

AMANDA LIRA NOGUEIRA BARROS

ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *VELB* DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

BRASÍLIA, 2014.

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

AMANDA LIRA NOGUEIRA BARROS

ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *VELB* 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
2014

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

Amanda Lira Nogueira Barros

Análise Funcional do gene *VELB* de *Cryptococcus neoformans*

Banca Examinadora:

Presidente:

Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos – FCE- UnB

Examinadores:

Profa. Dra. Ana Karina Rodrigues Abadio – UEMT

Profa. Dra. Rosangela Vieira Andrade – UCB-DF.

Prof. Dr. André Moraes Nicola – UCB-DF. (suplente)

Data: 06/06/2014, 9:00h

Local: Auditório UED, FCE/UnB, Campus Ceilândia

*Dedico este trabalho aos meus pais Mário e Rosalina,
e aos meus irmãos Mário Filho e Renata
pelo apoio, incentivo e carinho
em todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mário e Rosalina, pelo apoio incondicional, paciência e incentivo durante todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós, grandes incentivadores e motivadores, Evandro, Maria José e “Mãe Dindinha”.

Aos meus irmãos, Mário Filho e Renata, que tanto me apoiam e compreendem e de quem tanto cuido.

À minha família de Brasília que me recebeu de braços abertos, em especial às minhas tias Bene e Noêmia e aos meus primos.

Ao Hélder, por todo o carinho e por tornar meus dias mais leves com sua alegria contagiante.

Às minhas amigas e amigos, muitos desde os tempos de escola, outros mais recentes, mas que estão ao meu lado me apoiando e participando de todas as importantes etapas de minha vida sempre. Pela compreensão durante as ausências e alegria em todos os momentos

À Universidade de Brasília pelo conhecimento adquirido e apoio estrutural para a realização de meu trabalho.

À minha orientadora Larissa Fernandes, pela confiança e pela oportunidade de vivenciar o meu tão esperado mestrado.

À minha co-orientadora Maria Sueli, por disponibilizar as instalações de seu laboratório e pelo partilhamento de tantas experiências.

Aos meus amigos e colaboradores Tayná Santos, Luísa Peconick, Fabiana Oliveira e Hugo Paes por todo apoio e contribuição em processos tão importantes para a realização deste trabalho.

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

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, a todos que de alguma forma me ajudaram para que a conclusão deste trabalho fosse possível, **MUITO OBRIGADA**. Esses dois anos de luta não teriam acontecido sem vocês do meu lado.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 O <i>CRYPTOCOCCUS</i> E A CRIPTOCOCOSE | 19 |
| 1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA <i>C. NEOFORMANS</i> | 21 |
| 1.3 MORFOLOGIA DO <i>C. NEOFORMANS</i> | 21 |
| 1.4 PROTEÍNAS <i>VELVET</i> | 22 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 2.1 LINHAGENS E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS | 24 |
| 2.1.1 Linhagens celulares | 24 |
| 2.1.2 Meios de cultura | 24 |
| 2.2 ANÁLISE IN SILICO DO GENE <i>VELB</i> DE <i>C. NEOFORMANS</i> UTILIZANDO O BANCO GENÔMICO DISPONÍVEL | 28 |
| 2.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO GÊNICA DE <i>VELB</i> ATRAVÉS DE DELEÇÃO GÊNICA NO MODELO <i>C. NEOFORMANS</i> | 29 |
| 2.3.1 Construção do cassete de deleção do gene <i>VELB</i> de <i>C. neoformans</i> | 29 |
| 2.3.2 Transformação de <i>C. neoformans</i> por biobalística para obtenção dos mutantes <i>velBaΔ</i> e <i>velBaΔ</i> | 39 |
| 2.3.3 Extração do DNA genômico (DNAg) de <i>C. neoformans</i> | 39 |
| 2.3.4 Confirmação da deleção de <i>VELB</i> | 39 |
| 2.3.5 Confirmação dos mutantes <i>velBaΔ</i> e <i>velBaΔ</i> por Southern Blot | 39 |
| 2.4 RECONSTITUIÇÃO DO LOCUS DE <i>VELB</i> | 40 |
| 2.5 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA IN VITRO DOS MUTANTES <i>VELBAΔ</i> E <i>VELBAΔ</i> | 41 |
| 2.5.1 Capacidade de crescimento a 37 °C | 41 |
| 2.5.2 Síntese de melanina | 41 |
| 2.5.3 Produção de cápsula | 41 |
| 2.5.4 Produção de urease | 41 |
| 2.5.5 Produção de fosfolipase | 41 |
| 2.5.6 Integridade da Parede Celular | 42 |
| 2.5.7 Estresse oxidativo | 42 |
| 2.5.8 Estresse osmótico | 42 |
| 2.5.9 Estresse térmico | 42 |
| 2.5.10 Teste de Resistência à luz UV | 42 |
| 2.5.11 Teste de Fusão | 42 |
| 2.5.12 Acasalamento | 43 |
| 2.6 AVALIAÇÃO IN VITRO DA SOBREVIVÊNCIA DO MUTANTE <i>VELBAΔ</i> APÓS ENSAIO DE FAGOCITOSE POR MACRÓFAGOS J774. A1 | 43 |
| 2.7 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS <i>VELVETS</i> DE <i>C. NEOFORMANS</i> –DUPLO-HÍBRIDO | 43 |
| 2.7.1 Extração de RNA e síntese do cDNA | 43 |
| 2.7.2 Desenho de oligonucleotídeos para duplo-híbrido | 44 |
| 2.7.3 Amplificação dos cDNAs dos <i>Velvets</i> de <i>C. neoformans</i> | 44 |
| 2.7.4 Clonagem dos genes de interesse, transformação e recuperação do plasmídeo | 44 |
| 2.7.5 Transformação das leveduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 45 |
| 2.7.6 Acasalamento de <i>S. cerevisiae</i> para duplo-híbrido | 45 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 46 |
| 3.2. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO GÊNICA DE <i>VELB</i> POR MEIO DE DELEÇÃO GÊNICA EM <i>C. NEOFORMANS</i> | 57 |
| 3.2.1. Obtenção dos mutantes <i>velB</i> | 58 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 69 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da evolução do complexo *Cryptococcus*.

Figura 2: Ciclo infeccioso de *Cryptococcus* (ambiente e hospedeiro).

Figura 3: Processo de acasalamento e frutificação haploide de *C. neoformans*.

Figura 4: Representação das proteínas *Velvet* (*VeA*, *VelB*, *VosA* e *VelC*) em *A. nidulans*.

Figura 5: Representação da técnica de PCR *Double Joint*.

Figura 6: Mapas dos plasmídeos utilizados no ensaio de duplo-híbrido.

Figura 7: Esquema de funcionamento do duplo-híbrido.

Figura 8: Alinhamento das sequências dos domínios *Velvet* encontradas em *C. neoformans*.

Figura 9: Cladograma para comparação dos domínios *Velvet* de proteínas *Velvet*.

Figura 10: Alinhamento múltiplo comparativo da sequência protéica de *VelB* com as de diferentes fungos patogênicos.

Figura 11: Cladograma da proteína *VelB* em diversos outros fungos.

Figura 12: Predição estrutural da proteína *VelB* de *C. neoformans*.

Figura 13: Construção do cassete de deleção *VELB::HPH* e *VELB::NAT* através de PCR *Double Joint*.

Figura 14: PCR confirmatório da deleção do gene *VELB* em *C. neoformans*.

Figura 15: Confirmação por *Southern Blot* da deleção de *VELB* nos mutantes confirmados por PCR – digestão com *EcoRV*.

Figura 16: Confirmação da reconstituição do locus de *VELB* em *C. neoformans* por PCR.

Figura 17: Crescimento das cepas selvagem, mutante e reconstituída nos meios com suas respectivas marcas de seleção.

Figura 18: Avaliação da capacidade de crescimento a altas temperaturas.

Figura 19: Teste de avaliação da capacidade de crescimento a diferentes doses de radiação UV.

Figura 20: Teste de sensibilidade ao estresse osmótico.

Figura 21: Teste de sensibilidade ao estresse oxidativo.

Figura 22: Teste de sensibilidade ao estresse de parede através da análise de sensibilidade ao Congo Red em duas concentrações (0,5 e 1,0%).

Figura 23: Teste de sensibilidade ao estresse de parede através da análise de sensibilidade ao SDS.

Figura 24: Teste de sensibilidade ao estresse de parede através da análise de sensibilidade à cafeína, em duas concentrações (0,5 e 1,0%).

Figura 25: Avaliação da capacidade de produzir melanina em Niger Seed e no meio L-DOPA.

Figura 26: Análise da produção de cápsula polissacarídica em *C. neoformans*.

Figura 27: Análise da produção de urease.

Figura 28: Análise da produção de fosfolipase.

Figura 29: Ensaio de fusão de mutantes *velvet*.

Figura 30: Acasalamento acompanhado diariamente realizado em meio *Filament* e SLAD.

Figura 31: Teste de acasalamento da cepa reconstituída de *VELB*.

Figura 32: Ensaio de sobrevivência de *C. neoformans* após fagocitose por macrófagos peritoniais.

Figura 33: Isolamento dos insertos dos genes *velvets* de *C. neoformans*.

Figura 34: Eletroforese dos plasmídeos após realização da miniprep.

Figura 35: PCR de confirmação de inserção dos insertos nos plasmídeos.

Figura 36: PCR do sistema de recombinação e PCR de colônia das presas de *VELC*.

Figura 37: Confirmação da clonagem por meio de PCR com oligonucleotídeo T7.

Tabela 1: Oligonucleotídeos (primers) utilizados no estudo de *VELB* em *Cryptococcus neoformans*.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius
AMP – Monofosfato cíclico de adenosina
CFW – Calcoflúor White
CTAB – Brometo de cetoltrimetilamônio
DIC – Contraste Diferencial de Interferência
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO – Dimetil Sulfóxido
GalXM – Galactoxilomanana
GXM – Glucuroxilomanana
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HPH – Higromicina Fosfotransferase
Kb – Kilobases
M – Molar
Maa – Milhões de anos atrás
MAP – Proteína Ativada por Mitógeno
Min. – Minutos
NES – Sinal de Exportação Nuclear
NLS – Sinal de Localização Nuclear
ORF - *Open Reading Frame*
pb – Pares de Bases
PBS – Tampão Fosfo-Salino
PCR – Reação de polimerização em cadeia
PEG – Polietilenoglicol
PLB – Fosfolipase B
PLC – Fosfolipase C
RPM – Rotações por minuto
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB – Soro Fetal Bovino
SNC – Sistema Nervoso Central
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UV – Ultravioleta
Vs. - *versus*
Y2H – *Yeast Two Hybrid*

RESUMO

As proteínas *Velvet* compreendem quatro membros altamente conservados entre ascomicetos e basidiomicetos, os quais compartilham o domínio *Velvet*. Eles regulam diferentes vias de sinalização em resposta a estímulos ambientais e também coordenam o metabolismo secundário e diferenciação assexua e sexual em diferentes espécies de fungos. Recentemente, as proteínas *Velvet* foram implicadas na virulência de alguns agentes patogênicos de plantas. Buscou-se avaliar o papel das proteínas *Velvet* no fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans*, causador da criptococose, importante micose sistêmica e a terceira doença mais prevalente em indivíduos portadores do vírus HIV. Entre as micoses sistêmicas, ela é classificada como tendo a maior incidência em pacientes imunocomprometidos. A infecção por *C. neoformans* ocorre pela inalação de células infecciosas e é considerada uma infecção pulmonar primária, o que pode levar a uma infecção disseminada e meningoencefalite. O objetivo geral do trabalho foi avaliar o papel do gene *VELB* na patogenidade e morfogênese de *C. neoformans*. O primeiro passo realizado no estudo foi a deleção do gene *VELB* em *Cryptococcus neoformans*. O cassete foi transformado em células leveduriformes haploides de *C. neoformans* diretamente através de biobalística. Confirmou-se a deleção por PCR e Southern Blot. Após confirmação, os transformantes foram submetidos a diferentes condições de crescimento para determinação de seus fenótipos e virulência. Foram realizados testes de estresse osmótico (NaCl), estresse na parede celular (CongoRed, SDS, cafeína) e estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio. Foram avaliados os fatores de virulência de *C. neoformans* como fosfolipase, urease, melanina e cápsula. Os testes fenotípicos não apresentaram alterações entre a linhagem e mutante indicando que o gene *VELB* parece não ter nenhum envolvimento em virulência e resposta a agentes estressores. Para avaliação da capacidade de acasalamento foram realizados co-cultivos no escuro em diferentes meios de cultura (Filament, SLAD e MS), além disto foi testada a capacidade de fusão dos mutantes. Estes testes demonstraram que a deleção de *VELB* bloqueia a produção de hifas no acasalamento entre mutantes e que estes apresentam também defeito no

processo de fusão celular. Estes resultados gerados neste trabalho sobre o papel de *VELB* corroboram os dados anteriormente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa de que os membros da família *velvet* estão diretamente envolvidos na regulação do ciclo sexual de *C. neoformans*.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, *VelB*, *mating*, acasalamento, complexo *velvet*.

ABSTRACT

The Velvet proteins consist of four highly conserved members in ascomycetes and basidiomycetes, sharing the Velvet domain. They regulate different signaling ways in response to environmental stimulation and also coordinate secondary metabolism and asexual to sexual differentiation in different species of fungi. Recently, Velvet proteins have been implicated in the virulence of some pathogenic agents of plants. It was evaluated the role of Velvet proteins in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* that causes cryptococcosis, an important systemic mycosis and the third most prevalent disease in HIV positive individuals. Compared to other systemic mycoses, it is classified as having the highest incidence in immunocompromised patients. *C. neoformans* infection is by inhalation of infectious cells and is considered a primary pulmonary infection, which can lead to widespread infection and meningoencephalitis. The overall objective of this study was to evaluate the role of the VELB gene in morphogenesis and pathogenicity of *C. neoformans*. The first step was performed at study deletion of the gene VELB in *Cryptococcus neoformans*. The cassette was transformed into haploid yeast cells of *C. neoformans* directly through biolistic. The deletion was confirmed by PCR and Southern blot. After confirmation, the transformants were submitted to different growth conditions to determine their phenotypes and virulence. Tests of osmotic stress (KCl, NaCl, sorbitol), stress in the cell wall (Congo Red, Calcofluor, SDS, caffeine) and oxidative stress with hydrogen peroxide were performed. Virulence factors of *C. neoformans* as phospholipase, urease, melanin and capsule were evaluated. Phenotypic tests showed no change between the strain and mutant indicating that the VELB gene seems to have no involvement in virulence and response to stressors. To evaluate the ability of mating co-cultures were performed in the dark in different culture media (Filament, SLAD and MS), in addition it was tested the ability of fusion of mutants. These tests showed that the deletion of VELB blocks the production of hyphae in mating and that these mutants also exhibit defective cell fusion process. These results generated in this paper about the VELB function corroborate data previously

obtained by our research group that the members of the velvet family are directly involved in the regulation of the sexual cycle of *C. neoformans*.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *VelB* mating, mating, velvet complex.

1 Introdução

1.1 O *Cryptococcus* e a criptococose

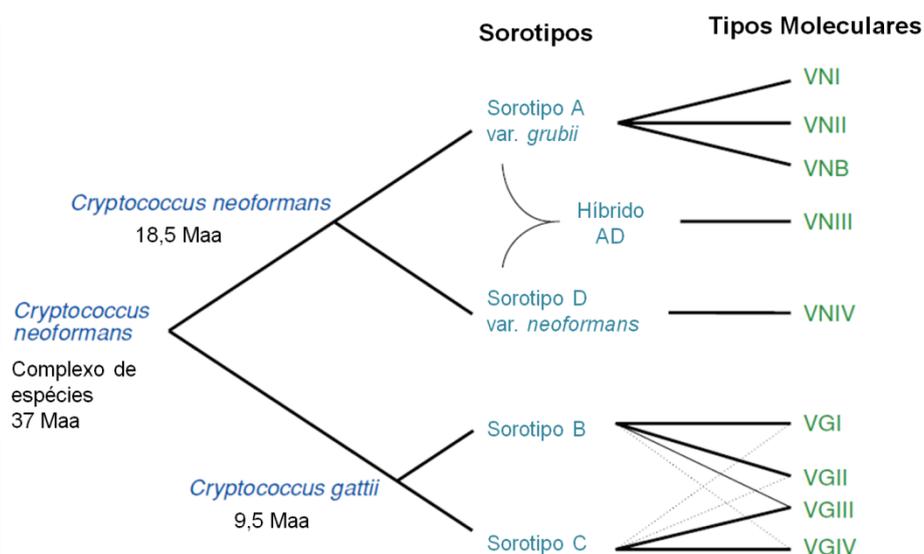
O gênero *Cryptococcus* inclui mais de 50 espécies de leveduras encapsuladas do Filo Basidiomycota. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são as espécies de maior relevância por serem agentes etiológicos da criptococose, uma micose sistêmica que ocorre no homem e em animais, saudáveis ou imunossuprimidos (Casadevall, 1998; Ma e May, 2009).

A doença foi descrita pela primeira vez em 1894, em uma mulher de 31 anos que apresentava uma lesão na tíbia, tratando-se de uma enfermidade relativamente rara. A frequência de infecções por *C. neoformans* tem aumentado exponencialmente nos últimos 30 anos, principalmente devido à epidemia do HIV e ao aumento do uso de terapias imunossupressoras para transplante de órgãos e quimioterapia (Rapp, 2004; Bovers *et al.*, 2008). Cerca de 115 anos após a descrição inicial do *C. neoformans*, todo o conhecimento básico, aplicado e clínico, permitiu a definição, em 2002 (Kwon-Chung *et al.*, 2002) de *C. gattii* e *C. neoformans* como duas espécies distintas, apresentando diferenças filogenéticas e moleculares, bem como sua relação quanto ao nicho, distribuição geográfica, epidemiologia, patologia e sintomatologia clínica (Bovers *et al.*, 2008).

C. gattii antes tida como uma variedade de *C. neoformans*, hoje já reconhecida como espécie distinta, foi responsável por um surto de infecções em pessoas saudáveis e animais no oeste da América do Norte (Kwon-Chung *et al.*, 2002; Datta *et al.*, 2009). Com base em estudos sorológicos utilizando anticorpos contra a cápsula da levedura, o complexo *C. neoformans/C. gattii* foi classificado em cinco sorotipos: A, B, C, D e AD (Evans, 1950; Meyer *et al.*, 2009). Destes, os sorotipos B e C são variantes de *C. gattii* (Enache-Angoulvant *et al.*, 2007; Chatuverdi e Chatuverdi, 2011). Este mesmo complexo possui oito genótipos. *C. neoformans var. grubii* corresponde aos tipos moleculares VNI e VNII; *C. neoformans var. neoformans* corresponde ao genótipo VNIV e o híbrido AD corresponde ao tipo molecular VNIII. VGI, VGII, VGIII e VGIV representam espécies críticas de *C. gattii*. Destes, VGI e VGII são os tipos mais frequentes e podem ser encontradas no oeste da América do Norte e Oceania, afetando preferencialmente imunocomprometidos. VGII é

subdividido nos subtipos VGIIa, VGIIb e VGIIc. VGIIa pode ser encontrado tanto no ambiente quanto em pacientes, e possui maior virulência em modelo murino de criptococose, quando comparado aos outros subtipos. Por outro lado, VGIII e VGIV também associados a pacientes imunossuprimidos, são encontrados na África e nos Estados Unidos (Bovers *et al.*, 2008; Byrnes *et al.*, 2010; Springer e Chaturvedi, 2010; Cogliati, 2013). A **Figura 1** mostra um esquema com todos os tipos moleculares e sorotipos de *C. neoformans*.

Figura 1: Representação esquemática da evolução do complexo *Cryptococcus*. Os sorotipos conhecidos descendem de um ancestral comum que divergiu a 37 milhões de anos atrás em *C. neoformans* e a 18.5 milhões de anos atrás em *C. gattii* duas subespécies.



Fonte: Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

Até recentemente *C. gattii*, era identificado predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, como Austrália, América do Sul, sudeste da Ásia e África Central (Hoang, 2011). Entretanto, a ocorrência de um surto de criptococose em homens e animais selvagens na Ilha de Vancouver, Canadá, em 2004, demonstrou a expansão do nicho da levedura para regiões de clima temperado (Macdougall *et al.*, 2007; Bartlett *et al.*, 2012). Diante disso, aumentou significativamente o número de pesquisas relacionadas ao nicho do fungo. Seu reservatório no ambiente está relacionado a poucas espécies de

eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*), algumas espécies de cactos suculentos (*Cephalocereus royenii*), ou ainda, é mais provável de ser recuperado dos detritos de ocos de árvores em decomposição ou no solo ao redor destas. O fungo foi isolado de diferentes espécies de plantas, como cedro (*Thuja* spp.), de amieiro (*Alnus* spp.), de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), carvalho (*Quercus garryana*), amendoeira (*Terminalia cattapa*), mangueira (*Mangifera indica*), entre outras (Hagen e Boekhout, 2010). *C. neoformans* também pode ser isolado mundialmente, mas está comumente associado a solo e fezes de pombos e outras aves domésticas (Ma e May, 2009).

No Brasil, há algumas regiões onde a epidemiologia de *C. neoformans* e *C. gattii* ainda é pouco explorada. Uma delas é a região norte do país, porém Fortes *et al.* (2001) demonstraram a ocorrência de *C. gattii* em madeira em decomposição em um oco de uma árvore *Guettarda acreana* em uma área selvagem da Floresta Amazônica. Foi relatado pela primeira vez o isolamento de *C. neoformans* e *C. gattii* de fontes ambientais na cidade de Belém, PA (Costa *et al.*, 2009). Trilles *et al.* (2008) analisaram molecularmente a distribuição geográfica de *C. neoformans* e *C. gattii* dos isolados no país e descreveram VNI como o tipo molecular mais comum e VGII como o tipo molecular predominante em hospedeiros imunocompetentes nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Embora tenham sido analisados um grande número de isolados (aproximadamente 443), nenhum deles era do Pará. Em um estudo mais recente, analisaram os agentes de 43 casos de criptococose e descobriu-se que VNI foi o tipo mais comum em pacientes imunocomprometidos, enquanto o tipo molecular VGII foi a principal causa da micose endêmica primária em indivíduos HIV-negativos, incluindo um número muito alto de crianças no Pará (Santos *et al.*, 2008). A detecção de tipo molecular VGII em um oco de uma árvore na cidade de Belém reforça que este tipo molecular requer uma maior atenção em outras partes da Amazônia brasileira, bem como em outros países sul-americanos (Costa *et al.*, 2009).

A filiação genética de um grande número de isolados do complexo de espécies *C. neoformans* a partir de fontes ambientais no Brasil tem sido investigada usando AFLP (Amplified fragment length polymorphism). As cepas de *C. neoformans*, isoladas a partir de uma única árvore, assim como a partir de árvores vizinhas, mostraram valores de similaridade elevado (> 95 %) dos

seus padrões de AFLP, sugerindo homogeneidade genética considerável. A maioria dos isolados de *C. neoformans* pertencia ao genótipo AFLP 1, e teve o sorotipo A e tipo de acasalamento alfa (= *C. neoformans* var. *Grubii*). Três isolados pertenciam a AFLP genótipo 2, com o sorotipo D e tipo de acasalamento alfa (= *C. neoformans* var. *neoformans*). Um isolado, obtido de um edifício no Rio de Janeiro habitado por pombos, pertencia ao genótipo AFLP AD híbrido 3. Todos os isolados a partir de árvores de *C. neoformans* var. *gattii* (*C. gattii*) pertenciam ao AFLP genótipo 6, e seus padrões de bandas mostraram baixa homogeneidade genética com um valor de similaridade de cerca de 76%. Isolados deste genótipo ocupam um nicho ambiental nas Américas e são causadores de doenças em pacientes portadores do vírus da AIDS ou não (Trilles *et al.*, 2003).

Em outro estudo foram analisados um total de 467 isolados de *C. neoformans* obtidos de fontes clínicas e ambientais de regiões do Brasil estudados sorologicamente utilizando o kit Crypto Check Latron RM 304-K. A sorotipagem dos isolados clínicos mostraram as seguintes prevalências dos sorotipos: sorotipo A (77,95%), seguida pelo B (18,2%), AD (1,3%), D (0,4%), C (0,2%) e não-tipável (1,93%). A epidemiologia de sorotipo A, nas regiões Sul e Sudeste brasileiros repete o resultado observado em todo o mundo. Contrariamente, o sorotipo B foi o agente mais frequente da criptococose na região Nordeste, que ocorrem quase igualmente em hospedeiros saudáveis masculinos e femininos. Entre os isolados de fontes ambientais, sorotipos A e B foram encontrados nos ocos de árvores tropicais dos gêneros *Cassia*, *Ficus* e *Moquillea*. Os poucos isolados de detritos de *Eucalyptus camaldulensis* foram sorotipos A e B e não-tipável. Um isolado sorotipo C foi recuperado a partir de um hospedeiro imunocompetente e o sorotipo AD predominou sobre sorotipo D entre os dois isolados clínicos e ambientais (Nishikawa *et al.*, 2003).

Em meados de 2005, por meio de um estudo multicêntrico, todas as características a respeito do genoma de *C. neoformans* foram descritas com a finalização do sequenciamento de duas cepas sorotipo D, a JEC21 e a B3501-A (Loftus *et al.*, 2005). Atualmente, estão disponíveis também o genoma de *C. neoformans* var. *grubii* H99 (sorotipo A), e de dois isolados de *C. gattii*, WM276 (isolado ambiental) e R265 (isolado clínico associado ao surto em Vancouver), ambos sorotipo B (Lin e Heitman, 2006). A comparação do sequenciamento

entre *C. neoformans* e *C. gattii* revelou variação no conteúdo de genes entre os genomas: apenas 50% do conteúdo gênico de ambas é idêntico, o restante apresenta polimorfismos (Loftus *et al.*, 2005); (Faganello *et al.*, 2009).

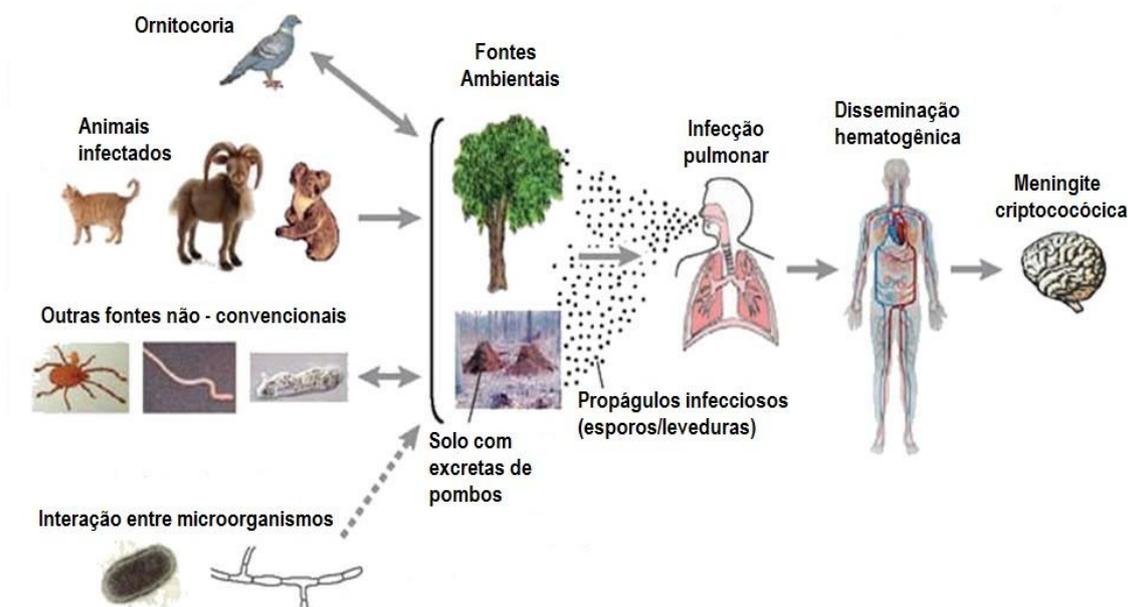
O projeto genoma trouxe novas ideias para o estudo da criptococose e seus agentes etiológicos, especialmente no que diz respeito à biologia e mecanismos de virulência deste basidiomiceto. A disponibilidade das sequências genômicas do fungo permitiu fazer estudos de genômica comparativa para explorar os genes de virulência e melhorar a compreensão acerca dos mecanismos moleculares da patogenicidade.

A relação entre o nicho de *Cryptococcus* sp. e a criptococose está bem esclarecida, tendo sido relatado que isolados clínicos apresentam o mesmo tipo molecular que amostras ambientais, e com o mesmo padrão de susceptibilidade aos antifúngicos, tornando claro então que humanos são infectados por meio da exposição ao nicho do microrganismo (Kidd *et al.*, 2007). A porta primária de entrada do fungo, o trato respiratório superior, é alcançada pela inalação dos propágulos infectantes, que possuem geralmente de 5 a 10 µm de diâmetro (Griffiths, *et al.*, 2012). Após essa etapa, estes são depositados nos espaços alveolares, atingindo o interstício pulmonar (Barbosa *et al.*, 2006).

Além do trato respiratório, inoculação direta no tecido através de trauma ou transplante de tecido infectado também podem ser consideradas portas de entrada ocasionais (Chayakulkeeree e Perfect, 2006; Badiie e Alborzi, 2011; Desalermos *et al.*, 2012). Apesar de acometer tanto animais como humanos, a transmissão direta do microrganismo entre humanos ou de animais para humanos não foram documentadas (Chayakulkeeree e Perfect, 2006). Mesmo rara, a transmissão transplacentária já foi relatada na literatura (Molnar-Nadasdy *et al.*, 1994; Patel *et al.*, 2012).

Após a inalação, forma mais comum de infecção, a doença pode ficar latente ou se desenvolver, dependendo do estado imunológico do paciente. No parênquima pulmonar, as leveduras inaladas são fagocitadas por macrófagos alveolares e em seguida pode ocorrer disseminação hematogênica, onde o fungo pode atingir qualquer órgão, inclusive o sistema nervoso central (SNC), pelo qual o *C. neoformans* possui tropismo (Hull e Heitman, 2002). A **Figura 2** mostra o ciclo de transmissão da doença.

Figura 2: Ciclo infeccioso de *Cryptococcus* (ambiente e hospedeiro). Dentre os ambientes onde o fungo é capaz de sobreviver estão: solo, 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 ursos coala. *C. neoformans* também é capaz de sobreviver em associação com predadores ambientais como insetos, nematóides 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 tem seu sistema imunológico comprometido, 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 e Heitman (2008).

Em hospedeiros saudáveis, a criptococose é assintomática ou subclínica e limitada ao tecido pulmonar. Na ausência de uma resposta imune efetiva, os fungos podem utilizar-se dos seus fatores de virulência e disseminar-se para outros tecidos, geralmente o cérebro, causando meningoencefalite (Casadevall *et al.*, 2009; Zaragoza *et al.*, 2009). Apesar da diferença de pacientes acometidos pela criptococose no que se refere ao status imunológico do paciente (*C. gattii* - pacientes imunocompetentes X *C. neoformans* – pacientes imunossusceptíveis), tanto para *C. neoformans*, como para *C. gattii*, os sintomas mais frequentemente relatados de infecção pulmonar são tosse, dispnéia e dor no peito (Pappas *et al.*, 2001). Quando há infecção no SNC, relata-se cefaléia, diminuição da capacidade mental e redução da acuidade visual, e, nesse caso, o tratamento torna-se mais complicado. Há sintomas

menos observados como paralisia dos nervos cranianos e hidrocefalia. Dentre os sintomas, pode-se haver diferença entre a infecção por *C. neoformans* e *C. gattii*, como por exemplo, convulsões, 38% mais comuns em infectados por *C. gattii*, contra 9% por *C. neoformans* (Seaton *et al.*, 1997; Charlier *et al.*, 2008).

Além do trato respiratório e SNC, outros sítios também podem ser afetados tais como pele, próstata, olhos, glândulas adrenais, linfonodos, medula óssea e fígado. Em imunossuprimidos, infecções extrapulmonares e do SNC, envolvem na maioria das vezes *C. gattii* (Chen *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2012).

A epidemiologia de *C. neoformans* revela uma grande discrepância na incidência de infecções em pacientes de sexo diferentes (incluindo AIDS e pacientes transplantados), com os indivíduos do sexo masculino possuindo maior incidência de infecção por *C. neoformans* que as mulheres. Curiosamente, a diferença de gênero na suscetibilidade de infecções por *C. neoformans* foi notada mesmo antes do início da epidemia do HIV, onde a incidência de infecção foi de 2-3 homens: 1 mulher (Mitchell *et al.*, 1995). Estudos sugerem que a reatividade ao antígeno entre ambos os sexos apresentam taxas iguais, porém estudos anteriores mostram que o estrogênio inibe o crescimento de *C. neoformans in vitro* e que a administração de dietilestilbestrol para pacientes infectados aumenta a atividade fagocítica dos leucócitos de pacientes (Davis *et al.*, 2007). Estudos realizados por McClelland *et al.*, 2013 demonstraram que há uma interação de *C. neoformans* com testosterona resultando em um aumento da liberação de GXM presente na cápsula e morte de macrófagos mediada pelo fungo. Estes dados sugerem um possível mecanismo para o aumento da doença observada em pacientes do sexo masculino observando-se que macrófagos do sexo masculino são mais propensos a serem mortos por *C. neoformans* do que fagocitarem a célula fúngica. Além disso, estes dados sugerem que a interação de *C. neoformans* e resposta imune do hospedeiro é complexa e uma interação prolongada pode ser necessária antes de surgirem defeitos na resposta imune masculina.

Vários métodos de diagnósticos da criptococose estão bem estabelecidos na rotina laboratorial. Entre estes, exame direto dos fluídos corporais, citologia, histopatologia, cultura e sorologia. Testes bioquímicos baseados na hidrólise de uréia e avaliação do crescimento em meio contendo

cicloheximida também são utilizados (Chayakulkeeree e Perfect, 2006; Jackson e Van Der Horst, 2012). Após um surto ocorrido no, Canadá, métodos moleculares, rápidos e sensíveis para identificação e diferenciação de *C. gattii* e *C. neoformans*, foram desenvolvidos. Atualmente, existem sequências específicas que podem ser usadas para detectá-los em amostras clínicas usando a PCR e suas variantes e sequenciamento. Além disso, pode ser realizada a identificação de sorotipos e genótipos, utilizando PCR fingerprinting, PCR–RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), and MLST (Multi-Locus Sequence Typing), sendo estes extremamente úteis no diagnóstico da criptococose, identificação específica do agente e monitoração do aparecimento de cepas resistentes (Sidrim *et al.*, 2010).

O tratamento de escolha para formas mais leves da doença é o fluconazol. Outras alternativas incluem itraconazol, posaconazol e voriconazol, todos administrados por via oral duas vezes ao dia (Calvo *et al.*, 2010). Em estágios mais avançados da doença pulmonar, é recomendado que o tratamento seja iniciado com Anfotericina B em associação com 5-flucitosina durante duas semanas, seguido da manutenção com fluconazol durante 12 meses. Em pacientes com complicações no SNC esse tempo de tratamento com Anfotericina B em associação com 5-flucitosina deve ser aumentado para seis semanas, e deve ser feita manutenção com fluconazol durante 18 meses (Perfect *et al.*, 2010; Day *et al.*, 2013).

1.2 Fatores de virulência *C.neoformans*

Para entender a criptococose, é de extrema relevância compreender os mecanismos de virulência e patogenicidade do *C. neoformans*. A efetividade do processamento dos sinais externos e sua resposta adequada aos mesmos são cruciais para que o *C. neoformans* sobreviva tanto no ambiente quanto no hospedeiro. Para que a resposta seja desencadeada de forma adequada, vias de transdução de sinal são ativadas em resposta as condições adversas em que o fungo pode se encontrar (Kozubowski, *et al.* 2009). Tais respostas contribuem para a patogenicidade do fungo e conferem a ele os atributos de virulência necessários para a sua sobrevivência. No caso do *C. neoformans*,

são diversos os fatores de virulência necessários para causar a criptococose (Bahn *et al.*, 2007).

Um fator ímpar e diferencial em *C. neoformans*, é a produção da cápsula polissacarídica. A cápsula é composta de três principais componentes: manoproteínas, glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), e funciona como um verdadeiro escudo contra os diversos ambientes em que o *C. neoformans* pode se encontrar, atuando na proteção contra dissecação no ambiente e fagocitose por predadores ambientais como amebas e outros nematodas, devido a sua capacidade altamente hidrofílica (Steenbergen *et al.*, 2003). No hospedeiro a cápsula age reduzindo a resposta imunitária via citocinas antiinflamatórias, causando depleção do sistema complemento e diminuindo a capacidade de apresentação de antígenos por monócitos (Vecchiarelli *et al.*, 2003; Voelz e May, 2010). Provou-se que mutantes cuja síntese da cápsula apresenta problemas, tem sua virulência diminuída em estudos com modelos animais (Bulmer *et al.*, 1967; O'Meara e Alspaugh, 2012). A cápsula pode interferir na resposta imune de diferentes formas: presença de propriedades antifagocitárias, por meio da inibição da produção de anticorpos, depleção do complemento, inibição da migração de leucócitos e indução da apoptose em macrófagos e células T. Além disso, está relacionada com a proteção do *Cryptococcus* contra ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio dentro da célula hospedeira (Zaragoza, 2011; O'meara e Alspaugh, 2012).

A capacidade de crescimento à temperatura corporal (37°C) de hospedeiros mamíferos é um diferencial para que o patógeno consiga infectar e desenvolver a doença em seus hospedeiros. Um dos genes envolvidos na tolerância a altas temperaturas é o que codifica para a calcineurina (*CNA*), mutantes de calcineurina são incapazes de crescer a 37 °C bem como apresentam virulência atenuada em modelo de infecção animal, porém crescem normalmente na temperatura ótima para *C. neoformans* (Odom *et al.*, 1997). Diferentes estudos também constataram que outros genes são essenciais para a tolerância à temperatura corporal de hospedeiros mamíferos, dentre eles, a via que compreende *PKC1* está intimamente ligada à integridade de parede. Mutantes de *PKC1* apresentam diversos fenótipos, dentre eles perturbação da parede celular, alteração na produção de cápsula e melanina

além da inviabilidade das células a 37 °C (Gerik *et al.*, 2008; Djordjevic, 2010). 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 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 (Petzold *et al.*, 2006).

A atividade da fosfolipase já foi descrita em *C. neoformans* e a relacionaram à virulência, visto que 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 (Chen *et al.*, 1997). Estudos posteriores mostraram que após a inalação, as leveduras ou esporos atingem o epitélio pulmonar seguida das vias aéreas inferiores e permanecendo nos alvéolos. Neste ambiente, o fungo entra em contato com os macrófagos, e observa-se a produção de fosfolipases, favorecendo o início da infecção pulmonar, por permitirem a adesão do fungo no epitélio pulmonar (Ganendren, 2006; Djordjevick, 2010). A deleção de *PLB1* atenua a virulência em modelos animais e causa redução do crescimento quando submetido ao teste de macrófagos, podendo indicar assim, que a secreção de fosfolipase é um fator determinante para a virulência (Cox *et al.*, 2001). O substrato inositol fosfofingolípido-fosfolipase-C1 (*Isc1*) é necessário para a sobrevivência dos fungos no interior das células de macrófagos, o que é consistente com o papel de *Fbp1* (proteína F-box) na regulação da interação *Cryptococcus*-macrófago e, conseqüentemente, na virulência do fungo (Liu *et al.*, 2011).

A urease é considerada um fator importante para o desenvolvimento e estabelecimento da criptococose em sua forma mais grave (meningoencefalite criptocócica). Esse agravamento se dá quando as leveduras se disseminam pela corrente sanguínea até alcançar a barreira hematoencefálica (BHE), atravessando-a e tendo acesso ao sistema nervoso central (Idnurm *et al.*,

2005). Estudos têm demonstrado que mutantes do gene *URE1* possuem dificuldade de causar a forma mais severa da doença em modelos animais porque não conseguem atravessar a barreira (Cox, 2000). O correto funcionamento das proteínas acessórias de *Ure1* também tem sido reportado como fator determinante para a virulência do fungo, sendo sua ativação necessária para que ocorra a invasão no SNC (Singh *et al.*, 2013; Morrow e Fraser, 2013).

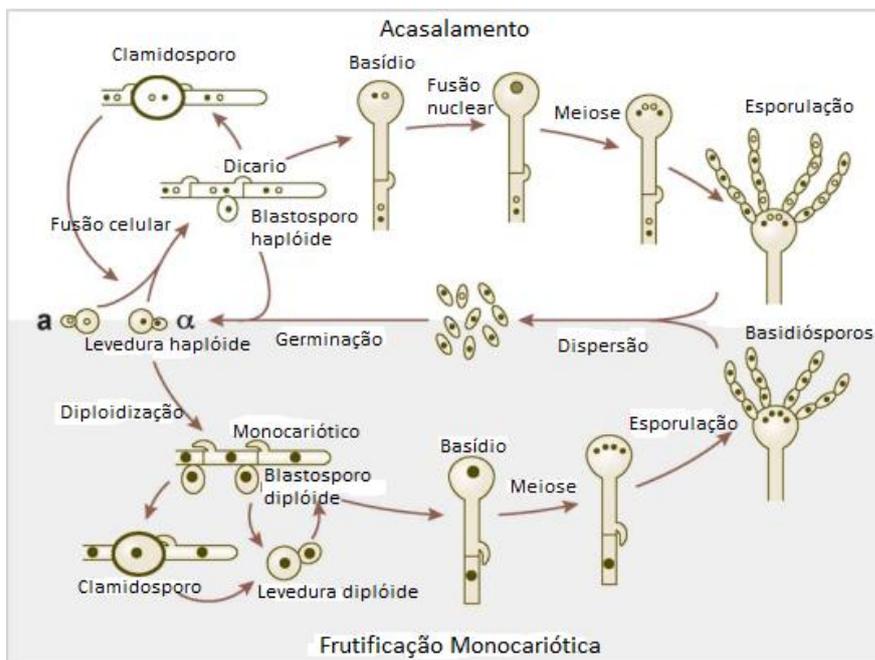
A capacidade de sintetizar melanina a partir de compostos fenólicos é outro fator relevante para virulência de *C. neoformans*. A melanina atribuí ao fungo estabilidade de sua parede celular, proteção contra radiação, resistência ao calor e ao frio e a metais pesados, além de proteção contra o estresse oxidativo no interior de células fagocíticas, bem como maior resistência à anfotericina B, principal droga de escolha no tratamento da criptococose (Wang *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 2003). A principal enzima envolvida na melanização é a lacase ou fenoloxidase, que sintetiza melanina a partir de substratos como difenóis (por exemplo, L-Dopa) e compostos indólicos (Trofa *et al.*, 2011). Outras catecolaminas podem ser utilizadas, como por exemplo, a dopamina e a noraepinefrina (Eisenman *et al.*, 2007; Eisenman *et al.*, 2011). No genoma de *C. neoformans* foram identificados os dois genes codificantes da lacase, enzima que cataliza a síntese de melanina a partir de L-DOPA: LAC1 e LAC2. Destes, LAC1 é o principal relacionado com a produção de melanina (Pukkila-Worley *et al.*, 2005).

1.3 Morfologia do *C. neoformans*

Estima-se que exista cerca de 1,5 milhão de espécies de plantas e fungos na terra, sendo a maioria não patogênica aos seres humanos. Uma característica proeminente partilhada por alguns dos fungos patogênicos é o dimorfismo. A maioria dos fungos ou existe na forma filamentosa - crescimento por extensão apical, ou na forma de levedura – reproduzindo-se por brotamento ou fissão. Destes, uma minoria são fungos dimórficos e pode alternar entre a forma filamentosa multicelular e a forma de levedura unicelular. O dimorfismo, considerado relativamente raro curiosamente é comum entre espécies de fungos que podem causar infecções sistêmicas nos mamíferos. *C. neoformans* pode variar de morfologia dependendo das fases de seu ciclo de vida, visto que

na fase vegetativa ou assexuada, encontram-se leveduras que se reproduzem por brotamento ou ainda podem produzir pseudohifas ou gerar frutificação haplóide com produção de hifas. Na sua fase sexuada, ocorre acasalamento de leveduras com tipos sexuais opostos (a e α) com produção de feromônios (quando ocorre fusão celular) e produção de hifas dicarióticas de basídios, formando os basidiósporos após o processo de meiose (Lin, 2009) (**Figura 3**).

Figura 3: Processo de acasalamento e frutificação haplóide de *C. neoformans*.



Fonte: Adaptado de Lin e Heitman (2006).

No chamado acasalamento bipolar, células leveduriformes a e α secretam feromônios que desencadeiam fusão celular quando em condições de limitação de nutrientes. A célula dicariótica resultante inicia seu crescimento filamentosos, ao mesmo tempo em que 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 3**) (Lin, 2009).

Nos fungos, a reprodução sexuada 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 descrita primeiramente em *S. cerevisiae*, sendo que em *C. neoformans*, o locus *MAT* é responsável pela codificação de mais de 20 genes precursores de proteínas como *Sxi1 α* e *Sxi2 a* , incumbidos de estabelecer a identidade sexual das células (Hull *et al.*, 2005).

O *C. neoformans* é encontrado na natureza em sua maioria na forma haplóide e sua reprodução sexuada (acasalamento e meiose) ocorre em resposta à limitação nutricional, como carência de nitrogênio, ou a sinais específicos. Outros estímulos ambientais também exercem influência sobre sua reprodução tais como extrato de vegetais, íons de cobre, excretas de pombo, limitação de nitrogênio, suco V8, ácido indolacético (IAA) e mioinositol, no entanto luz, altas temperaturas, altos níveis de CO₂ e água são fatores inibidores de acasalamento (Hsueh *et al.*, 2011).

A descoberta do suco V8 como meio de cultura para acasalamento em laboratório foi crucial para a investigação dos compostos envolvidos nesse processo. Ele é composto de fatores como mioinositol e íons de cobre, responsáveis pelo estímulo do acasalamento e pela indução da expressão de genes envolvidos na produção de feromônios (Kent *et al.*, 2008). Além do meio V8, o meio SLAD (*synthetic low ammonium dextrose*) e o ágar Filament, mimetizam situações de privação de nitrogênio e permitem que ocorra o acasalamento em *C. neoformans*. A detecção de nitrogênio no ambiente em *C. neoformans* é mediada por um transportador de amônio *Amt2*. Quando este gene é mutado, as cepas não conseguem desenvolver sua fase sexuada devido à dificuldade em assimilar nitrogênio (Rutheford *et al.*, 2008).

O meio Murashige e Skoog (MS) é eficaz na indução de esporulação em *C. neoformans*, pois acredita-se que, assim como no meio V8, o composto responsável por essa indução também seja o mioinositol, presente neste meio (Xue *et al.*, 2007).

A luz é um fator ambiental importante na regulação do acasalamento por ser um regulador negativo do ciclo sexuado. Em outros fungos, tais como *Neurospora crassa*, a luz regula o ciclo circadiano (Schafmeier e Diernfellner, 2011). Em *C. neoformans*, a luz inibe o acasalamento. O complexo de fotorreceptores *BWC1 - BWC2* (*White Collar proteins*) é expresso para regular o acasalamento em resposta à luz, virulência e tolerância à radiação ultravioleta. Mutantes destes genes tornam-se insensíveis à luz e conseguem realizar fusão celular e acasalamento na presença de luz além de apresentarem hipersensibilidade à luz UV (Idnurm e Heitman, 2005).

Existem algumas vias de sinalização relevantes também para a produção de feromônios. A via da MAP quinase (MAPK) ativada por feromônio, e a via do AMP cíclico, necessária para o sensoriamento de nutrientes, estão intimamente relacionadas ao processo de acasalamento. A via de sinalização mediada por feromônios é conservada em basidiomicetos e ascomicetos. *STE12*, fator transcricional que responde a via das MAP quinases, demonstra importância no acasalamento, principalmente em células α (Chang *et al.*, 2003). Os receptores de feromônios são proteínas G heterotriméricas responsáveis pela transdução de sinal no interior da célula para que ocorra a ativação da cascata das MAPK (Kozubowski *et al.*, 2009). Em *C. neoformans*, as MAP quinases envolvidas no acasalamento e filamentação haplóide são controladas por *STE20*, *STE11*, *STE7* e *STE12* e estão a montante (*downstream*) das proteínas G (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 e Heitman, 2002). Estudos já mostraram que mutações nos principais componentes dessa via como na subunidade *a* da proteína G (*Gpa1*) ou na adenil-ciclase *Cac1* causam defeitos severos no acasalamento de *C. neoformans* (Alspaugh *et al.*, 1997; Alspaugh *et al.*, 2002).

Inicialmente, acreditava-se que a filamentação haplóide ocorria somente em tipos sexuais α , devido a alta predominância deste tipo sexual no ambiente (Wickes *et al.*, 1996), porém foi demonstrado que o tipo sexual *a* também pode realizar este processo (Tschärke *et al.*, 2003).

O mecanismo de frutificação haplóide assemelha-se muito com a reprodução sexuada entre tipos sexuais opostos, principalmente por acontecer

nas mesmas condições ambientais. O processo ocorre da mesma forma, porém não há parceiro sexual oposto, as células de mesmo tipo sexual tornam-se diplóides por meio de fusão celular. A hifa forma conexões em forma de grampo que não se fundem à próxima hifa e o núcleo do basídio sofre meiose formando 4 cadeias de basidiósporos (Lin e Heitman, 2005). Acredita-se que a frutificação haplóide aconteça 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 microrganismo, pois produz esporos capazes de sobreviver a condições adversas devido a uma maior resistência à desidratação e a outros estresses ambientais como mudanças de temperatura (Hull e Heitman, 2002).

Várias vias de sinalização estão relacionadas à frutificação haplóide, incluindo a via de sensoamento de ferormônios. 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 nos processos de frutificação e acasalamento (Lin *et al.*, 2010).

Outro tipo morfológico identificado no ciclo de vida de *C. neoformans* é a pseudohifa, um tipo intermediário entre a levedura e as hifas propriamente ditas. Essa morfologia pode variar entre uma sequência de células leveduriformes alongadas e ligadas umas as outras em forma de cadeia linear a uma estrutura similar à hifa verdadeira com alguns septos de constricção. Estudos anteriores mostraram que as células de *Cryptococcus* na forma de pseudohifas podem resistir à fagocitose por amebas (predadores naturais de *C. neoformans*) existentes no solo (Neilson *et al.*, 1981), sugerindo então que as pseudohifas possam ter um mecanismo de fuga biológica em determinados ambientes. No modelo *S. cerevisiae* a forma de pseudohifas é induzida sob condições limitantes de nutrientes e permite aumentar a absorção de nutrientes em meios de cultura (Gimeno *et al.*, 1992). Em *C. neoformans*, alguns estudos mais recentes que utilizaram a deleção de genes envolvidos na via de sinalização de RAM também demonstraram alterações morfológicas da forma de levedura para a forma pseudohifas, tornando o crescimento do fungo hiperpolarizado (Walton *et al.*, 2006).

1.4 Proteínas Velvet

As proteínas da família *Velvet*, incluem *VeA*, *VelB*, *VelC* e *VosA*, apresentam o domínio *Velvet* e são altamente conservadas em fungos (Ni e Yu, 2007). Estas proteínas foram bem caracterizadas em *Aspergillus nidulans* (Kim *et al.*, 2002; Calvo, 2008; Bayram *et al.*, 2008) e estudos recentes revelaram que as proteínas *Velvet* podem formar os complexos multiméricos tais como *VelB-VeA-LaeA*, *VelB-VosA* e *VelB-VelB*. O complexo heterotrimérico *VelB-VeA-LaeA* controla o desenvolvimento sexual e o metabolismo secundário em resposta à luz. O complexo de ligação *VelB-VosA* regula a biogênese de trealose e a maturação dos esporos (Bayram *et al.*, 2008). Em *A. nidulans* os genes *velvets* têm como principal função o controle do desenvolvimento sexual e assexual (Kim *et al.*, 2002). A representação esquemática dos domínios encontrados nas proteínas *velvets* de *A.nidulans* está na **Figura 4**.

Figura 4: Representação das proteínas *velvet* (*VeA*, *VelB*, *VosA* e *VelC*) em *A. nidulans*. Arquitetura das sequências protéicas de *VeA*, *VelB*, *VosA* e *VelC* de *A. 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*.

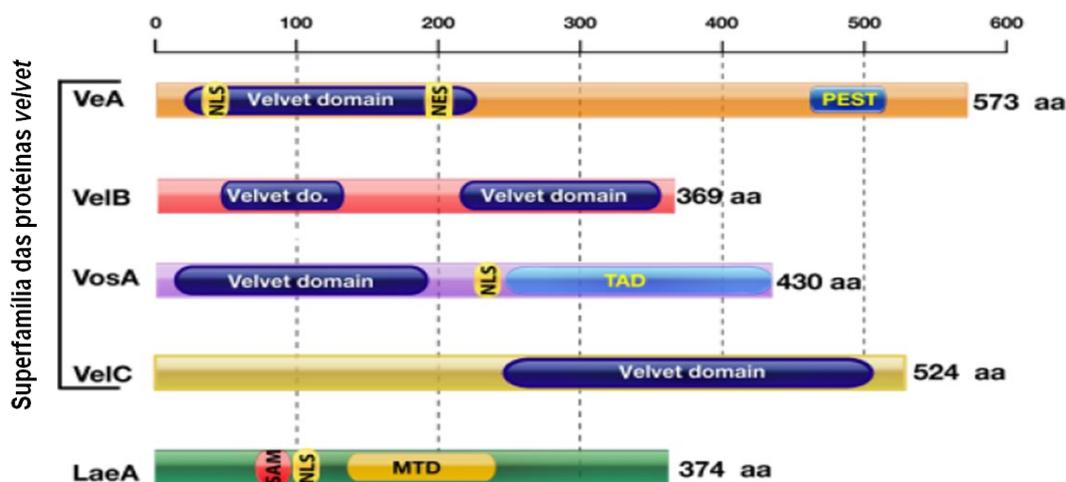


Figura 4: Adaptada de Bayram & Braus (2012).

No experimento onde se descobriu as proteínas *Velvet*, foi observado que um mutante em especial, apresentava padrões anormais de conidiação

(aumento) e desenvolvimento sexual (redução de corpos de frutificação), resultando numa colônia com aspecto aveludado, e, a partir deste momento, tal mutante fora denominado *VEA1* (Calvo, 2008). Estudos posteriores com o mutante *VEA1* de *A. nidulans* revelou que o mesmo possuía uma mutação pontual no códon de iniciação, substituindo a Guanina por Timina, resultando numa proteína sem os primeiros 36 aminoácidos comparada à proteína produzida pelo selvagem (Kim *et al.*, 2002).

Em *A. nidulans*, *VeA*, forma complexo com *VelB* na ausência de luz através da porção N-terminal, e interage com *LaeA*, uma proteína envolvida no metabolismo secundário, na porção C-terminal. Na família *velvet* a interação entre *VeA* e *VelB* tem o papel de conectar o *VelB* com o *LaeA* em espécies de fungos produtores de micotoxinas. Enquanto a interação entre *VeA* e *LaeA* ocorre no núcleo, a interação entre *VeA* e *VelB* ocorre tanto no núcleo quanto no citoplasma (Bayram *et al.*, 2008).

Em *A. nidulans*, *VeA* possui 573 resíduos de aminoácidos com o domínio *velvet* acompanhado de um sinal de localização nuclear e sinal de exportação nuclear, todos localizados na região N-terminal da proteína. Na porção C-terminal, a proteína apresenta uma região rica em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina – denominada de PEST, que é característica de proteínas instáveis (Bayram e Braus, 2012).

VosA está envolvido na biossíntese de trealose e na maturação de conídios conferindo resistência aos mesmos (Yu, 2010). Bayram e Braus descreveram a proteína contendo 430 aminoácidos e apresentando o domínio *velvet* na porção N-terminal e um domínio NLS. A deleção de *VosA* tem como principal fenótipo a má formação do cleistotécio (estrutura sexuada dos ascomicetos) e inviabilidade dos esporos produzidos (Ni e Yu, 2007). Em alguns ascomicetos, tal como *Aspergillus fumigatus*, a deleção de *VosA* gera sensibilidade à estresse osmótico e à luz UV (Park *et al.*, 2012).

VelC foi a última proteína *velvet* descoberta e ainda há poucos estudos sobre ela. Estudo já realizado em *A. nidulans* indica que *VelC* tem a função de regulador positivo no desenvolvimento sexual, assemelhando-se com *VosA*. No mesmo estudo, é verificado que *VelC* e *VosA* interagem *in vivo* e *in vitro* (Park *et al.*, 2014). Em *F. oxysporum* e *A. fumigatus*, os mutantes de *VelC* apresentam fenótipos sutis quando comparados aos outros mutantes dos

velvets nestes organismos (Park *et al.*, 2014; López-Berges *et al.*, 2013), indicando que *VELC* provavelmente possui uma função acessória aos demais *velvets*.

A proteína *VelB* é pouco estudada em fungose a menor entre todas da família *velvet*, com apenas 369 aminoácidos em *A. nidulans* (Bayram e Braus, 2012). Ao contrário de *VeA*, *VelB* não possui nenhum dos sinais NLS ou NES tendo sua importação para o núcleo dependente de *VeA*. Essa proteína carrega dois domínios *velvet*, um na porção N-terminal e outro na porção C-terminal (Bayram e 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 com ela própria. O complexo dimérico *VelB-VelB* 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 caracterização do *VELB* em desenvolvimento assexuado e esporogênese em *A. nidulans* indica que *VelB* atua como um regulador positivo de desenvolvimento assexuado e é um componente essencial para a biogênese da trealose em esporos. A formação do complexo *VelB-VelB* também acontece nesse fungo, agindo não só na biossíntese de trealose como no processo de germinação de conídios. Mutantes onde o gene *VELB* foi deletado, apresentam acúmulo elevado de pigmentos marrons e a diminuição de conídios (Park *et al.*, 2012).

VelB participa na formação de vários complexos *Velvet* incluindo *VelB-VeA* e *VelB-VeA-LaeA* que desempenham diferentes papéis no desenvolvimento sexual e metabolismo secundário fúngico (Bayram *et al.*, 2008). Estudos realizados por Park *et al.*, 2012a sugerem que nas hifas *VelB* interage com *VeA* formando o complexo *VeA – VelB*. Neste estudo foram caracterizados os quatro genes *Velvet* por abordagens genéticas e bioquímicas em *A. fumigatus* e apresentadas provas de que eles desempenham um papel central na regulação do desenvolvimento, biossíntese de trealose e germinação de conídios. Diferentemente do acontecido em *A. nidulans*, a deleção de *AfuVeA* ou *AfuVelB* resulta em hiperativação do processo de conidiação,

levando à formação abundante de conidióforos submersa em cultura líquida e acumulação constitutiva de altos níveis de mRNA *AfuVrIA* em crescimento vegetativo, sugerindo que *AfuVeA* e *AfuVelB* são os reguladores negativos primários da conidiação durante o crescimento vegetativo. Notou-se que o controle do *feedback* de desenvolvimento após a formação de conidióforos é conferida por *AfuVelB* e *AfuVosA*, que são ativadas por *AfuAbaA*. Além disso, tanto *AfuVosA* quanto *AfuVelB* participam da biogênese da trealose de conídios e esporogênese, e *AfuVosA*, *AfuVeA* e *AfuVelB* desempenham um papel diferencial no controle de germinação de esporo.

Estudos anteriores demonstraram que a ausência de *VELB* ou *VOSA* resultam na ausência de trealose em conídios e viabilidade dos esporos diminuída, e que o complexo *VosA-VelB* é formado no núcleo, sugerindo que o complexo *VelB-VosA* é a unidade funcional que regula a maturação de conídios (Ni e Yu, 2007; Bayram *et al.*, 2010).

Em *Fusarium graminearum*, patógeno de plantas, a deleção de *FgVELB*, provoca uma série de defeitos no mutante, como ausência de hifas aéreas, diminuição da hidrofobicidade da colônia, aumento da conidiação e aumento da resistência a estressores osmóticos e de parede celular. Além disto, os mutantes apresentaram-se avirulentos em modelo de infecção de plantas. Diferente do que foi observado em outros fungos em ensaios de duplo híbrido, *FgVelB* não interage com *FgVeA* (Jiang *et al.*, 2011).

Em *Fusarium oxysporum* a deleção dos genes *VEA*, *VELB* e em menor extensão *VELC* causou uma repressão de conidiação, bem como alterações na forma e tamanho de microconídeos. *VeA* e *LaeA* foram relevantes para virulência de *F. oxysporum* em tomateiros e em ratos imunodeprimidos. Uma contribuição fundamental dos *Velvets* foi promover a expressão do agrupamento de genes de biossíntese para a beauvericina, uma micotoxina que funciona como um determinante de virulência. Estes resultados revelaram um papel conservado do complexo *Velvet* durante a infecção por fungos em plantas e mamíferos (López-Berges *et al.*, 2013).

Ainda não é claro o mecanismo com que *VELB* afeta a produção de escleródios em *Aspergillus flavus*. Os resultados de estudos com duplo-híbrido sugerem que a mediação na produção de escleródios por *VelB* pode estar relacionada com a sua capacidade de interagir com *FluG*, que consiste de um

domínio N-terminal amidohidrolase e um domínio C-terminal de glutamina sintetase e está envolvido na síntese de um fator difusível que inicia conidiação. Alterações no equilíbrio de *VelB* e FluG resultantes da superexpressão de *VELB* ou exclusão de FluG, além de afetar a conidiação, também podem afetar a produção de escleródios (Chang *et al.*, 2013).

Em *Botrytis cinerea*, foram investigadas as funções de dois genes *Velvet* BcVEA e BcVELB. A caracterização morfológica de mutantes de BcVEA e BcVELB mostrou que a ausência destes genes levou ao aumento da conidiação e biossíntese da melanina. Os mutantes dos genes abordados também mostraram aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo e que estes genes são essenciais para a virulência de *B. cinerea*. Ensaio de duplo-híbrido em levedura mostraram a interação de BcVeA com BcVelB. Com os resultados obtidos no estudo, indicou-se que BcVeA e BcVelB são responsáveis pela coordenação de processos semelhantes na regulação do desenvolvimento de fungos, resposta ao estresse oxidativo e virulência em *B. cinerea* (Yang *et al.*, 2013).

Em *Histoplasma capsulatum* foram identificados dois genes (*Ryp2* e *Ryp3*) necessários para o crescimento da fase leveduriforme. RYP2 e RYP3 são homólogos uns aos outros e aos *Velvets* de *Aspergillus* (*VOSA* e *VELB*). As cepas selvagens de *H. capsulatum* crescem na forma miceliana à temperatura ambiente e as células de levedura a 37°C, porém os mutantes *ryp2* e *ryp3* crescem constitutivamente como filamentos independentemente de temperatura. Transcritos de *Ryp2* e *Ryp3* apresentam maior expressão em temperaturas superiores a 37°C em relação à temperatura ambiente. Além disto, são essenciais para a produção de esporos viáveis e regulação de esporulação à temperatura ambiente. Esta função reguladora é cada vez mais semelhante ao papel dos *velvets* em *Aspergillus* no desenvolvimento de esporos em resposta à luz, com a distinção de que o circuito de *H. capsulatum* responde à temperatura (Webster e Sil, 2008).

Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa foram caracterizados os genes *Velvet* VEA, *VOSA* e *VELC* em *C. neoformans* (Peconick, LDF; 2013 e Santos, TC.; 2014). Os resultados da deleção de *VEA* e *VELC* de *C. neoformans*, mostraram que estes genes não participam da regulação dos fatores de virulência deste fungo e não apresentam envolvimento no

crescimento do fungo em condições de estresse ou na virulência e morfologia das hifas quando submetido ao acasalamento. Observou-se presença de hifas dicarióticas nas bordas do cruzamento entre os mutantes de *VEA* a partir do sexto dia de co-cultivo na presença contínua de luz branca, as quais não foram observadas nos cruzamentos bilaterais entre selvagens e mutantes e também nos reconstituídos, podendo-se afirmar que *VEA* participa no processo de sensoramento de luz. Nos cruzamentos bilaterais de mutantes de *VELC*, os mutantes *ve/CΔ* demonstram uma insensibilidade tardia a luz branca (Santos, TC, 2014).

Os mutantes *vosA* demonstraram não sofrer alteração na sensibilidade às condições de estresse testadas, mas apresentaram alterações no processo de acasalamento, com diminuição drástica na produção de hifas e incapacidade de realizar fusão celular (Peconick, LDF, 2013). O estudo de *VelB* complementa o estudo das proteínas *Velvets* em *C. neoformans*, visto que em estudos utilizando outros modelos fúngicos, sua interação com *VosA* influencia nas condições de acasalamento. Sabe-se que *C. neoformans* apresenta em seu genoma seis sequências que codificam as proteínas *Velvet*, no entanto a forma como elas funcionam neste patógeno ainda é desconhecida. É de grande relevância elucidar o papel de mais um gene *Velvet* de *C. neoformans* para que se compreenda a fundo seu papel no fungo e o que isso pode trazer de conhecimento para pesquisas posteriores. A análise da interação de proteínas *Velvet* permitirá a compreensão da atuação dessa família na patobiologia deste fungo, neste contexto, insere-se o presente projeto de mestrado, que tem como objetivo geral a caracterização funcional do gene *VELB* neste fungo patogênico humano.

Objetivou-se com o estudo avaliar o papel do gene *VELB* na virulência, morfogênese, acasalamento e patogenicidade de *C. neoformans*. Especificamente, avaliou-se a função de *VELB* na levedura oportunista *C. neoformans* através da deleção gênica e análise dos fenótipos dos mutantes quanto à capacidade de realizar acasalamento, de crescimento em condições de estresse como oxidativo, osmótico e térmico e avaliação da capacidade de sobrevivência do mutante *velB* em ensaio de fagocitose por macrófagos murinos (*in vitro*).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Linhagens e meios de cultura utilizados

2.1.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens de *C. neoformans* variedade *grubii* KN99a e KN99 α sorotipo A. Para os ensaios de fagocitose por macrófagos murinos (*in vitro*), foi utilizada a linhagem de macrófagos peritoniais J774.A1 (ATCC TIB-67).

2.1.2 Meios de cultura

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

| | |
|---------------------|-----|
| Extrato de levedura | 1 % |
| Glicose | 2 % |
| Peptona | 2% |

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

2.1.2.2 Meios de cultura para testes fenotípicos

- a) Meios Congo Red, Cloreto de sódio (NaCl), 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; 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 (KH₂PO₄) 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 % |
| KH ₂ PO ₄ | 2 % |
| <i>Phenol Red</i> 0,2% | 8 uL |
| 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).

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

a) 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 %.

b) 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.

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

| | |
|---------------------|-----------|
| YNB | 0,17 % |
| Sulfato de amônio | 5 μ M |
| 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 %.

2.1.2.4 Meios utilizados para o Duplo-Híbrido (Y2H)

a) Meio YPDA

| | |
|------------------------|---------|
| Extrato de Levedura | 1% |
| D-Glicose | 2 % |
| Peptona | 2% |
| Agar | 2% |
| Hemisulfato de Adenina | 20 mg/L |

b) Meio SD

| | |
|------------|---------|
| YNB | 0,67% |
| Glicose | 2% |
| Ágar | 2% |
| Adenina | 20 mg/L |
| Histidina | 20 mg/L |
| Metionina | 20 mg/L |
| Triptofano | 20 mg/L |
| Leucina | 50 mg/L |

c) Meio SD/-Triptofano

| | |
|-------------|---------|
| YNB | 0,67% |
| Glicose | 2% |
| Ágar | 2% |
| Adenina | 20 mg/L |
| L-Histidina | 20 mg/L |
| L-Metionina | 20 mg/L |
| L-Leucina | 50 mg/L |

d) Meio SD/-Leucina

| | |
|-------------|---------|
| YNB | 0,67% |
| Glicose | 2% |
| Ágar | 2% |
| Adenina | 20 mg/L |
| L-Histidina | 20 mg/L |
| L-Metionina | 20 mg/L |

e) Meio SD/ Double *Drop Out* (DDO): Sem Triptofano e Leucina

| | |
|-------------|---------|
| YNB | 0,67% |
| Glicose | 2% |
| Ágar | 2% |
| Adenina | 20 mg/L |
| L-Histidina | 20 mg/L |
| L-Metionina | 20 mg/L |

f) Meio SD/ *Quadruple Drop Out* (QDO)

| | |
|-------------|---------|
| YNB | 0,67% |
| Glicose | 2% |
| Ágar | 2% |
| L-Metionina | 20 mg/L |

2.2 Análise *in silico* do gene *VELB* de *C. neoformans* utilizando o banco genômico disponível

As sequências genômica e proteica de *VELB* (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 *VELB* 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 membros da família *Velvet* de vários fungos selecionados, fez-se o alinhamento múltiplo das sequências proteicas por meio da ferramenta *CLUSTALW algorithm* (www.ebi.ac.uk/clustalw/). O

alinhamento permitiu a construção de árvores filogenéticas para comparação das sequências entre os organismos testados.

Foi realizada uma investigação mais detalhada na estrutura e composição da proteína *VelB* 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 *VELB* de *C. neoformans* foi avaliada através do *software* Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/> - Punta *et al.*, 2012). A predição do fator NLS foi feita através do *software* NLS Predictor (mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi). O motivo PEST de *VELB* 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.

2.3 Avaliação da função gênica de *VELB* através de deleção gênica no modelo *C. neoformans*.

2.3.1 Construção do cassete de deleção do gene *VELB* 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 (**Figura 5**). Selecionou-se a sequência do gene *VELB* a partir do banco de dados do Broad Institute (CNAG_05640) 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.

Para que a construção do cassete de deleção fosse possível, a reação de PCR foi realizada em duas etapas (**Figura 5**). Na **Tabela 1** encontram-se as sequências dos oligonucleotídeos utilizados durante esse trabalho.

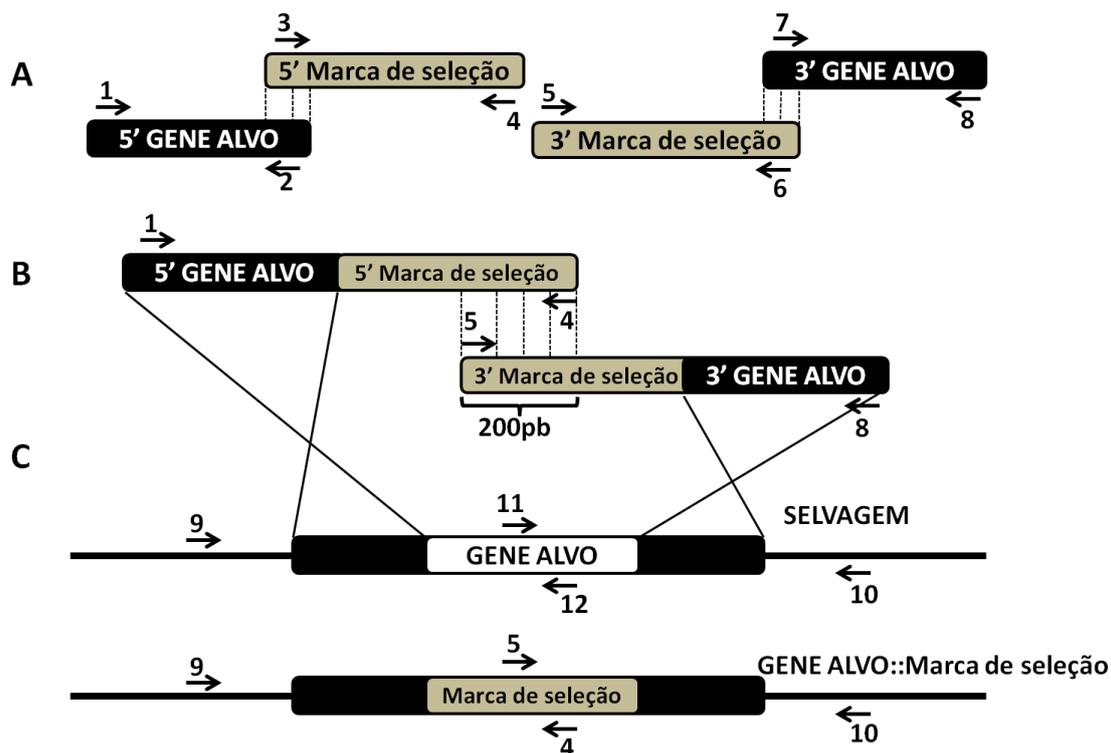
Para a primeira etapa, foi realizada a amplificação dos fragmentos 1 + 2, que corresponde à região flanqueadora 5' de *VELB*, e 7 + 8, que corresponde à região flanqueadora 3' de *VELB*. Os fragmentos 3 + 4 que corresponde à região 5' do marcador seletivo HPH ou NAT e 5 + 6 que corresponde à região 3' de HPH ou NAT também foram amplificados. Os tamanhos esperados foram: 1 + 2 hph: 948 pb; 7 + 8 hph: 818 pb, 3 + 4 hph: 1235 pb; 5 + 6 hph: 1295 pb; 3 + 4 nat: 639 pb; 5 + 6 nat: 1333 pb. Nesta primeira etapa, utilizou-se a Enzima Fast DNA Polimerase, a partir da qual foi preparado um mix contendo: 1X 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* KN99α) para amplificação dos fragmentos 1 + 2 (região 5' flanqueadora de *VELB*) e 7 + 8 (região 3' flanqueadora de *VELB*) e pPZPhyg ou pPZPnat para amplificação dos fragmentos 3 + 4 (região 5' do marcador seletivo HPH ou NAT, controlados por promotor de actina e terminador de TrpC ambos de *C. neoformans* e 5 + 6 (região 3' do marcador seletivo HPH ou NAT) e água *milliQ* suficiente para completar o volume final de 50 µL. Nesta etapa ocorreu a amplificação dos fragmentos 1 + 2, 3 + 4, 5 + 6 e 7 + 8. 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 – 1 min – 1 vez e, 4 °C até o fim da reação.

Para a segunda etapa, cujo objetivo foi fundir os fragmentos 1 + 2 com 3 + 4 e 5 + 6 com 7 + 8 em duas reações de amplificação (**Figura 5**) distintas, foi feita uma PCR de sobreposição para obtenção dos fragmentos 1 + 4 (1 + 4 – equivalente a região flanqueadora 5' de *VELB* fusionada à região 5' do marcador seletivo) e 5 + 8 (5 + 8 – equivalente à região flanqueadora 3' de *VELB* fusionada à região 3' do marcador seletivo). Para o fragmento 1 + 4 fundido com HPH, o tamanho esperado foi de 2,2 Kb. Todas as reações foram checadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Para tais reações utilizou-se Enzima Platinum (Invitrogen) 1 U/ reação; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, Concentrações variáveis MgSO₄ 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.

A posterior transformação do cassete foi realizada por biobalística em células leveduriformes haplóides KN99 α .

Figura 5: Representação da técnica de PCR *Double Joint*. (A) Os oligonucleotídeos 1 e 2 tem como alvo a região 5' adjacente ao gene alvo enquanto o par 7 e 8 foi utilizado para amplificação da região 3' do mesmo gene, tais fragmentos foram obtidos a partir do DNA genômico de KN99 α . As regiões 5' e 3' de HPH e NAT foram amplificadas usando os pares 3 e 4 e 5 e 6, respectivamente e como molde o plasmídeo pZPHYG para a marca de resistência à Higromicina e pZPNAT para a marca de resistência à Nouseotricina. (B) Fusão dos fragmentos 5' do gene alvo com 5' de HPH ou 5' NAT e 3' do gene alvo com 3' de HPH ou 3' NAT, utilizando os primers 1 e 4 para a região 5' e 5 e 8 para a região 3', os moldes utilizados foram os fragmentos 1+2; 3+4; 5+6 e 7+8, os quais foram obtidos na etapa anterior. (C) Os fragmentos 1+4 e 5+8 foram co-transformados em leveduras de *C. neoformans*. As células de KN99 α receberam HPH como marca de seleção e as leveduras KN99 α receberam a marca NAT. Existe uma região de 200 pb de sobreposição entre os fragmentos 1 + 4 e 5 + 8 que recombinarão *in vivo* após a transformação do fungo.



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

Tabela 1: Oligonucleotídeos (primers) utilizados no estudo de *VELB* em *Cryptococcus neoformans*.

| Primer | Descrição | Sequência | TM (°C) | Uso |
|--------|-----------|---|---------|--------------------------|
| LF193 | VELB1 | AAGTGG AAGCAGATCGGGAAG | 64 | Double-Joint PCR-VELB |
| LF194 | VELB2 | ATCATGTCATAGCTGTTTCCTGCC CCATCCGTTATGTGAATGA | 62 | Double-Joint PCR-VELB |
| LF020 | M13Re | CAGGAAACAGCTATGACATGAT | 62 | Double-Joint PCR |
| LF028 | NSL_hph | GCGGGAGATGCAATAGGTCAG | 66 | Double-Joint PCR |
| LF029 | NSR_hph | AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT | 66 | Double-Joint PCR |
| LF188 | NSL_nat | CTCCAGAACATTTCGTCGCTTAC | 64 | Double-Joint PCR |
| LF187 | NSR_nat | AGCAAGACCCATCAAAGCTCTA | 66 | Double-Joint PCR |
| LF021 | M13Fen | GTA AACGACGGCCAGTGC | 60 | Double-Joint PCR |
| LF184 | VELB7 | GCACTGGCCGTCGTTTTACCATG | 64 | Double-Joint |

| | | CGCTCACTGAAG | <i>PCR-VELB</i> | |
|-------|------------|---|-----------------|---|
| LF183 | VELB8 | GTACAAGCCCGATGTGTTGGA | 64 | <i>Double-Joint PCR-VELB</i> |
| LF189 | VELB9 | CTTGCTTTTCGAGTGGATCAG | 64 | Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus- <i>VELB</i> |
| LF190 | VELB10 | GTGATCAGTGGGTGATCTCGT | 64 | Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus- <i>VELB</i> |
| LF191 | VELB11 | TTTGGGAGACCTACGACCACA | 66 | Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus- <i>VELB</i> |
| LF186 | VELB12 | G TTCAGCAGCTTGGCTTTCAA | 66 | Confirmação de Deleção/Reconstituição do locus- <i>VELB</i> |
| LF298 | VeATHF | CATGGAGGCCGAATTCATGAGCC CGGCCAACGGC | 70,1 | Duplo-Híbrido (isca) <i>VEA</i> |
| LF299 | VeATHFMut | CATGGAGGCCGAATTCATGAGCC CAGCCAACGGC | 70,1 | Duplo-Híbrido (isca) <i>VEA</i> - Mutação nula |
| LF300 | VeATHR | GCAGGTCGACGGATCCTTACCGT CTCTCGTAGCTTCTCTCTCC | 68,9 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) <i>VEA</i> |
| LF328 | VelBTHF | CATGGAGGCCGAATTCATGTTTCC CTCAACAGGCA | 63,6 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) <i>VELB</i> |
| LF329 | VelBTHR | GCAGGTCGACGGATCCTCATTGA CCACCTTCATCTT | 60,1 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) <i>VELB</i> |
| LF301 | VelCTHF | CATGGAGGCCGAATTCATGCCTG TTCCACAACCC | 64 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) <i>VELC</i> |
| LF302 | VelCTHFMut | CATGGAGGCCGAATTCATGCCAG TTCCACAACCC | 65,1 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) <i>VELC</i> - Mutação nula |
| LF303 | VelCTHR | GCAGGTCGACGGATCCTCAATCT CCTGTCCCTGTT | 60,2 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) <i>VELC</i> |
| LF317 | VosATHF | CATGGAGGCCGAATTCATGTCCG CCCGCGCCCAT | 69,4 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) <i>VOSA</i> |
| LF319 | VosATHR | GCAGGTCGACGGATCCTCAACC CAGCAGGTTGCC | 67,9 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) <i>VOSA</i> |

| | | | | |
|-------|-------------|---|------|---|
| LF318 | VosATHRMut | GCAGGTCGACGGATCCTTAACCC AGCAGGTTGCC | 62,9 | Duplo-Híbrido (isca-pGBKT7) VOSA-Mutação nula |
| LF306 | VeATHPF | CAGTGAATTCCACCCATGAGCCC GGCCAACGGC | 75,1 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) <i>VEA</i> |
| LF307 | VeATHPR | TATCGATGCCCACCCTTACCGTCT CTCGTAGCTTCTCTCTTCC | 69,4 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) <i>VEA</i> |
| LF315 | VelBTHPF | CAGTGAATTCCACCCATGTTTCCC TCAACAGGCA | 63,6 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) <i>VELB</i> |
| LF316 | VelBTHPR | TATCGATGCCCACCCTCATTGACC ACCTTCATCTT | 60,1 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) <i>VELB</i> |
| LF310 | VelCTHPF | CAGTGAATTCCACCCATGCCTGTT CCACAACCC | 64 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) <i>VELC</i> |
| LF311 | VelCTHPR | TATCGATGCCCACCCTCAATCTCC TGTCCTGTT | 60,2 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) <i>VELC</i> |
| LF312 | VosATHPF | CAGTGAATTCCACCCATGTCCGC CCGCGCCCAT | 77,4 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) <i>VOSA</i> |
| LF313 | VosATHPR | TATCGATGCCCACCCTCAACCCA GCAGGTTGCC | 67,9 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) <i>VOSA</i> |
| LF314 | VosATHPRMut | TATCGATGCCCACCCTCATCCCA GCAGGTTGCC | 66,8 | Duplo-Híbrido (presa- pGADT7) VOSA-Mutação nula |

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.2 Transformação de *C. neoformans* por biobalística para obtenção dos mutantes *velBa* Δ e *velBa* α Δ

Colônias isoladas das linhagens KN99 α e KN99 α 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 μ m, 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 ressuscitado 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 ressuscitadas em 500 μ L 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 μ L de partículas estéreis, 5 μ L de DNA (quantidade total variou de 0,5 a 1 μ g), 50 μ L de CaCl₂ (2,5 M) estéril, 20 μ L 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 μ L 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 μ L de acordo com a quantidade de placas a serem bombardeadas (por exemplo, 3 tiros, 12 μ L de etanol absoluto; 4 tiros, 16 μ L de etanol absoluto; e assim por diante). As partículas foram sonicadas por 3 segundos, e 4 μ L 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 transformadas com marca HPH (tipo sexual α) inoculadas em placas com meio seletivo, Higromicina B (200 μ g/ml) e células do tipo sexual a foram selecionadas com Nourseotricina (200 μ g/ml) por terem sido transformadas com o cassete de deleção contendo a marca NAT. Após 72 h de incubação a 30°C os transformantes foram transferidos para uma nova placa de YPD contendo os marcadores seletivos para confirmação da estabilidade mitótica. O DNA genômico dos possíveis transformantes foi extraído conforme protocolo para posterior confirmação via PCR.

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

Para a extração do DNAg de *C. neoformans*, células foram cultivadas por 12h 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 ressuscitado 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 μ m, 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 μ L 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 μ L 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 μ L H₂O MilliQ, acrescida de RNase A (150 μ g/mL) e incubou-se os tubos a 37 °C por 1 h e depois todos foram armazenados no freezer (-20 °C).

2.3.4 Confirmação da deleção de *VELB*

Para confirmação da integração do cassete de deleção *VELB::HPH* ou *VELB::NAT* no locus de *VELB* das células α ou a , respectivamente foram utilizados oligonucleotídeos desenhados externamente às regiões de *VELB* escolhidas para construção do cassete de deleção, e combinados com oligonucleotídeos que reconhecem a região do marcador seletivo HPH ou NAT, conforme listados na **Tabela 1**. Para as amplificações utilizou-se a Enzima Fidelity Taq 2X (Fermentas) (1 X), 0,25 μ M de cada oligonucleotídeo (variável de acordo com cada par de cada reação, LF190 + LF029 para HPH (LF193 + LF187 para NAT) ambos da região 5' e LF028 + LF189 para HPH (LF188 + LF183 para NAT) ambos da região 3'; 10 ng de molde (DNA genômico dos transformantes escolhidos aleatoriamente, que tornaram-se resistentes a Higromicina B ou Nourseotricina), e água suficiente para volume final de 20 μ L. 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.

2.3.5 Confirmação dos mutantes *velBa* Δ e *velBa* α por Southern Blot

Após a confirmação da deleção da ORF de *VELB* 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 por 12h, 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 $\times g$. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi congelado a -80 °C, por 12h. 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.

2.3.5.1 Digestão do DNAg e o Southern blot

O DNA genômico extraído dos mutantes *velBaΔ* e *velBaΔ* confirmados por PCR foram quantificados e diluídos para a concentração de 2 µg/µL, sendo utilizados 20 µg de DNA para cada digestão com a enzima selecionada EcoRV (New England Biolabs). As reações de digestão foram conduzidas conforme as instruções do fabricante.

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 previamente ao do processo de hibridização em quantidade proporcional ao volume do tampão de hibridização. O fragmento de DNA correspondente (10 ng/μL) foi denaturado 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 centrifugado por 30 segundos em velocidade máxima. 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..

Para a hibridização da membrana e detecção, foram utilizados os protocolos do kit *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche).

Foi realizada a PCR da sonda (fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos 1 + 2 - LF193 e LF194) para incorporação do marcador DIG (digoxigenina) do gene *VELB* de *C. neoformans* tendo como DNA molde o DNA genômico de KN99a , para tal, foi utilizado o kit *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) com os oligonucleotídeos LF193 e LF194, também foi feita a mesma PCR utilizando a *OneTaq® DNA Polymerase* (New England Biolabs) com a finalidade de observar se o fragmento da sonda possuía um tamanho molecular um pouco maior que o fragmento gerado por PCR comum, tendo em vista que a sonda deveria incorporar a cauda de DIG. O ciclo utilizado foi: 94 °C – 2 min – 1 vez; 94 °C – 30 seg, 60 °C – 30 seg, 68 °C – 1 min, repetidos 45 vezes, 68

°C – 5 min – 1 vez, e 4 °C até o término da reação. O tamanho do fragmento foi de 948pb e corresponde a região 5' do gene *VELB*.

A membrana foi hibridizada com *DIG Easy Hyb Granules* (Roche), sendo que o tampão de hibridização fora adicionado à membrana em forno de hibridização para que fosse realizada a etapa de pré-hibridização e equilíbrio da temperatura do tampão. A marcação da sonda foi realizada conforme descrito anteriormente com o auxílio do kit *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) e a hibridização ocorreu *overnight*.

Após esse período, a solução foi retirada e a membrana foi lavada duas vezes com a solução WASH 1 (2X SSC, 0,1% SDS) por 5 minutos. Em seguida foi feita a lavagem duas vezes com a solução WASH 2 (0,05X SSC, 0,05% SDS) por 15 minutos.

Com o auxílio do *DIG Wash and Block Buffer Set* (Roche) foram feitos o preparo e bloqueio da membrana. Inicialmente, a membrana foi lavada com *DIG Washing Buffer* por 5 minutos. Após, a membrana foi bloqueada com a mistura da solução de bloqueio com o tampão de ácido málico por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo contra DIG e o mesmo foi incubado com a membrana por 30 minutos em agitação. Ao final, a membrana foi lavada duas vezes com *DIG Washing Buffer* por 15 minutos. Após este período, a membrana foi incubada em saco plástico com o detector para prosseguir o processo de sensibilização do filme e revelação.

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, o filme foi lavado em água destilada e submetida à análise.

2.4 Reconstituição do locus de *VELB*

Alguns dos procedimentos utilizados nessa etapa são os mesmos descritos anteriormente para obtenção dos mutantes *velBa*Δ e *velBa*Δ. Inicialmente, amplificou-se o locus *VELB* (1,7 kb) via PCR utilizando-se os

oligonucleotídeos LF273 e LF274 com a enzima FideLiTaq (Fermentas) no volume final de 50 μ L (FideLiTaq Mix 2 X, 10 μ M de cada oligonucleotídeo LF273 e LF274, 10 ng DNA genômico de KN99a e água *milliQ*). O ciclo utilizado para a amplificação foi: 94 °C – 1 minuto – 1 X, 94 °C – 15 segundos, 59 °C – 30 segundos, 68 °C – 05 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 μ g do fragmento foi adicionado 1,5 μ g 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 *velBa* Δ 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 μ g/mL.

O DNA genômico das colônias obtidas foi extraído conforme descrito anteriormente. A confirmação da reconstituição do locus de *VELB* foi realizada por meio de amplificação da região 5'*VELB* e da região 3'*VELB* 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 2,5 Kb (oligonucleotídeos LF189 + LF186) e 2,0 Kb (oligonucleotídeos LF190 + LF191).

Para amplificação da região 5' foram feitas reações de volume final 20 μ L com a enzima Phusion HF (Thermo Scientific) (10 ng DNA genômico, FideLiTaq mix 2 X, 10 μ M de cada oligonucleotídeo (*forward* e reverso) e água *milliQ* até o volume final de 50 μ L). O ciclo utilizado foi 98 °C – 30 segundos – 1 X, 98 °C – 10 segundos, 62 °C – 30 segundos, 72 °C – 1,5 minuto, repetidos 35 X, 72 °C – 7 minutos – 1 X e 4 °C até o fim da reação.

As cepas que tiveram amplificação confirmada da região 5' de *VELB* foram submetidas à amplificação da região 3' com a seguinte reação: 20 μ L de volume final em cada reação, com a mesma composição da primeira etapa. O ciclo utilizado foi 98 °C – 30 segundos – 1 X, 98 °C – 10 segundos, 62 °C – 30 segundos, 72 °C – 1,5 minuto, repetidos 35 X, 72 °C – 7 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.

2.5 Avaliação fenotípica *in vitro* dos mutantes *velBa* Δ e *velBa* α Δ

Mutantes *velBa* Δ e *velBa* α 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 1×10^5 células/mL. A partir da concentração padrão foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 1×10^1 células/mL. Para a visualização de defeitos na parede e produção de cápsula e melanina, alíquotas de 10 μ L 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.

2.5.1 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.

2.5.2 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 Níger, 0,1 % de glicose, 0,1 % de KH_2PO_4 , 0,1 % de creatinina, 1,5 % ágar bacteriológico) e submetidas a crescimento a 30 e 37°C por aproximadamente 7 dias.

2.5.3 Produção de cápsula

A produção de cápsula foi avaliada por meio do plaqueamento de 1.10^5 das leveduras selvagens e mutantes e reconstituídas em placas de meio DMEM acrescido de MOPS (Gilbert *et al.*, 2010). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por até 72 horas, posteriormente, uma fração da colônia foi ressuspensa em 20 µL de água destilada estéril e foi realizada a visualização das células microscopicamente com tinta nanquim. Utilizou-se microscópio *Zeiss Axio Observer Z1*, sendo que as imagens foram captadas em DIC.

2.5.4 Produção de urease

A produção de urease foi avaliada após incubação de 1×10^5 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.

2.5.5 Produção de fosfolipase

A capacidade de sintetizar fosfolipase foi avaliada após incubação de 1×10^7 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).

2.5.6 Integridade da Parede Celular

A determinação de possíveis defeitos na síntese de parede celular dos mutantes *velBa*Δ e *velBa*αΔ foi realizada após o inóculo de leveduras crescidas em YPD ágar, um acrescido de 0,5 % e outro a 1 % de *Congo Red*, outro meio com cafeína em duas concentrações (0,5 mg/mL e 1 mg/mL) e outro contendo SDS (0,05 %) 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 e Durán, 1985).

2.5.7 Estresse oxidativo

O efeito de agentes oxidativos sobre os mutantes *velBa* Δ e *velBa* α Δ foi testado em meio YPD, acrescido peróxido de hidrogênio H₂O₂, (0,5 mM e 1 mM). As placas foram incubadas a 30 e 37 °C durante 48-72 h.

2.5.8 Estresse osmótico

O efeito de agentes osmóticos sobre os mutantes *velBa* Δ e *velBa* α Δ foi avaliado em meio YPD, acrescido de NaCl 1,5 M. As placas foram incubadas a 30 e 37 °C durante 48-72 h.

2.5.9 Estresse térmico

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

2.5.10 Teste de Resistência à luz UV

A capacidade de crescimento após a irradiação com luz UV também foi observada a fim de verificar se *VelB* participa na resistência ou hipersensibilidade à luz UV, haja vista que mutantes *BWC1* de *C. neoformans*, além de acasalarem na presença de luz, os mesmos possuem hipersensibilidade à luz UV (Idnurm e Heitman, 2005).

As células foram irradiadas com doses de 10 a 50 mJ/cm² de luz UV com o auxílio do UV Crosslinker- FB-UVXL-1000 em placas de YPD Agar contendo as diluições seriadas das linhagens selvagem, mutante e reconstituída de *VelB*.

2.5.11 Teste de Fusão

A fim de verificar se os mutantes de *VELB* possuem defeito na fusão celular durante o processo de acasalamento as células foram cultivadas *overnight* a 30 °C sob agitação e no dia seguinte, foi realizado o co-cultivo entre

linhagens de tipos sexuais opostos na concentração padrão de 1×10^7 células por mL.

Foram plaqueados spots de 5 μ L dos cruzamentos: KN99 α X KN99 α e *velBa* Δ X *velBa* Δ em meio MS na ausência de luz. As placas foram incubadas por 24 horas, os cruzamentos foram cortados do meio e os mesmos foram depositados em tubos de polipropileno contendo 2 mL de água destilada estéril. Os cruzamentos foram recuperados por meio de homogeneização vigorosa em vórtex. Alíquotas de 200 μ L de cada cruzamento foram plaqueados em meio YPD contendo 200 μ g/mL de Higromicina B e Nourseotricina e incubadas em estufa a 30 °C. Após 3 a 5 dias foi possível observar a presença das colônias contendo as duas marcas de seleção HPH e NAT resultantes do processo de fusão.

2.5.12 Acasalamento

Foi avaliada a capacidade das leveduras haplóides de realizarem acasalamento (quando em contato com o tipo sexual oposto) em meio Agar Filament, meio Murashige and Skoog 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 21 dias e observadas em lupa e microscópio para o aparecimento de hifas indicativas de acasalamento.

2.6 **Avaliação *in vitro* da sobrevivência do mutante *velBa* Δ após ensaio de fagocitose por macrófagos J774. A1**

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 hematocítômetro 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 por doze horas à temperatura de 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 à opsonizá-las. A proporção macrófagos:leveduras utilizadas no experimento foi de 1:5.

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. 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* 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.

2.7 Análise da interação das proteínas *Velvets* de *C. neoformans*–Duplo-Híbrido

A fim de verificar a possível interação dos *velvets* *VeA*, *VelB*, *VelC* e *VosA*, ensaios de duplo-híbrido foram conduzidos utilizando o kit *Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System* (Clontech).

2.7.1 Extração de RNA e síntese do cDNA

Foi preparada uma cultura de 24 horas da cepa H99 em crescimento vegetativo (OD_{600} menor do que 1.0) pela semeadura de uma colônia jovem grande em 200 mL de YPD líquido em um frasco cônico de 500 mL, seguida de incubação a 30 °C por 24 horas a 150-200 rpm.

A cultura foi dividida em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL, o meio foi removido por centrifugação, o precipitado celular foi ressuspenso em água pré-tratada com DEPC, a suspensão foi centrifugada novamente e a água foi removida. O precipitado foi congelado imediatamente pela imersão dos tubos em nitrogênio líquido. Os tubos foram liofilizados por uma noite, após o que se adicionaram 5 mL de pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro. O material foi agitado vigorosamente à mão até que se reduzisse a um pó fino.

Em capela de biossegurança, os tubos foram abertos e se adicionaram, a cada um, 4 mL de reagente TRI reagente (Life Technologies) trazido previamente para a temperatura ambiente, a que se seguiu nova agitação vigorosa. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionaram-se 800 μ L de clorofórmio a cada tubo, que foi então fechado e agitado vigorosamente à mão por 30 s. Transferiram-se as amostras para tubos de polipropileno de 15 mL com tampa, e no total foram deixadas por 3 minutos à temperatura ambiente.

Centrifugaram-se os tubos por 15 minutos a 12.000 g a 4°C num rotor de ângulo fixo pré-resfriado e então a fase aquosa de cada tubo foi cuidadosamente transferida para um tubo novo idêntico ao anterior por pipetagem (ponteiras de 1mL). A cada tubo se adicionaram 2mL de 2-propanol, que foram fechados e invertidos algumas vezes para misturar a suspensão. Os tubos foram então incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4°C num rotor de ângulo fixo.

O sobrenadante foi decantado e o precipitado, lavado pela adição seguida de mistura por inversão de etanol a 75% (feito em água tratada com DEPC). Decantou-se o etanol cuidadosamente, os restos de líquido foram removidos por pipetagem e os tubos, secos ao ar invertidos sobre papel absorvente. Cada precipitado foi acrescido de 500 µL de água tratada com DEPC e solubilizado pela incubação dos tubos a 55 °C por 10 minutos.

O RNA foi aliquotado, uma amostra foi submetida à verificação de integridade e quantificação por meio de um bioanalisador (Agilent Technologies, de acordo com as instruções do fabricante para o sistema RNA Nano6000). As alíquotas foram congeladas a -80 °C.

O cDNA foi gerado a partir do RNA obtido na extração. Não foi feito o tratamento com DNase. Foi utilizado o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems) e o procedimento foi conduzido conforme instruções do fabricante. Para transcrição reversa, foram utilizados 2 µg de RNA para a 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.

2.7.2 Desenho de oligonucleotídeos para duplo-híbrido

Foram desenhados no mínimo dois pares de oligonucleotídeos para cada gene *Velvet* tendo como referência as sequências dos transcritos dos mesmos. O primeiro par serviu para que o gene alvo fosse amplificado a partir do cDNA de H99 (*C. neoformans* var. *neoformans* - Sorotipo A) e o mesmo possuía nas extremidades uma região de homologia ao plasmídeo pGBKT7

linearizado por EcoRI e BamHI, para que isso facilitasse a clonagem pelo sistema de recombinação *In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit* (Clontech). Para o desenho dos oligonucleotídeos da presa, foi adicionado uma região de homologia ao plasmídeo pGADT7 linearizado por SmaI.

2.7.3 Amplificação dos cDNAs dos *Velvets* de *C. neoformans*

Os fragmentos de transcritos para as iscas de *VEA*, *VELB*, *VELC* e *VOSA*, foram gerados a partir por PCR comum tendo como molde o cDNA de H99. Tais reações de PCR foram realizadas com a enzima Phusion (Thermo Scientific).

Para a produção dos fragmentos das iscas e presas de *VEA*, *VELB*, *VELC* e *VOSA*, foram utilizados 2 µL da reação de cDNA diretamente em cada reação de PCR convencional, cujo objetivo foi isolar os fragmentos dos genes em investigação.

Para a obtenção dos fragmentos da isca foi realizada uma PCR com os iniciadores LF298 e LF300 e uma segunda PCR com os oligonucleotídeos LF299 e LF300 no qual o LF299 possui uma mutação nula. O fragmento correspondente à presa de *VEA* foi obtido por meio de PCR comum com os oligonucleotídeos LF306 e LF307. Para todas as reações foi utilizado o mesmo ciclo de dois passos, no qual foi constituído de 98 °C – 30 segundos – 1 vez, 98 °C – 10 segundos, 72 °C – 1:20 minutos, repetidos 45 vezes, 72 °C – 5 minutos – 1 vez e 4 °C até o fim da reação. Os fragmentos esperados foram de 1,6 Kb.

Para a obtenção do fragmento da isca de *VELB*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF328 e LF329. Para o fragmento referente à presa foram utilizados os oligonucleotídeos LF315 e LF316, o ciclo utilizado para ambas reações foi 98 °C – 30 segundos – 1 vez, 98 °C – 10 segundos, 60,1 °C – 30 segundos, 72 °C – 1:30 minutos, repetidos 5 vezes, 98 °C – 5 segundos, 72 °C – 30 segundos, repetidos por 40 vezes, 72 °C – 5 minutos – 1 vez e 4 °C até o fim da reação. Os fragmentos esperados foram de 1,7 Kb.

Para a obtenção dos fragmentos da isca foram utilizadas duas combinações de oligonucleotídeos, a primeira foi LF301 e LF303 e a segunda foi LF302 e LF303, onde LF302 possui uma mutação nula. Para a presa de

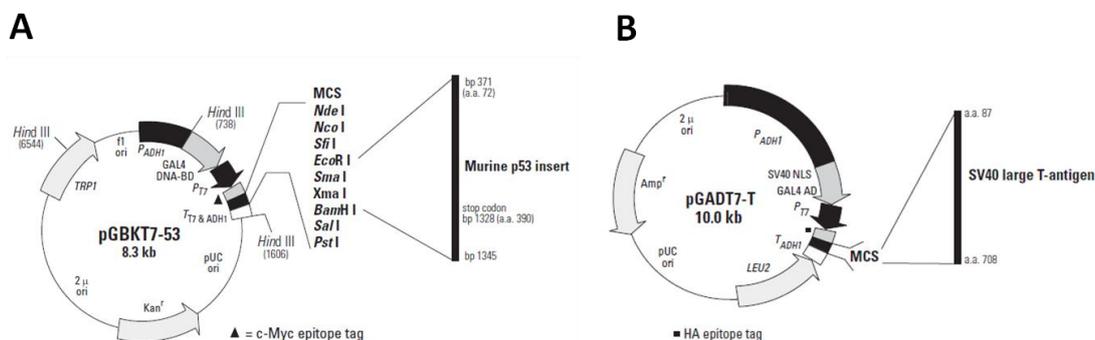
VELC, foram utilizados os oligonucleotídeos LF310 e LF311. Para todos os fragmentos, foi utilizada uma PCR comum de três passos, no qual o ciclo utilizado foi 98 °C – 30 segundos – 1 vez, 98 °C – 10 segundos, 60,2 °C – 30 segundos, 72 °C – 1 minuto, repetidos 5 vezes, 98 °C – 5 segundos, 72 °C – 30 segundos, repetidos por 40 vezes, 72 °C – 5 minutos – 1 vez e 4 °C até o fim da reação. Os fragmentos esperados foram de 1,5 Kb.

Para a obtenção do fragmento da isca de *VOSA*, foram utilizados os oligonucleotídeos LF317 e LF319 e uma segunda combinação com os oligonucleotídeos LF317 e LF318, cujo LF318 possui uma mutação nula. Para a primeira reação (sem o nucleotídeo com mutação nula), foi utilizado o ciclo foi 98 °C – 30 segundos – 1 vez, 98 °C – 30 segundos, 67,9 °C – 30 segundos, 72 °C – 1:30 minutos, repetidos 5 vezes, 98 °C – 5 segundos, 72 °C – 40 segundos, repetidos por 40 vezes, 72 °C – 5 minutos – 1 vez e 4 °C até o fim da reação. Para a segunda reação, foi utilizado o ciclo 98 °C – 30 segundos – 1 vez, 98 °C – 30 segundos, 60,2 °C – 30 segundos, 72 °C – 1:30 minutos, repetidos 5 vezes, 98 °C – 5 segundos, 72 °C – 40 segundos, repetidos por 40 vezes, 72 °C – 5 minutos – 1 vez e 4 °C até o fim da reação. O ciclo para a obtenção da presa foi o mesmo, diferindo somente na temperatura de anelamento utilizada, que foi de 67,9 °C, para o oligonucleotídeo sem mutação nula e de 66,8 °C para o oligonucleotídeo com mutação nula. Os fragmentos esperados foram de 1,9 Kb.

2.7.4 Clonagem dos genes de interesse, transformação e recuperação do plasmídeo

A clonagem dos insertos se deu por meio do kit *In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit*. Onde, 100 ng do plasmídeo de interesse (pGBKT7 para a isca e pGADT7 para a presa) (**Figura 6**) e 100 ng de seu inserto correspondente, em um volume final de 10 µL, foram colocados em um tubo do kit e homogeneizados por meio de pipetagem. Em seguida, os tubos foram incubados em termociclador num ciclo de 37 °C – 15 minutos, 50 °C – 15 minutos e 4 °C até o fim da reação.

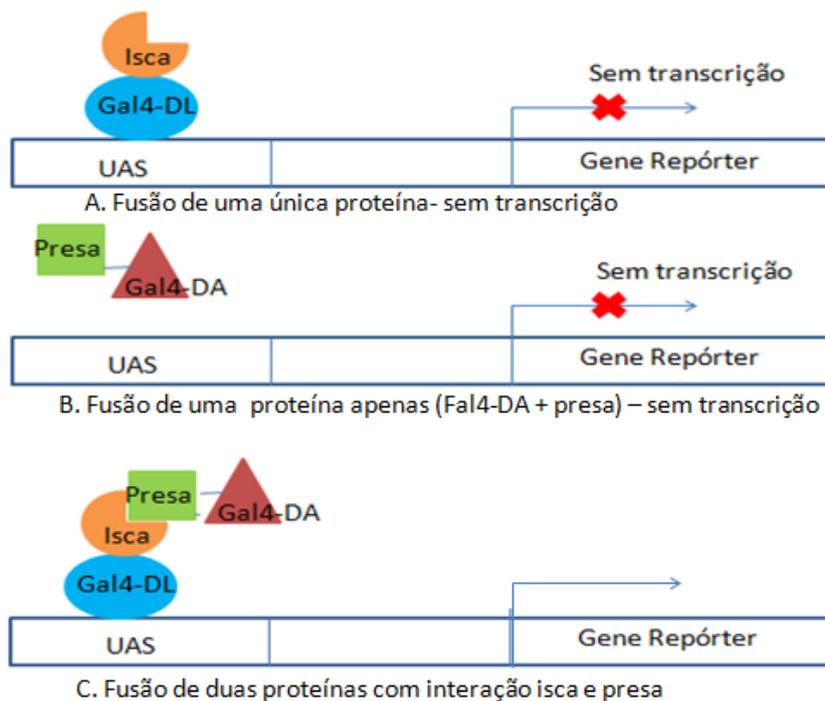
Figura 6: Mapas dos plasmídeos utilizados no ensaio de duplo-híbrido. (A) Mapa do plasmídeo pGBKT7 utilizado para clonar as iscas. (B) Mapa do plasmídeo pGADT7 utilizado para clonar as presas.



Fonte: *Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System* (Clontech).

O duplo-híbrido se trata de um teste de interação entre proteínas. O cDNA referente ao transcrito do gene alvo é clonado num vetor que possui um promotor específico, no nosso caso *GAL4*. A proteína fusionada aos domínios de ligação e ativação de *GAL4* somente ativam o gene repórter quando ocorre a interação (Ferro e Trabalzini, 2013) (**Figura 7**).

Figura 7: Esquema de funcionamento do duplo-híbrido. O fator de transcrição de *GAL4* produz duas proteínas ligadas a dois domínios (DL – domínio de ligação e DA- domínio de ativação), essenciais para a transcrição do gene repórter. A e B: Duas proteínas de fusão são preparadas: Gal4BD + Isca e GAL4-DA + Presa. Nenhum deles é geralmente suficiente para iniciar a transcrição do gene repórter. C: Quando ambas as proteínas de fusão são produzidas e parte da isca da primeira interage com a presa da segunda e a transcrição do gene repórter ocorre



Fonte: Produção do autor.

Para a replicação dos plasmídeos com os insertos de interesse, foi realizada a transformação de *E. coli* competentes *Stellar*TM (Clontech) por choque térmico, conforme o protocolo do fabricante. Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB Agar acrescido da droga a qual o plasmídeo conferia resistência (Canamicina 50 µg/mL para pGBKT7 e Ampicilina 100 µg/mL para pGADT7) e incubadas a 37 °C por 16 horas. Decorridas às 16 horas, foram escolhidas colônias aleatórias e as mesmas foram inoculadas em meio LB líquido para posterior extração do DNA plasmidial com o auxílio do kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) conforme as instruções do fabricante. Após a extração, 5 µL de cada DNA plasmidial foi submetido à eletforese em gel de agarose 0,8% e quantificado para posterior transformação das células de *S. cerevisiae*.

2.7.5 Transformação das leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*

Foram feitas células competentes das cepas Y2HGold e Y187 conforme o protocolo de Acetato de Lítio seguindo as instruções do fabricante (Clontech).

Em seguida, as células competentes foram transformadas com seus respectivos plasmídeos, no qual 100 ng de DNA plasmidial e 10 µg de DNA carreador foram adicionados a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Após, foram adicionados 50 µL de leveduras competentes e misturadas gentilmente ao DNA. Em seguida foram adicionados 500 µL da mistura de PEG e Acetato de lítio, e as mesmas foram incubadas a 30 °C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 20 µL de DMSO e misturados gentilmente. A mistura foi colocada em banho-maria a 42 °C por 15 minutos e centrifugadas a velocidade máxima por 15 segundos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de YPD Plus, o ressuspendido foi novamente centrifugado por 15 segundos em velocidade máxima e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:10 e 1:100 e 100 µL das mesmas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio SD/-Tryptofano e SD/-Leucina para iscas e presas, respectivamente. Após 48 horas, foi observado o crescimento das colônias e as mesmas foram submetidas ao teste de toxicidade e ao teste de auto ativação que consistiu no plaqueamento das colônias em duas placas de seu respectivo meio (SD/-Leucina ou SD/-Tryptofano), a primeira placa suplementada com 40 µg/mL X-α-gal e a segunda suplementada com 40 µg/mL X-α-gal e 200 ng/mL de Aurobasidina A. A auto ativação foi verificada por meio da coloração azulada das colônias que se auto ativam e a toxicidade pelo tamanho das colônias das diluições em relação aos controles (leveduras transformadas com pGBKT7 ou pGADT7 vazios).

2.7.6 Acasalamento de *S. cerevisiae* para duplo-híbrido

As iscas de *VEA*, *VELB*, *VELC* e *VOSA* e o controle do pGBKT7 transformado em leveduras da cepa Y2HGold de *S. cerevisiae*, foram crescidas overnight em 5 mL de meio SD/-Tryptofano líquido a 30 °C sob agitação. As presas de *VEA*, *VELB*, *VELC* e o controle do pGADT7 transformado em Y187, foram crescidas overnight em 5 mL em meio SD/-Leucina líquido.

No dia seguinte, as iscas e presas dos genes de interesse com os seus respectivos controles foram centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 1 mL de água

destilada estéril. Em seguida, os cruzamentos foram realizados de acordo com a necessidade. Aliquotas de 5 µL de tais cruzamentos foram plaqueados em três meios diferentes, SD/QDO acrescido de 40 µg/mL de X-α-Gal e 200 ng/mL de Aurobasidina A, SD/QDO acrescido de 40 µg/mL de X-α-gal e SD/DDO sem suplementação alguma. Os cruzamentos foram incubados a 30 °C por até 48 horas e fotodocumentados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise *in silico* das sequências dos *Velvets* de *C. neoformans* utilizando o banco genômico disponível

As sequências genômica e proteica de *VELB* de *C. neoformans*, foram obtidas utilizando a ferramenta BLASTp através das sequências de *Velvets* já conhecidas de *A. nidulans*. Todas as sequências de *velvets* de *C. neoformans* estão disponíveis no banco de dados *Broad Institute* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html), e foram utilizadas para comparação com outros membros da família *Velvet* de alguns fungos selecionados. A determinação de regiões e domínios conservados foi realizada por alinhamento das sequências obtidas por meio da ferramenta CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) e checadas no BLAST (Pfam) (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) para determinação de domínios e regiões conservadas.

O gene *VELB* de *C. neoformans* (CNAG_00564) apresenta 3,2 kb e contém 6 íntrons. A proteína codificada é composta de 560 aminoácidos. O DNA complementar (cDNA) possui um tamanho de 1,6kb. Foi realizado alinhamento com as sequências dos domínios *Velvet* identificadas no banco genômico de *C. neoformans*, conforme demonstrado na **Figura 8**.

Figura 8: Alinhamento das sequências dos domínios *Velvet* encontrados em *C. neoformans* (*VeA*, CNAG_02387; *VelC*, CNAG_02697; *VosA*, CNAG_07989; *VelB*, CNAG_00564) em *C. neoformans*.

```

VELB      MFPSTGKDLMLLETACPTSPLPTKKRKRMDQTSSHLLPTNHEL PVD----- 46
CNAG_05697 -----MVNPSHVSQS----- 11
CNAG_04086 -MKSQPKSHL PRLHPQADRVPYDPPDVLGRPHSHPHRG----- 38
VELC      -MPVPQPSQD TESQHISSAVPSIPRPIATAVEKHGSQFAR----- 40
VOSA      MSARAHPPSSSQPHLSNILAPTSQPANTERTESI QADDGDAEGEPGQKAGRRGSDK GK 60
VEA       ---MSPANGGNVQAFAMPWAGNSSYALVVRQQPERARLCS----- 37

VELB      -----MPNMASKTGREGWYHLEILQEPLRARACGFGNKDR-RPLT 86
CNAG_05697 -----LLRTYRITPIQQPLRSAAFEKAYLSR-LPLS 41
CNAG_04086 -----PMPYTCSQQPARPYAYAWEYDYPYPHSQSLD 70
VELC      -----EPDASFATSACASQPSNGNMRSDNALMLFT 70
VOSA      EKDKEDDKWIQGVYAYEYVVPVTRRQGRKNITYELTMRQQPVQARMCGIGDKSDRRPVD 120
VEA       -----YKEENETIDRRPVDPPPVELRVGSGREVT 67

VELB      PPIIIRLWIQDALGNQVDPNIVDSNAIILQVD-----LCSADGLEGRNVV 131
CNAG_05697 PPLIIQLDCWDARGEQIIP----- 60
CNAG_04086 RQLSLPLQLPPPLPYPAASSYPATCAANPTTN-----DINSANVNKHGST 115
VELC      PPIILQKGI FSGKKMRFALSVEQE-----PVLGRKTEKD 105
VOSA      PTPIIQLKVIDPQDDITSIDPQTKQIRRPSSGEMTYM QNPYYFLFACL VGGEEQEDE 180
VEA       PEQLLESTSEFFIRATTVASDPLTSASATSF TP-----SLFSSEPLTHTGPTY 114

VELB      RHPVPGPNVPAVVSLENVRSGHLDPSALPSTPAAVSEQPYS DPSMDHYSWSKHYSSDSS 191
CNAG_05697 ----- 173
CNAG_04086 RQPTPPPPPPASAPEPSAAGRTSELSGFQVDYTRVSPRKA VRRPRMVLEEEEEVGG-- 173
VELC      RRPLGPAPIVRLRAVECRSVEDDTGVIEEVDAGTLD AVN----- 145
VOSA      LHVIDDGKTRFLTGT PVS SLYHLKDLDNSDAAFFVFPDLGVRKEGRYK LKLT LFEIVDQE 240
VEA       APVKTPLGADATTEGEVIQTPEKLRLLDGRMAVLCIFAKISVRVPGIFRLKFTLFETTEHG 174

VELB      DRTPPGWTYQDTFASSPRIAG-----THPSIARRVRTPTRPSTAPSLRPPAWSVDV 242
CNAG_05697 ----- 198
CNAG_04086 -----GIHVKT VILRKGADSQGIDHDQVGE 198
VELC      -----IVCAADLCAPTTTQHS AIEETN 167
VOSA      VYYCTTMFTSTFSVYSAKKFP GMSKATDLSV SFAEQGLKIRVRKDP RPQPARATASSSGKS 300
VEA       IVELAQTVSEPFVFSPLFKG-----MHES TPLTRHLAAQGLKVKLR TDTTVGRQS 226

VELB      SQRPLYDEALPPI SALAEDIRDP SGRSSFPDPHSMQRPTSSSSLSRSPHTSYSTDLSTA 302
CNAG_05697 -----YDELP-----FLVCHLSLET PNGQD-----AAIVTSPDTE 90
CNAG_04086 IGPPPEEAYIVLRPHRVPGIVNLDGKVS GVGVGGMGTTKGKGKYGKSIGTGVSRKGV D 258
VELC      EAKLLPESEHRPYGEHDTSLVNFAGVTSSEQASSGPSTPARKARDQAVTSEVDPTSLGDA 227
VOSA      KRKSDAHESEEEETPAQQQSKRTRGLSMGYPGHEQR FHP PPEHHYYPYPPNYPPPPSGYY 360
VEA       VRRRRASANPTIPSTPTFIKEDVPAPMNI PPASSPHFLPTKSRLLP SLSAQAPSHSLSAQ 286

VELB      P--TDYSFGRPTTSSSTASWHLSADSEYKGFAL ESQA AERSKPGHRPKSND SKV PMLSAE 360
CNAG_05697 P--VSMLYG----- 97
CNAG_04086 VGWDDGVPGDIPTFEQWSYELEVLQSPTRGRALGNLPLSRGFPSLSAPLIVQLIVRDGSG 318
VELC      PLAADVREKAAKKWKRQKSSGEVSSGSA TEIERARRSGAGHGA AVPERNLYGNLHVGG 287
VOSA      PPSGHPMPPPPPSAYDPYRSHMSRSGSPHPYHPSYPPY SAPGYPPPPSSYYHVNSGRPS 420
VEA       APSHLSAQAPSHQEVPSSSSKVARRTVSDSPRNLVWRHAAYEIVRPHATENRVSGPGER 346

VELB      TQTTSPGSFLPASFSDRFTLHDS PQLPHSYHNCHYRSNVA SVKDWDLSLHIPDLDTMKETR 420
CNAG_05697 -----TLIATP----- 103
CNAG_04086 GIIPADNSALSRRLVHVMMVDLVSADGKQSRGVVRVCAAGSGGEVGVGVEEDGVESY 378
VELC      VKVPDLEKMGVWFLFTDLCVRQEGSYSLRFRCYDITAVEEGGLPVAQLAECRSQFFRIY 347
VOSA      THPESGPSRRHSLPPPGYVLGSR LIPSPSSLGHHAYPIPPGMGYPPYPMHSESYDRAGM 480
VEA       PFTDDGSPISFNPDWRV SAPSSDLSAFSLRSLHRVDPFRPPSV PNDTTSASPSQSYTPS 406

```

```

VELB      YVAPASAASTLVLVGKRHTPCNKLKDEHG---RLGLFFFDATD--LGVRTTEGRFCFLRMKIM 475
CNAG_05697 -----AEMDDQGTG---AQGVYFVFPD--VSVRHVGRFRLKALLM 137
CNAG_04086 HLRNPLGGTFRLSSTFSQSRGKEKKRGEGRGKKEKNFFIFSE--MVRTPGEYALMVRL 436
VELC      SPRQIPILPKLTELAEHFAKLGFKLNTRKNDRAAQSPLEPPP--STAPPSAHAAVLTMGS 405
VOSA      PWPQDHRPILPLPPHPESVMGRPGSRGTGHRSTHPSSLRQGG--SPLASGRFQYAQS-- 536
VEA       SYSSTQLSSTQSLPTTPPPMTSSSHSIQSTLPTPRRSLGIDGVPILPLPSSFNSPGHAE 466
          :
          .

VELB      DLSLFSRAPNPGDSTPVLAETTSQPIEVYSAKRFPVGIPTTKLTRLFAAQGIKLAVRESH 535
CNAG_05697 RITGG-----PAVHVSVTRTFEIVHTKDY-IAPPVTALTKHFDSQRIVRFGLPY 186
CNAG_04086 DIAGPPLGTSIGVTRSLAEVLTKEPFTVFHSSKFPGPSIPVTELSVEFARQGERNLGQRKV 496
VELC      RPQPCPIQLDPSHMSPPSSSTSNSEKAMRSTSTGQCTSFMTDNTSKTSNSLGGSGESSA 465
VOSA      -PDMGSYRPSSSAGTGDGRDGRERERERELHRRSPVILPPLTRSPALIPQSLPITDPRD 595
VEA       FVPPSVNQVLNPLRRSSTSSGPGLEPHGSGGAPSQSAAGPLTSRNRYLASIPGPSSLRR 526

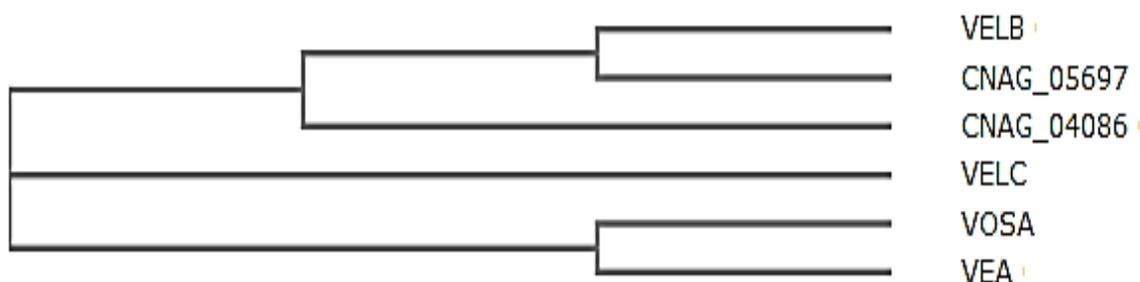
VELB      KQKHRNKESVDMVDVQDEIEEDEGGQ----- 560
CNAG_05697 Q----- 187
CNAG_04086 RDAIAGSSEEDDG----- 509
VELC      KGASTAQGTGQSFQVTSVSSEENNGTGTGD----- 494
VOSA      SRESQNESRASVGEESGSRPSSSGKNKMGLGNLLG 630
VEA       PSPLTLPLPLRPPPEERSYERR----- 548

```

Fonte: Elaborado pelo autor.

Avaliando a similaridade entre as proteínas Velvet de *C.neofomans*, e utilizando-se dos dados obtidos no alinhamento, montou-se um cladograma com a análise filogenética das proteínas (**Figura 9**).

Figura 9: Cladograma para comparação dos domínios Velvet de proteínas *VeA*, *VelB*, *VelC*, *VosA* e dois domínios recentemente encontrados (CNAG_05697 e CNAG_04086) de *C. neofomans*.



Fonte: Produção do autor.

Em seguida, foi realizado um alinhamento entre as sequências proteicas de *VelB* de *C.neofomans* e de outros fungos patogênicos para avaliar a similaridade entre as sequências (**Figura 10**).

Figura 10: Alinhamento múltiplo comparativo da sequência protéica de *VelB* com as de diferentes fungos patogênicos (% de identidade com a sequência de *C. neoformans*). F.g.= *Fusarium graminearum* (18%); F.o.= *Fusarium oryzae* (18%); M.o.= *Magnaporthe oryzae* (21%); B.c.= *Botrytis cinerea* (22%); A.f. = *Aspergillus fumigatus* (25%); A.n.= *Aspergillus nidulans* (22%); H.c.=*Histoplasma capsulatum* (25,7%); U.m.=*Ustilago maydis* (18%); L.b. = *Laccaria bicolor* (23%); C.n_JEC21= *Cryptococcus neoformans* JEC21 (85%); C.g. = *Cryptococcus gattii* (77%). Destacados encontram-se os dois domínios Velvet da proteína *VelB* de *C. neoformans* H99 sorotipo A.

```

F.g -----
F.o -----MNSAYHSPDMSQRIPGPAYSSSAPPPPIHTYQQHQHPPPLPPPSQ
M.o -----MNPGYSSSTASQPGHN-----
B.c -----
A.f -----
A.n -----
H.c -----
U.m -----MSRSDTDGRDTSFASRNGVGGSQLSEPPSQRRERPDIYGYAVEET
L.b -----MIQHTNARQSSVAIAPLRQLVSDSPEQWGYWLGKHK
C.n H99 MFPSTGKDLMLLETACPTSPLPTKKRKRMDQTSSHLLPTNHELVDMPNMAKGTGRE GWT
C.n JEC21 MFPSTGKDSMLMEIAGPTSPLSTKKRKRMDQTSSHPLPTN--HEVDMFDMASRTGREGWT
C.g -----MLAETAYTTPALSTKKRKRMDQTSSHPLPTN-----HELSGWT

```

```

F.g -----
F.o -----HHSSHPPPLPPPSAPHPHQHPPPPPPSHSLSSHQHSQPPHHQSQQLPPYAPAPYQQPQ
M.o -----PSALPHDVHHALPAIGHPGSYHASMPQLPSIPPSMPPHYSDQYGMMP
B.c -----MNTTAYASPPRDMHPRSTMPSLHDTTYRSGPPHQGAPYSMPQTMASQHSTIS
A.f -----MYAVEERSHPVPPPPPLSMDRIPPPS
A.n -----MYAVEDRAHSG-HHPPPLSMDRIPPPS
H.c -----MYTLKQDRPHPVPPPPPLTMDHLQHG
U.m -----HRPHTAQERFPDSHGQRSAPDLYSRDSRFSYHRGDTLTPAQERSYQRELELMKARQE
L.b -----YSLEVQHPPLRARMCGFGDKRRRLAPAAVAKMVRRDDNSIVDVDDMCSFFLVTVDLW
C.n H99 YHLEILQEPLRARACGFGNKDRRPLTPPPIIRLWIQDALGNQVDPNIVDSNAIILQVDLC
C.n JEC21 YHLEILQEPLRARACGFGNKDRRPLTPPPIIRLWIQDALGNQVDPNIVDSNTIILQVDLC
C.g -----YHLEILQEPLRARACGFGNKDRRPLTPPPIIRLWIRDALGNQVDPNTVDSNTLVLQIDL

```

```

F.g -----
F.o -----PSQYPRPHPHQQHAPSQHDPEPPPPPPFSGPSPTDHQKDSEYVPPSY-----
M.o -----QPQDQAPASSTTEGGAETKPSADAVARTQKKLQPHVG-----
B.c -----AYEQYNNSLPVSRRPPPEHLPSSEAVSSFSIGLPGQEPS-----
A.f -----SAYPTPGSAGPMRS---ADHLAPVS-----
A.n -----TMYPSSAGPSAMVSPAGQPEPELS-----
H.c -----STN-----TPVTLPGIPEAARSVS-----
U.m -----RSYGGASASRSRPLEADHHYGGMPLTRGLVDDFAPEPMASGRPNLE-----
L.b -----SEDGKHETNLVLPSSVDRHIPHSSTKSRRRGTSSSAPQSRAPANQT-----
C.n H99 SADGLEGRNVVRHPVGPNGVPAVSVLDENVRSGLDPSALPSTPAAVSEQPYSDPSMDHY
C.n JEC21 SADGHEGRNVVRHPVGPVPAVSVSENVRSGHVDPSTLPTTSTAVSEQPYRNSMDYS
C.g -----SADGHEGRNVVRHPAGPNAVAVSMGENARPGHVDSSTLPPPIATAVTDQPYEDTSTDHS

```

```

F.g -----
F.o -----SKIEEGSGWKYSLDVKQPVRRARMCGFGDKDRRPIPTPPPCVRLVIINTETG
M.o -----EQDGRKYRLDVVQQPKRARMCGFGDKDRRPIPTPPPCIRLIVTDAVTG
B.c -----RSITVDGRKYTLEVQQPKRARMCGFGDKDRRPIPTPPPCVKLSITEIATG
A.f -----TIHEGRIWSLQVVQQPIRARMCGFGDKDRRPIPTPPPCIRLIVRDAQTE
A.n -----TVHDGRIWSLQVVQQPIRARMCGFGDKDRRPIPTPPPCIRLIVKDAQTTQ
H.c -----TVYEGRIYSLDVVQQPIRARMCGFGDKDRRPLTPPPCIRLIVRDATTQ
U.m -----GFSRVENGRYRLVVVQHPSRARMCGFGDKDRRPLSPTLIVKLIITEEATG
L.b -----PSGGSTPTLSQHRPGEQRPLPHPHASGYNNQGYVTPHAPQVNDALGFPPS
C.n H99 SWSKHYSDDSDRTTPGWTYQDTFASSPRIAGTHPSIARRVRTPTRPSTAPSLRPPAWSV
C.n JEC21 SWPEQYSSSDSDRTTPGWTYQDAFVSSPRIAGTRPPMARRVRTPTRPSTAPSLRPPAWSV
C.g -----SWSKQYALGSSDSDRTTPGWTYQDNFASSSHVAGTRPLIARQVRTPTRPSTAPSSRPPAWSL

```

```

F.g -----
F.o KEVDYNLSDHAMFVLSVDLWNHDGTKEVNLVRSSTGTGAMASSSTYTYSSLEP-----
M.o KEIDCNEIEHTMYVLNVDLWSEDAQQEVNLVRHTSATPSISSTTPASFAQIDS-----
B.c KEVDVNNIEHGMFVLNVDLWSADGERFVNLVRHSQTSPSISATVPVSYTQIQGGAAAYSS
A.f KEIDINEIDTSFYVLTVDLWNADGTSEVNLVKHSATSPSISAMSSSYP-----
A.n KEVDINSLDSSFYVVMADLWNADGTHEVNLVKHSATSPSISAMSSSYP-----
H.c KEIDINEIDTSFYVLTVDLWNAEGTSEVNLVRHSATSPSISATSSAYP-----
U.m EEISPCVNTSLFLLATDLCHPDDLMLAPRNILVHHHASSLSSNPIQHG-----
L.b TPYGPTQADSSWGYPPPPGDRSTSFPHPTLPSIHTLGRSPSSSTSDHWNSEP---EPQSL
C.n H99 DVSQRPLYDEALPPI S A LAEDIRDP SGRSSFDPHNSMQRPTSSSSLSRSPHTSYSTDLS
C.n JEC21 DVSQRPLYEEALPPI S A LAENIRDP SGRPWFPDPHINTQRPTSSSSLSRSPHTSHSTDLS
C.g DVSRRPLNEEVL PPI S A LAEDLRHSSGHSWFPDPHNDMQRPTSSSSLSRSPHTSHSTDLS

```

```

F.g -----
F.o GTPSYQQQLPPSRESGYQSQGLN-----YGDYPPPVQQSYGQAP---SYPP
M.o TPPAFAQIPGTNREMPSYPQSQAYAPSVTPFAQQGGYGGQAI SPVGPHYGMVANTYGGQG
B.c LLPGQSQRPTSPTYGSAPPFQAGFSFPFGPPQVSAYSQQQPGQQSGYGGNPNYPPNG
A.f -PPPQNLSPYPAFTQN-----PYGQPVGYPPQMN
A.n -PPHPTSSDY PASYQTNPYG-----QPVGQPVGQPVGYAGVGN
H.c -PPANIMFPQYAQTHGYPT-----AYPPYGGQPGYNPHAGY
U.m GAGGYATDEFGRHSGLG-----NFAADGGGPDGDGY
L.b PYGAWNTDAPYHPSISSYSNSQVDP-----SVRNHSNSEGIENPGWSS
C.n H99 TAPTDFSGRPTTSSSTASWHLSADSEYKGFALESQAAERSKPGHRPKSNDKVPMLSAE
C.n JEC21 TAPTDFSGRPTTSSSTGSHWLSADSEYKGFALENQAAEGSKPGGAKSNDPNVPISSAE
C.g TAPTDFSGRPTTSSSTSWHLPLNSEYKGYGSQAAEDSETDPGGGP--DDSKVPTSSAE

```

```

F.g -----M-----AV
F.o SSSYGPPQQYYPRHSGYSAEPSAPPPGAPFRNGYGQDQNALTRM-----AV
M.o GYTYASPTDMHPHQLGSLVGPYGPRI FN-GAPDMGMHQRMALQG-----TH
B.c YQVAPQQSNYYYPQPSQSI SHNQDPYPSRPFPTQDLGIGRIP-----IS
A.f YYGGNAQLAYQYG-TNPQASYPYYPYAGQMPPAG---MSPAQ-----QP
A.n YYGGSTQLQYQNAYPNPQAQQYQPMYGGMAQP-----QMPAA-----PH
H.c QYPQGGPDYYPGLPAASTYPPGTPPTQALGP-----QSALG-----QP
U.m RSSTHPQHASESTGAAALPLSSSSMNPYDRSPHASSSIQFGGGG-----NF
L.b SEATSPHSQADHAAYESSYHHSAYHPAPTHSQMAPGTCSQHV-----ST
C.n H99 TQTTSPGSLPASFSDFRFTLHDSQPLPHSYHNCHYRSNVA SVKDWDLSLHI PDL DTMKETR
C.n JEC21 TQATSPEFSLPGSFTDRFTQNDSPRVYPYSYHNHSHYRSVDVAPGKERDSFHSPDLDTMKETR
C.g TQTS-PRPFLPGYFTERFSLYDSPRLPNSYHNPHYPPNVALIKDWDLSLHSPDLNTKKEIP

```

```

F.g VGTQPQGMFTRNLIGSLAASAFRLNDTDKKAGIWFVLQDLSVRTEGTFRLRFSFVNVGGA
F.o VGGQPQGMFTRNLIGSLAASAFRLDTEGQSGIWFVLQDLSVRTEGTFRLRFSFVNVRGP
M.o QGAPPQGMFTRNLIGSLASAFRLNDPQEKIGIWFVLQDLSVRTEGTFRLRFSFVNVRGP
B.c QTNPQGMFTRNLIGSLASAFRLTDPDDRIGIWFVLQDLSVRTEGDFRLRFSFVNVRGP
A.f VPAGPGGMFTRNLIGSLASAFRLTDPDNKIGVWFILQDLSVRTEGTFRLKMSFVNVRGTQ
A.n VTPGPGGMFTRNLIGSLASAFRLYDTEDKIGVWFVLQDLSVRTEGTFRLKFSFVNVRGTQ
H.c ISSASTGMFTRNLIGSLASAFRLTDPDDKIGVWFVLQDLSVRTEGTFRLKMNFSVNVRGTQ
U.m AQQSQAESYTRNLVGA AVASAVLKDQDKWCTFFVFQDISVRTEGVYRIKLMFVNVRLEVS
L.b VPPP RHTYTRTLVGPLSANACRLLEDEHRKPGIFFLQDLSVRTEGTFRLRMLMNVGAP
C.n H99 YVAPASAASTLVLVGKRHTPCNKLKDEHGRLGLFFFATDLGVRTEGRFCLRMKIMDLSLF
C.n JEC21 CFAPASVASTLVLVGKRHTPCNKLKDEHGRLGLFFFATDLGVRTEGRFCLRMKIMDLSLF
C.g CIAPASAASTLVLVGKRHTPCNKLKDEHGRLGLFFFATDLGVRTEGRFCLRMKIMDLSLF
      *  * : * . * * . : : * . * : . * * * * * : : : : :

```

```

F.g GGG-----LPIHVNQGRAPILASCYSQDFSVYSAKKFPGVCESTPLSKTFALQGIK
F.o GG-----QGTNVNQGRAPILSSCYSESFHVYSAKKFPGVCESTPLSKKFANQGIK
M.o TRTPNGGP--ANQTSILNTGKAPILASCFSDAFQVYSAKKFPGVCESTPLSKCFAGQGIK
B.c SAPQNN---ANSSCSVNTGKAPVLASCFSFVFKVYSAKKFPGVVESTPLSKCFATQGIK
A.f SGDSTNN-----TPVINHGSA PVLASVFSEPFQVFSAKKFPGVIESTPLSKCFALQGIK
A.n VSDLPQSD---IAEVINKGTAPILASTFSEPFQVFSAKKFPGVIESTPLSKVFANQGIK
H.c SQAQDQSPGGTPSSPVINVGSA PVLASVFSEPFQVYSAKKFPGVIESTPLSKCFAFQGIK
U.m GR-----VGTGVADALAEYTD AFTVYSPRRFPGM LDP TPLSRKLASQGIK
L.b PAPEVG-----AARVHNDVSPVLAQTFTEQFTVYSAKRFPGV PDTALSIALGNQGIK
C.n H99 SRAPNPGD-----STPVLAE TTSQPIEVYSAKRFPGVIP TTKLTRLFAAQGIK
C.n JEC21 LRPPNPGD-----STPILAETISQPIEVYSAKRFPGVIP TTKLTRLFAAQGIK
C.g LRAPNPGD-----SVPI LAETVSQPIEVYSAKRFPGVIP TTKLTRLFAAQGIK
      * : . : : * : . : * * : . * * *

```

```

F.g      IPIRKDTNIK-----GEGDEEMMYDQN-----
F.o      IPIRKDANIK-----GEGDEEMMYDQN-----
M.o      IPIRKAEGGG-----KNNDDDDDY-----
B.c      IPIRKDGKDGPGKGGKDGSRGDDDDDDY-----
A.f      IPIRKDGVKGPGRGGDGGDDADDYE-----
A.n      IPIRKDGVKGGQSRGRHSDEDDGLDNEY-----
H.c      IPIRKDGVKGPGRGGQSHGSKGQDGEEDWENEG--
U.m      IPVRNDKKKQRRRNDEGGDGMGDYDGASGGDEDEDE
L.b      LPLASDGLSEALVEESSRVQQASETQWFRV-----
C.n H99  LAVRESHKQKHRNKESVDMQVQDEIEEDEDGQ---
C.n JEC21 LAVRESHKQKHRNKENVDMQVQDEIEEDEDGQ---
C.g      LAVRESHKQKYNKESLDMQVQDGI DEDEDGQ---
: : : .

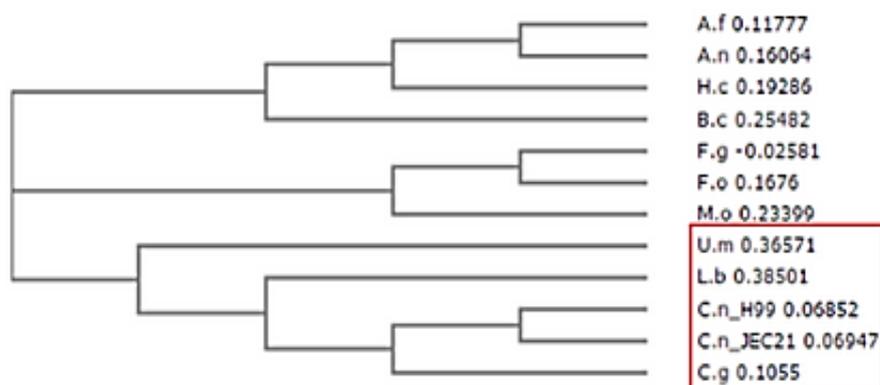
```

Fonte: Produzido pelo autor.

O alinhamento múltiplo das sequências proteicas de diferentes fungos revelou uma alta conservação na região C-terminal (segundo domínio *velvet*), no entanto ressalta-se que em todas as sequências foram encontrados os dois domínios *VELVET*, característico desta família. Vale ressaltar que os genes que codificam tais proteínas não são identificados no genoma humano, sendo exclusivos de fungos.

A partir dos dados obtidos no alinhamento de sequências gerou-se um cladograma que mostrou maior conservação das proteínas *Velvets* de *C. neoformans* com outros membros de basidiomicetos como *C. gatii* e *Ustilago maydis*, quando comparados aos demais fungos, ascomicetos. Em geral a maioria das proteínas *Velvet* é conservada principalmente em basidiomicetos e ascomicetos (Bayram e Braus, 2011; Karakkat *et al.*, 2013). O cladograma está descrito na **Figura 11**.

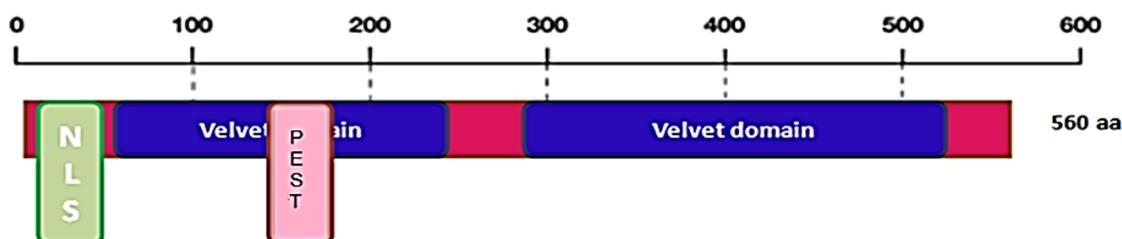
Figura 11: Cladograma da proteína *VelB* em diversos outros fungos, ascomicetos e basidiomicetos (em vermelho) que demonstra alta conservação dentre elas.



Fonte: Produzido pelo autor.

Como uma segunda análise, foram buscadas na sequência de *C. neoformans*, características e domínios previamente identificados por Bayram e Braus, 2012 nas sequências protéicas de *A. nidulans*. Utilizando-se o software Pfam foi possível identificar a presença do domínio Velvet na sequência testada. O sinal de localização nuclear (NLS) foi identificado através do software NLS Predictor na sequência testada. A **Figura 12** mostra os domínios da proteína *VelB* em *C. neoformans*.

Figura 12: Predição estrutural da proteína *VelB* de *C. neoformans*. NLS = sinal de localização nuclear bipartido; PEST = região rica em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina. O domínio NLS está localizado na posição 20 do gene e o domínio PEST, entre os aminoácidos 154 e 179.



Fonte: Produzida pelo autor.

Foram realizadas predições com *softwares* específicos fornecendo informações sobre a presença de domínio PEST, localizado entre os aminoácidos 154 e 179. Diferentemente do encontrado em *A. nidulans*, onde não foi descoberto nenhum domínio, nem NLS nem NES, em *C. neoformans* foi encontrado NLS (Sinal de Localização Nuclear), localizado na posição 20 e o PEST, já citado. Em *A. nidulans*, *VelB* precisa de *VeA* para que ocorra uma importação nuclear eficiente (Bayram *et al.*, 2008). Surpreendentemente, *VelB* em *A. nidulans*, é o único membro da família que carrega dois domínios *Velvet* localizados nas porções N e C terminal. Homólogos de *VelB* de outros membros ascomicetos e basidiomicetos também incluem dois domínios *Velvet*, o que sugere um ancestral comum de *VelB* antes da separação dos dois grupos durante o processo de evolução. Isso pode ter acontecido após algum rearranjo do genoma, resultando em uma recombinação de dois genes do domínio *Velvet* ancestral ou talvez uma duplicação de éxon correspondente dentro de um gene original com um único domínio *Velvet* (Bayram e Braus,

2011). Como nos demais fungos, observa-se que em *C. neoformans* a presença de dois domínios *vel/vets* também foi identificada.

3.2. Avaliação da função gênica de *VELB* por meio de deleção gênica em *C. neoformans*

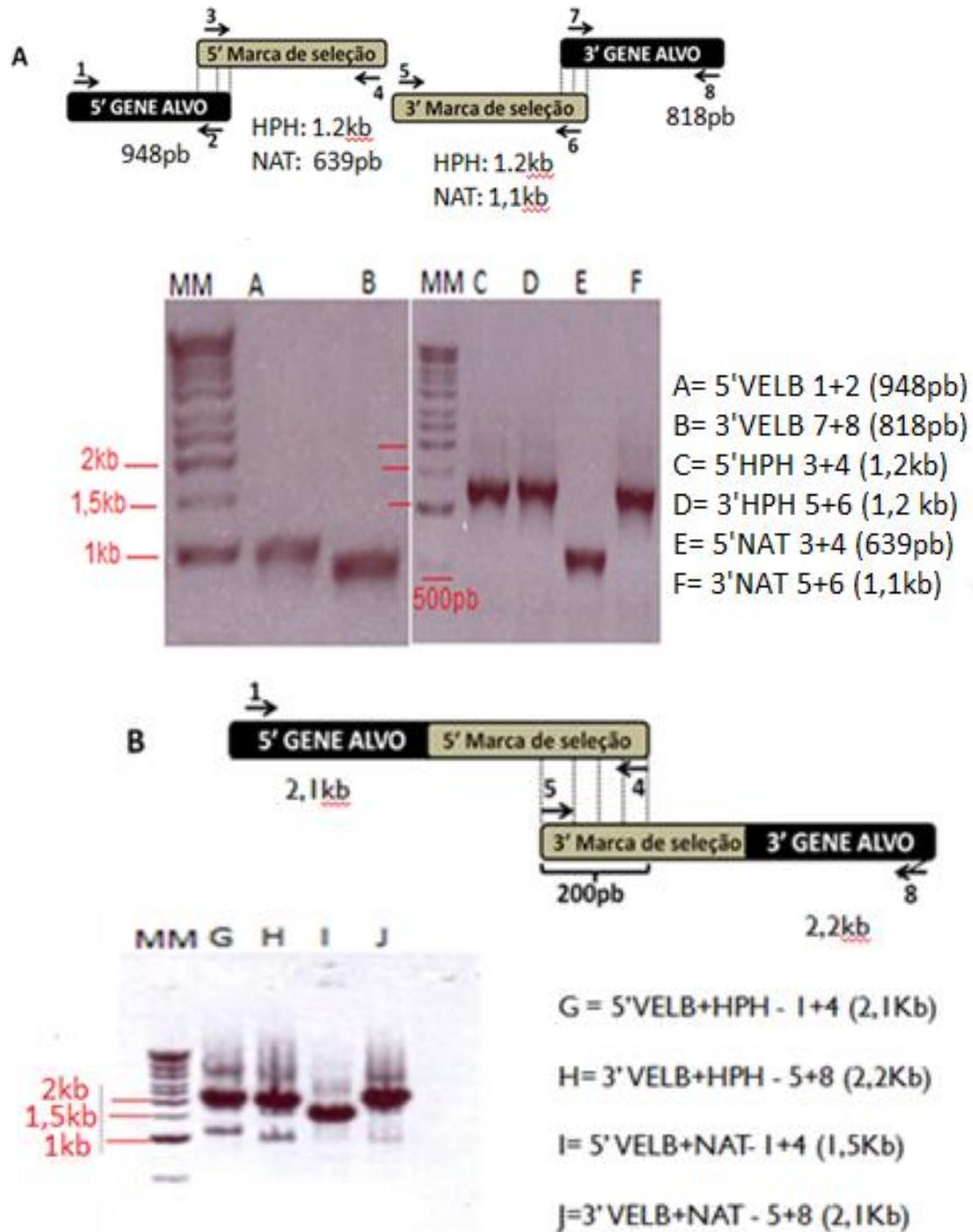
3.2.1. Obtenção dos mutantes *velB*

Como explicado na seção de materiais e métodos para que a construção do cassete de deleção fosse possível, foram realizadas duas etapas da reação de PCR (**Figura 13a**). Para a primeira etapa, foi realizada a amplificação dos fragmentos 1 + 2, que corresponde à região flanqueadora 5' de *VELB*, e 7 + 8, que correspondem à região flanqueadora 3' de *VELB*. Os fragmentos 3 + 4 que correspondem à região 5' do marcador seletivo HPH ou NAT e 5 + 6 que corresponde à região 3' de HPH ou NAT também foram amplificados. Os tamanhos esperados foram: 1 + 2: 948 pb; 7 + 8: 818 pb, 3 + 4 hph: 1235 pb; 5 + 6 hph: 1295 pb; 3 + 4 nat: 639 pb; 5 + 6 nat: 1333 pb.

Para a segunda etapa, cujo objetivo foi fundir os fragmentos 1 + 2 com 3 + 4 e 5 + 6 com 7 + 8 em duas reações de amplificação (**Figura 13b**) distintas, foi feita uma PCR de sobreposição para obtenção dos fragmentos 1 + 4 (1 + 4 – equivalente a região flanqueadora 5' de *VELB* fusionada à região 5' do marcador seletivo) e 5 + 8 (5 + 8 – equivalente à região flanqueadora 3' de *VELB* fusionada à região 3' do marcador seletivo). Para o fragmento 1 + 4 fundido com HPH, o tamanho esperado foi de 2,2 Kb. Para o fragmento 5 + 8 fundido com HPH, o tamanho esperado foi de 2,1 Kb. Em contrapartida, para o fragmento 1 + 4 fundido com NAT, o tamanho esperado foi de 1,6 Kb e para o fragmento 5 + 8 fundido com NAT, o tamanho esperado foi de 2,2 Kb.

Figura 13: Construção do cassete de deleção *VELB::HPH* e *VELB::NAT* através de PCR *Double Joint*. **A)** Primeira etapa do PCR *Double Joint*. Os fragmentos representam: **A)** 1+2 *VELB* – região 5' *VELB* (948pb), **B)** 7+8 *VELB* – região 3' *VELB* (818pb), **C)** 3+4 HPH (1235pb), **D)** 5+6 HPH (1295pb), **E)** 3+4 NAT (639pb) e **F)** 5+6 NAT (1333pb) e **B)** Gel confirmatório dos produtos obtidos na segunda etapa do PCR DJ. As bandas G e H representam a fusão 5' *VELB*+HPH - 1+4 (2,1Kb) e 3' *VELB*+HPH - 5+8 (2,2Kb), respectivamente, enquanto que as

bandas I e J representam a fusão 5' *VELB*+*NAT*- 1+4 (1,5Kb) e 3' *VELB*+*NAT* - 5+8 (2,1Kb), respectivamente . Foi utilizado o marcador molecular DNA Ladder Plus 1Kb (Fermentas).



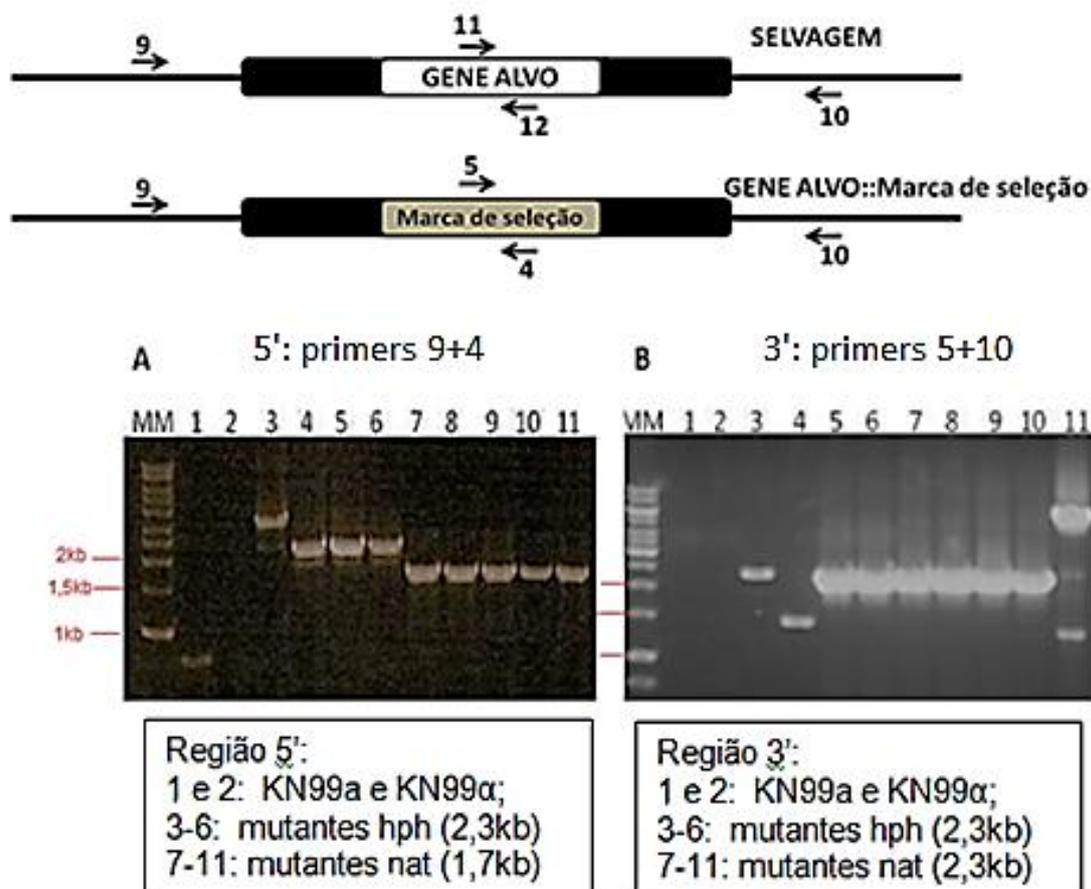
Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Após a transformação por biobalística, os transformantes que cresceram em meio YPD acrescido com a droga de sua respectiva marca de seleção, foram escolhidos aleatoriamente e seu DNA foi extraído conforme o protocolo descrito anteriormente. Tais mutantes foram inoculados em meio YPD líquido

para extração de DNA genômico e posterior confirmação dos mutantes por PCR. Confirmou-se a deleção de *VELB* por PCR comum. Para a confirmação dos possíveis mutantes por PCR foram desenhados iniciadores que se anelam fora do locus do gene *VELB* (LF189 e LF190) a fim de confirmar se a marca de seleção substituiu a ORF do gene *VELB*. Foi amplificado somente a região 5' do locus com os iniciadores LF189 e 4. NSL_HPH (2,3 Kb), para os mutantes *VELB::HPH*. Para os mutantes *VELB::NAT*, foram utilizados os iniciadores LF189 e 4. NSL_NAT (1,7Kb) (**Figura 14a**). Somente foi feita a amplificação da região 3' dos mutantes que confirmaram a 5'. Após a amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para a confirmação da região 3' de *VELB* dos possíveis mutantes *VELB::HPH*, foram utilizados os primers 5. NSR_HPH e LF190 (2,3 kb) e para os possíveis mutantes *VELB::NAT* foram utilizados os iniciadores 5. NSR_NAT e LF190 (2,3 Kb). Após a amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, observou-se a confirmação dos 16 mutantes que confirmaram a região 5' de *VELB* (**Figura 14b**). Ao todo, foram confirmados 8 mutantes do tipo sexual α : (**2.12. *velBa* Δ** , **2.26. *velBa* Δ** ; **1.13. *velBa* Δ** ; **1.26. *velBa* Δ** ; **1.37. *velBa* Δ** ; **1.46. *velBa* Δ** ; **2.02. *velBa* Δ** ; **2.20 *velBa* Δ**) e 11 mutantes do tipo sexual **a**: **1.01. *velBa* Δ** ; **1.09. *velBa* Δ** ; **1. 15. *velBa* Δ** ; **1.30. *velBa* Δ** ; **2.24. *velBa* Δ** ; **1.22. *velBa* Δ** ; **2.01. *velBa* Δ** ; **2.04. *velBa* Δ** ; **2.08. *velBa* Δ** ; **2.17. *velBa* Δ** ; **2. 37. *velBa* Δ**) dos quais são necessários um mutante de cada marca de seleção confirmados por Southern Blot para que os ensaios fenotípicos se iniciem.

Figura 14: PCR confirmatório da deleção do gene *VELB* em *C. neoformans*, amplificação região 5' de *VELB*. **A.** Eletroforese em gel de agarose referente à análise das regiões 5' de *VELB* e HPH – tipo sexual α e 5' de *VELB* e NAT – tipo sexual **a**. MM. Marcador; 1. KN99a; 2. KN99 α ; **3. 1.26.*velBa* Δ** ; **4. 1.44.*velBa* Δ** ; **5. 2.12.*velBa* Δ** ; **6. 2.07.*velBa* Δ** ; **7. 1.01.*velBa* Δ** ; **8. 1.09.*velBa* Δ** ; **9. 1.30.*velBa* Δ** ; **10. 2.24.*velBa* Δ** ; **11. 2.46.*velBa* Δ** . Em negrito os 08 mutantes positivos para a região 5' *VELB* (Gel representativo de todas as amostras analisadas). **B.** PCR confirmatório da deleção do gene *VELB* em *C. neoformans*, amplificação região 3' de *VELB*. Eletroforese em gel de agarose referente à análise das regiões 3' de *VELB* e HPH – tipo sexual α : M. Marcador; 1. Controle KN99a negativo; 2. Controle KN99 α negativo 3. KN99a (controle positivo com oligonucleotídeos que amplificam a ORF); 4. KN99 α (controle positivo com oligonucleotídeos que amplificam a ORF); **5. 2.12.*velBa* Δ** ; **6. 2.26.*velBa* Δ** e 3' de *VELB* e NAT – tipo sexual **A**: **7. 1.01.*velBa***; **8. 1.09.*velBa***; **9. 1.30.*velBa***; **10. 2.20.*velBa***; **11.**

2.46. *velBa*Δ. Em negrito os 06 mutantes positivos para a região 3' *VELB*. (Gel representativo de todas as amostras analisadas).

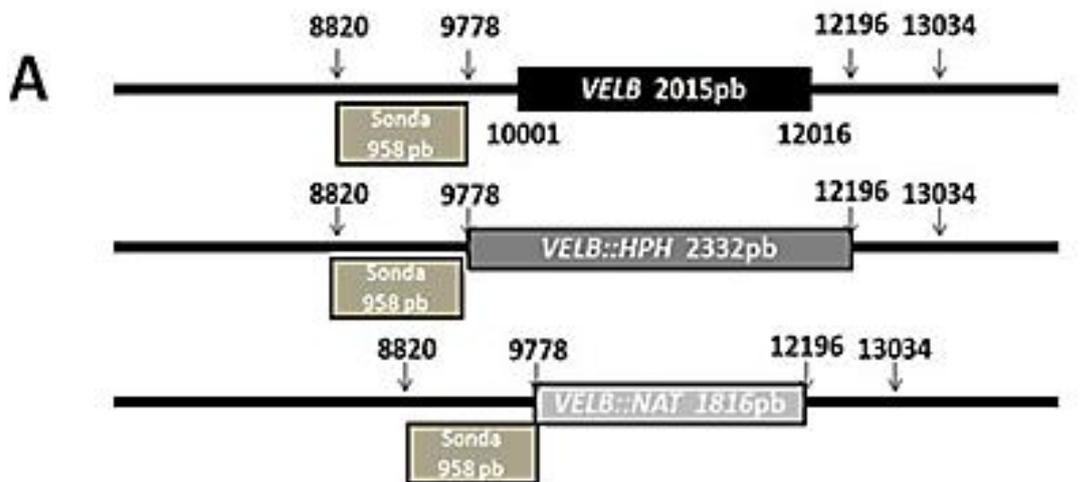


Fonte: Elaborado pelo autor.

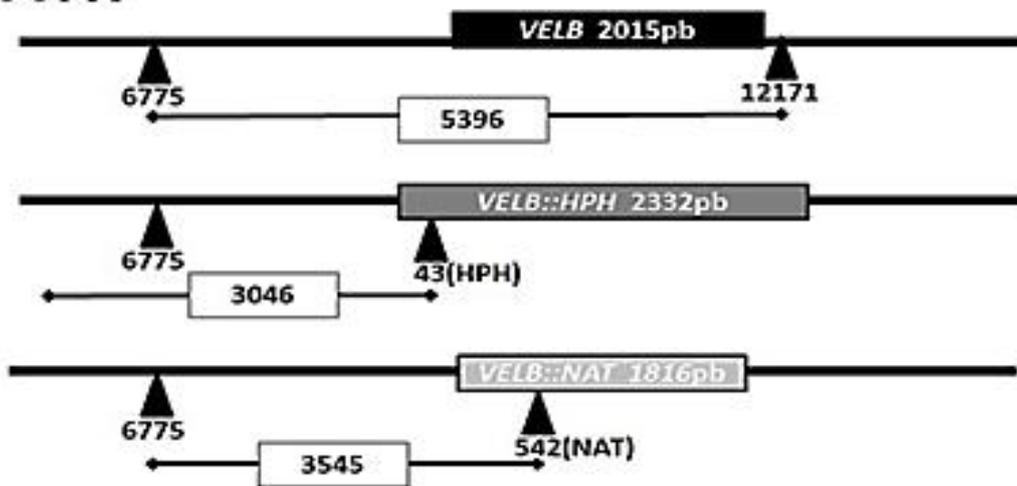
Após a PCR confirmatória, os mutantes foram submetidos ao Southern Blot e digestão das amostras com a enzima *EcoRV* foi realizada. O perfil de restrição está representado na **Figura 15a** e pode-se observar que dos mutantes com a marca NAT – **Figura 15b** - poços de 1 a 4, apenas o mutante 1.30. *velBa*Δ, localizado no poço 1, foi confirmado, observando-se o tamanho do fragmento esperado após a hibridização da sonda (3,5kb). Já os mutantes com a marca de seleção HPH – poços 8 a 14, pôde-se confirmar avaliando o tamanho do fragmento – 3Kb, que os mutantes 08. *velBa*Δ; 1.13. *velBa*Δ; 1.44. *velBa*Δ e 1.26. *velBa*Δ nos poços de 8, 9, 10 e 14 eram positivos para deleção de *VELB*. Diante deste resultado, os mutantes confirmados para deleção de *VELB*, com padrões confirmados são: 1.30. *velBa*Δ, 08. *velBa*Δ; 1.13. *velBa*Δ e 1.26. *velBa*Δ. Para os testes fenotípicos foram escolhidos os mutantes 1.30. *velBa*Δ e 13. *velBa*Δ.

Figura 15. Confirmação por *Southern Blot* da deleção de *VELB* nos mutantes confirmados por PCR – digestão com *EcoRV*. 10 µg de DNA total foram digeridos com a enzima *EcoRV* para os mutantes resistentes à Higromicina B e à Nourseotricina. Em seguida, o DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 %, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com a sonda de *VELB* (fragmento 5' de *VELB*)

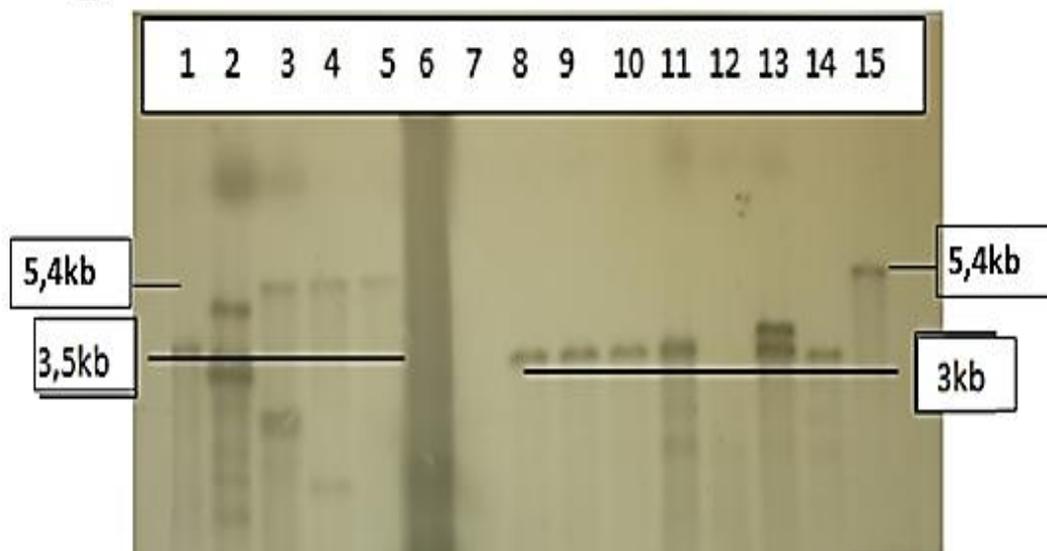
Perfil de restrição para *EcoRV* do locus de *VELB* com a marca de seleção NAT: selvagem, apresentará fragmentos de 5,3Kb e o mutante, fragmento de 3,5kb. **Perfil de restrição para *EcoRV* do locus de *VELB* com a marca de seleção HPH:** selvagem, apresentará fragmentos de 5,3kb e o mutante fragmentos de 3,0kb. A foto mostra o resultado do *Southern blot* após hibridização com sonda de *VELB* para os mutantes **1. 30. *velBa*Δ;** 2. 01. *velBa*Δ, 3. 24. *velBa*Δ, 4. 37. *velBa*Δ, 5. KN99a; 6. Sonda; 7. Marcador; **8. 08. *velBα*Δ; 9. 13. *velBα*Δ; 10. 44. *velBα*Δ;** 11. 46. *velBα*Δ; 12. 12. *velBα*Δ; 13. 20. *velBα*Δ; **14. 26. *velBα*Δ;** 15. KN99α. A sonda hibridiza a 948pb. Os mutantes confirmados estão destacados em negrito.



EcoRV



B

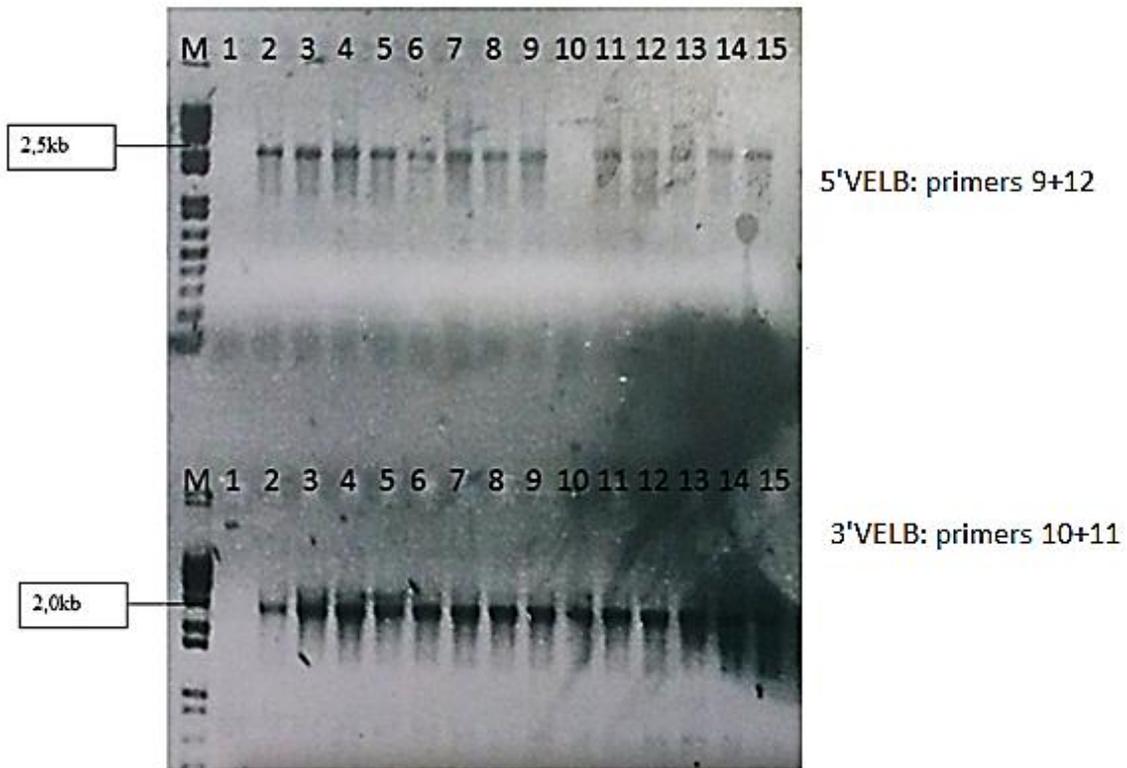


Fonte: Produzido pelo autor.

3.2.2. Obtenção de linhagens reconstituídas dos mutantes de *VELB*

Após o processo de deleção do gene, é necessário que seja realizada reconstituição do locus deletado.. Esse passo é relevante para validar os testes fenotípicos e 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 dos mutantes. Neste caso, foi introduzida no fungo: a sequência do gene de interesse (*VELB*) juntamente com um plasmídeo (pJAF), que contém a marca de resistência a neomicina através de uma co-transformação por biobalística. Os transformantes resistentes a Neomicina e que perderam a marca de HPH foram selecionados para análise molecular. Os PCRs confirmatórios foram realizados em 13 possíveis reconstituídos do tipo sexual MAT α , onde todos foram confirmados (**Figura 16**). Destes, 03 linhagens foram escolhidas para teste fenotípico de acasalamento e apenas uma apresentou a reconstituição de fato do fenótipo. Assim, a linhagem confirmada foi 02R.*vel/B α* Δ , pelo método de PCR e pela avaliação do fenótipo. Não foi realizado Southern blot para confirmação da reintegração no locus.

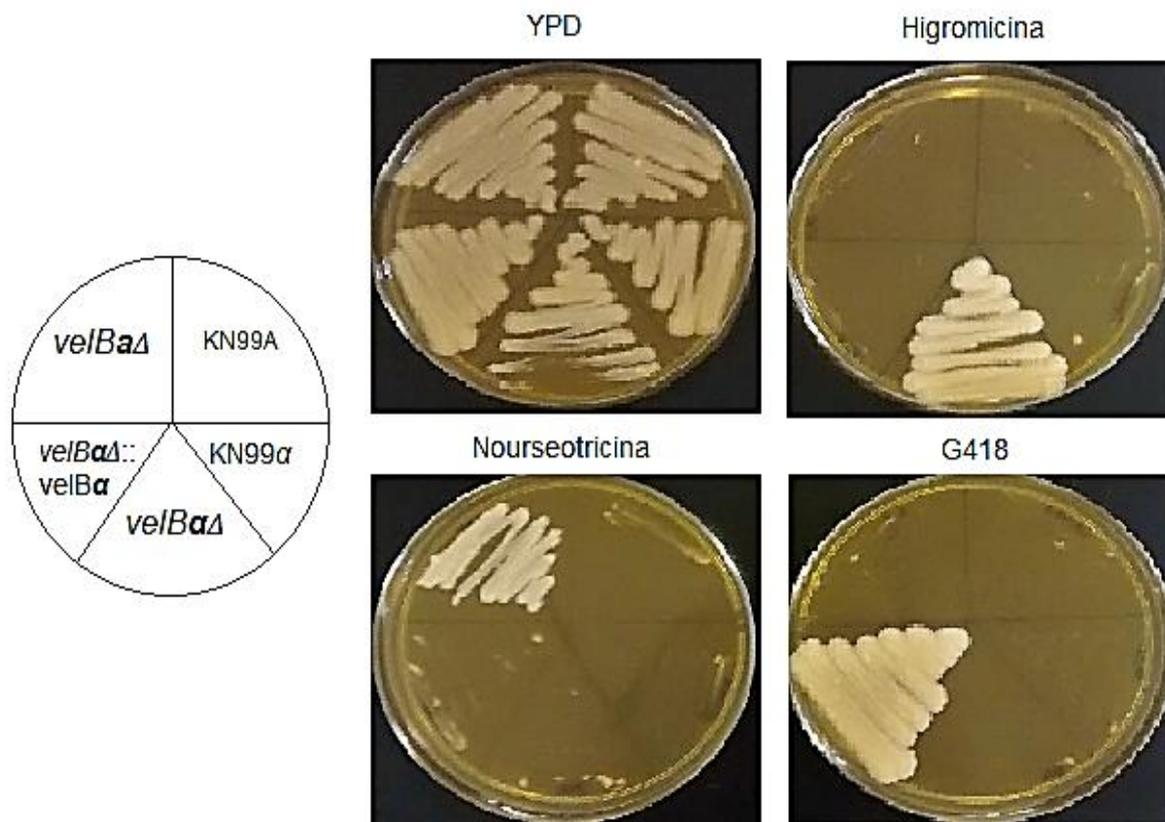
Figura 16: Confirmação da reconstituição do locus de *VELB* em *C. neoformans* por PCR. Eletroforese de gel de agarose 0,8% em TBE 0,5 X dos produtos de PCR obtidos por meio da amplificação das regiões 5' (Andar superior) e 3'(Andar inferior) do locus de *VELB* do tipo sexual α . M. marcador; 1. *vel/B α* Δ (controle negativo); 2. KN99 α (controle positivo); 3-15. Possíveis reconstituídos. No andar de cima estão os fragmentos referentes a região 5' (oligonucleotídeos LF189 + LF186) e abaixo os fragmentos da região 3' (LF190 + LF191), com tamanhos de 2,5 e 2,0kb, respectivamente.



Fonte: Produzido pelo autor.

A fim de demonstrar a estabilidade das marcas de seleção de cada cepa e comprovar que foram obtidos os reconstituídos de *VELB*, as cepas selvagem, mutante e reconstituída de cada tipo sexual, foram plaqueadas em meio YPD contendo a droga que corresponde à sua marca de seleção e incubadas a 30 °C por até 72 horas. A figura 17 mostra o resultado após o período de incubação.

Figura 17: Crescimento das cepas selvagem, mutante e reconstituída em YPD e em YPD acrescido com as respectivas drogas: Higromicina B (200 µg/mL), Nourseotricina (200 µg/mL) e Neomicina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 30°C por 48h.



Fonte: Produzido pelo autor.

3.2.3. Análise fenotípica *in vitro* dos mutantes *velB*

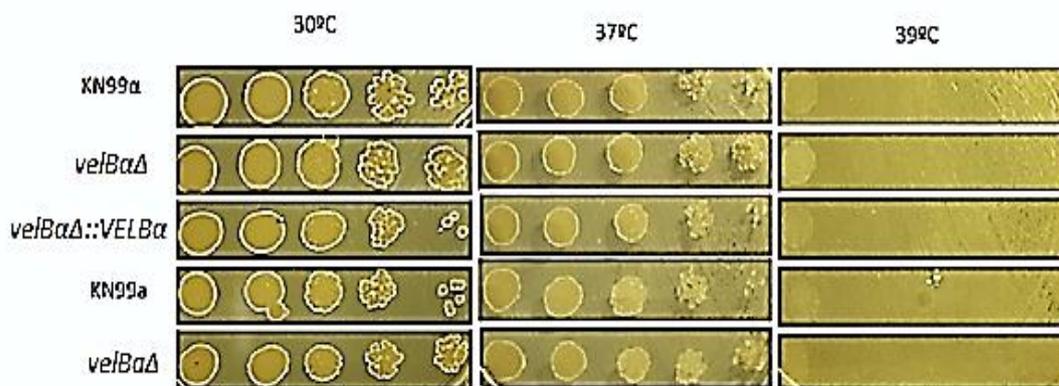
Os mutantes confirmados por PCR e *Southern Blot* foram submetidos aos principais testes fenotípicos e de virulência com a finalidade de elucidar o papel de *VELB* em *C. neoformans*. Foram avaliados quanto à capacidade de crescimento a altas temperaturas, capacidade de produzir cápsula, sintetizar melanina, fosfolipase e urease.

A. Capacidade de crescimento a 37°C e 39°C

A capacidade de crescimento a 37 °C é característica fundamental para garantir a sobrevivência de um patógeno durante a infecção em um hospedeiro, visto que essa é a temperatura corporal normal do hospedeiro. As cepas selvagem, mutante e reconstituído foram avaliadas quanto à sua

capacidade de crescimento a 30 e 37 °C. Foram testados também a uma temperatura mais alta (39°C), para checar sua viabilidade nestas temperaturas. A **Figura 18** mostra os resultados de crescimento das cepas.

Figura 18: Avaliação da capacidade de crescimento a altas temperaturas. Foram feitas diluições seriadas das cepas a serem analisadas e, em seguida, cada placa foi incubada a uma temperatura diferente. No primeiro teste, a 30°C, houve crescimento de todas as cepas, em igual proporção. A 37°C ocorreu uma pequena diminuição no crescimento, porém não houve diferença de crescimento entre a selvagens (KN99) e mutantes. A 39°C as cepas não conseguiram crescer, exceto na diluição de 10^7 .



Fonte: Produzido pelo autor.

Nenhuma alteração foi observada no padrão de crescimento ou no tempo de crescimento dos mutantes *velBaΔ* e *velBaΔ* em relação às cepas selvagens e reconstituída. Apesar da temperatura ótima de crescimento de *C. neoformans* ser 30 °C, a capacidade de crescimento a 37 °C é essencial para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro. Dessa forma, os mutantes *velBaΔ* e *velBaΔ* não possuem alteração de crescimento nesta temperatura. Até o momento, não foi reportada nenhuma evidência que a ausência de *VELB* em outros fungos possa afetar seu crescimento em altas temperaturas.

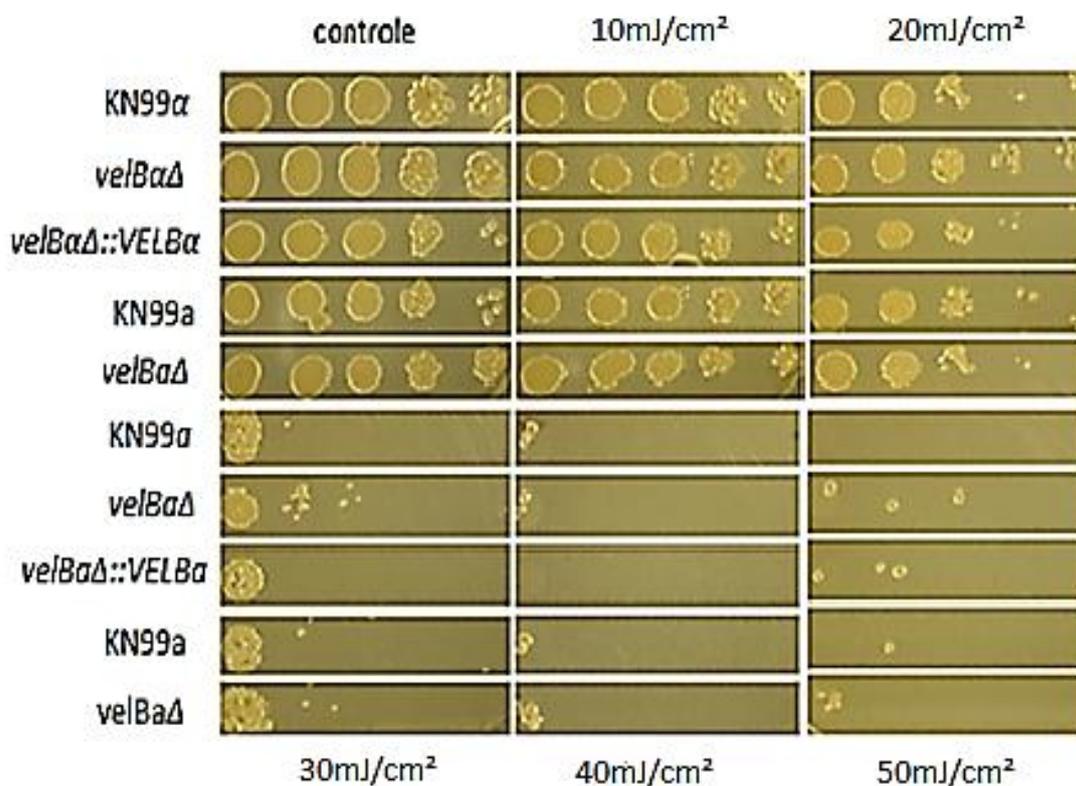
B. Resistência à luz Ultravioleta

Sabe-se que os fungos senseiam a luz ultravioleta através de fotorreceptores. Recentemente, Idnurm e Heitman, 2005, identificaram em *C. neoformans* genes que codificam dois fotorreceptores *BWC1* e *BWC2*, responsáveis pelo senseamento de luz. Os mutantes analisados além de

apresentarem defeitos no processo de acasalamento e na virulência demonstraram hipersensibilidade a luz ultravioleta. Posteriormente, Verna e Idnum, 2013, identificaram que o complexo BWC1/BWC2 regula UVE1, uma endonuclease responsável por responder ao estresse e danos causados pela luz UV para proteção do genoma mitocondrial.

Diante destes dados, decidiu-se por avaliar se os genes *Vel/vets* estão envolvidos nesta resposta à luz UV e se tem alguma relação com estes fotorreceptores. Dessa forma, avaliou-se então a capacidade de desenvolvimento das cepas (selvagem, mutante e reconstituído) após exposição a diferentes doses de radiação ultravioleta (10 a 50 mJ/cm²) (**Figura 19**).

Figura 19: Teste de avaliação da capacidade de crescimento após exposição a diferentes doses de radiação UV, comparando-a com a placa controle que não recebeu nenhuma radiação. Analisou-se as cepas selvagens (*KN99 α* e *KN99a*), mutantes (*velBa Δ* e *velBa Δ*) e reconstituída (*velBa Δ ::VELBa*) de *C.neoformans*. As placas foram incubadas por um período de 48-72°C em estufa a 30°C.



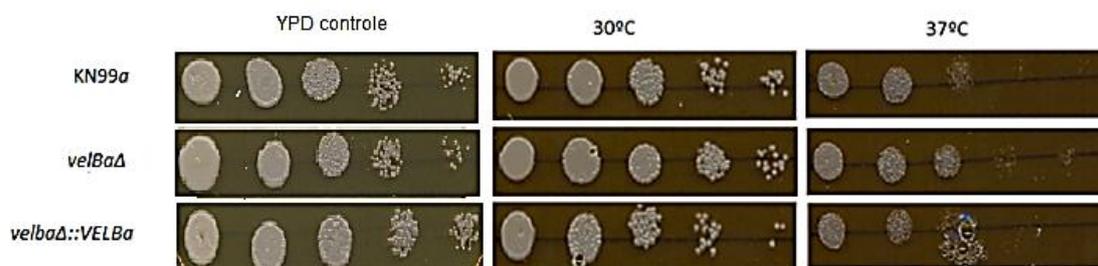
Fonte: Produção do autor.

Nota-se a partir da figura acima, uma relevante diminuição de crescimento em todas as linhagens analisadas à medida que a radiação é aumentada (a partir de $30\text{mJ}/\text{cm}^2$ a diferença é ainda mais perceptível). Porém, não se notou diferença entre as linhagens selvagem (*KN99 α* e *KN99 α*), mutantes (*velB Δ α* e *velB Δ α*) e reconstituído (*VelB α Δ ::VELB α*). Assim, estes resultados sugerem que *VELB* não participa do sensoriamento de luz UV através do complexo protéico BWC.

C. Estresse osmótico

O efeito do estresse osmótico sobre as linhagens selvagens e mutantes foi avaliado com auxílio do estressor NaCl em altas concentrações (1,5M). A incubação das linhagens na presença deste estressor osmótico não evidenciou qualquer defeito de crescimento que pudesse ser atribuído ao gene *VELB* estar relacionado à alteração da permeabilidade da membrana plasmática, em relação às linhagens selvagem, mutante e reconstituído.

Figura 20: Teste de sensibilidade ao estresse osmótico. Análise de sensibilidade a cloreto de sódio 1,5 M das cepas selvagem (*KN99 α*), mutante (*velB α Δ*) e reconstituída (*velB α Δ ::VELB α*) de *C. neoformans* a 30 e 37 °C incubadas por um período de 48-72 h.



Fonte: Produzido pelo autor.

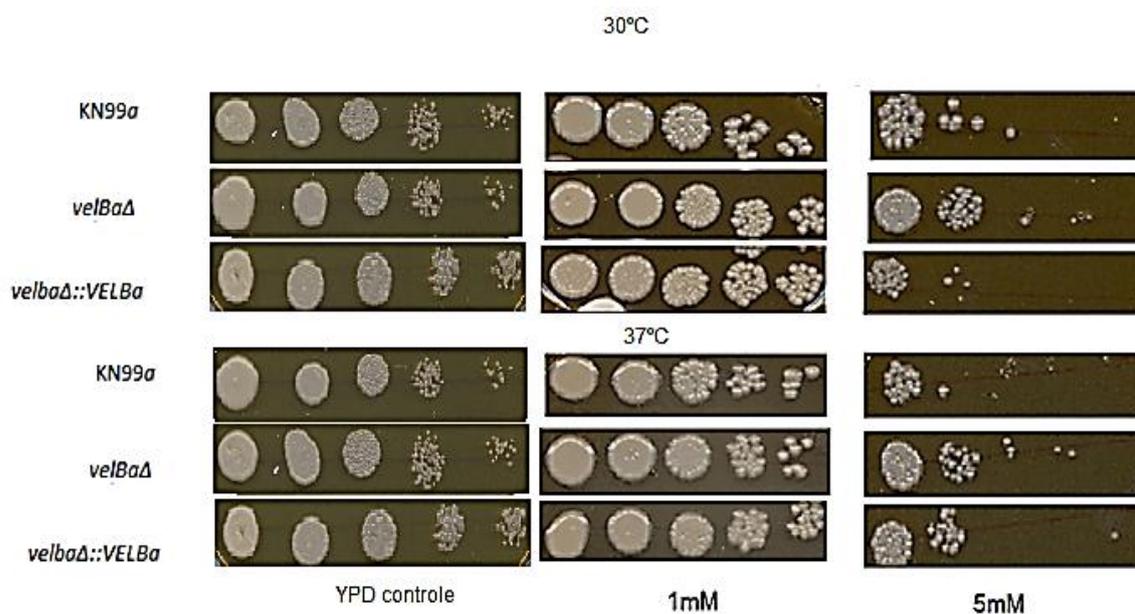
Não houve alteração de crescimento das colônias mutantes com relação às linhagens selvagem e reconstituída, indicando que não houve qualquer desestabilização da fluidez e permeabilidade da membrana celular por influência do sal utilizado. A perda da tolerância ao estresse osmótico está relacionada principalmente a alterações em componentes da membrana como manitol e ergosterol. Chatuverdi *et al.*, 1996 comprovaram que mutantes de *C.*

neofomans que possuem uma produção reduzida de manitol (*Cnm1p*) não resistem à incubação em altas concentrações de NaCl.

D. Estresse oxidativo

Avaliou-se o efeito do estresse oxidativo sobre as linhagens selvagem, mutante e reconstituído com auxílio do peróxido de hidrogênio em duas 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 ao selvagem e reconstituído. 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 *velBΔ* de *C. neoformans*, descartando, assim, qualquer participação do gene *VELB* na manutenção da integridade celular em condições de estresse oxidativo.

Figura 21: Teste de sensibilidade ao estresse oxidativo através da análise de sensibilidade a peróxido de hidrogênio em duas concentrações (1mM e 5mM). Avaliou-se o crescimento das cepas selvagem (*KN99α*), mutante (*velBαΔ*) e reconstituída (*velBαΔ::VELBα*) de *C. neoformans* a 30 °C e 37 °C incubadas por um período de 48-72 h.

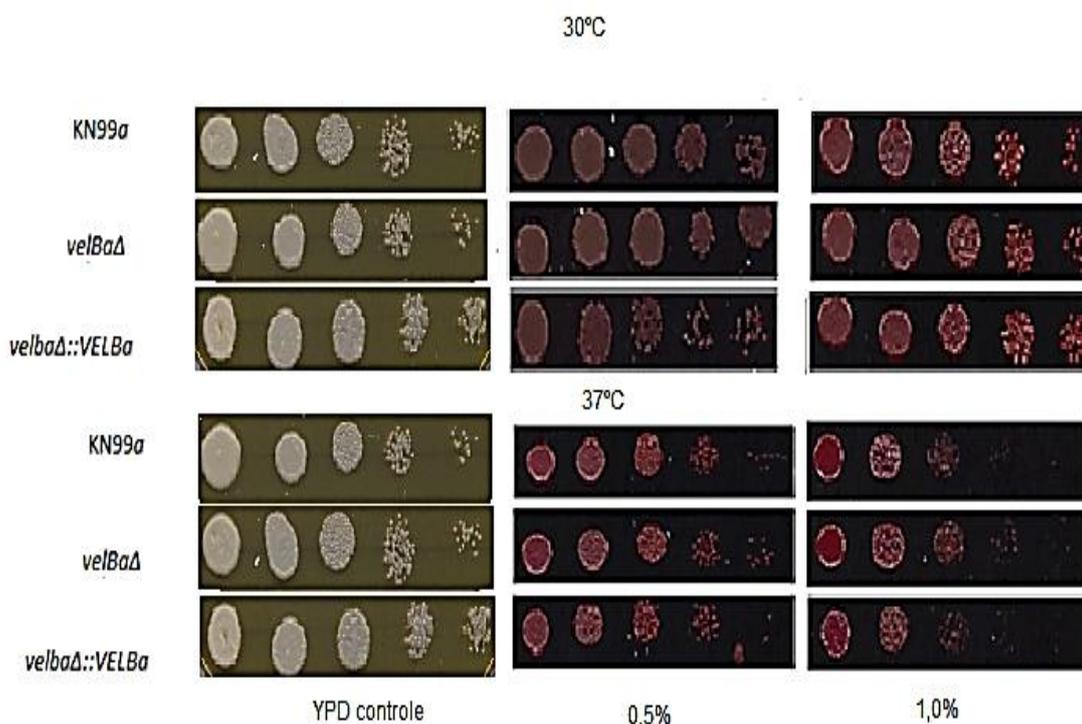


Fonte: Produzido pelo autor.

E. Avaliação da Integridade da parede celular

Foram utilizados meios indicadores de defeitos na estrutura da parede celular para a análise das cepas selvagem, reconstituída e mutante. Os seguintes estressores foram testados: Congo Red a duas concentrações (0,5 e 1,0%), SDS e cafeína. Avaliou-se, a partir destes, a participação de *VELB* na manutenção e integridade da parede celular.

Figura 22: Teste de sensibilidade ao estresse de parede através da análise de sensibilidade ao Congo Red em duas concentrações (0,5 e 1,0%). Avaliou-se o crescimento das cepas selvagem (*KN99 α*), mutante (*velBa Δ*) e reconstituída (*velBa Δ ::VELB α*) de *C. neoformans* a 30 °C e 37 °C incubadas por um período de 48-72 h.

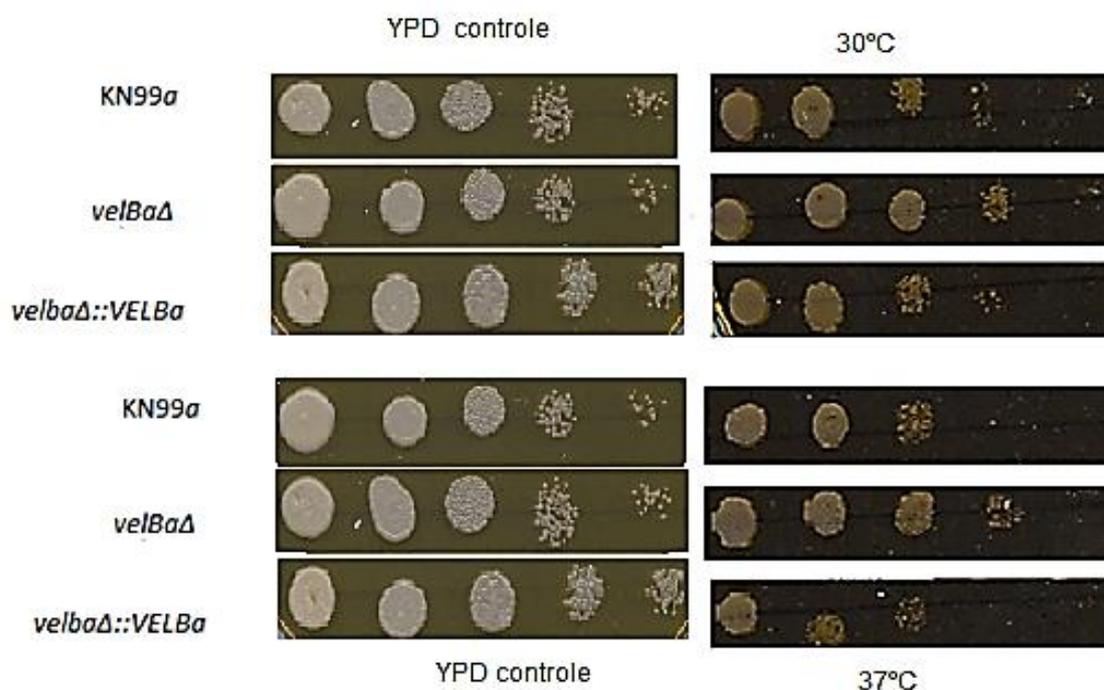


Fonte: Produzido pelo autor.

O Congo Red liga-se a β -1,4-glucana da parede celular afetando sua integridade (Liu *et al.*, 2011). Os resultados mostraram que não houve nenhuma alteração significativa de crescimento das cepas testadas nesta condição.

O segundo teste realizado para detectar defeitos na parede foi com o estressor Dodecil Sulfato de Sódio, mais conhecido pela sigla SDS. O SDS promove a lise celular, rompendo a parede e a membrana plasmática e, conseqüentemente lisando a célula. Expondo as cepas a essa substância, pode-se avaliar sua interferência no seu crescimento. A **Figura 23** mostra o resultado do teste, que foi exposto às duas temperaturas propostas (30 e 37°C).

Figura 23: Teste de sensibilidade ao estresse de parede através da análise de sensibilidade ao SDS. Avaliou-se o crescimento das cepas selvagem (KN99 α), mutante (*velBa* Δ) e reconstituída (*velBa* $\Delta::VELBa$) de *C. neoformans* a 30 °C e 37 °C incubadas por um período de 48-72 h.

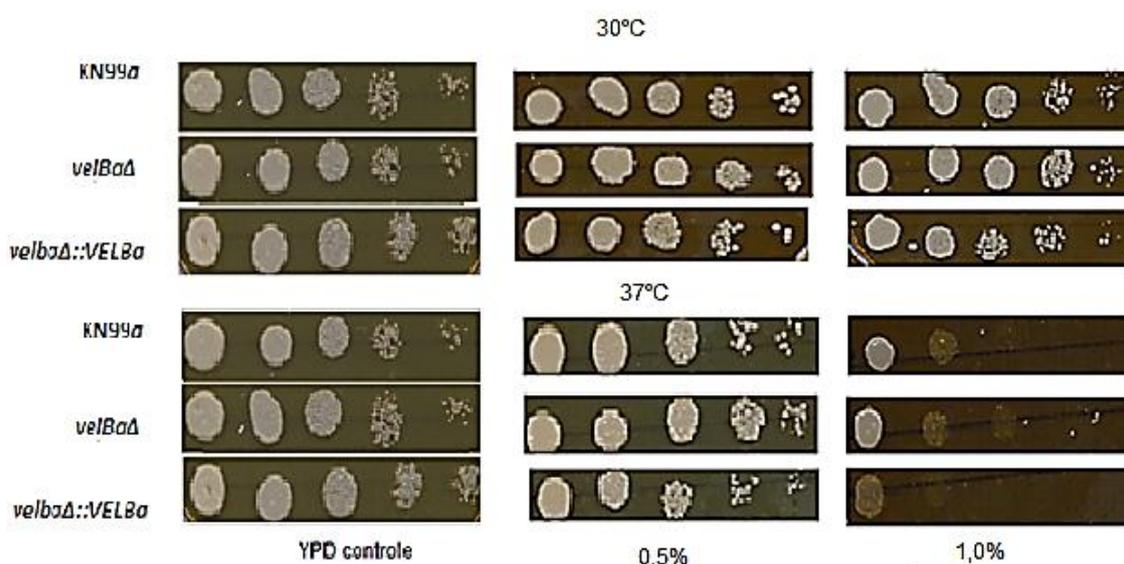


Fonte: Produzido pelo autor.

Como observado na **figura 23**, houve uma pequena diferença no crescimento entre mutante e selvagem/reconstituído. O mutante *velBa* Δ não apresentou diferença de crescimento quando comparado ao selvagem e reconstituído.. Contrariamente ao resultado do teste em *C. neoformans*, em estudos anteriores realizados com *Beauveria bassiana* observou-se que os mutantes *velB* apresentaram sensibilidade aos agentes perturbadores de parede celular, Congo Red e SDS. Isso acontecia porque eles apresentavam reduções significativas de manitol intracelular e trealose e a parede celular enfraquecia-se nestes mutantes (Chen *et al.*, 2014).

A cafeína também é utilizada como estressor de parede celular em testes que avaliam a integridade da mesma. A **Figura 24** mostra o resultado do teste realizado com as cepas selvagem, mutante e reconstituída nas temperaturas de 30 e 37°C.

Figura 24: Teste de sensibilidade ao estresse de parede através da análise de sensibilidade à cafeína, em duas concentrações (0,5 e 1,0%). Avaliou-se o crescimento das cepas selvagem (KN99 α), mutante (*velB α* Δ) e reconstituída (*velB α* Δ ::*VELB α*) de *C. neoformans* a 30 e 37 °C incubadas por um período de 48-72 h.



Fonte: Produzido pelo autor.

O defeito de crescimento fúngico na presença de cafeína sugere possíveis defeitos na via de síntese da parede celular (Siafakas *et al.*, 2007). Como observado na foto do teste (**Figura 24**), a 37°C e a uma concentração maior de cafeína, não houve alteração do crescimento do fungo no meio em relação nas concentrações e temperaturas testadas entre a cepa mutante com relação às selvagem e reconstituída.

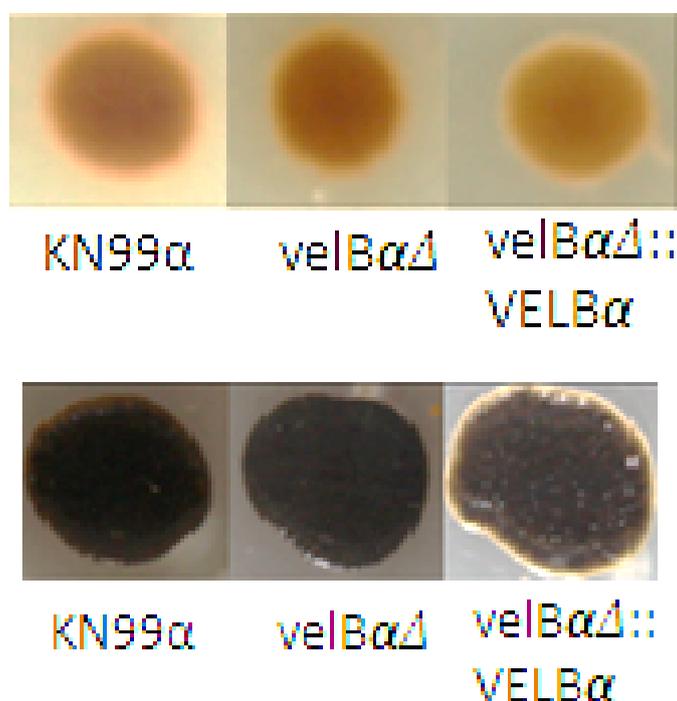
F. Fatores de virulência

F.1. Síntese de melanina

Uma das principais características de *C. neoformans* é sua habilidade de sintetizar melanina na presença de compostos fenólicos. Uma mutação em

qualquer dos componentes ou enzimas da via de tirosinase (responsável pela produção de melanina) 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 (Casadevall *et al.*, 2000). A **Figura 25** abaixo mostra a produção de melanina nas três cepas analisadas.

Figura 25: Avaliação da capacidade de produzir melanina em Niger Seed e no meio L-DOPA. As cepas foram incubadas a uma temperatura de 30°C e concentração de 10^7 células. A coloração marrom é indicativa da produção da melanina.



Fonte: Produzido pelo autor.

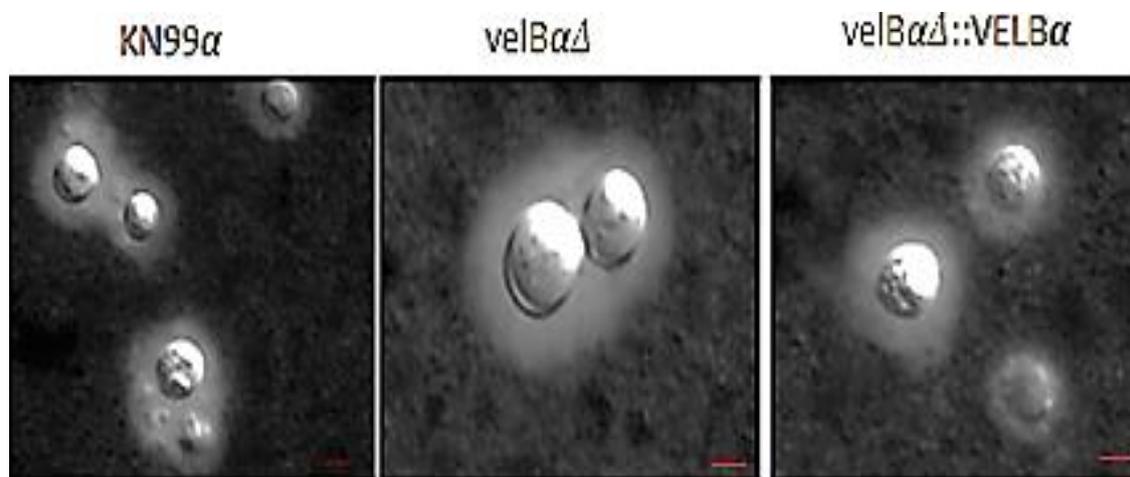
Através desse experimento observou-se que mesmo após a deleção do gene (*velBαΔ*), não houve diferença na produção de melanina se comparado às cepas selvagem e reconstituída, e portanto, sugere-se que não há participação de *VelB* na biossíntese de melanina de *C. neoformans*.

F.2. Produção de cápsula

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. Todas as cepas testadas foram capazes de produzir cápsula na condição testada, no entanto não foi avaliado o seu tamanho e sua composição. O gene em estudo (*VELB*) parecer não interferir na síntese da cápsula polissacarídica em *C. neoformans*.

Figura 26: Análise da produção de cápsula polissacarídica em *C. neoformans*. Utilizou-se o meio DEMEM + MOPS, incubadas a 37°C por 72h. Tinta nanquin foi utilizada para observação de cápsula das cepas selvagem KN99 α , mutante *velB α Δ* e reconstituído *velB α Δ ::VELB α* . As células foram avaliadas em microscópio óptico. Barra: 10 μ m.



Fonte: Produzido pelo autor.

F.3. Produção de Urease

A capacidade de produzir urease foi analisada nas cepas selvagens e mutantes pelo plaqueamento em meio Christiansen's Urea Agar. A urease é um fator de virulência relacionado à capacidade de *C. neoformans* transpassar a barreira hematoencefálica (Singh *et al.*, 2013). Embora a atividade de urease não seja necessária para o desenvolvimento do fungo, os padrões de difusão fúngica nos tecidos após a inoculação intravenosa do mutante nulo diferem daqueles da linhagem selvagem (Olszewski *et al.*, 2004).

A **Figura 27** mostra o experimento realizado com as cepas selvagem, mutante e reconstituído no meio de Christiansen's Urea Agar.

Figura 27: Análise da produção de urease em cepas selvagem KN99 α , mutante *velB α Δ* e reconstituído *velB α Δ ::VELB α* de *C. neoformans* a 30 °C. As cepas foram

incubadas em meio Christiansen's Urea Agar a 30 °C por 48-72 h. A cor rosa da colônia indica produção de urease.



Fonte: Produzido pelo autor.

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, metabolizando a uréia em NH_3 e aumentando o pH do meio à medida em que é produzida, alterando a cor do meio para rosa ou vermelho. A coloração rósea das colônias comprovou a capacidade de todas as cepas produzirem urease. A perda do gene *VELB* não parece influenciar a produção de urease. Como *C. neoformans* necessita da urease para transpassar a barreira hematoencefálica e se alojar no SNC causando meningite e meningoencefalite, e o gene *VELB* não influencia na produção desta enzima, sua perda não altera a virulência do fungo nesse quesito.

F.4. Produção de Fosfolipase

A capacidade de produção de fosfolipase das cepas selvagem KN99 α , mutante *velB* Δ e reconstituído *velB*::*VELB α* de *C. neoformans* foi testada através de incubação em meio de emulsão de gema de ovo. A **Figura 28** mostra o crescimento das cepas estudadas em meio de emulsão de gema de ovo para que seja observado a produção de halos de degradação de fosfolipídeos.

Figura 28: Análise da produção de fosfolipase em cepas selvagem KN99 α , mutante *velB* Δ e reconstituído *velB*::*VELB α* de *C. neoformans* a 30 °C. As cepas foram incubadas em meio de emulsão de gema de ovo a 30 °C por 48-72 h para observação da formação de halos de atividade enzimática.



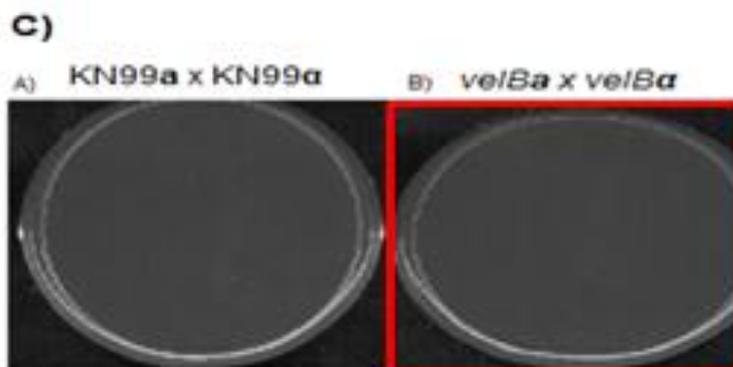
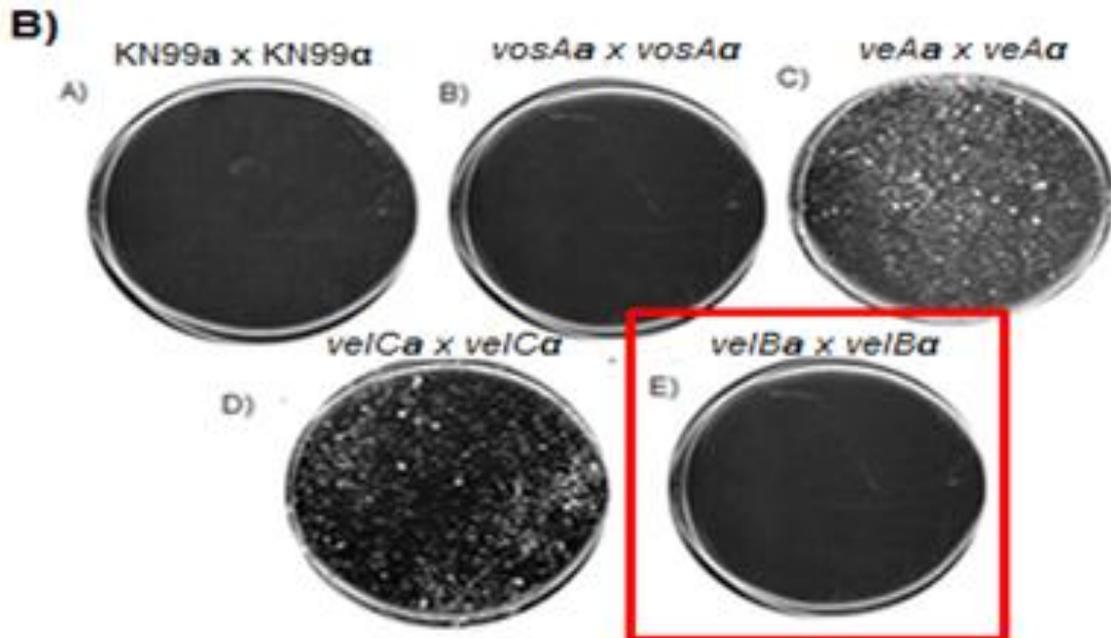
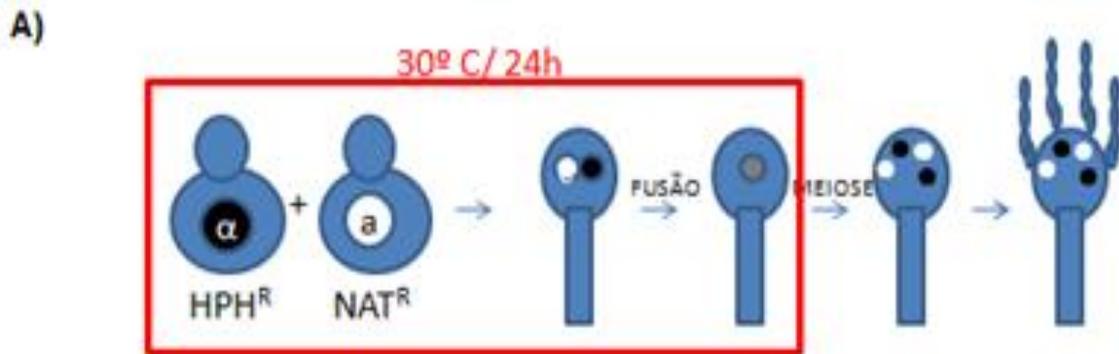
Fonte: Produção do autor.

Não foi possível identificar qualquer alteração do mutante *VELB* em relação à cepa selvagem e até mesmo à cepa reconstituída. A função de *VELB* em *C. neoformans* parece não estar relacionada à produção e secreção de fosfolipase ou à virulência dependente de fosfolipase.

G. Acasalamento: Teste de Fusão

Em fungos, o acasalamento sempre envolve duas células de tipo sexual oposto que secretam feromônios com o objetivo de induzir a fusão celular e, conseqüentemente, fusão nuclear e meiose, para gerar progênie recombinante (Feretzaki e Heitman, 2013). Em experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa, avaliou-se a capacidade de fusão de todos os mutantes dos genes *Velvet* de *C. neoformans* estudados no grupo (**Figura 29**).

Figura 29: Ensaio de fusão de mutantes *Velvet*. Teste de fusão com os cruzamentos bilaterais de selvagens KN99α e mutantes de *VELB* incubados em meio MS na ausência de luz. Após 24 horas de co-cultivo uma alíquota de 200 μL de cada cruzamento foi plaqueada em meio YPD acrescido com 200 μg/mL de Higromicina B e Nurseotricina. As placas foram documentadas após 5 dias de crescimento a 30 °C. **1)** Esquema da etapa de fusão celular. **2)** Cruzamentos de todos mutantes *Velvets* estudados no grupo e controle (a) KN99a x KN99α – controle negativo; (b) *vosAα* x *vosAα*; (c) *veAα* x *veAα*; (d) *velCa* x *velCa*; (e) *velBa* x *velBa*. **3)** Cruzamento para confirmar resultado de ausência de fusão do mutante de *VELB* (a) KN99a x KN99α – controle negativo; (b) *velBa* x *velBa*. Em vermelho estão as placas onde foram realizados os testes com mutantes de *VELB*.



YPD + Higromicina B + Nourseotricina / 30°C
/ 5 dias

Fonte: Produzido pelo autor.

Após análise das placas de YPD contendo os antibióticos Higromicina B e Nourseotricina, observou-se que os mutantes das proteínas *Velvets* *VosA* e *VelB* apresentaram defeito no processo de fusão celular pois não apareceram colônias nas placas contendo os antibióticos onde foram plaqueados os

cruzamentos dos mutantes de *VELB* e *VOSA*. A ausência de fusão nos cruzamentos pode indicar problemas de sensoriamento ou na via de feromônio desses mutantes. Sabe-se que os feromônios do acasalamento são essenciais para o reconhecimento inicial e para as etapas de fusão célula-célula (Shen *et al.*, 2002). Repetiram-se os testes com o gene estudado no trabalho (*VELB*) com o intuito de confirmar o resultado (**Figura 28.2**).

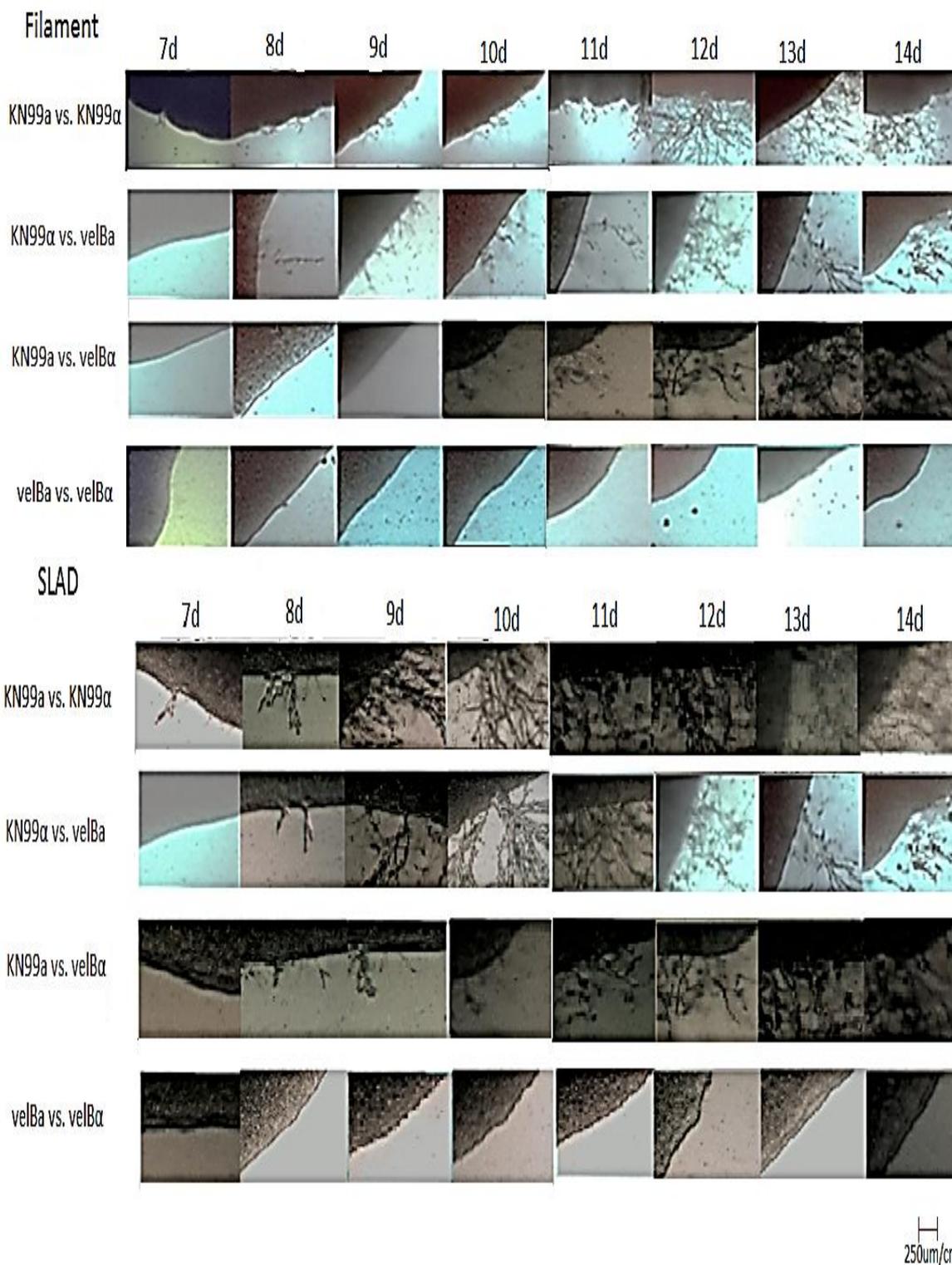
Após realização do segundo teste, confirmou-se que os mutantes de *VELB* apresentam defeitos na fusão celular, etapa fundamental para o processo de acasalamento.

H. Acasalamento: produção de filamentos

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 e que se sabe pela literatura estimulam o acasalamento. Foi observado a ausência de filamentos característicos de acasalamento nos cruzamentos bilaterais dos mutantes de *VELB* (*velBa*Δ vs. *velBa*Δ) em condições favoráveis (escuro) (**Figura 30**), que não foram detectados nem ao final do experimento que corresponde ao 10^o dia de observação. Observa-se um ligeiro atraso no aparecimento de hifas nos cruzamentos entre os selvagens e os mutantes de *VELB*, (*velB*Δ vs. KN99), no entanto no final de 10 dias é possível detectar os filamentos, indicando que é necessária pelo menos uma cópia de *VELB* intacta para que o acasalamento ocorra. Este resultado sugere que *VELB* seja um regulador positivo de acasalamento em *C. neoformans*, tendo em vista que sua ausência no genoma promove o bloqueio da produção de filamentos.

Figura 30: Acasalamento acompanhado diariamente realizado em meio *Filament* e SLAD na ausência de luz (escuro) a temperatura ambiente. O aparecimento de filamentos característicos de acasalamento, entre mutantes de *VELB* não foi detectado entre as linhagens mutantes, apenas entre as linhagens selvagens e nos cruzamentos entre selvagens e mutantes. As fotos foram tiradas em microscópio óptico com a

objetiva 4X – Escala foto original: 250 $\mu\text{m}/\text{cm}$ a partir do 7º dia de incubação. Os retângulos em vermelho mostram os cruzamentos entre mutantes de *VELB*.

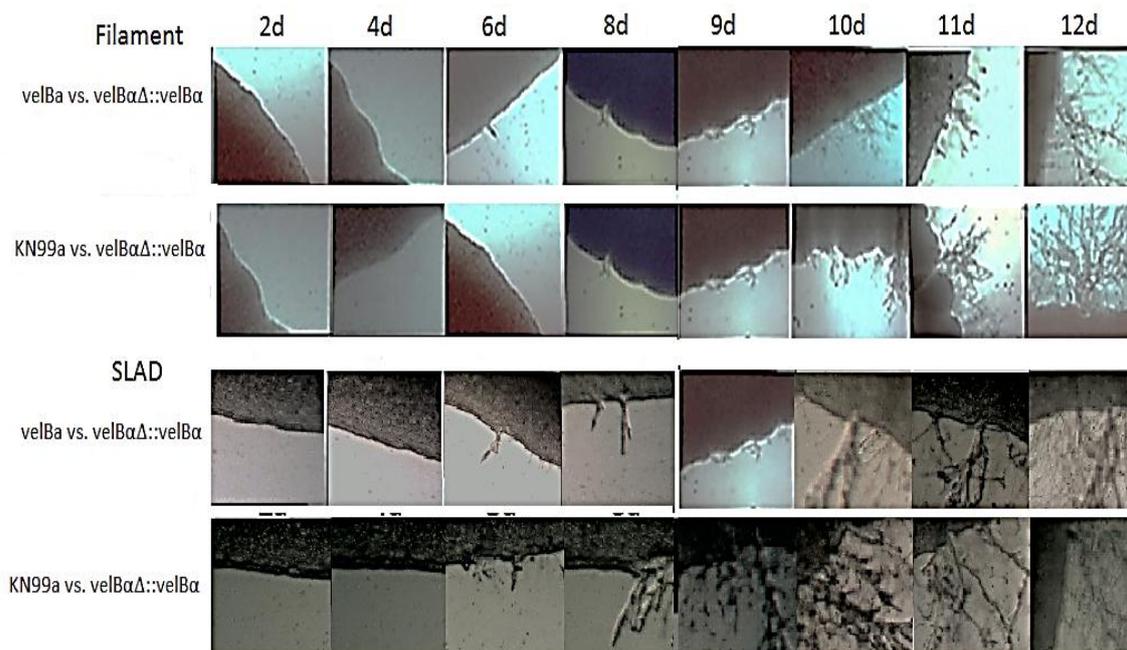


Fonte: Produzido pelo autor.

O transformante reconstituído *02R.velBa Δ ::VELBa* recuperou a capacidade de realizar acasalamento e produzir hifas, inclusive quando

submetidos a cruzamentos com cepas mutantes. O gene *VELB* foi reintegrado ao genoma do mutante *velB* Δ (**Figura 31**).

Figura 31: Teste de acasalamento da cepa reconstituída de *VELB*. Painel ilustrativo dos cruzamentos *velBa* Δ vs. *02R.velBa* Δ ::*VELBa* e KN99a vs. *02R.velBa* Δ ::*VELBa* em meio ágar Filament e SLAD ao longo de 14 dias de incubação no escuro, à temperatura ambiente. Zoom microscópio 4 X – Escala foto original: 250 μ m/cm.



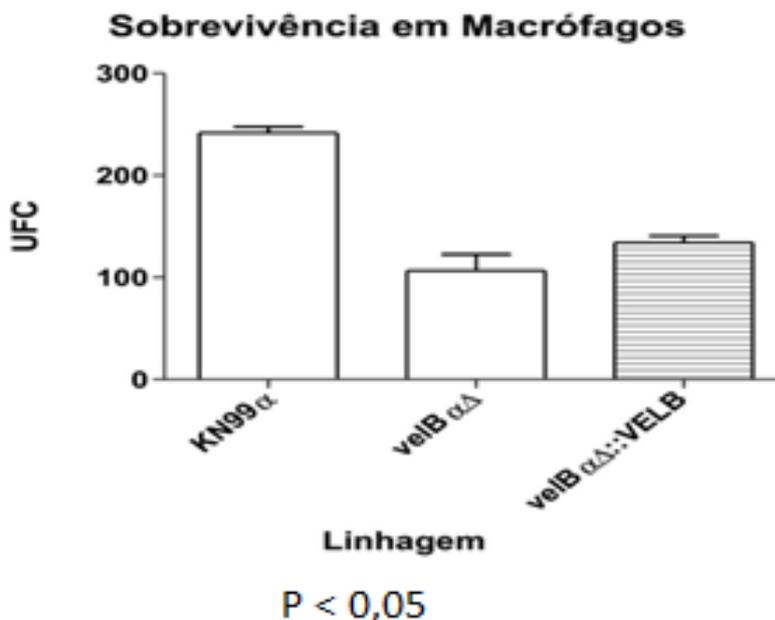
Fonte: Produzido pelo autor.

I. Ensaio de fagocitose por macrófagos J774

As cepas selvagem, mutante e reconstituída foram avaliadas quanto a sua capacidade de sobrevivência após fagocitose por macrófagos J774. Estudos anteriores de outros *Velvets* em *C.neofomans* mostraram que a ausência de *VEA* ou *VELC* não atenua a virulência do fungo (Santos, T.C, 2014) A ausência do gene *VOSA* também não atenua a virulência de *C.neofomans* (Peconick,LDF, 2013). Os ensaios foram realizados em uma proporção de macrófagos : leveduras de 1:5.

Figura 32: Ensaio de sobrevivência de *C. neofomans* após fagocitose por macrófagos peritoniais. Teste *in vitro* utilizando macrófagos peritoniais J774.A1 e as cepas selvagem (KN99a), mutante (*VelBa* Δ) e reconstituída (*velBa* Δ ::*VelBa*) de *C.*

neoformans. Experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata experimental, com as três cepas distintas (selvagem, mutante e reconstituída. O gráfico representa as células fúngicas que sobreviveram após lise dos macrófagos através das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), obtidas por plaqueamento em meio YPD. A incubação se deu a 30° C por 48h.



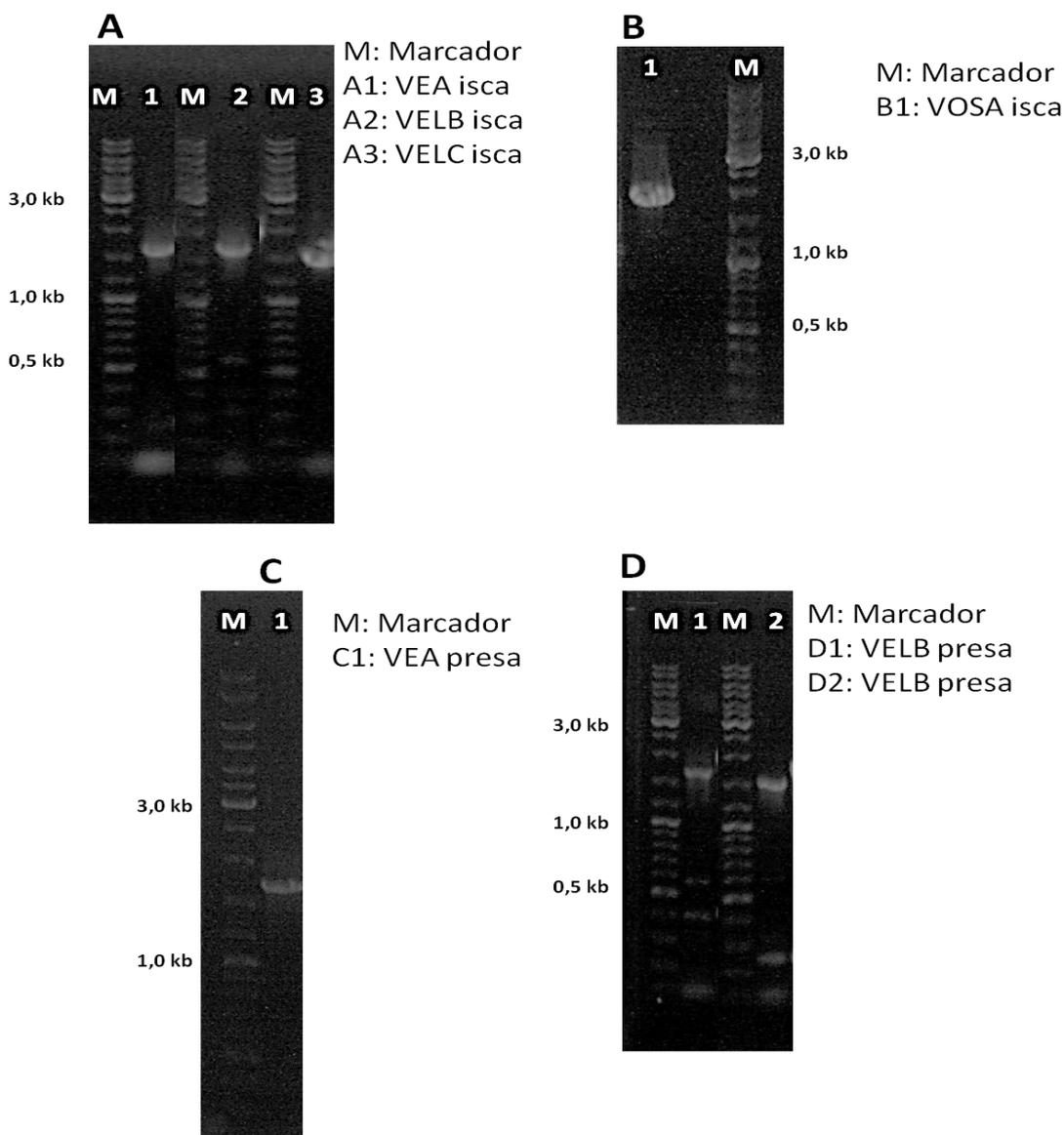
Fonte: Produzido pelo autor.

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 ($p < 0,05$) de acordo com teste estatístico *Oneway ANOVA* seguido de teste de Tukey. A ausência de *VelB* não altera a capacidade de sobrevivência de *C. neoformans* após fagocitose por macrófagos J774.

J. Análise da interação entre as proteínas *Velvets* de *C. neoformans*– Duplo-Híbrido

Em *A. nidulans* as interações e a formação de complexos entre as proteínas *Velvets* já são amplamente estudadas. A fim de verificar a interação dos *Velvets* de *C. neoformans*, foram construídas cepas das iscas e presas contendo os genes *velvets* fusionados ao domínio de ativação (AD) ou domínio de ligação (BD) de *GAL4*. Para que isso fosse possível, foram amplificados cada um dos cDNAs dos *velvets* de *C. neoformans* para posterior clonagem no plasmídeo da isca (pGBKT7) e da presa (pGADT7).

Figura 33: Isolamento dos insertos dos *velvets* de *C. neoformans*. (A) Amplificação dos cDNAs das iscas de *VEA*, *VELB* e *VELC*. (B) Amplificação do cDNA da isca de *VOSA*. (C) Amplificação do cDNA da presa de *VEA*. (D) Amplificação dos cDNAs das presas de *VELB* e *VELC*. Os tamanhos esperados foram 1,6 Kb para *VEA*; 1,7 Kb por *VELB*; 1,5 Kb para *VELC* e 1,9 Kb para *VOSA*.

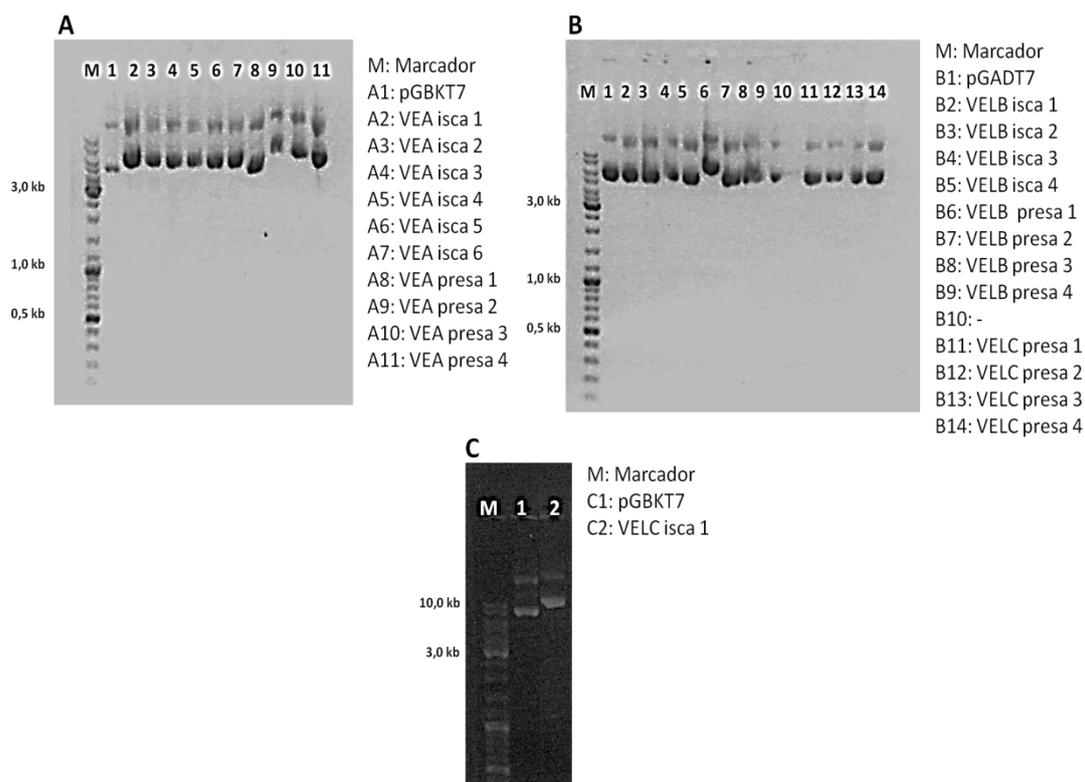


Fonte: Produzido pelo autor.

Para a replicação dos plasmídeos com os insertos de interesse, foi realizada a transformação de *E. coli* competentes *Stellar*TM (Clontech) por choque térmico, conforme o protocolo do fabricante. Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB Agar acrescido da droga a qual o plasmídeo conferia resistência (Canamicina para pGBKT7 e Ampicilina para

pGADT7) e incubadas a 37 °C por 16 horas. Decorridas às 16 horas, foram escolhidas colônias aleatórias e as mesmas foram inoculadas em meio LB líquido para posterior extração do DNA plasmidial que fora extraído com o auxílio do kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) conforme as instruções do fabricante. Após a extração, 5 µL de cada DNA plasmidial foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificado para posterior transformação das células de *S. cerevisiae*.

Figura 34: Eletroforese dos plasmídeos intactos após realização da miniprep. (A) Plasmídeos pGBKT7 e pGADT7 clonados os insertos de *VEA* de *C. neoformans*. (B) Plasmídeos pGBKT7 e pGADT7 clonados os insertos de *VELB* e pGADT7 clonado com *VELC* de *C. neoformans*. (C) Plasmídeo pGBKT7 clonado com *VELC* de *C. neoformans*.

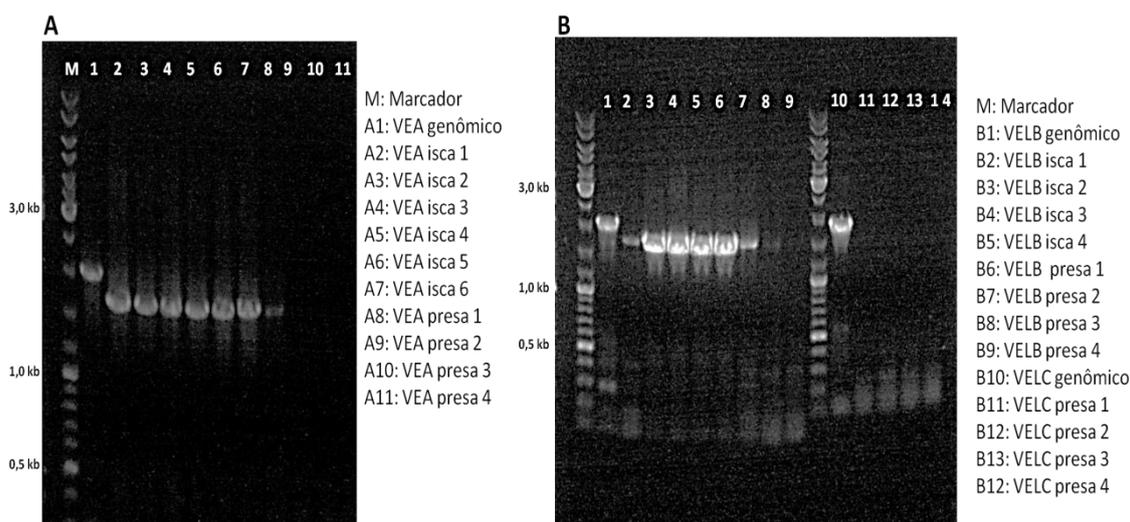


Fonte: Produção do autor.

Foi realizada a confirmação da clonagem do inserto em seus respectivos vetores por meio de PCR de dois passos, utilizando os mesmos oligonucleotídeos necessários para o isolamento do cDNA dos genes-alvo. Os fragmentos foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose

0,8%, os quais deviam possuir os tamanhos de 1,6 Kb para *VEA*; 1,7 Kb para *VELB*; 1,5 Kb para *VELC* e 1,9 Kb para *VOSA*.

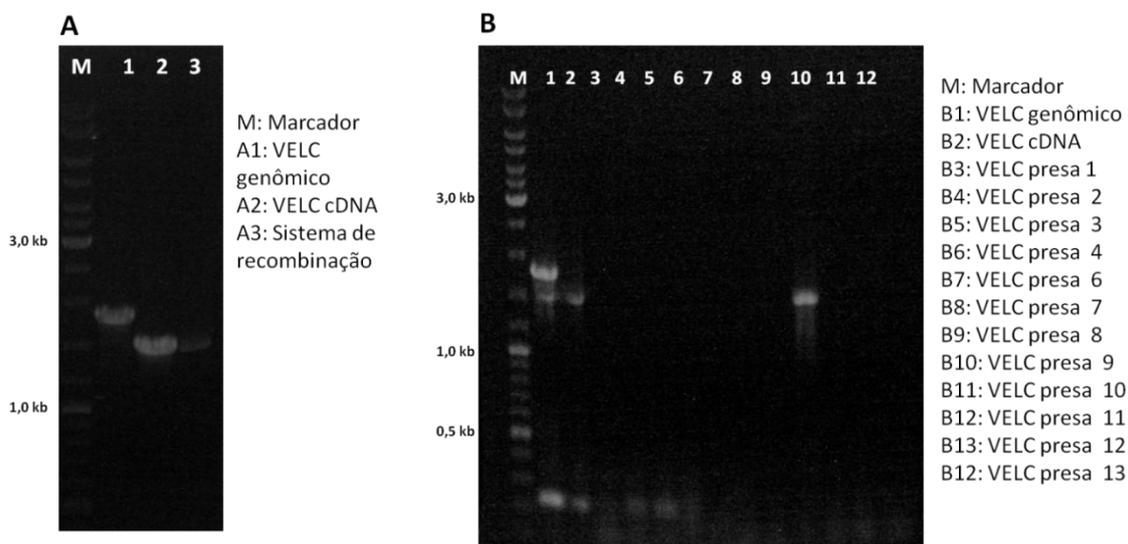
Figura 35: PCR de confirmação de inserção dos insertos nos plasmídeos. (A) PCR dos insertos (iscas e presas) de *VEA*. (B) PCR dos insertos (iscas e presas) de *VELB* e presas de *VELC*.



Fonte: Produção do autor.

Devido à ausência de fragmentos clonados nos plasmídeos da presa de *VELC* escolhidas anteriormente, foi realizada a PCR do sistema de recombinação utilizando os oligonucleotídeos usados para o isolamento do cDNA de *VELC* e concomitantemente foi realizada PCR de colônia das bactérias transformantes que não haviam sido escolhidas anteriormente com a enzima *PyroStart*TM Fast PCR (Fermentas Life Science). O amplicon foi confirmado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% no qual teria de ter um tamanho de 1,5kb.

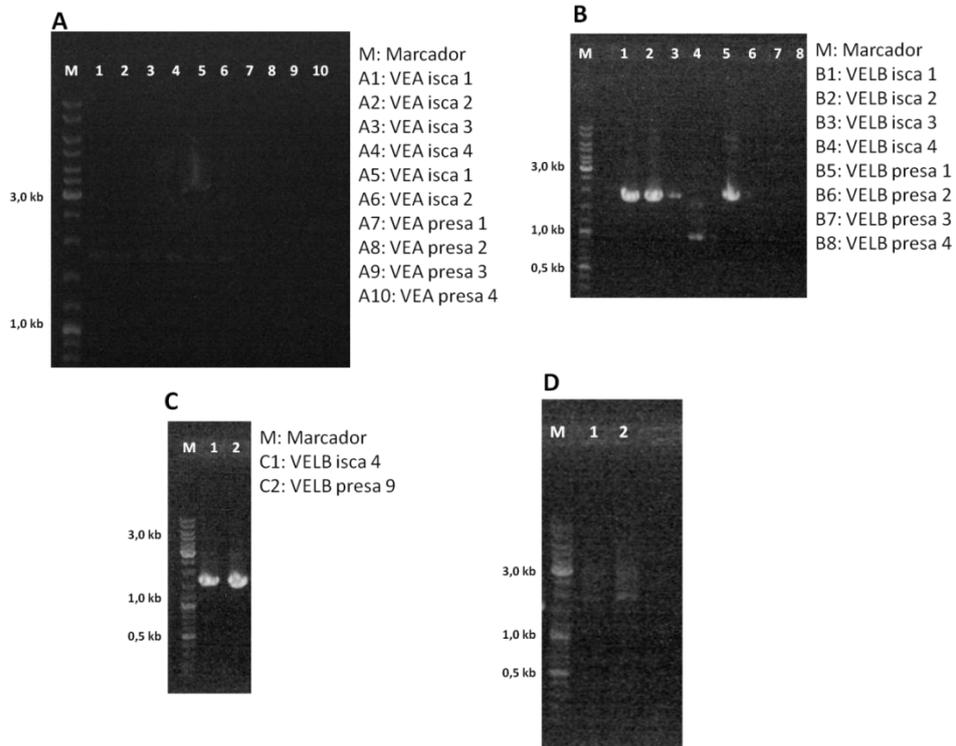
Figura 36: PCR do sistema de recombinação e PCR de colônia das presas de VELC. (A) PCR do sistema de colônia da presa de VELC. (B) PCR de colônias transformadas com o sistema de recombinação da presa de VELC.



Fonte: Produzido pelo autor.

Além da primeira confirmação da clonagem por PCR utilizando os fragmentos do isolamento do cDNA, foi realizada uma segunda confirmação com a enzima *Phusion* (Thermo Scientific) a fim de verificar se os insertos haviam entrado corretamente no plasmídeo. Para tal, foi utilizado o oligonucleotídeo T7 com o oligonucleotídeo reverso utilizado para o isolamento do cDNA de seu respectivo *Velvet*. Foi feita confirmação por eletroforese em gel de agarose (0,8%) para que se obtivessem os seguintes fragmentos: *VEA* (1,7kb), *VOSA* (2kb) e *VELB* e *VELC*, 1,9kb.

Figura 37: Confirmação da clonagem por meio de PCR com oligonucleotídeo T7. (A) Amplificação dos insertos de *VEA* presa e isca. (B) Amplificação dos insertos de *VELB* isca e presa. (C) Amplificação dos insertos de *VELC* isca e presa. (D) Amplificação dos insertos da isca de *VOSA*. Os tamanhos esperados foram de aproximadamente 1, 7 Kb para *VEA*, 1,8 Kb para *VELB*, 1,6 Kb para *VELC* e 2 Kb para *VOSA*.



Fonte: Produzido pelo autor.

Ainda não foram realizadas as outras etapas do duplo-híbrido, visto que os plasmídeos estão em etapa de sequenciamento para que sejam confirmados antes de dar continuidade às outras etapas do experimento. Até o término, não se pode concluir sobre a interação das proteínas *Velvet* em *C.neofomans*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados dos experimentos realizados para análise funcional de *VELB* em *C. neoformans* demonstraram que a perda deste gene não prejudica a produção dos principais fatores de virulência deste fungo tais como seu crescimento a 37°C (temperatura corporal do hospedeiro), síntese de melanina, produção de urease e fosfolipase e produção da cápsula, considerado por muitos como o principal fator de virulência de *C. neoformans*. Foi testada a capacidade do mutante *velB* de sobreviver após fagocitose por macrófagos em ensaios *in vitro* e não foi mostrada nenhuma diferença significativa de crescimento comparada a cepa selvagem.

A perda de *VELB* também não afeta a sensibilidade do fungo às condições estressoras osmóticas e de parede, conforme demonstrado em diversos testes realizados.

Em contrapartida, a deleção de *VELB* provoca um bloqueio da produção de hifas provenientes de cruzamento entre os mutantes *velBΔ* de tipos sexuais opostos em relação ao cruzamento entre os selvagens, indicando que o gene *VELB* é essencial para o desenvolvimento sexuado de *C. neoformans*. Além disto, observou-se pelo ensaio de fusão que o cruzamento dos mutantes de *VELB* não produz fusão entre as células de tipos sexuais opostos etapa crucial para o acasamento neste fungo. Estes resultados demonstram que *VELB* é um regulador positivo de acasalamento em *C. neoformans*.

Visto que em diferentes fungos, incluindo *A. nidulans*, foram observadas formações de complexos entre as proteínas *Velvets*, estão em andamento experimentos de duplo híbrido para avaliar a interação entre estas proteínas de *C. neoformans*. As etapas de obtenção dos cDNAs, clonagem nos vetores isca e presa, transformação nas linhagens de *S. cerevisiae* já foram realizadas, no entanto, estão sendo realizados os sequenciamentos dos plasmídeos para dar continuidade aos experimentos que consistem nos testes de acasalamento para avaliar as possíveis interações das proteínas *Velvets* de *C. neoformans*. Até o presente momento ainda não se sabe quais outros genes podem estar sendo regulados por *VelB* ou quais são suas proteínas interactantes.

Estudos anteriores já demonstraram e deixaram claros os papéis de *VELB* e sua regulação durante a conidiogênese em ascomicetos. Em *A. nidulans*, *VelB* é um regulador multifuncional de desenvolvimento e

desempenham um papel crucial durante todo o ciclo de vida do fungo (Ni e Yu, 2007) . A interação entre *VelB* e suas proteínas parceiras (*VelB*, *VeA* ou *VosA*) desempenham diferentes papéis no controle do desenvolvimento de fungos e esporogênese.. Em *C.neofomans*, podemos observar com os testes realizados durante esse trabalho e em trabalhos anteriores, como descrito por Peconick, LDF 2013 que tanto *VelB* quanto *VosA* apresentam-se essenciais para o processo de fusão celular e aparecimento de hifas no acasalamento e portanto podem ser considerados reguladores positivos de desenvolvimento sexual desempenhando um papel crucial no ciclo de vida do fungo.

Após a conclusão dos experimentos de duplo-híbrido, será possível entender como estas proteínas *Velvets* se interrelacionam em *C. neoformans*. Até o momento, podemos presumir que *VelB* não afeta os fatores de virulência de *C.neofomans*, mas está diretamente envolvido com o processo de acasalamento do fungo em questão. Ainda não haviam sido feitos estudos com proteínas *Velvet* em *C.neofomans* e com certeza o estudo servirá de base para futuras investigações no assunto.

5 Referências Bibliográficas

- 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, 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, 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
- Badiee, P.; Alborzi, A. Invasive fungal infections in renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant* 2011; 355-62.
- Bahn Y-S, Xue C, Idnurm A, Rutherford JC, Heitman J, Cardenas ME. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:57–69
- Barbosa FM, Fonseca FL, Holandino C, Alviano CS, Nimrichter L, Rodrigues ML. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes Infect*. 2006;8: 493-502.
- Bartlett KH, Cheng PY, Duncan C, Galanis E, Hoang L, Kidd S, Lee MK, Lester S, MacDougall L, Mak S, Morshed M, Taylor M, Kronstad J. A decade of experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. *Mycopathologia*. 2012; 173: 311-9.
- 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. VelB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science* 2008; 320: 1504-06.
- Bovers, M.; Hagen, F.; Boekhout, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol*, 2008; 25: S4-12.
- Bulmer GS, Sans MD, Gunn CM. *Cryptococcus neoformans*.I.Nonencapsulated mutants. *J Bacteriol*. 1967; 94(5):1475-9.

- Byrnes EJ 3rd, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect.* 2011; 13: 895-907.
- Cai X, Liu K, Liang Y, Yu H, Lv F, Liang X. Isolated biliary cryptococcosis manifesting as obstructive jaundice in an immunocompetent adult. *Int J Med Sci.* 2012; 9: 200-6.
- Calvo A. The VeA Regulatory System and its Role in Morphological and Chemical Development in Fungi. *Fungal Genet Biol* 2008; 45: 1053-61.
- Calvo E, Pastor FJ, Rodríguez MM, Pujol I, Guarro J. Antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 4074-7.
- Casadevall A, Perfect JA *Cryptococcus neoformans*. (1998) ASM Press. Washington, DC.
- Casadevall A, Nosanchuk JD, Williamson P, Rodrigues ML. Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends Microbiol.* 2009;17: 158-62.
- Casadevall, A.; Rosas, A. L.; Nosanchuk, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*, 2000; 3: 354-8.
- 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.
- 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 PK, Scharfenstein LL, Li P, Ehrlich KC. *Aspergillus flavus* VelB acts distinctly from VeA in conidiation and may coordinate with FluG to modulate sclerotial production. *Fungal Genet Biol.* 2013; 58-59:71-9.
- Charlier C, Dromer F, Lévêque C, Chartier L, Cordoliani YS, Fontanet A, Launay O, Lortholary O; French Cryptococcosis Study Group. Cryptococcal neuroradiological lesions correlate with severity during cryptococcal meningoencephalitis in HIV-positive patients in the HAART era. *PLoS One.* 2008; 3: e1950.
- 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. Washington, DC.
- Chatuverdi V, Flynn T, Niehaus WG, Wong B. Stress Tolerance and Pathogenic Potential of Mannitol Mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol* 1996;

142: 937-43.

Chayakulkeeree, M.; Perfect, J. R. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 2006; 20: 507-44.

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 Y, Zhu J, Ying SH, Feng MG. The GPI-anchored protein Ecm33 is vital for conidiation, cell wall integrity, and multi-stress tolerance of two filamentous entomopathogens but not for virulence. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98: 5517-29.

Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 499-508.

Chung S, Mondon P, Chang YC, Know-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* with a mutation in the tetratricopeptide repeat-containing gene, CCN1, causes subcutaneous lesions but fails to cause systemic infection. *Infect Immun*. 2003; 71(4):1988-94.

Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo). 2013;2013: 675213.

Costa Sdo P, Lazéra Mdos S, Santos WR, Morales BP, Bezerra CC, Nishikawa MM, Barbosa GG, Trilles L, Nascimento JL, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104: 662-4.

Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*. 2000;68(2):443-8.

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.

Datta, K. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15: 1185-91.

- 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(2):469-85.
- Davis J, Zheng WY, Glatman-Freedman A, Ng JA, Pagcatipunan MR, et al. Serologic evidence for regional differences in pediatric cryptococcal infection. *Pediatr Infect Dis J*, 2007. 26: 549–551.
- Day JN, Chau TT, Lalloo DG. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med*. 2013; 368: 2522-3.
- Desalermos, A.; Kourkoumpetis, T. K.; Mylonakis, E. Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis. *Expert Opin Pharmacother*, 2012; 13: 783-9.
- Djordjevic JT Role os Phospholipases in Fungal Fitness, Pathogenicity and Drug Development – Lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, 2010. 1: 125.
- Eisenman HC, Chow SK, Tsé KK, McClelland EE, Casadevall A. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. *Virulence*. 2011; 2: 329-36.
- Eisenman HC, Mues M, Weber SE, Frases S, Chaskes S, Gerfen G, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology*. 2007;153: 3954-62.
- Enache-Angoulvant A, Chandenier J, Symoens F, Lacube P, Bolognini J, Douchet C, Poirot JL, Hennequin C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *J Clin Microbiol*. 2007;45: 1261-5.
- Erickson T, Gueyikian A, Zhu X, Gibbons J, Williamson PR. Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on VPH1. *Mol Microbiol*. 2001;42(4);1121-31.
- Evans, E.E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A. Serologic classification by means of capsular and agglutination reactions. *J Immunol*. 1950; 64: 423-30.
- Faganello J, Dutra V, Schrank A, Meyer W, Schrank IS, Vainstein MH. Identification of genomic differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Representational Difference Analysis (RDA). *Med Mycol*. 2009; 47:584-91.

- Feretzaki M, Heitman J. Unisexual reproduction evolution of eukaryotic microbial pathogens. *Plos Pathog.* 2013; 9(10).
- Fortes ST, Lazéra MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses.* 2001;44: 137-40.
- 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.
- Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect.* 2006; 8(4):1006-15.
- Gerik KJ, Bhimireddy SR, Ryerse JS, Specht CA, Lodge JK. PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative stresses, cell integrity and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2008;7(10):1685-98.
- Gilbert NM, Donlin MJ, Gerik KJ, Specht CA, Djordjevic JT, Wilson CF, Sorrell TC, Lodge JK. KRE genes are required for beta-1,6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2010; 76: 517-34.
- 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;
- Griffiths, E. J.; Kretschmer, M.; Kronstad, J. W. Aimless mutants of *Cryptococcus neoformans*: Failure to disseminate. *Fungal Biology Reviews*, 2012; 26: 1-12.
- Hagen, F.; Boekhout, T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia*, 2010; 170: 209-11.
- Hoang, LMN. *Cryptococcus gattii*: A review of the epidemiology, clinical presentation, diagnosis and management of this endemic yeast in the Pacific Northwest. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2011; 33:24-9.
- Hsueh Y-P, Lin X, Kwon-Chung KJ, Heitman J. Sexual Reproduction of *Cryptococcus*. In: *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast.* 2011. ASM Press pp. 81-96. Washington, DC.

- Hull CM, Boily MJ, Heitman J. Sex-specific Homeodomain Proteins Sxi1alpha and Sxi2a Coordinately Regulate Sexual Development in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 526-35
- Hull CM, Heitman J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet* 2002; 36: 557-615.
- 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.
- Jackson, A.; Van Der Horst, C. New insights in the prevention, diagnosis, and treatment of cryptococcal meningitis. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2012; 9: 267-77.
- Jiang J, Liu X, Yin Y, Ma Z. Involvement of a velvet protein FgVeA in theregulation of asexual development, lipid and secondary metabolisms and virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One*. 2011;6: e28291.
- Kent CR, Ortiz-Bermúdez P, Giles SS, Hull CM. Formulation of a defined V8 medium for induction of sexual development of *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(20): 6248-53.
- Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JW, Bartlett KH. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 1433-43.
- 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*. 2009. *Cell Microbiol.* 11: 370-80.
- Kraus PR, Fox DS, Cox GM, Heitman J. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol Microbiol.* 2003; 48: 1377-87.

- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes Tremellomycetidae). *Taxon* 2002; 51: 804-806.
- La Cour T, Kiemer L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*, 2004; 17(6):527-36.
- Lin X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, Infection and Evolution. *Infection, Genet Evol* 2009; 9: 401-16.
- 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
- Lin, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol*, 2009; 9: 401-16.
- Liu T-B, Wang Y, Stukes S, Chen Q, Casadevall A, Xue C. The F-Box protein Fbp1 regulates sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2011;10: 791–802.
- López-Berges MS, Hera C, Sulyok M, Schäfer K, Capilla J, Guarro J, Di Pietro A. The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol Microbiol*. 2013; 87:49-65.
- Ma, H.; May, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol*, 2009; 67: 131-90.
- MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, Kronstad JW, Morshed MG, Bartlett KH. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis*. 2007;13: 42-50.
- McClelland EE, Hobbs LM, Rivera J, Casadevall A, Potts WK, Smith JM, Ory JJ. The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. 2013; 8(5).
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*. 2009; 47: 561-70.
- Mitchell DH, Sorrell TC, Allworth AM, Heath CH, McGregor AR, Papanoum K,

- Richards MJ, Gottlieb T. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin Infect Dis*. 1995; 20: 611-6.
- Molnar-Nadasdy G, Haesly I, Reed J, Altshuler G. Placental cryptococcosis in a mother with systemic lupus erythematosus. *Arch Pathol Lab Med*. 1994;118: 757-9.
- Morrow CA, Fraser JA Is the Nickel-Dependent Urease Complex of *Cryptococcus* the Pathogen's Achilles' Heel? *Molecular Biology*. 2013; 4: 4–6.
- Neilson, J. B.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S. Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: decreased survival in vivo. *Mycopathologia*, 1981. v. 73, n. 1, p. 57-9.
- Ni M, Yu JH. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*. 2007; 3: e970.
- Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, Bezerra CC, Pérez MA, Cardarelli P, Wanke B. *J Clin Microbiology*. 2003; 41(1): 73-77.
- Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamatheven J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA, Allen JE, Bosdet IE, Brent MR, Chiu R, Doering TL, Donlin MJ, D'Souza CA, Fox DS, Grinberg V, Fu J, Fukushima M, Haas BJ, Huang JC, Janbon G, Jones SJ, Koo HL, Krzywinski MI, Kwon-Chung JK, Lengeler KB, Maiti R, Marra MA, Marra RE, Mathewson CA, Mitchell TG, Perteza M, Riggs FR, Salzberg SL, Schein JE, Shvartsbeyn A, Shin H, Shumway M, Specht CA, Suh BB, Tenney A, Utterback TR, Wickes BL, Wortman JR, Wye NH, Kronstad JW, Lodge JK, Heitman J, Davis RW, Fraser CM, Hyman RW. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*. 2005; 307: 5713:1321-4.
- O' Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* Capsule : a Sword and a Shield. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25: 387–408.
- Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO Journal*. 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.

- Pappas PG. Therapy of Cryptococcal Meningitis in non-HIV-infected Patients. *Curr Infect Dis Rep.* 2001; 3: 365-70.
- Park HS, 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.
- Park HS, Nam TY, Han KH, Kim SC, Yu JH. VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One.* 2014; 9: e89883. doi:10.1371/journal.pone.0089883. eCollection 2014.
- Peconick, LDF. Caracterização Molecular e Funcional do gene VOSA em *Cryptococcus neoformans*. Dissertação, 2013. Faculdade de Ceilândia, UnB.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis.* 2010; 50(3):291-322
- 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.
- Pukkila-Worley R, Gerrald QD, Kraus PR, Boily MJ, Davis MJ, Giles SS, Cox GM, Heitman J, Alspaugh JA. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(1):190-201.
- Rapp RP. Changing strategies for the management of invasive fungal infections. *Pharmacotherapy.* 2004; 24: 4S-28S; quiz 29S-32S.
- 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: 1180-5.
- 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(2): 237-46.
- Santos, TC. Caracterização Funcional dos Genes Velvet VEA e VELC no Fungo Patogênico Humano *Cryptococcus neoformans*. Dissertação, 2014. Faculdade de Ceilândia, UnB.

- Santos WR, Meyer W, Wanke B, Costa SP, Trilles L, Nascimento JL, Medeiros R, Morales BP, Bezerra Cde C, Macêdo RC, Ferreira SO, Barbosa GG, Perez MA, Nishikawa MM, Lazéra Mdos S. Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 2008; 103: 813-8.
- Schafmeier T, Diernfellner AC. Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Lett*. 2011; 585(10):1467-73.
- Seaton RA, Verma N, Naraqi S, Wembri JP, Warrell DA. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans var. gattii* meningitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997; 91(1): 44-9.
- Shen WC, Davidson RC, Cox GM, Heintman J. Pheromones stimulate mating and differentiation via paracrine and autocrine signaling in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2002; 1(3): 366-77.
- Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, Wilson C, Larsen M, Boadle R, Williamson PR, Djordjevic JT. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *J Biol Chem*. 2007; 282: 37508-14.
- Sidrim JJ, Costa AK, Cordeiro RA, Brilhante RS, Moura FE, Castelo-Branco DS, Neto MP, Rocha MF. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can J Microbiol*. 2010; 56: 445-58.
- Singh A, Panting RJ, Varma A, Saijo T, Waldron KJ, Jong A, Ngamskulrungrroj P, Chang YC, Rutherford JC, Kwon-Chung KJ. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*. 2013;4: e00220-13.
- Springer, D. J.; Chatuverdi, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis*, 2010; 16: 14-20.
- Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Stephanie D, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun*, 2003;71: 4862–72.
- Trilles L, Lazéra Mdos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103: 455-62.
- Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gacser A, Goldman DL. A rat model

- of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Mycopathologia*. 2011; 172(3):169-78.
- 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(3):230-7.
- Vecchiarelli A, Pietrella D, Lupo P, Bistoni F, Mcfadden DC, Casadevall A. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *J Leukoc Biol*. 2003;74:370–8.
- Voelz, K; May RC. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot Cell*. 2010;9:835–46.
- Walton FJ, Heitman J, Idnurm A. Conserved elements of the RAM signaling pathway establish cell polarity in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* in a divergent fashion from other fungi. *Mol Biol Cell*. 2006; 17(9):3768-80.
- Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action. *Infect Immun*, 1995; 62: 3131-6.
- Webster RH, Sil A. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:14573-8
- Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the a-mating type. *Microbiology*. 1996;93:7327–31.
- 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.
- Yang Q, Chen Y, Ma Z. Involvement of BcVeA and BcVeIB in regulating conidiation pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet Biol*. 2013; 50:63-71.
- Yu JH. Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol* 2010; 38: 229-37.
- Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 2009;68:133-216.

Zaragoza, O. Multiple Disguises for the Same Party: The Concepts of Morphogenesis and Phenotypic Variations in *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol*, 2011; 2: 181.