 3 semanas de incubação no escuro, à temperatura ambiente. (a-c) Fotografia em detalhe do cruzamento entre mutantes, zoom lupa 2,5 X – Escala foto original: 400 μm/cm; (d-e) Fotografia em detalhe das hifas do cruzamento entre mutantes, zoom lupa 3,2 X – Escala foto original: 312,5 μm/cm; (g-i) Fotografia em detalhe das bordas do co-cultivo entre mutantes, zoom microscópio 4 X – Escala foto original: 250 μm/cm.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

O cruzamento entre mutantes não apresentou qualquer formação de hifa dentro do tempo esperado ou mesmo em incubação prolongada. Esse fenótipo indica participação do gene VOSA nos processos de desenvolvimento sexuado, atuando como um regulador positivo. Observou-se através desse experimento a necessidade da presença de pelo menos uma cópia do gene VOSA para que o fenótipo de acasalamento seja retomado, mesmo que parcialmente.

A ausência de acasalamento no mutante *vosAΔ* não pode ser atribuída a um desbalanço na sensibilidade à luz, reguladora de vários processos fisiológicos em

fungos, pois o mesmo experimento foi realizado com exposição de placas à luz contínua sem qualquer alteração do resultado.

Um gene homólogo ao sensor de luz azul White collar 1 (WC1) de *N. crassa* foi descrito em *C. neoformans*. BWC1, Basidiomycete White collar 1, ao ser mutado, tornou *C. neoformans* insensível à influência da luz. Enquanto o acasalamento e a frutificação haploide em cepas selvagens são processos inibidos na presença de luz, mutantes *bwc1Δ* realizam ambos os processos com a mesma eficiência (Idnurm & Heitman, 2005). Caso VOSA estivesse envolvido na sensibilidade à luz, alguma diferença fenotípica teria sido observada durante o experimento de acasalamento em ambiente iluminado.

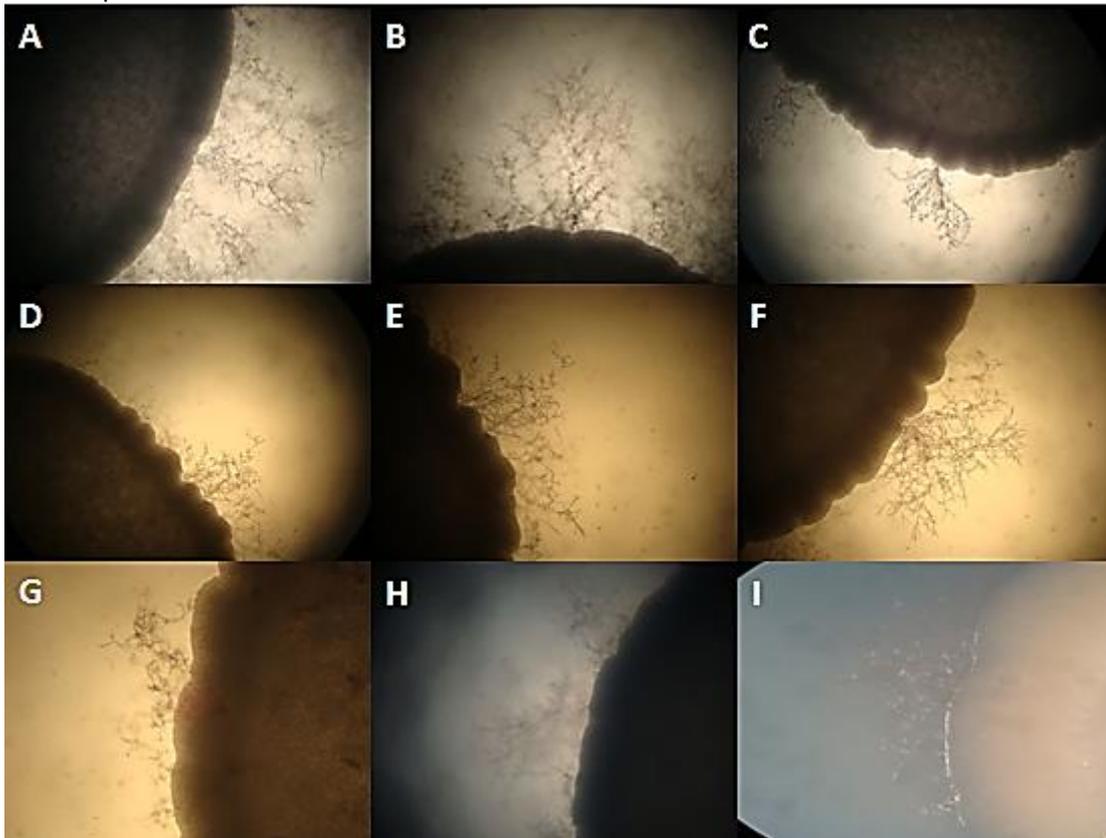
Mutantes *vosA* de *A. nidulans* apresentam ativação incontrolada da fase assexuada e corpos de frutificação sexual (cleistotécio) defeituosos contendo esporos inviáveis com redução drástica da tolerância ao calor e a H₂O₂. Em *H. capsulatum*, o gene RYP2, órtologo a VOSA, está envolvido na transição dimórfica em resposta a elevadas temperaturas e na viabilidade de esporos e regulação da esporulação (Webster & Sil, 2008). Em ambos os casos, no que concerne o controle do desenvolvimento sexuado, assim como em *C. neoformans*, VOSA se revela um regulador positivo.

Acredita-se que, assim como observado na literatura, mutantes *vosAΔ* em *C. neoformans* possivelmente apresentam alteração de fenótipo também na frutificação haploide. No entanto, não foi possível avaliar o envolvimento de VOSA na frutificação haploide de *C. neoformans* ao longo deste trabalho, visto que as linhagens que foram utilizadas para deleção gênica deste trabalho (KN99) não realizam tal processo in vitro, dessa forma seria necessária a deleção de VOSA na linhagem JEC21 (sorotipo D).

Sabe-se que a reprodução sexuada representa uma vantagem adaptativa para a maioria dos organismos, e aqueles que perdem ou nunca desenvolvem esta habilidade são mais suscetíveis à extinção do que aqueles que possuem essa capacidade (Burt, 2000). O acasalamento permite que ocorra a recombinação entre diferentes perfis genéticos e facilita a propagação de mutações benéficas dentro de uma população. Propicia também o surgimento de novas combinações genéticas que poderão representar vantagens adaptativas frente a ambientes em modificação. Além disso, a recombinação proporciona a oportunidade de algumas mutações deletérias serem removidas de uma população (Zeyl & Bell, 1997).

São necessárias maiores investigações a respeito do papel de VosA em vias de sinalização e interação com outros genes para que se possa estabelecer sua localização e função exatas no desenvolvimento sexuado de *C. neoformans*.

Figura 32 – Teste de acasalamento das cepas reconstituídas. Painel ilustrativo dos cruzamentos KN99 α vs. 30.62.vosA Δ ::VOSA α , KN99 α vs. 48.62.vosA Δ ::VOSA α e 30.62.vosA Δ ::VOSA α vs. 52.vosA α Δ em meio ágar filament após 3 semanas de incubação no escuro, à temperatura ambiente. (a-c) Fotografia em detalhe do cruzamento KN99 α vs. 30.62.vosA Δ ::VOSA α , zoom microscópio 4 X – Escala foto original: 250 μ m/cm; (d-e) Fotografia em detalhe do cruzamento KN99 α vs. 48.62.vosA Δ ::VOSA α , zoom microscópio 4 X – Escala foto original: 250 μ m/cm; (g-i) Fotografia em detalhe do cruzamento 30.62.vosA Δ ::VOSA α vs. 52.vosA α Δ , zoom microscópio 4 X – Escala foto original: 250 μ m/cm



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

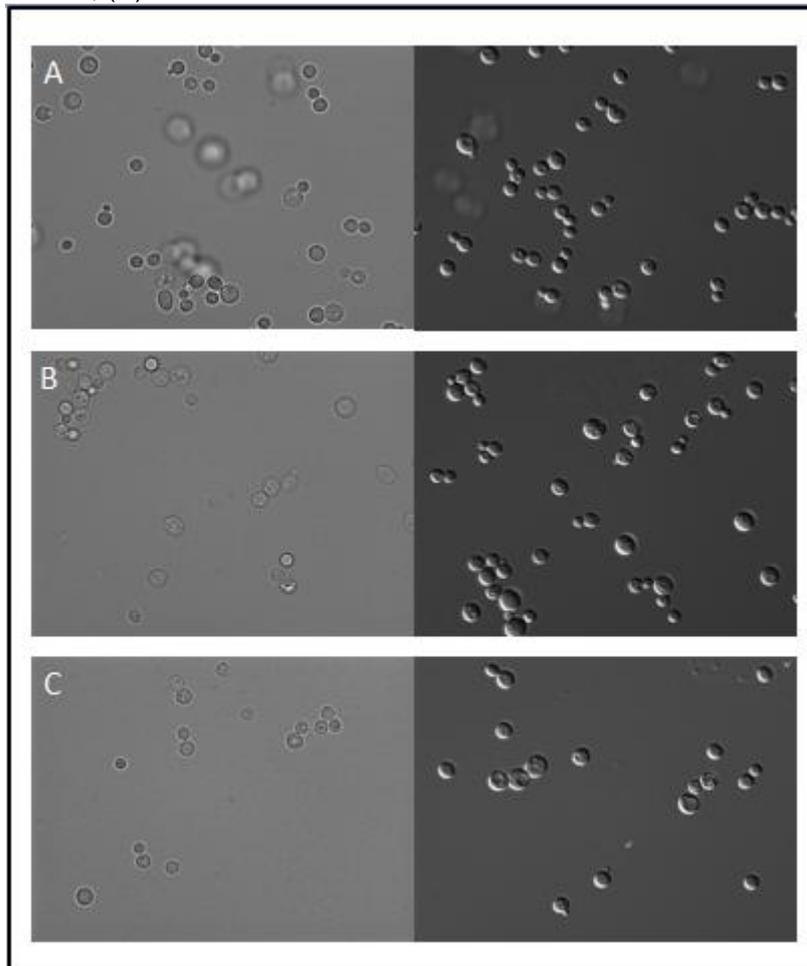
Os transformantes reconstituídos recuperaram a capacidade de realizar acasalamento e produzir hifas, inclusive quando submetidos a cruzamentos com cepas mutantes. O gene VOSA foi reintegrado ao genoma do mutante vosA Δ .

4.5 Análise microscópica da morfologia de leveduras e hifas mutantes vosA Δ

Foi realizada análise microscópica das cepas selvagem, mutante e reconstituída em busca de possíveis alterações morfológicas que as diferenciasssem.

As células leveduriformes foram observadas e seu diâmetro aferido para que as cepas pudessem ser comparadas (**Figura 33**).

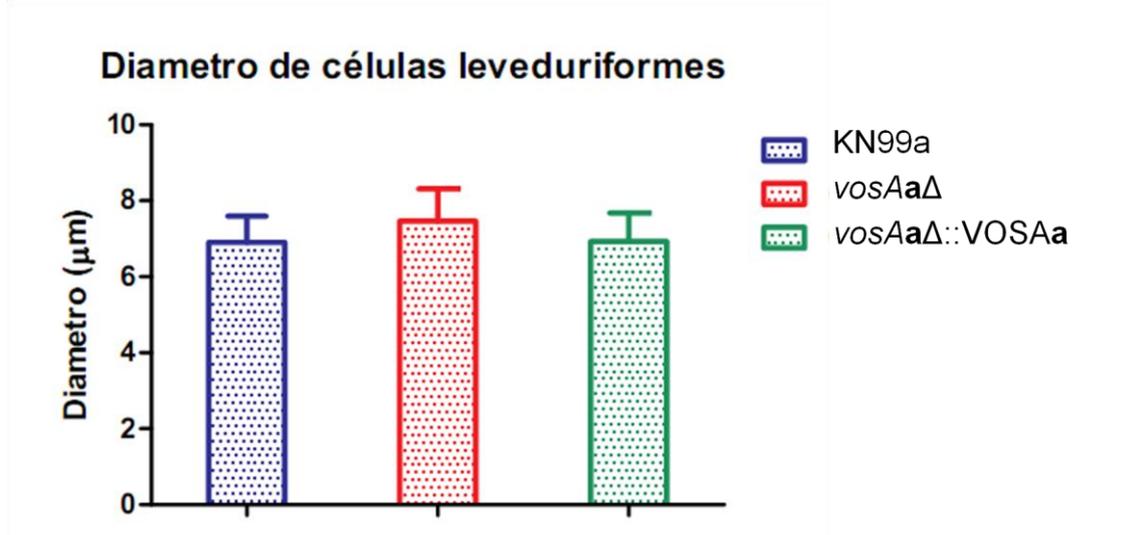
Figura 33 – Morfologia de leveduras de *C. neoformans*. Análise microscópica de células leveduriformes de *C. neoformans* em campo claro e DIC, respectivamente, com auxílio do microscópio. Zoom ótico de 63 X – Escala foto original: 15,87 $\mu\text{m}/\text{cm}$, lentes EC- Plan Neofluar. (A) KN99a, (B) 62.vosAa Δ , (C) 30.62.vosAa Δ ::VOSAa.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Não foi detectada nenhuma alteração morfológica e o diâmetro das células também não sofreu variação drástica (**Figura 34**).

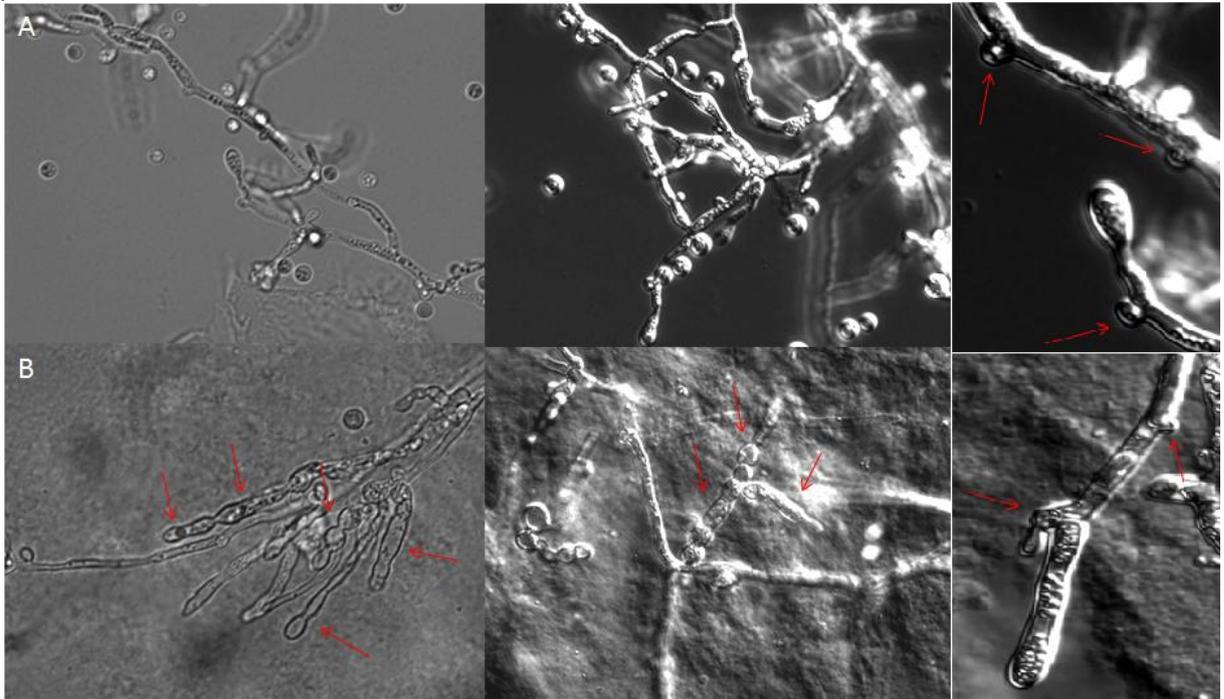
Figura 34 - Diâmetro médio das células leveduriformes de diferentes cepas de *C. neoformans*. Sendo a linhagem selvagem KN99a, mutante 62.vosAaΔ e reconstituído 30.62.vosAaΔ::VOSAa.a medida foi realizada com auxílio do software Zen Pro 11.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Não foi detectada nenhuma diferença significativa entre o valor dos diâmetros das células leveduriformes avaliadas após realização do teste estatístico *t-test* ($p > 0.001$). A ausência do gene VOSA não causa qualquer alteração morfológica nesse tipo celular. Além da análise de leveduras, as hifas formadas após co-cultivo para acasalamento também foram submetidas às avaliações: morfológica e morfométrica (**Figura 35**).

Figura 35 - Morfologia de hifas de *C. neoformans*. Análise morfológica das hifas resultantes de cruzamento KN99 α vs. KN99 α (A) e KN99 α vs. 52.vosA $\alpha\Delta$ (B) de *C. neoformans* em campo claro e DIC das hifas e em detalhe das conexões em forma de grampo, respectivamente. Alterações morfológicas foram evidenciadas com setas vermelhas. Zoom ótico de 40 X – Escala foto original: 25 μ m/cm, lentes EC- Plan Neofluar.

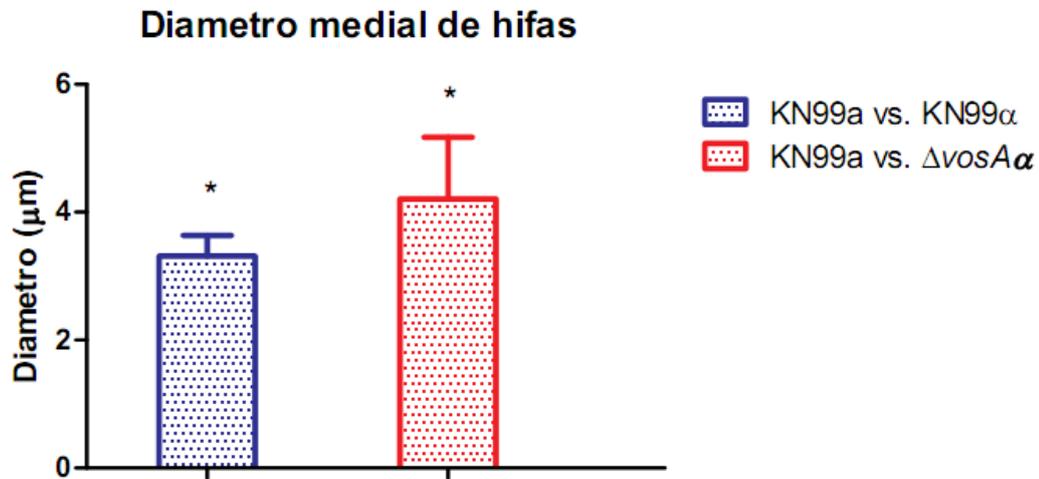


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

A análise microscópica evidenciou malformações nas hifas provenientes de cruzamento selvagem vs. mutante. Em geral, as hifas se mostram mais curtas e mais espessas, com o ápice achatado sem forma definida nem características de basídio. As conexões em forma de grampo desse cruzamento também se mostram alteradas em relação às conexões do cruzamento selvagem. Várias estruturas exóticas resultantes desse cruzamento podem ser observadas, incluindo as conexões em forma de grampo defeituosas.

A partir dessa observação pode-se concluir que o gene VOSA está envolvido na diferenciação de tipos celulares necessários ao desenvolvimento sexuado como acontece em *A. nidulans*. O diâmetro medial das hifas foi medido para uma melhor avaliação dos defeitos gerados pela deleção de VOSA (**Figura 36**).

Figura 36 – Diâmetro médio de hifas de *C. neoformans*. Análise do diâmetro medial de hifas provenientes de cruzamento KN99a vs. KN99 α e KN99a vs. 52.vosA Δ de *C. neoformans* com auxílio do software Zen Pro 11.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Foi possível observar uma pequena diferença estatisticamente significativa no diâmetro de hifas selvagem x mutante ($4,21\mu\text{m}\pm 0,96\mu\text{m}$) em relação às obtidas do cruzamento entre as linhagens selvagens ($3,31\mu\text{m}\pm 0,32\mu\text{m}$), comprovada pelo teste estatístico *t-test* ($p < 0.0001$). A variação nos valores de diâmetro se dá principalmente aos defeitos encontrados nas hifas híbridas (provenientes do cruzamento de cepas selvagem x mutante). Possivelmente esses defeitos estão relacionados ao fato de a hifa resultante deste cruzamento possuir apenas uma cópia do gene VOSA, suficiente para o aparecimento da estrutura, mas não para seu desenvolvimento perfeito.

Experimentos de dissecação para observação da morfologia e viabilidade dos basidiósporos resultantes desse cruzamento bem como de hiperexpressão do gene VOSA na cepa selvagem a ser cruzada são fundamentais para avaliar o papel desse gene na formação de esporos e para a compreensão do funcionamento do mecanismo de regulação do desenvolvimento de estruturas sexuais, no entanto não foram realizadas neste presente trabalho.

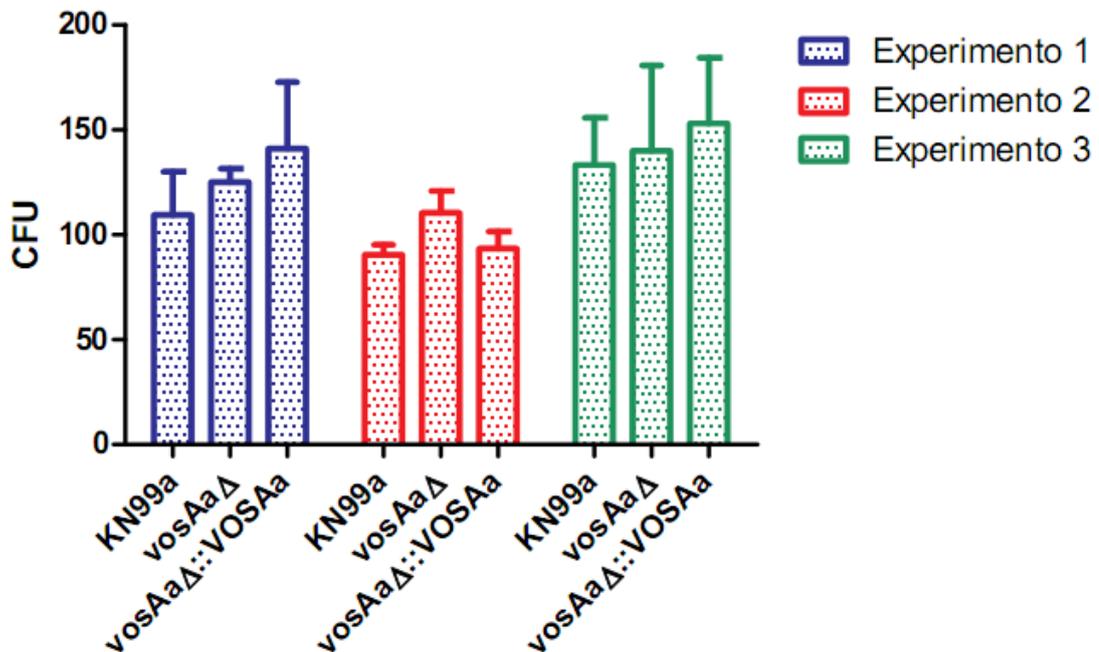
4.6 Avaliação de virulência *in vitro* dos mutantes vosA Δ

As cepas selvagem, mutante e reconstituída foram avaliadas quanto a sua virulência a partir da infecção de macrófagos (**Figura 37**). Sabe-se que mutantes

envolvidos na produção de trealose de *C. neoformans* são avirulentos em alguns modelos animais como coelhos e camundongos (Petzold *et al.*, 2006).

Figura 37 – Ensaio de sobrevivência em macrófagos peritoneais. Teste de virulência *in vitro* em macrófagos peritoneais J774.A1 das cepas selvagem (KN99a), mutante (62.vosAa Δ) e reconstituída (30.62.vosAa Δ ::VOSAa) de *C. neoformans*.

Ensaio de sobrevivência em macrófagos



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

A partir da análise dos resultados do teste de virulência foi possível afirmar que não há diferença significativa entre as taxas de sobrevivência das cepas avaliadas ($p > 0.001$) de acordo com teste estatístico 2way ANOVA. A perda do gene VOSA não acarreta em diminuição da virulência de *C. neoformans*.

4.7 Curva de crescimento em meios com diferentes concentrações de nitrogênio

O nitrogênio é uma das principais moléculas essenciais à sobrevivência de vários organismos. Porém, nem todos são capazes de assimilar quantidades suficientes para suprir suas necessidades diretamente da atmosfera, o que faz com que a habilidade de utilizar formas reduzidas de nitrogênio de recursos alternativos seja fundamental para manter seu abastecimento.

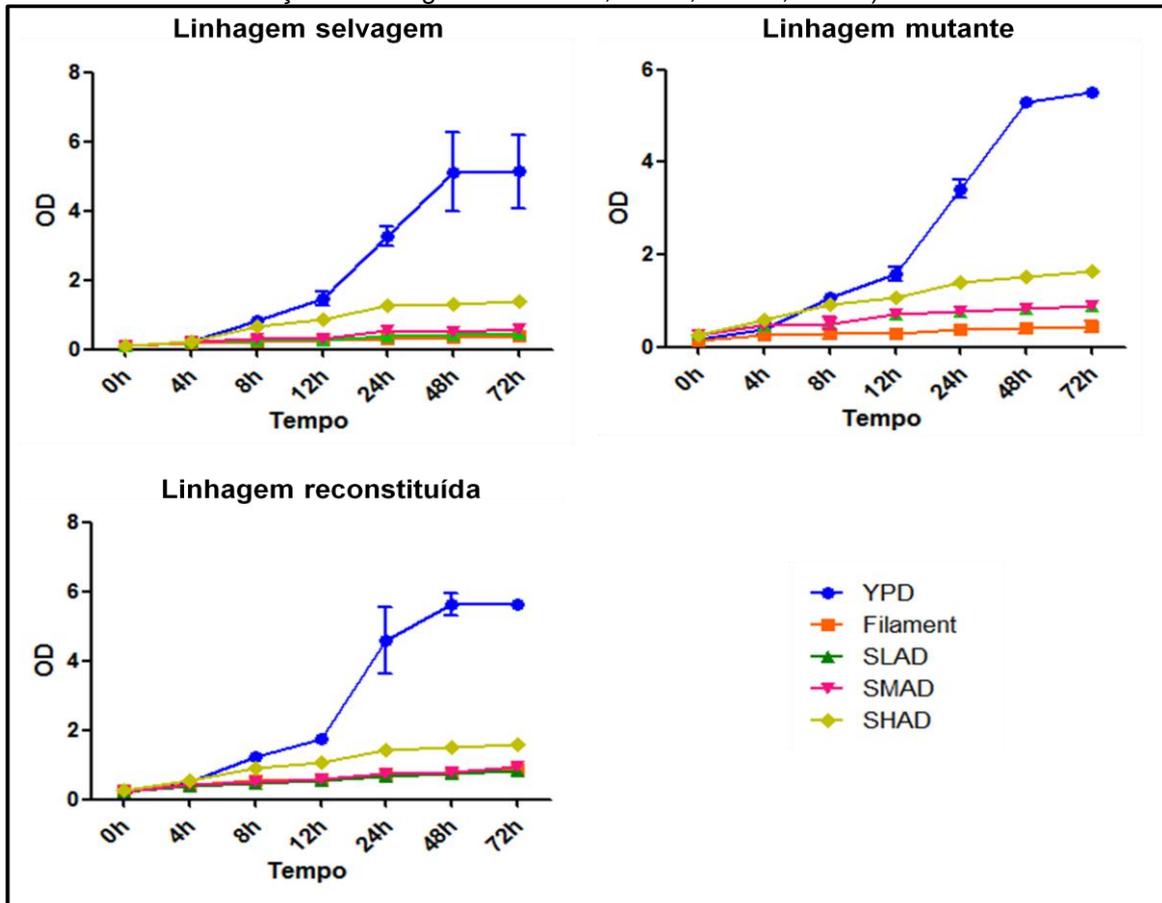
Fungos são notadamente hábeis na utilização de vários compostos como fonte de nitrogênio pela ação de algumas enzimas e permeases em uma variedade de vias. Amônio e glutamina são as principais fontes de nitrogênio fúngicas de

rápida assimilação. Na falta delas, aminas, amidas, purinas e pirimidinas podem ser utilizadas (Lee *et al.*, 2011).

Em *C. neoformans*, a importância do metabolismo de nitrogênio é evidente ao levarmos em conta seu nicho ecológico principal, as excretas de pombo, (rico em nitrogênio na forma de ácido úrico: cerca de 70% da composição), ureia, xantina e creatinina (Casadevall & Perfect, 1988). Durante a infecção humana, a oferta de nitrogênio passa a ser muito baixa e alguns fatos indicam que o metabolismo de nitrogênio em *C. neoformans* é importante para regulação de sua virulência. A cápsula polissacarídica, um dos principais fatores de virulência, é altamente induzida na presença de ácido úrico, que para ser assimilado requer a utilização de outro conhecido fator de virulência, a urease. Apesar de se saber pouco sobre essa relação entre metabolismo de nitrogênio e a patogenicidade de *C. neoformans*, Lee e colaboradores (2011) descreveram recentemente um fator de transcrição, Gat1, que além de funcionar no controle do metabolismo de nitrogênio está envolvido na regulação negativa do acasalamento, na produção de melanina a 37 °C e na síntese da cápsula polissacarídica.

A partir dessas informações, em especial no que se refere ao envolvimento desse fator de transcrição na regulação do acasalamento, realizou-se uma curva de crescimento com cepas selvagem, mutante e reconstituída em diferentes meios de cultura contendo diferentes quantidades de nitrogênio de modo a investigar uma possível relação entre o metabolismo de nitrogênio e VOSA (**Figura 38**).

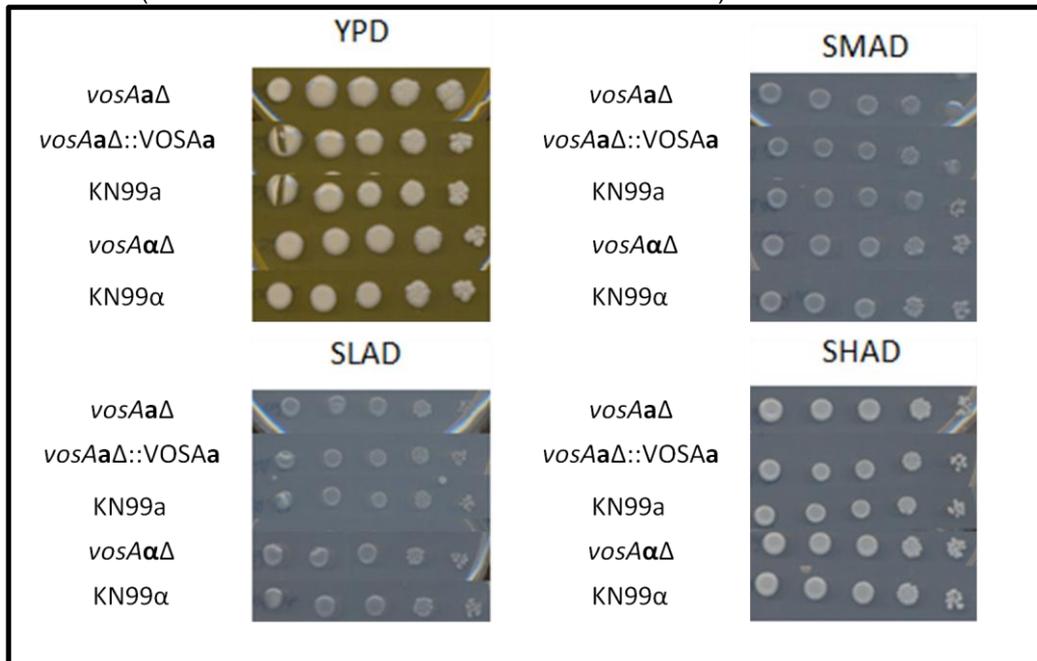
Figura 38 – Curvas de crescimento de *C. neoformans*. Foram geradas através da medida turbidez a OD=660nm das cepas selvagem, mutante e reconstituída de *C. neoformans* para análise da capacidade de crescimento em meios com diferentes concentrações de nitrogênio (Em ordem crescente de concentração de nitrogênio: Filament, SLAD, SMAD, SHAD).



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

As curvas de crescimento geradas não apresentaram qualquer diferença significativa entre as cepas testadas, indicando que a ausência de VOSA não acarreta prejuízo no metabolismo de nitrogênio de *C. neoformans*. Um experimento de diluição seriada nas mesmas condições da curva de crescimento foi realizado para confirmar o resultado (**Figura 39**).

Figura 39 – Diluição seriada de *C. neoformans* em meios compostos de fontes de nitrogênio. Análise da capacidade de crescimento a 30 °C em meios com diferentes concentrações de nitrogênio (YPD, SLAD, SMAD e SHAD) de cepas selvagens (KN99a e KN99 α), mutantes (62.vosAa Δ e 52.vosA $\alpha\Delta$.) e reconstituídas (30.62.vosAa Δ ::VOSAa e 48.62.vosAa Δ ::VOSAa) de *C. neoformans*.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Nenhuma alteração no crescimento de mutantes *vosA* Δ foi identificada em relação às cepas selvagens portanto, o gene VOSA não está envolvido no mecanismo de controle do metabolismo de nitrogênio em *C. neoformans*.

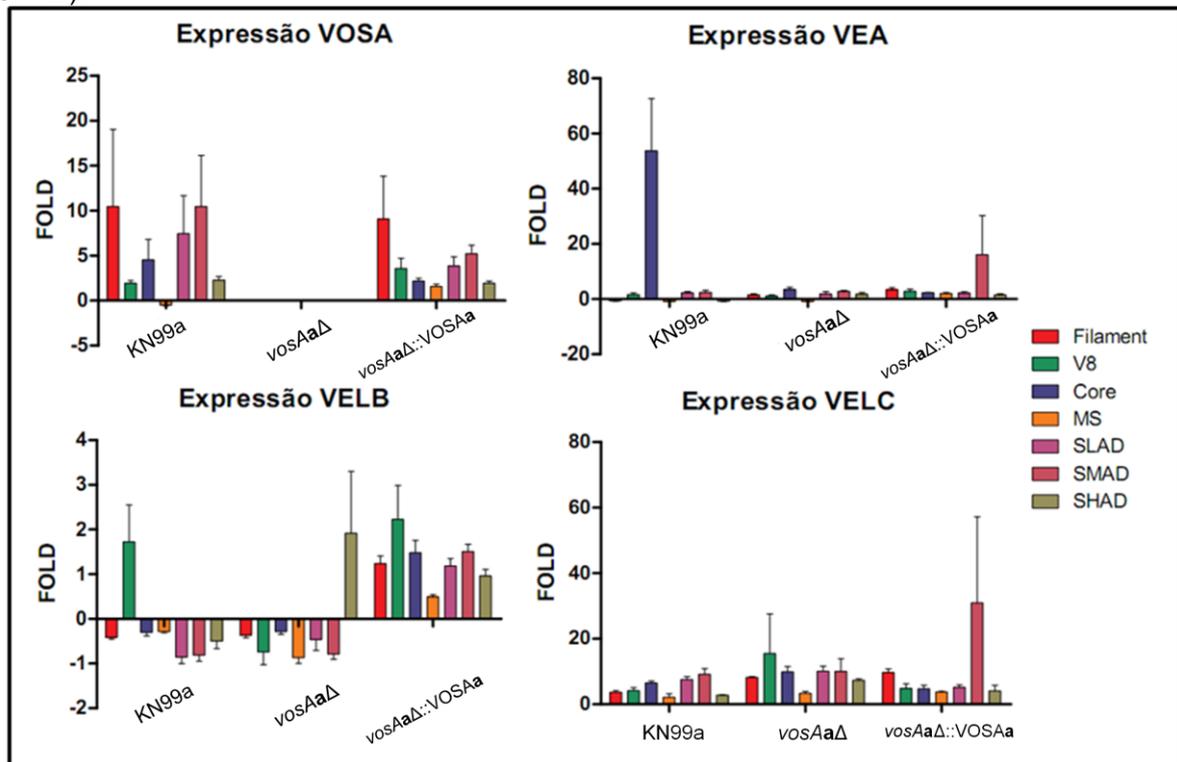
4.8 Investigação por PCR em tempo real da expressão dos genes *velvet* nos mutantes *vosAa* Δ

A família de proteínas *velvet* é conhecida por participar do controle do metabolismo secundário e de processos de diferenciação como esporulação sexuada e assexuada e formação de corpo de frutificação (Bayram e Braus, 2012). Sabe-se que as proteínas dessa família interagem de formas variadas formando complexos protéicos e desempenhando diferentes funções. No entanto, não há registro na literatura de *C. neoformans* e *A. nidulans* a respeito da regulação direta destas proteínas por VOSA como ocorre com *H. capsulatum*. Neste fungo os genes ortólogos aos *velvet* são diferencialmente controlados por RYP1 (Webster & Sil, 2008).

A fim de investigar se VOSA regula a expressão das demais proteínas *velvet* em *C. neoformans*, foi realizada a análise da expressão dos genes que codificam

tais proteínas no mutante *vosAΔ* em diferentes meios indutores de acasalamento em comparação às cepas selvagem e reconstituída (**Figura 40**).

Figura 40 – Padrão de expressão da família *velvet* em mutantes *vosAΔ*. Análise da expressão dos genes *velvet*: VOSA (LF087 + LF088), VEA (LF259 + LF260), VELB (LF273 + LF274) e VELC (LF265 + LF266) nas cepas selvagem (KN99a), mutante (62.*vosAaΔ*) e reconstituída (30.62.*vosAaΔ::VOSAa*) de *C. neoformans* em meios indutores de acasalamento (Filament, V8, Core, MS, SLAD, SMAD, SHAD).



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

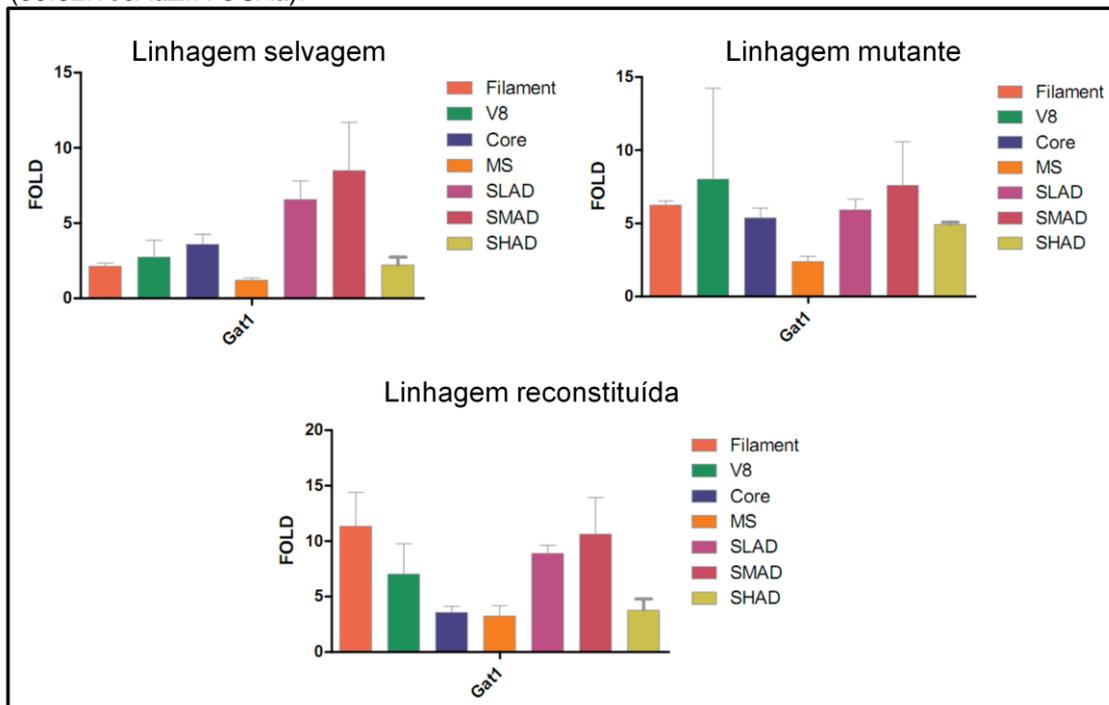
A análise das expressões não evidenciou qualquer alteração no padrão de expressão dos genes *velvet* na linhagem mutante em relação à selvagem. No entanto, não foi possível mimetizar as condições de acasalamento na realização desse experimento e extrair o RNA das linhagens de um cruzamento.

A fim de se melhor investigar a relação transcricional entre as proteínas *velvet*, é necessário gerar a cepa mutante *velCΔ* em *C. neoformans* (etapa em andamento, realizada por Santos, T.C) para que seja possível realizar cruzamentos entre as cepas mutantes *velvet*. Além disso, a geração de uma biblioteca para ensaios de duplo-híbrido bem como a realização de um experimento de imunoprecipitação poderiam evidenciar se existe a interação física entre essas proteínas.

4.9 Investigação por PCR em tempo real da expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio nos mutantes *vosAΔ*

As cepas selvagem, mutante e reconstituída foram analisadas quanto à expressão do gene envolvido no metabolismo de nitrogênio em meios indutores de acasalamento, GAT1 (**Figura 41**).

Figura 41 – Padrão de expressão de GAT1 em mutantes *vosAΔ*. Análise da expressão de GAT1 (LF257 + LF258), gene envolvido no metabolismo de nitrogênio de *C. neoformans*, em meios indutores de acasalamento nas cepas selvagem (KN99a), mutante (62.*vosAΔ*) e reconstituída (30.62.*vosAΔ::VOSAa*).



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Os dados demonstram que o mutante *vosAΔ* não apresenta qualquer interferência significativa no padrão de expressão de GAT1, o que corrobora os experimentos fenotípicos em meios com diferentes concentrações de nitrogênio realizados previamente. Nenhuma alteração de crescimento ou fenotípica foi observada no mutante *vosAΔ*.

Sabe-se que Gat1 em *C. neoformans* exerce controle negativo sobre o acasalamento (Lee *et al.*, 2011), efeito oposto ao de VOSA pelo que foi demonstrado em experimentos fenotípicos. Uma efetiva confirmação acerca da possível interação entre VOSA e GAT1 pode ser esclarecida por meio de ensaios de duplo-híbrido

aproveitando-se a biblioteca que será gerada para o experimento com proteínas *velvet*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Experimentos de análise funcional de VOSA excluíram seu envolvimento no controle ou síntese de fatores de virulência de *C. neoformans*, o que foi confirmado ao se constatar que não houve nenhuma alteração na sua capacidade de virulência em ensaios de sobrevivência em macrófagos *in vitro*. Da mesma forma, VOSA não está relacionado à sensibilidade a qualquer das condições de estresse testadas.

A deleção do gene VOSA em *C. neoformans* evidenciou sua participação no controle e regulação da morfogênese fúngica durante o processo de acasalamento. No entanto, o papel exato deste fator nas vias de sinalização envolvidas no acasalamento ainda precisa ser elucidado.

Concluiu-se que apenas uma cópia do gene VOSA é necessária para que ocorra o acasalamento em um co-cultivo de linhagens de tipo sexual oposto. Porém, apenas uma cópia do gene no processo resulta em redução da quantidade de hifas produzidas.

Mutantes *vosA* Δ de *C. neoformans* apresentam má formação das hifas geradas no desenvolvimento sexuado, indicando sua importância nessa diferenciação morfológica de forma análoga ao que acontece em mutantes *vosA* Δ de *A. nidulans* na formação do cleistotécio (Ni & Yu, 2007).

Isentou-se a participação de VOSA na regulação da assimilação e sensoamento de nitrogênio em *C. neoformans*. A incapacidade dos mutantes *vosA* Δ de realizarem acasalamento não está ligada a um defeito no sensoamento de níveis de nitrogênio no meio extracelular que porventura influenciasse na percepção de condições de deprivação de nitrogênio indutoras desse processo. Não foi observada nenhuma relação transcricional entre VOSA e GAT1, que codifica um fator transcricional de genes responsáveis pela aquisição de nitrogênio (Lee *et al.*, 2011).

Por fim, não foi possível estabelecer qualquer regulação transcricional entre os genes da família velvet em *C. neoformans*, na ausência de VOSA.

6 PERSPECTIVAS

Sabe-se que gene VOSA em *A. nidulans* é necessário para regulação dos genes da biossíntese de trealose e para seu acúmulo tanto em esporos sexuados quanto assexuados (Ni & Yu, 2007). Dessa forma, uma investigação sobre a relação de VOSA de *C. neoformans* com essa via é de extrema importância. Um estudo aprofundado da relação entre VOSA e os demais genes de síntese e degradação de trealose envolvidos nesta via no mutante é necessário para relacionar o papel de VOSA com este processo. A análise dos padrões de expressão de TPS1, TPS2 e NTH1 em *vosA*Δ e a quantificação de trealose de esporos originados de cruzamento selvagem vs. mutante podem colaborar na caracterização desse processo em *C. neoformans*.

Esporos produzidos por reprodução sexuada e assexuada são importantes para infecção de *C. neoformans* (Velagapudi *et al.*, 2009). Testes de viabilidade por microdissecação de esporos provenientes de cruzamentos entre linhagens selvagem e mutante *vosA*Δ, caso existam, são necessários para caracterização do papel desse gene na viabilidades destas formas de disseminação do fungo. Em contrapartida, a incapacidade das linhagens de sorotipo A aqui testadas em realizar frutificação haploide, levam à necessidade da deleção de VOSA no sorotipo D para futuros testes de acasalamento, frutificação haploide e viabilidade de esporos.

Um experimento já em andamento para obtenção de cepas repórter para citolocalização de VosA é de fundamental importância para auxiliar os trabalhos de caracterização de sua função dentro da célula, como um possível fator transcricional. A construção de VOSA fusionado a GFP já foi gerada e transformada nos mutantes de *vosA*Δ, no entanto não foi possível selecionar um transformante com fluorescência forte o suficiente para citolocalização (dados não mostrados).

VosA é uma proteína *velvet* que, em *A. nidulans*, forma um complexo dimérico com VelB (VelB-VosA), em hifas vegetativas atuando no início do desenvolvimento assexuado (Bayram *et al.*, 2008). Sabe-se que *C. neoformans* apresenta em seu genoma todas as sequências que codificam os genes *velvet*, no entanto a forma como eles funcionam neste patógeno ainda é desconhecida. A análise da interação de proteínas *velvet* permitirá a compreensão da atuação dessa família na patobiologia deste fungo. Ensaio de acasalamento entre mutantes *velvet*, a geração de linhagens duplo-mutantes e ensaios de duplo-híbrido são maneiras eficazes de se observar essa interação.

O presente trabalho é o primeiro a explorar o papel das proteínas *velvet* em *C. neoformans* e representa apenas o início do conhecimento a respeito do papel do gene VOSA neste fungo, uma vez que, a partir dos experimentos realizados, surge uma gama de novas possibilidades e desafios para aqueles que estudam fungos patogênicos humanos, em especial *C. neoformans*. O aprofundamento nas investigações é fundamental para a inédita caracterização molecular e funcional deste gene em *C. neoformans*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler A, Park Y-D, Larsen P, Nagarajan V, Wolleberg K, Qiu J, Myers TG, Williamson PR. A Novel Specificity Protein 1 (SP1)- Like gene, regulating Protein Kinase 1 (Pkc-1) Dependent Cell Wall Integrity and Virulence Factors in *Cryptococcus neoformans*. J. Biol. Chem. 2011; 286: 20977-90.
- Al-Bader N, Vanier G, Liu H, Gravelat FN, Urb M, Hoareau CM-Q, Campoli P, Chabot J, Filler SG, Sheppard DC. Role of Trehalose Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* Development Stress Response, and Virulence. Infect Immun. 2010; 78: 3007-18.
- Alspaugh JA, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* Mating and Virulence are Regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. Gen Dev 1997; 11: 3206-17.
- Alspaugh JA, Cavallo LM, Perfect JR, Heitman J. RAS1 Regulates Filamentation, Mating, and Growth at High Temperature of *Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol 2000; 36: 352-65.
- Alspaugh JA, Pukkila-Worley R, Harashima T, Cavallo LM, Funnell D, Cox GM, Perfect JR, Kronstad JW, Heitman J. Adenylyl ciclase Functions Downstream of the Galpha protein Gpa1 and Controls Mating and Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell 2002; 1:75-84.
- Amaike S, Keller N.P. Distinct roles for VeA and LaeA in Development and Pathogenesis of *Aspergillus flavus*. Eukaryot Cell 2009; 8: 1051-60.
- Arguelles JC. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. Arch Microbiol 2000; 174: 217-24.
- Bahn YS, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* Growth, Differentiation, and Virulence. Current Biology 2005; 15: 2013-20.
- Bhattacharjee AK, Bennet JE, Glaudemans CP. Capsular Polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. Rev Infect Dis 1984; 6: 619-24.
- Bahn YS, Kojima K, Cox GM, Heitman J. Specialization of HOG Pathway and its Impact on Differentiation and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Mol Biol Cell 2005; 16: 2285-2300.
- Ballou ER, Alspaugh JA, Nichols CB. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. In: Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi: Topics in Current Genetics, ed. Pérez-Martin J, Di Pietro A, Springer Berlin Heidelberg 2012; 22: 197-223.
- Bayram O, Braus GH. Coordination of Secondary Metabolism and Development in Fungi: The Velvet Family of Regulatory Proteins. FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 1-24.

- Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok J-W, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeyer S, Kwon N-J, Keller NP, Yu J-H, Braus GH. Ve1B/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science* 2008; 320: 1504-06.
- Branco MR, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. Decrease of H₂O₂ Plasma Membrane Permeability during Adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 6501-06.
- Buchanan KL, Murphy JW. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? *Emerg Infect Diseases* 1998; 4: 71-83.
- Bulmer GS. Twenty-five Years with *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1990; 109: 111-22.
- Burt A. Perspective: Sex, Recombination and the Efficacy of Selection – Was Weismann right?. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 2000; 54: 337-51.
- Calvo A. The VeA Regulatory System and its Role in Morphological and Chemical Development in Fungi. *Fungal Genet Biol* 2008; 45: 1053-61.
- Casadevall A, Perfect JA (1998) *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, DC.
- CDC.gov. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention [atualizada em: 2013 May 6, acesso em 2013 June 15] Sources of Infection. Disponível em: <http://www.cdc.gov/>
- Champe SP, Kurtz MB, Yager LM, Butnick NJ and Axelrod DE. Spore Formation in *Aspergillus nidulans*: Competence and other Developmental Processes. In Turian,G. and Hohl,H.R. (eds), *The Fungal Spore: Morphogenic Controls*, Academic Press, Inc., 1981, NY, pp. 255–76.
- Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The Second STE12 Homologue of *Cryptococcus neoformans* is MATa-specific and Plays an Important Role in Virulence. *PNAS* 2001; 98: 3258-63.
- Chang YC, Miller GF, Kwon-Chung KJ. Importance of a Developmentally Regulated Pheromone Receptor of *Cryptococcus neoformans* for Virulence. *Infect Immun* 2003; 71: 4953-60.
- Chaturvedi S, Chaturvedi V. Virulence Mechanisms of *Cryptococcus gattii*: Convergence and Divergence. *In: Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. 2011; ASM Press pp. 189-201.
- Chatuverdi V, Flynn T, Niehaus WG, Wong B. Stress Tolerance and Pathogenic Potential of Mannitol Mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol* 1996; 142: 937-43.

- Chen SC, Muller M, Zhou JZ, Wright LC, Sorrell TC. Phospholipase Activity in *Cryptococcus neoformans*: A New Virulence factor? *J Infect Dis* 1997; 175: 414-20.
- Chen L-C, Goldman DL, Doering TL, Pirofski L-A, Casadevall A. Antibody Response to *Cryptococcus neoformans* Proteins in Rodents and Human. *Infect Immun* 1999; 67(5): 2218-24.
- Clarke DL, Woodlee GL, McClelland CM, Seymour TS, Wickes BL. The *Cryptococcus neoformans* STE11alpha Gene is Similar to Other Fungal Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) Genes but is Mating Type Specific. *Mol Microbiol* 2001; 40: 200-13.
- Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell T, Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum MA, Perfect JR. Extracellular Phospholipase Activity is a Virulence Factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2001; 39: 166-75.
- Cruz MC, Fox DS, Heitman J. Calcineurin is Required for Hyphal Elongation During Mating and Haploid Fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2001; 49: 469-85.
- Davidson RC, Nichols CB, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. A MAP kinase Cascade Composed of Cell Type Specific and Non-specific Elements Controls Mating and Differentiation of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2003; 49: 469-85.
- Djordjevic JT (2010) Role of Phospholipases in Fungal Fitness, Pathogenicity and Drug Development – Lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology* 1: 1-13.
- Erickson T, Liu L, Gueylkian A, Zhu X, Gibbons J, Williamson PR. Multiple Virulence Factors of *Cryptococcus neoformans* are Dependent on VPH1. *Mol Microbiol* 2001; 42: 1121-31.
- Folmer V, Pedroso N, Matias AC, Lopes SCD, Antunes F, Cyrne L, Marinho HS. H₂O₂ Induces Rapid Biophysical and Permeability Changes in the Plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 1141-47.
- Fox DS, Cox GM, Heitman J. The Phospholipid-binding Protein Cts1 Controls Septation and Functions Coordinately with Calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2003; 2: 1025-35.
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. Unipolar Cell Divisions in the Yeast *S. cerevisiae* Lead to Filamentous Growth: Regulation by Starvation and RAS. *Cell* 1992; 68: 1077-90.
- Granger DL, Perfect JR, Durack DT. Virulence of *Cryptococcus neoformans*

- Regulation of Capsule Synthesis by Carbon Dioxide. (1985). *J Clin Invest.* 1985; 76; 508–516.
- Haynes BC, Skowrya ML, Spencer SJ, Gish SR, Williams M, Held EP, Brent MR, Doering TL (2011) Toward an Integrated Model of Capsule Regulation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* 7: e1002411. doi:10.1371/journal.ppat.1002411.
- Herskowitz I, Oshima Y (1981) Control in Cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: Mating Type and Mating-type Interconversion. *In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance* pp. 181-209.
- Hsueh Y-P, Lin X, Kwon-Chung KJ, Heitman J (2011) Sexual Reproduction of *Cryptococcus*. *In: Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast.* ASM Press pp. 81-96.
- Hull C, Davidson RC, Heitman J. Cell Identity and Sexual Development in *Cryptococcus neoformans* are Controlled by the Mating-type-specific Homeodomain Protein Sxi1 α . *Gen Dev* 2002; 16: 3046-60.
- Hull CM, Heitman J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet* 2002; 36: 557-615.
- Hull CM, Boily MJ, Heitman J. Sex-specific Homeodomain Proteins Sxi1 α and Sxi2 α Coordinately Regulate Sexual Development in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 526-35.
- Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Rev Microbiol* 2005; 3: 753-64.
- Idnurm A, Heitman J. Light Controls Growth and Development via a Conserved Pathway in the Fungal Kingdom. *PLoS Biology* 2005; 3: e95.
- Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of Melanin upon Susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol. Immunol.* 2003; 47: 271-7.
- Janbon G, Doering TL (2011) Biosynthesis and Genetics of the *Cryptococcus* capsule *In: Cryptococcus: From Pathogen to Model Yeast.* ASM Press pp.27-41.
- Käfer E (1965) The Origin of Translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52: 217-32.
- Kent CR, Ortiz-Bermudez P, Giles SS, Hull CM. Formulation of a Defined V8 Medium for Induction of Sexual Development of *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 6248-53.
- Kim HS, Han KY, Kim KJ, Han DM, Jahng KY, Chae KS. The veA Gene Activates Sexual Development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 2002; 37: 72-80.

- Kim HS, Kim S-Y, Yoon JK, 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* 2009; 390: 983-88.
- Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling Pathways in the Pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol.* 11: 370-80.
- Kraus PR, Fox DS, Cox GM, Heitman J. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Homolog Mpk1 Regulates Cell Integrity in Response to Antifungal Drugs and Loss of Calcineurin Function. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1377-87.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of Alpha and a Mating Types of *Cryptococcus neoformans* Among Natural and Clinical Isolates. *Am J Epidemiol* 1978; 108: 337-40.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Popkin TJ. Melanin-lacking Mutants of *Cryptococcus neoformans* and their Virulence for Mice. *J Bacteriol* 2009; 150: 1414-21.
- La Cour T, Kiemer L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and Prediction on Leucine-rich Nuclear Export Signals. *Protein Eng. Des. Sel.* 2004; 17: 527-36.
- Lam WC, Gerik KJ, Lodge JK. Role of *Cryptococcus neoformans* Rho1 GTPases in the PKC1 Signalling Pathway in Response to Thermal Stress. *Eukaryot Cell* 2013; 12: 118-31.
- Lee IR, Chow EWL, Morrow CA, Djordjevic JT, Fraser JA. Nitrogen Metabolite Repression of Metabolism and Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 2011; 188: 309-23.
- Lee SC, Phadke S, Sun S, Heitman J. Pseudohyphal Growth of *Cryptococcus neoformans* Is a Reversible Dimorphic Transition in Response to Ammonium that Requires Amt1 and Amt2 Ammonium Permeases. *Eukaryot Cell* 2012; 11: 1391-98.
- Lengeler KB, Wang P, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Identification of the MAT α Mating-type Locus of *Cryptococcus neoformans* Reveals a Serotype A MAT α Strain thought to have been Extinct. *PNAS* 2000; 97: 14455-60.
- Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2010; 7: 186-96.
- Lin X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, Infection and Evolution. *Infection, Genet Evol* 2009; 9: 401-16.
- Lin X, Heitman J. Chlamyospore Formation During Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2005;4: 1746-54.

- Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Ann Rev Microbiol* 2006; 60: 69-105.
- Lin X, Jackson JC, Feretzaki M, Xue C, Heitman J. Transcription Factors Mat2 and Znf2 Operate Cellular Circuits Orchestrating Opposite- and Same-sex Mating in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Genetics* 2010; 6: e10000953.
- Lu YK, Sun KH, Shen WC. Blue Light Negatively Regulates the Sexual Filamentation via the Cwc1 and Cwc2 Proteins in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2005; 56: 480-91.
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC *et al.* Consensus Multi-locus Sequence Typing Cheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2009; 47: 561-70.
- Mooney JL, Yager LN. Light is Required for Conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Gen Dev* 1990; 4: 1473-82.
- Murphy JW. Protective Cell-mediated Immunity Against *Cryptococcus neoformans*. *Res. Immunol.* 1998; 149: 373-96.
- Myung K, Li S, Butchko RA, Busman M, Proctor RH, Abbas HK, Calvo AM. FvVE1 Regulates Biosynthesis of the Mycotoxins Fumonisin and Fusarins in *Fusarium verticilloides*. *J Agricult Food Chem* 2009; 57: 5089-94.
- Ngamskulrungrroj P, Himmelreich U, Breger JA, Wilson C, Chayakukeeree M, Krockenberger MB *et al.* The Trehalose Synthesis Pathway Is an Integral Part of the Virulence Composite for *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun* 2009; 77: 4584-96.
- Ni M, Yu J-H. A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2007; 2: e970.doi10.1371/journal.pone.0000970.
- Nielsen K, De Obaldia AL, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* Mates on Pigeon Guano: Implications for the Realized Ecological Niche and Globalization. *Eukaryot Cell* 2007; 6: 949-59.
- Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect JR, Heitman J. Calcineurin is Required for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* 1997; 16: 2576-89.
- Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *Am J Pathol* 2004; 164: 1761-71.
- Park H-S, Ni M, Jeong KC, Kim YH, Yu J-H. The Role, Interaction and Regulation of the Velvet Regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 2012; 7: e45935. doi:10.1371/journal.pone.0045935.
- Petzold EW, Himmelreich U, Mylonakis E, Rude T, Toffaletti D, Cox GM, Miller JL, Perfect JR. Characterization and Regulation of the Trehalose Synthesis Pathway

- and Its Importance in the Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2006; 74: 5877-87.
- Pitkin JW, Panaccione DG, Walton JD. A Putative Cyclic Peptide Efflux Pump Encoded by the *TOXA* gene of the Plant- pathogenic Fungus *Cochliobolus carbonum*. *Microbiol* 1996; 142: 1557-65.
- Prado M, da Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality Due to Systemic Mycosis as a Primary Cause of Death or in Association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Ist Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 513-21.
- Punta M, Coggil PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Bournsnel C *et al*. The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research* 2012; 40:D290-D301.
- Roncero C, Durán A. Effect of Calcofluor White and Congo Red on Fungal Cell Wall Morphogenesis: In Vivo Activation of Chitin Polymerization. *J Bacteriol* 1985; 163: 1180-85.
- Rutherford JC, Lin X, Nielsen K, Heitman J. Amt2 Permease is Required to Induce Ammonium-responsive Invasive Growth and Mating in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 237-46.
- Sarikaya Bayram O, Bayram O, Valerius O, Park HS, Irniger S, Gerke J, Ni M, Han K-H, Yu J-H, Braus GH. LaeA Control of Velvet Family Regulatory Proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genetics* 2010; 6: e1001226.
- Sia RA, Lengeler KB, Heitman J. Diploid Strains of the Pathogenic Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* are Thermally Dimorphic. *Fungal Genet Biol* 2000; 29: 153-63.
- Trofa D, Casadevall A, Nosanchuk JD (2011) Melanin: Structure, Function and Biosynthesis in *Cryptococcus*. *In: Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. ASM Press pp. 56-66.
- Tscharke RL, Lazera M, Chang YC, Wickes BL, Kwon-Chung KJ. Haploid Fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not Mating Type Alpha-specific. *Fungal Genet Biol*. 2003; 39: 230-7.
- Velagapudi R, Hsueh Y-P, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2009; 77: 4345-55.
- Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The Human Fungal Pathogen *Cryptococcus* can Complete its Sexual Cycle During a Pathogenic Association with Plants. *Cell Host Microbe* 2007; 1: 263-73.
- Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action. *Infect Immun* 1995; vol. 62 n. 8 pp. 3131-3136.

- Wang P, Perfect JR, Heitman J. The G-protein Beta Subunit GPB1 is Required for Mating and Haploid Fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 352-62.
- Wickes BL, Edman U, Edman JC. The *Cryptococcus neoformans* STE12alpha Gene: a Putative *Saccharomyces cerevisiae* STE12 Homologue that is Mating Type Specific. *Mol Microbiol* 1997; 26: 951-60.
- Wills E, Himmelreich V, Mylonakis E, Perfect JR (2003) The characterization of the trehalose survival pathway in *Cryptococcus neoformans*. 15th International Society of Human and Animal Mycology abstract.
- Yu J-H. Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol* 2010; 38: 229-37.
- Zeyl C, Bell G. The Advantage of Sex in Evolving Yeast Populations. *Nature* 1997; 388: 465-68.