



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Aspectos Epigenéticos da Virulência em  
*Cryptococcus neoformans*: Papel das Histonas  
Desacetilases.

Doutoranda: Fabiana Brandão Alves Silva

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Co-orientador no estágio sanduíche: Dr. Andrew Alspaugh

Brasília, 27 de abril de 2016.

Brasil.

**FABIANA BRANDÃO ALVES SILVA**

---

Aspectos Epigenéticos da Virulência em  
*Cryptococcus neoformans*: Papel das Histonas  
Desacetilases.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília  
2016

Trabalho desenvolvido Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília – UnB e na Universidade Duke, EUA.

Este trabalho recebeu apoio financeiro dos órgãos CNPq, INCT Nanobiotecnologia, CAPES e FAP-DF.

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Co-orientador no estágio sanduíche: Dr. Andrew Alspaugh.

*“ Failures, repeated failures, are finger posts on the road to achievement. One fails forward toward success.”*  
C. S. Lewis

*“There can never be any real opposition between religion and science; for the one is the complement of the other. Every serious and reflective person realizes, I think, that the religious element in his nature must be recognized and cultivated if all the powers of the human soul are to act together in perfect balance and harmony. And indeed it was not by accident that the greatest thinkers of all ages were deeply religious souls.”*

*—Max Planck, the Nobel Prize winning physicist who made the crucial scientific contribution of founding quantum physics.*

## Agradecimentos

**Meu primeiro agradecimento, o mais importante e indubitavelmente o mais justo, é a DEUS, obrigada por me orientar pela vida.**

*"Oceans (Where Feet May Fail)"*

*You call me out upon the waters  
The great unknown where feet may fail  
And there I find You in the mystery  
In oceans deep  
My faith will stand*

*And I will call upon Your name  
And keep my eyes above the waves  
When oceans rise  
My soul will rest in Your embrace  
For I am Yours and You are mine*

*Your grace abounds in deepest waters  
Your sovereign hand  
Will be my guide  
Where feet may fail and fear surrounds me  
You've never failed and You won't start now*

*So I will call upon Your name  
And keep my eyes above the waves  
When oceans rise  
My soul will rest in Your embrace  
For I am Yours and You are mine*

*Spirit lead me where my trust is without borders  
Let me walk upon the waters  
Wherever You would call me  
Take me deeper than my feet could ever wander  
And my faith will be made stronger  
In the presence of my Savior*

*Oh, Jesus, you're my God!  
I will call upon Your name  
Keep my eyes above the waves  
My soul will rest in Your embrace  
I am Yours and You are mine.*

*(Hillsong United)*

Quero dizer obrigada aos meus pais: Fábio Wladimir Alves Silva e Gladys Brandão Alves Silva, eu tenho tanto orgulho de vocês! Obrigada por me ensinar a ser honesta e trabalhadora. Meu pai me ensinou a amar a DEUS e olhar a vida sem medo. A minha mãe é a mulher mais generosa e guerreira que conheço, nos ensinou sempre a

estender a mão a quem precisa. Meus pais criaram os quatro filhos com decência e honestidade, eles nos ensinaram a batalhar pelas coisas e a sermos sempre gratos pelo que conquistamos. Amo vocês, meus exemplos!

Agradeço à minha avó Gercila Queiroz Brandão, minha segunda mãe, o maior exemplo de humildade e fé na minha vida, sempre acreditou em mim. Vovó, você me ensinou a ser sábia e humilde, a ter sempre gratidão no coração, te amo vovó Cila!

A uma pessoa do mais alto valor em minha vida, amiga fiel, Samyra Caxito. Obrigada por tudo que você é e por fazer parte em minha vida, me ensinando e me dando suporte nos momentos mais difíceis. Sem você esta jornada teria sido muito, muito difícil.

À minha Tia avó Gildete Queiroz Brandão, sempre generosa, batalhadora, correta em tudo que faz, sempre se preocupando com o próximo. Tia Dete, se hoje sou o que sou, devo muito a senhora por investir e acreditar em mim. Te amo. Obrigada também a querida tia Jandira, um exemplo de mulher.

Aos meus irmãos: Mariana, Anna e Raul, tenho tanto orgulho de vocês quanto sei que vocês têm por mim. Vocês se tronaram tão fortes e honestos, guerreiros, amo vocês! Obrigada pelos melhores presentes que vocês poderiam me dar, meus sobrinhos: Alan, Joseph, Giovana e Gustavo. Saibam meus amores que vocês são também meus filhos, a vida de vocês alegre a minha todos os dias.

À minha tia Viviane Pereira Aguiar, por ser esta pessoa linda e forte que você é! Obrigada por ser parte da nossa família e nos dar sempre seu melhor. Obrigada pelos dois amores que você nos deu: Victor Matheus (meu afilhado) e Maria Cecília.

Ao meu orientador nos Estados Unidos da América, Dr. Andrew Alspaugh, sem você esta jornada não teria sido completa; sem você este sonho teria sido um tanto quanto pequeno comparado ao que se tornou:

*Captain... my Captain...*

*Thank you for teaching me to be a scientist more mature, smarter, braver, and for teaching me self-confidence. You are much more important in my life that I can say here. I'm so blessed for having met you! I was looking for an example to follow, now I got it: you are my example! One day I want to be like you: Humble and smart, strong and gentle. As you, I want to be able to conquer the ability to make the things simpler for understanding. Thank you for trusting in me!*

*Also, I want to thank my group in USA: Kyla Ots, Shannon Esher, Kaila Pionalto, Connie Nichols and Sandra... For receiving me with so affection and for teaching me so many important things; especially by bearing my jokes and my peculiar accent. You made my journey much easier and glad.*

Ao meu orientador no Brasil, Dr. Marcio Poças, um pesquisador sério, comprometido com a ciência e possuidor de uma inteligência admirável! Obrigada por me receber em seu grupo e ter me dado todo suporte. Obrigada também por compartilhar seus conhecimentos e especialmente pelos bons momentos nos EUA.

À Dra. Lorena Derengowski por todo apoio e discussões na primeira fase deste trabalho, você é uma excelente co-orientadora, eu pude aprender muito com você!

Aos amigos e bons conselheiros: Msc. Fernanda Guilheumelli, Msc. Marco Oliveira, Dra. Patrícia Nicola, Larissa Bittencourt, Msc. Nathália Vilela, Dr. Daniel Agostinho, Dra. Calliandra, Dr. André Nicola; por todas as discussões e conselhos, vocês são incríveis, fizeram a diferença!

A querida profa. Dra. Ildinete Silva Pereira, um exemplo de pessoa e de pesquisadora, por todo suporte e ajuda concedidos. Seja sempre, professora, essa profissional carinhosa e dedicada que és; sua postura, bem como a maneira respeitosa e alegre com os quais você lida com seus alunos, incentiva e melhora o ambiente de trabalho.

Ao laboratório de Biologia Molecular: Thompson Tomatieli, Sra. Fátima, Dona Sra. Ivonilde, Sra. Ivone, Dr. Tulio, Dra. Viviane,

Aos professores: Dra. Anamélia Bocca, Dra. Cynthia Kyaw, Dra. Larissa Matos, Dr. Aldo Tavares, Dra. Lídia Pepe, Dra. Janice de Marco, Dra. Izabel Silva, por todo suporte e conselhos.

Aos amigos, graças a DEUS por vocês: Renata Granjeiro, Ricardo Camargo, Geraldo Henrique, Jorge Souto, Derek Moreira, Jussara Cavalcante, Jaqueline Bueno, Leonardo Ângelo e a sempre amiga e primeira orientadora Dra. Alessandra Xavier. Vocês sempre torceram e me apoiaram nos momentos em que mais precisei de ajuda, obrigada.

Aos meus queridos Marcilio Caxito, Rosimere Caxito, Renan e Káthira Caxito, obrigada pelo carinho, apoio e tantos bons momentos, amo vocês!

## RESUMO

---

Os genes de histonas desacetilases (HDAC) são altamente conservados entre diferentes espécies e dirigem importantes processos epigenéticos na manutenção da estrutura e funcionamento do genoma. Entretanto, o papel das HDAC na regulação dos traços de virulência de patógenos permanece pobremente explorado. O fungo patogênico em humanos *Cryptococcus neoformans* passa por mudanças fenotípicas que promovem persistência e sobrevivência dentro do hospedeiro ou em nichos ecológicos. Tais mudanças estão associadas à regulação diferencial da expressão gênica. Neste contexto, inicialmente foi avaliado o efeito de dois inibidores químicos de histona desacetilases (HDACi), o butirato de sódio (NaBut) e a tricostatina A (TSA), sobre as células de *C. neoformans*. Os resultados demonstraram que ambos os inibidores foram capazes de afetar os principais traços de virulência de *C. neoformans*. Em seguida, foram identificados e deletados 8 genes de HDAC de Classe I e Classe II em *C. neoformans*. A maioria dos processos previamente associados à virulência em *C. neoformans* foi afetada pelo tratamento com HDACi e/ou pela deleção de genes: a capacidade de crescimento a 37 – 39 °C, a formação da cápsula polissacarídica, a produção de melanina, as atividades de fosfolipase e de proteases, a formação de hifas de acasalamento e a integridade da parede celular. Os mutantes de HDAC também mostraram defeitos na sobrevivência intracelular quando co-cultivados com macrófagos murinos, assim como virulência comprometida nos modelos de infecção de *Galleria mellonella* e camundongos. A histona desacetilase Clr3 foi apontada como um importante regulador da virulência em *C. neoformans*. A linhagem de *C. neoformans clr3Δ* mutante mostrou-se hipovirulenta em ambos os modelos de criptococose animal. Outrossim, a análise de RNA-seq indicou que a proteína Clr3 regula a expressão de vários genes importantes para a adaptação e sobrevivência de *C. neoformans* ao ambiente hospedeiro. Os resultados indicam que a remodelação da cromatina, por meio das conservadas HDAC, é um importante mecanismo envolvido na virulência de *C. neoformans*.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus neoformans*, regulação epigenética, histona desacetilases, inibidores de histonas desacetilases, virulência.

## ABSTRACT

---

Histone Deacetylase (HDAC) genes are highly conserved among different species, directing one of the most important epigenetic processes regulating gene expression – chromatin remodeling. However, the role of HDACs in the regulation of virulence traits in pathogens remains poorly explored. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* undergoes phenotypic changes to promote persistence and survival inside the host or in specific ecological niches. Very likely, these changes are associated with epigenetic regulation. In this context, we initially evaluated the effect of two chemical inhibitors of histone deacetylases (HDACi): Sodium butyrate (NaBut) and Trichostatin A (TSA). The results showed that both were able to impair the expression of the main virulence traits of *C. neoformans*. Based on these data, we identified and deleted eight genes encoding predicted class I/II HDACs in *C. neoformans*. In this way, we predicted that we would be able to assign specific function to each HDAC, especially in regards to virulence trait expression. Phenotypes of specific HDAC mutant strains indicate that individual proteins control non-identical but overlapping cellular processes associated with virulence. In the other hand, for some genes we also have observed an opposite regulation. Most processes previously related to virulence in *C. neoformans* were affected here, such as thermotolerance (growth at 37-39 °C); capsule, melanin and protease formation; and cell wall integrity. Additionally, defects in mating and hyphal development were observed for the *clr3Δ* HDAC mutant strain. HDAC mutants also displayed defects in intracellular survival when co-cultured with activated macrophages, a finding highly correlated with altered virulence in vivo. Also, we tested the virulence in *Galleria mellonella* and mice. Overall our results support that the Clr3 histone deacetylase is a newly identified regulator of fungal virulence. The corresponding mutant was hypovirulent in both animal models of cryptococcosis. Furthermore transcriptional profiling shows that the Clr3 protein regulates the expression of many genes that are important for the adaptation of *C. neoformans* for survival inside the host. Our work displays that chromatin remodeling by the conserved histone deacetylases is an important mechanism behind the virulence of *C. neoformans*.

**Keyword:** *Cryptococcus neoformans*, histone deacetylase, epigenetic regulation, histone deacetylase inhibitors, Virulence.

## Lista de Abreviaturas e Glossário

**ART** – *Antiretroviral therapy*

**DMSO** –Dimethyl Sulfoxide. Forte solvente orgânico

**Fold Change** – Expressão relativa do gene alvo em relação ao controle do experimento.

**g**- Aceleração da gravidade

**HAT** – Histona Acetiltransferase

**HDAC** – Histona desacetilase

**HDACi** – Inibidor de histona desacetilase

**HIV** – Human immunodeficiency virus

**L-Dopa** - L-3,4-dihydroxyphenylalanine

**MAT** – *Mating type locus*

**MOI** - *Multiplicity of infection*

**mRNA** – RNA mensageiro

**PBS** -Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato).

**PMA** - *Phorbol Myristate Acetate*

**Rpm** – Rotação por minute

**RT-PCR** – Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Estimativa global da incidência de criptococose .....	<b>20</b>
<b>Figura 2</b> Ciclo infeccioso do <i>Cryptococcus</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 3</b> Exemplo de fenótipos associados à virulência em <i>C. neoformans</i> .....	<b>27</b>
<b>Figura 4</b> Arvore filogenética das sequencias de HDAC em Eucariotos.....	<b>30</b>
<b>Figura 5</b> Dendograma representando a relação filogênica entre as HDACs de leveduras e humanos .....	<b>31</b>
<b>Figura 6</b> Organização dos domínios das HDAC classe I e II em leveduras e humanos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 7</b> Relação Filogenética entre Hos2, Rpd3 e suas proteínas homologas.....	<b>34</b>
<b>Figura 8</b> Inibidores de HDAC .....	<b>38</b>
<b>Figura 9</b> Classes de HDAC sobre as quais os inibidores atuam.....	<b>39</b>
<b>Figura 10</b> Efeito dose dependente dos inibidores de HDAC sobre crescimento de <i>C. neoformans</i> linhagem H99 .....	<b>50</b>
<b>Figura 11</b> As células de <i>C. neoformans</i> permanecem viáveis após tratamento com HDACi.....	<b>52</b>
<b>Figura 12</b> O tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> é reduzido pelos inibidores de HDAC.....	<b>54</b>
<b>Figura 13</b> O tamanho das células de <i>C. neoformans</i> é alterado pelos HDACi.....	<b>55</b>
<b>Figura 14</b> O efeito dos HDACi sobre a atividade de fosfolipase .....	<b>56</b>
<b>Figura 15</b> HDACi não afetaram a atividade de urease .....	<b>57</b>
<b>Figura 16</b> Efeito dose-dependente dos HDACi na formação de hifas de acasalamento em <i>C.neoformans</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 17</b> A produção de melanina por <i>C. neoformans</i> é afetada pelos HDACi .....	<b>60</b>
<b>Figura 18</b> NaBut provoca aumento na população de células de <i>C. neoformans</i> em G2 /M .....	<b>61</b>
<b>Figura 19</b> <i>C. neoformans</i> recupera a virulência <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> após remoção dos HDACi.....	<b>62</b>
<b>Figura 20</b> Diagrama esquemático do double-joint PCR com seletivo marcador dominante e transformação por biobalística para deleção de gene em <i>C. neoformans</i> ..	<b>79</b>
<b>Figura 21</b> Dendograma representando a relação entre as HDACs de três especies de fungos .....	<b>89</b>
<b>Figura 22</b> Análise por PCR em tempo real dos níveis dos transcritos dos genes de HDAC em <i>C.neoformans</i> .....	<b>90</b>
<b>Figura 23</b> Os genes de HDAC são requeridos para crescimento em certas condições de estresse.....	<b>91</b>
<b>Figura 24</b> HDACs atuam diferentemente sobre a expansão da cápsula.....	<b>93</b>
<b>Figura 25</b> Os mutantes <i>clr3Δ</i> e <i>hos2Δ</i> apresentaram atraso na produção de melanina .	<b>94</b>
<b>Figura 26</b> Os mutantes de HDAC não tiveram a produção de urease afetada .....	<b>95</b>
<b>Figura 27</b> O gene <i>CLR3</i> é requerido para correta formação de hifas de acasalamento.	<b>97</b>
<b>Figura 28</b> Atividade de protease nos mutantes de HDAC.....	<b>99</b>
<b>Figura 29</b> Os duplos-mutantes apresentaram maior defeito na expansão da cápsula..	<b>100</b>
<b>Figura 30</b> O efeito dos HDACi sobre o crescimento dos mutantes de HDAC .....	<b>102</b>
<b>Figura 31</b> O papel das HDAC na sobrevivida em macrófagos.....	<b>103</b>
<b>Figura 32</b> Os genes <i>HOS2</i> e <i>RPD3</i> são importantes para virulência em <i>G. mellonella</i> .....	<b>105</b>
<b>Figura 33</b> A mutação <i>clr3Δ</i> atenua a virulência em <i>G. mellonella</i> .....	<b>108</b>
<b>Figura 34</b> Efeito da mutação <i>clr3Δ</i> na virulência em camundongos após 7 dias .....	<b>109</b>
<b>Figura 35</b> Efeito da mutação <i>clr3Δ</i> na virulência em camundongos após 14 dias .....	<b>110</b>

<b>Figura 36</b> A mutação <i>clr3Δ</i> atenua a virulência em modelos murinos de criptococose .....	<b>111</b>
<b>Figura 37</b> O mutante <i>clr3Δ</i> apresentou aumento da população de células em G2/M. <b>112</b>	
<b>Figura 38</b> Esquema representando o modelo proposto para o papel das HDAC sobre os fenótipos de virulência de <i>C. neoformans</i> .....	<b>142</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Inibidores de HDAC em fase de desenvolvimento clínico.....	<b>37</b>
<b>Tabela 2</b> Locus gênicos analisados neste estudo .....	<b>70</b>
<b>Tabela 3</b> Linhagens de <i>C. neoformans</i> usadas neste estudo .....	<b>71</b>
<b>Tabela 4</b> Oligonucleotídeos usados para RT-PCR dos transcritos dos genes de HDAC em <i>C. neoformans</i> .....	<b>73</b>
<b>Tabela 5</b> Lista de oligonucleotídeos usados neste estudo.....	<b>78</b>
<b>Tabela 6</b> Correlação da expressão de genes envolvidos na virulência em <i>C. neoformans</i> entre o mutante <i>clr3Δ</i> e a linhagem selvagem. ....	<b>115</b>
<b>Tabela 7</b> Genes regulados negativamente no mutante <i>clr3Δ</i> com fold change $\leq -1$ ....	<b>117</b>
<b>Tabela 8</b> Genes regulados positivamente no mutante <i>clr3Δ</i> com fold change $\geq 1$ .....	<b>126</b>
<b>Tabela 9</b> Correlação dos fenótipos testados na presença dos HDACi e o mutante <i>clr3Δ</i> .....	<b>143</b>

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	19
1.1.2 Atributos de Virulência.....	23
1.1.2.1 Termotolerância.....	24
1.1.2.2. Cápsula polisacarídica.....	24
1.1.2.3. Melanina.....	25
1.1.2.4. Fosfolipases.....	25
1.1.2.5. Urease.....	26
1.1.2.6. Acasalamento.....	26
1.2 Histonas Desacetilases (HDAC).....	28
1.2.1 HDAC em fungos.....	33
1.2.2 Inibidores de histonas desacetilases (HDACi).....	36
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO 1: EFEITO DOS INIBIDORES DE HDAC: TRICOSTATINA A E BUTIRATO DE SÓDIO SOBRE OS PRINCIPAIS FENÓTIPOS DE VIRULÊNCIA DO FUNGO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1 Linhagens, condições de crescimento e preparo das drogas.....	44
4.2 Curvas de crescimento.....	44
4.3 Indução da Cápsula.....	45
4.4 Análise da expansão da cápsula.....	45
4.5 Análise do tamanho das células por Citometria de fluxo.....	45
4.6 Detecção da atividade de Fosfolipases.....	46
4.7 Ensaio de acasalamento.....	46
4.8 Ensaio de melanização.....	47
4.9 Análise do Ciclo Celular.....	47
4.10 Teste de virulência em <i>Galleria mellonella</i> .....	47
4.11 Análises estatísticas.....	48
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
5.1 Os inibidores de histona desacetilases interferem no crescimento de <i>C. neoformans</i> .....	49
5.2 HDACi não afetam a viabilidade celular.....	51

5.3 Efeito dos inibidores de histona desacetilase sobre a expansão da cápsula e o tamanho celular. ....	53
5.4 Os inibidores de HDAC afetam a atividade de fosfolipase .....	55
5.5 HDACi não afetaram a atividade de urease. ....	57
5.6 Inibidores de histonas desacetilase interferem na formação das hifas de acasalamento. ....	57
5.7 Efeito dos HDACi sobre a produção de melanina. ....	59
5.8 NaBut aumenta a população de células na fase G2 / M do ciclo celular. ....	60
5.9 A capacidade de expansão da cápsula e a virulência são restauradas após a remoção dos HDACi .....	61
<b>6. Discussão.....</b>	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO 2: ESTUDO DO PAPEL DOS GENES DE HDAC CLASSE I E II SOBRE A VIRULÊNCIA DO FUNGO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>7. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
7.1 Linhagens, meios de cultura e condições de crescimento:.....	70
7.2 Macrófagos murinos J774.1.....	71
7.3 Análise da homologia entre as proteínas HDAC classes I e II. ....	72
7.4 Extração de RNA e RT-qPCR .....	72
7.5 Técnicas de Biologia Molecular .....	74
7.6 Testes fenotípicos de crescimento .....	80
7.7 Indução da Cápsula.....	80
7.7.1 Análise da expansão da cápsula .....	80
7.8 Teste de melanização .....	81
7.9 Teste de acasalamento. ....	81
7.10 Avaliação da produção de urease.....	82
7.11 Avaliação da produção de proteases. ....	82
7.12 Teste de crescimento na presença dos HDACi (Tricostatina A e Butirato de Sódio).....	83
7.13 Teste de viabilidade em macrófagos.....	83
7.14 Teste de virulência em <i>Galleria mellonella</i> . ....	84
7.15 Teste de virulência em camundongos. ....	85
7.16 Análise histopatológica e de unidades formadoras de colônia (UFC) .....	85
7.17 Análise do Ciclo Celular.....	86
7.18 Sequenciamento do RNA (RNA-Seq) .....	86
7.19 Análises estatísticas .....	87
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>88</b>
8.1 <i>C. neoformans</i> possui oito genes de HDAC pertencentes às Classes I e II.....	88
8.2 Os genes de HDAC de <i>C. neoformans</i> são expressos sob condições de indução da cápsula. ....	90
8.3 Os genes de HDAC são requeridos para crescimento sob certas condições de estresse. ....	91

8.4 HDAC influenciam diferentemente a expansão da cápsula. ....	92
8.5 Os mutantes <i>clr3Δ</i> e <i>hos2Δ</i> apresentaram atraso na produção de melanina. ....	94
8.6 Os mutantes de HDAC não afetaram a produção de urease. ....	95
8.7 O gene <i>CLR3</i> é requerido para a correta formação de hifas de acasalamento. ....	96
8.8 Os genes <i>CLR3</i> e <i>HOS2</i> são importantes para atividade de proteases. ....	98
8.9 A combinação das deleções <i>clr3Δ/hos2Δ</i> e <i>clr3Δ/rpd3Δ</i> provocou drástica redução na expansão da cápsula. ....	100
8.10 O mutante <i>clr3Δ</i> apresentou maior resistência ao tratamento com TSA. ....	101
8.11 As HDAC regulam a sobrevivência em Macrófagos. ....	103
8.12 Os mutantes <i>hos2Δ</i> e <i>rpd3Δ</i> mostraram-se hipovirulentos em <i>G. mellonella</i> . ....	104
8.13 O gene <i>CLR3</i> é essencial para virulência de <i>C. neoformans</i> . ....	105
8.14 O gene <i>CLR3</i> está envolvido no ciclo celular de <i>C. neoformans</i> . ....	111
8.15 A HDAC Clr3 regula transcricionalmente genes requeridos para a adaptação no hospedeiro. ....	113
<b>9. DISCUSSÃO</b> .....	<b>127</b>
<b>10. CONCLUSÃO</b> .....	<b>138</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>144</b>
<b>12. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>149</b>

---

## *Introdução Geral*

---

# 1. INTRODUÇÃO

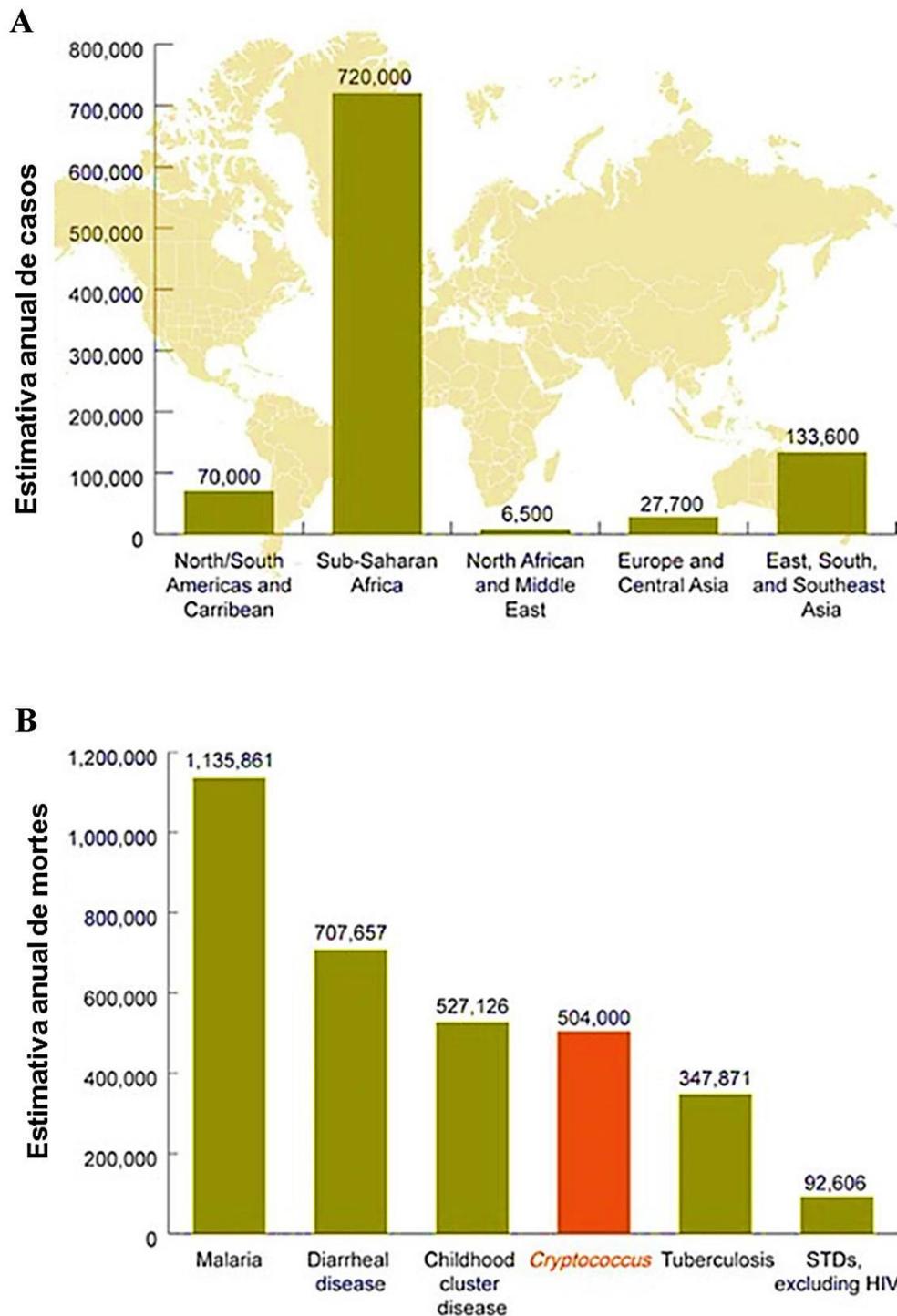
---

A habilidade de se adaptar às mudanças que ocorrem no ambiente, ou como resultado da interação com células hospedeiras, vem selecionando evolutivamente e garantindo a sobrevivência de muitos patógenos. As adaptações são reflexos de mudanças que ocorrem na expressão de genes e seus produtos, permitindo que alguns micro-organismos sobrevivam e se multipliquem mesmo em condições não favoráveis. Entender como essas mudanças ocorrem e como são reguladas no tempo/espaço é foco de inúmeros grupos de pesquisa em todo mundo. Neste contexto, cada vez mais estudos apontam para a importância da dinâmica da cromatina na regulação da expressão dos genes em resposta ao meio ambiente e suas constantes alterações.

A regulação da expressão de genes é um fértil e amplo campo de estudo que engloba diversos níveis de controle. Essa regulação envolve refinados mecanismos de controle, que atuam de forma orquestrada de modo a assegurar a correta expressão dos genes, refletindo em adaptações que permitem a sobrevivência, proliferação, morte celular programada e evolução. O termo epigenética refere-se a modificações que alteram os padrões de expressão gênica, herdáveis ao longo de sucessivas divisões mitóticas ou meióticas, não envolvendo alterações na sequência de bases do DNA. Os principais mecanismos epigenéticos envolvem a metilação de citosinas em ilhas CpG, e a metilação, acetilação, fosforilação, D-ribosilação, sumoilação e ubiquitinação de histonas, provocando a remodelação da cromatina, tornando-a mais acessível ou refratária à transcrição ( Jones & Takai, 2001; Jenuwein & Allis, 2001; Gal-Yam et al., 2008). Os mecanismos epigenéticos de regulação da expressão e herança em fungos patogênicos são pouco elucidados, em comparação a outros modelos, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa*. Uma metodologia bem empregada nos estudos de genes é a deleção de alvos supostamente relacionados à função em questão. Outro método empregado no estudo de função é o uso de compostos capazes de bloquear a atividade de produtos específicos dos genes alvos, como as enzimas. A combinação destes dois métodos de estudo pode ajudar a compreender uma possível relação entre a regulação epigenética, a plasticidade fenotípica e a virulência de fungos patogênicos, como o *Cryptococcus neoformans* que é de grande importância médica em todo mundo, bem como de sua interação com o hospedeiro.

## 1.1 *Cryptococcus neoformans*.

*C. neoformans* é um fungo oportunista que pode causar doenças sistêmicas e potencialmente fatais. É o agente etiológico da criptococose que acomete especialmente indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com HIV/AIDS, em quimioterapia contra o câncer ou que passaram por transplante de órgãos (Mitchell & Perfect, 1995). Embora o amplo acesso as terapias anti-retrovirais (ART) em países desenvolvidos venha ajudando a melhorar o sistema imune de pacientes com HIV, de modo que estes não se tornem vulneráveis a infecção por *C. neoformans*, a meningite criptocócica ainda é o maior problema em países subdesenvolvidos onde a AIDS prevalece. O basideomiceto *C. neoformans* é de grande importância médica e é globalmente distribuído (Kwon-Chung et al., 2002). Estima-se um total de 1 milhão de novas infecções e mais de 625.000 mortes anualmente (Park et al., 2009, 2014; Warkentien & Crum-Cianflone, 2010) (**Figura 1**). Nos pacientes que desenvolvem AIDS, condições neuropatológicas estão ainda presentes em aproximadamente 70% a 90% dos casos, sendo a meningite criptocócica a infecção fungíca mais comum no sistema nervoso central, e a terceira mais comum complicação neurológica nestes pacientes (Lin & Heitman, 2006). De acordo com dados do CDC (*Center for Disease Control and Prevention*, EUA) a maioria dos casos de meningite criptocócica ocorrem na África Subsaariana (**Figura 1A**), sendo a segunda maior causa de mortes em adultos, podendo matar mais pessoas por ano que a tuberculose (**Figura 1B**).



**Figura 1: Estimativa global da incidência de criptococose.** A) Média global de meningite criptocócica relacionada ao HIV. B) Causas de morte na África Subsaariana, excluindo HIV/AIDS. **Fonte:** <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html>

Este fungo é comumente encontrado na forma de uma levedura haplóide, que se reproduz predominantemente por brotamento. As células leveduriformes apresentam

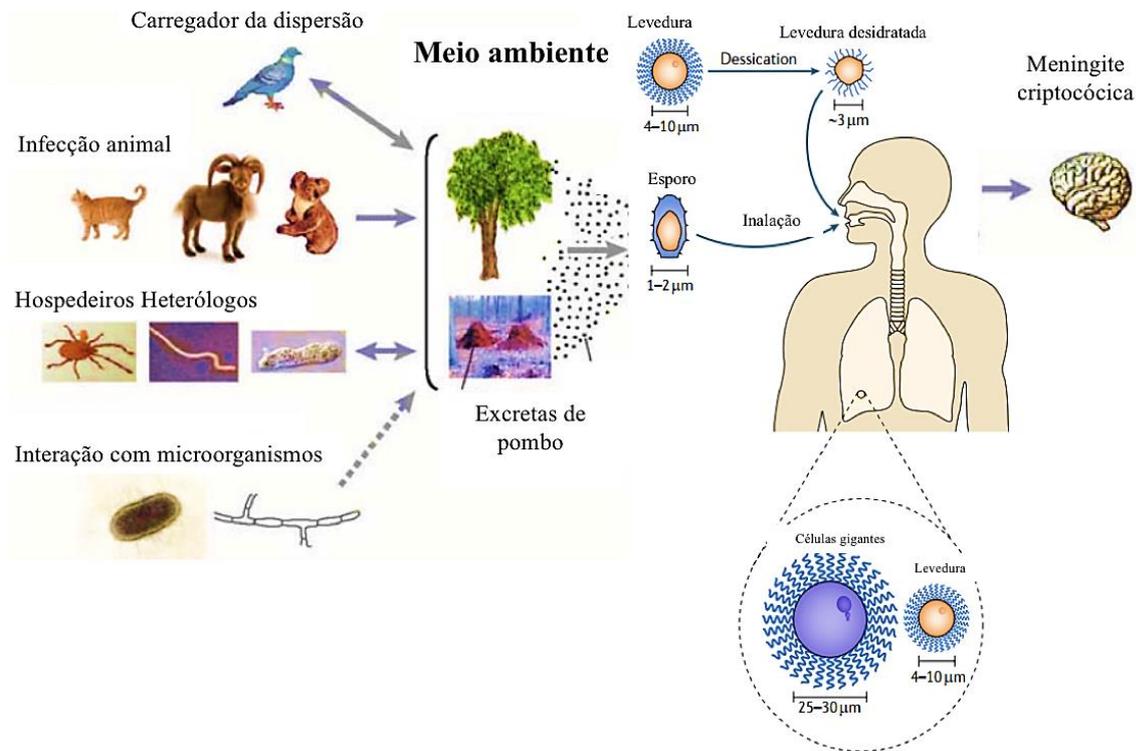
uma característica fenotípica peculiar ao complexo, que o distingue das demais leveduras de importância médica: a presença de uma estrutura composta por polissacarídeos em forma de cápsula que envolve toda a célula (Granger et al., 1985). *C. neoformans* pode também apresentar ciclo sexual (Kwon-Chung, 1975).

De acordo com a atual classificação taxonômica, baseada em propriedades imunogênicas da cápsula, bem como em análises filogenéticas, os complexos destas espécies correspondem a: *Cryptococcus neoformans* com sorotipos A, D e AD e *Cryptococcus gattii* com os sorotipos B e C (Kwon-Chung et al., 2002, Kwon-Chung & Varma, 2006). *C. neoformans* atualmente consiste de duas variedades: *C. neoformans* variedade *grubii* (Sorotipo A) (Bennett et al., 1978; Franzot et al., 1999) e *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo D) (Bennett et al., 1978). Mais recentemente, em 2015, o trabalho de Hagen e colaboradores propõe uma nova subdivisão do complexo das espécies *C. neoformans* / *C. gattii* em sete espécies, com base em outras análises filogênicas tomando 11 loci gênicos e diversos estudos de genotipagem. Hagen et al., 2015 propõem *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* como espécies separadas, e ainda dividem em 5 espécies o complexo *C. gattii*. Embora existam diferenças genéticas ou na virulência entre as variedades do complexo *C. neoformans*, que podem dar suporte a esta nova classificação proposta, o assunto ainda é bem recente e carece de maiores discussões.

*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A, é o mais prevalente, sendo a causa da vasta maioria (95%) das infecções ao redor do mundo e mais de 99% das infecções em pacientes com HIV (Casadevall & Perfect, 1998). *C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo D, é responsável por menos de 5% das infecções, todavia pode causar até 20 % das infecções clínicas na Europa, muitas destas relacionadas ao sorotipo híbrido AD, que são sabidamente mais patogênicos que o sorotipo D (Barchiesi et al., 2005; Tintelnot et al., 2004).

O fungo *C. neoformans* é cosmopolita de ampla distribuição mundial, tem sido isolado a partir de diversas fontes naturais como vegetais em decomposição, do solo e particularmente de excretas de aves, principalmente pombos, sendo os últimos uma das maiores fontes ambientais do fungo (Casadevall & Perfect 1998). A hipótese mais aceita para a infecção por *C. neoformans* é de que esta ocorre por via respiratória, pela inalação de esporos pelo hospedeiro, os quais podem atingir os alvéolos pulmonares onde são capazes de se proliferar (**Figura 2**). Uma vez presente no pulmão, os próximos

passos dependerão da resposta imunológica do hospedeiro, podendo a infecção tornar-se latente e patógeno será contido em granulomas, podendo, porém, mais tarde ser reativada ou evoluir para a forma aguda da doença (Perfect & Casadevall, 2002; Chayakulkeeree & Perfect, 2006).



**Figura 2: Ciclo infeccioso do *Cryptococcus*.** O fungo sobrevive no meio ambiente, presente no solo contaminado com excretas de aves e árvores. Aves, especialmente pombos, podem ser os propagadores do *Cryptococcus*. O fungo pode interagir com diferentes hospedeiros animais, bem como outros microorganismos. *Cryptococcus* podem também sobreviver a predadores tal qual insetos, vermes e amebas. O fungo pode ser contraído pela inalação de esporos ou leveduras desidratadas, e quando o hospedeiro se torna imunodeprimido, o fungo pode reativar a partir de formas latentes, presente no pulmão e invadir o sistema nervoso central (SNC) causando a doença. Adaptado de Lin & Heitman, 2006; Kronstad et al., 2011.

Embora *C. neoformans* se reproduza predominantemente por brotamento, o ciclo sexual tem sido reportado (Kwon-Chung, 1975; Kwon-Chung, 1976; Nielsen, et al., 2003). Uma hipótese para a ocorrência do ciclo sexual de forma geral, é que este tipo de reprodução promove variação genética por seleção natural, também facilita e promove o reparo ao dano no DNA ou promove diluição de mutações deletérias (Burt, 2000; Butlin, 2002; Nilsen & Heitman, 2007). *C. neoformans* possui um único lócus *MAT*

com dois alelos idiomórficos, **a** e **α**, que regula o ciclo sexual (Nielsen, et al., 2003). O acasalamento ocorre quando leveduras haplóides de alelos opostos **a** e **α** se fundem iniciando, deste modo, a transição dimórfica com formação de filamentos dicarióticos. O desenvolvimento dos filamentos leva à formação do basídio onde ocorre a meiose e produção de basidiósporos que podem ser prontamente aspirados (Kwon-Chung, 1975; Kwon-Chung, 1976). *C. neoformans* pode acasalar entre suas variedades, como cruzamento entre sorotipo A e D; ou até mesmo interespecies como sorotipos B x D - C x D, no entanto, a viabilidade dos basidiósporos é reduzida e varias progênies diplóides e aneuplóides são geradas (Lengeler et al., 2001).

O genoma das variedades de *C. neoformans* possui aproximadamente um tamanho de 20 Mb (*Megabase*) espalhados em 14 cromossomos (Loftus, 2005; Janbon et al., 2014). Recentes anotações para o genoma de *C. neoformans* sorotipo A linhagem H99, mostraram um genoma rico em *introns*, mais de 40.000 mil, presentes em 99.5% dos transcritos (Janbon et al., 2014). Uma particularidade deste organismo é a presença de RNAs denominados micelâneos, com variados tamanhos que podem sofrer *splice* e poliadenilação, embora não pareçam codificar para alguma proteína, não se descarta um possível papel na regulação da expressão de genes em *C. neoformans* (Janbon et al., 2014). De modo geral, foram preditos 6.962 genes que codificam proteínas, correspondendo a 85 % do genoma total, os outros 15% correspondem a centrômeros e regiões intergênicas. A transcrição em *C. neoformans*, em média 21% dos genes, ocorrer em ambos as fitas do DNA, em um arranjo já bem estabelecido como *tail-to-tail* (Janbon et al., 2014).

### **1.1.2 Atributos de Virulência**

Micro-organismos patogênicos vivem em um complexo relacionamento com o hospedeiro infectado. No início da infecção, o patógeno para sobreviver, precisa perceber o meio ambiente do hospedeiro e responder com adaptativas mudanças celulares. Essas mudanças incluem a indução de específicos fenótipos que permitem ao micro-organismo melhor sobreviver e proliferar dentro do novo ambiente (Buchanan & Murphy, 1998). Alguns destes atributos favorecem o patógeno a escapar do reconhecimento do hospedeiro (Casadevall et al., 2003).

Predominantemente crescendo no meio ambiente, *C. neoformans* não teve, ao longo de sua evolução, um relacionamento frequente com células do hospedeiro, portanto acredita-se muito provavelmente que este fungo tenha desenvolvido seus fenótipos relacionados à virulência, na sobrevivência no meio ambiente, ou na interação com hospedeiros não-humanos (Steenbergen et al., 2001). A diversidade de ambientes que este fungo vem experimentando, evolutivamente tem selecionado atributos que permitem a *C. neoformans* sobreviver e proliferar em diferentes ambientes, mesmo os mais inóspitos (Steenbergen et al., 2001; Alspaugh, 2014).

*C. neoformans* apresenta alta plasticidade fenotípica como o resultado de expressão diferencial de atributos de virulência (**Figura 3**), tais como a capacidade de crescer à 37 °C, a formação da cápsula, a produção de melanina, fosfolipases, proteases e ureases, além da capacidade de acasalamento e geração de esporos infecciosos, entre outros (Casadevall et al., 2003; Alspaugh, 2014).

#### 1.1.2.1 Termotolerância.

A termotolerância permite que o fungo *C. neoformans* possa crescer e proliferar em temperaturas entre 35–39 °C. Este atributo de virulência é que permite aos microorganismos crescerem dentro de hospedeiros mamíferos (Alspaugh et al., 2000; Perfect, 2006). A termotolerância envolve a expressão de diferentes genes, dentre os quais a calcineurina fosfatase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina e a proteína Ras1, uma vez que isolados mutantes incapazes de sintetizar tais proteínas mostraram sérios problemas de crescimento *in vitro* a 37 °C (Odom et al., 1997; Alspaugh et al., 2000). Linhagens mutantes com defeitos de crescimento à 37 °C tendem a serem hipovirulentas, sendo este um dos primeiros fenótipos avaliados no estudo de deleção de genes em *Cryptococcus*.

#### 1.1.2.2. Cápsula de polisacarídeo

A cápsula polissacarídica é uma das principais características de *C. neoformans*, podendo ser induzida em resposta a diversas condições associadas ao hospedeiro, tal qual: mudanças no pH (neutro/alcalino), elevados níveis de CO<sub>2</sub> e privação de ferro (Granger et al., 1985; Vartivarian et al., 1993). A formação da cápsula também requer a participação de vias metabólicas para fornecer energia e carboidratos precursores necessários a criação desta complexa estrutura (O’Meara & Alspaugh, 2012). A cápsula

protege a levedura da ação de células do sistema imune inato, inibindo a fagocitose por macrófagos (Bolanos & Mitchell, 1989, Levitz et al., 1989), células dendríticas (Vecchiarelli et al., 2003) e neutrófilos (Kozel et al., 1984). Essa é constituída por polissacarídeos antigênicos, tais como glicuronoxilomana (GXM), galactoxilomana (Galxm) e manoproteína (MP) (Fries et al., 1999). Consequentemente, as linhagens não encapsuladas são fagocitadas três vezes mais efetivamente (Bulmer et al., 1967). Isso demonstra a importância da cápsula para a virulência de *C. neoformans*, tornando-a um fator extensivamente estudado nesse fungo (Zaragoza et al., 2009).

#### 1.1.2.3. Melanina

A melanização foi descrita como fator de virulência em *C. neoformans*, uma vez que a perda deste atributo leva a uma virulência atenuada (Kwon-Chung et al., 1982; Salas et al., 1996; Nosanchuk et al., 2001; Rosas et al., 2000). A melanina é um polímero pigmentado de coloração preta ou marrom, hidrofóbico e com carga negativa, que protege as células fúngicas contra o estresse oxidativo (Wang & Casadevall, 1994; Wang et al., 1995), fagocitose, ação de antifúngicos e também modifica a resposta imune do hospedeiro (Gomez & Nosanchuk, 2003). A formação da melanina requer a ação de uma enzima fenol oxidase, identificada como lacase, que pode sintetizar melanina a partir de precursores como L- e D- Dopa, dopamina, epinefrina e norepinefrina (Williamson, 1994). *C. neoformans* apresenta dois genes descritos para lacase, *LAC1* e *LAC2*, ambos são induzidos por privação de glicose (Pukkila-Worley et al., 2005). *LAC1* é o principal responsável pela síntese de melanina, apresentando níveis de transcrito basal maiores. O gene *LAC2* é adjacente ao *LAC1* no genoma e apresenta 75% de identidade de nucleotídeos com *LAC1*, mutantes para o gene *LAC2* apresentaram apenas um modesto atraso na produção de melanina (Pukkila-Worley et al., 2005).

#### 1.1.2.4. Fosfolipases

Fosfolipases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam ligações éster em glicerofosfolipídios e deste modo, desestabilizam membranas, promovendo a lise celular e a liberação de lipídios como segundos mensageiros (Ghannoum, 2000; Schmiel and Miller, 1999). Ao menos duas enzimas com atividade fosfolipásica foram descritas como fatores de virulência em *C. neoformans*. A fosfolipase B (Plb) (Chen et

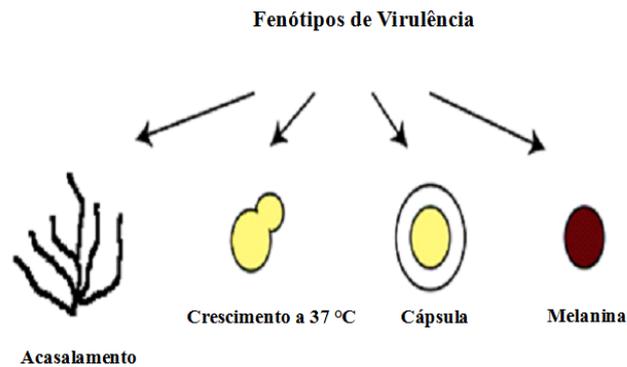
al., 1997) é importante para a sobrevivência e replicação das leveduras no interior de fagócitos e para a disseminação fúngica (Noverr et al., 2003). A fosfatidil-inositol fosfolipase C (Plc) auxilia na manutenção da morfologia celular e integridade da parede celular. A deleção do gene *PLBI* em *C. neoformans* drasticamente reduziu a sobrevivência das leveduras após ensaios com macrófagos, além de causar alterações morfológicas que resultaram em tamanho celular comparável as células Titãs (Cox et al., 2001; Evans et al., 2015).

#### 1.1.2.5. Urease

Outra importante enzima hidrolítica secretada por *C. neoformans* é a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e carbamato resultando em aumento do pH (Eaton et al., 1991). Mutantes para o gene *URE1* em *C. neoformans* causam, no modelo murino, menor taxa de mortalidade quando comparados aos animais infectados com o tipo selvagem (Cox et al., 2000). A produção de urease permite evasão das células hospedeiras e a difusão para o sistema nervoso central (Singh et al. 2013).

#### 1.1.2.6. Acasalamento.

Embora, a associação do acasalamento à virulência não seja claro, a grande maioria dos isolados clínicos são do tipo  $\alpha$  (Nielsen, et al., 2003). Linhagens  $\alpha$  de *C. neoformans* var. *grubii* também apresentaram maior tropismo pelo SNC durante co-infecção com linhagens congênicas do tipo **a** (Nielsen et al., 2005). Como foi dito anteriormente, as células haplóides de tipos de acasalamento opostos quando juntas, podem sofrer fusão e produzir filamentos dicarióticos. Estes últimos produzem o basídio onde meiose e fusão nuclear ocorrem, e longas cadeias de esporos infecciosos são produzidas (Kwon-Chung, 1975; Kwon-Chung 1976; Kwon-Chung KJ et al., 1992), podendo prontamente serem inalados e disseminados dependendo do organismo e do quadro imune do hospedeiro.



**Figura 3: Exemplo de fenótipos associados a virulência em *C. neoformans*.**

A expressão conjunta e orquestrada dos atributos de virulência em *C. neoformans* permite a adaptação do fungo a variados ambientes, mesmo os mais inóspitos, podendo a regulação ocorrer em diferentes níveis. Um exemplo claro de regulação da expressão dos genes que vem melhor sendo explorada na última década é a remodelação da cromatina, que resulta na regulação global da expressão de genes em resposta a mudanças que ocorrem no meio ambiente, ou meio extracelular, ou mesmo resultado da interação patógeno-hospedeiro (Cui et al., 2008; Lohse et al., 2010). Corroborando esta idéia, alguns poucos estudos com mutantes para os genes de histonas acetilases / desacetilases em *C. neoformans* levaram a defeitos de crescimento, desenvolvimento deficiente da cápsula e um acasalamento prejudicado (Liu et al., 2008; O'Meara et al., 2010; Haynes et al., 2011); tais dados sugerem que o remodelamento da cromatina exerça um importante papel na regulação dos atributos de virulência deste fungo. Nesta mesma linha de pensamento, outros trabalhos demonstraram que drogas que sabidamente são capazes de inibir atividades de enzimas que atuam na remodelagem da cromatina, como exemplo os inibidores de histonas desacetilases (HDACi), levaram ao comprometimento do crescimento, alterações na expressão de genes associados a sobrevivência e a virulência em diferentes espécies de fungos tais como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* ( Kar & Soll, 2001; Simonetti et al., 2007; Zacchi et al., 2010; Hnisz et al. 2010; Nguyen et al., 2011; Robbins et al. 2012).

## 1.2 Histonas Desacetilases (HDAC)

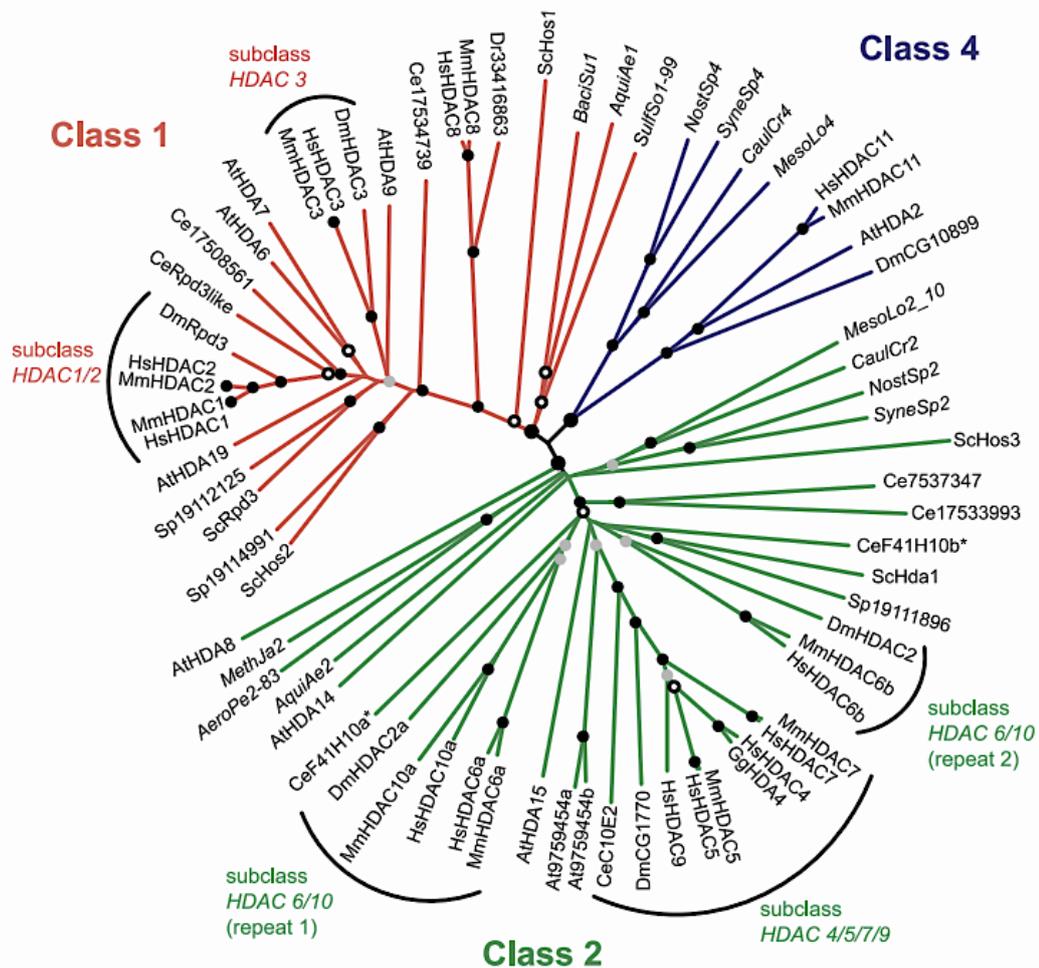
O DNA de células eucarióticas é compactado em torno de diferentes proteínas algumas destas são conhecidas como histonas, embora não sejam as únicas, para formar uma estrutura que denominamos cromatina (Kornberg, 1974; Chiu et al., 1975; Kornberg, 1977). A cromatina é bastante dinâmica, alterando entre estados condensado (Heterocromatina) ou descondensado (Eucromatina) (revisto por Kouzarides, 2007; Morrison & Shen, 2009). As histonas são proteínas altamente alcalinas, que sofrem importantes modificações reversíveis pós-traducionalmente. As alterações ocorrem nos resíduos de aminoácidos presentes nas caudas N- terminais das histonas, levando a uma série de mudanças no contexto celular. Essas alterações por sua vez geram o que conhecemos como marcadores epigenéticos ou um “código de histonas”, que governam a expressão dos genes (Jenuwein & Allis, 2001).

Uma dessas modificações é a acetilação de grupos de lisinas, inicialmente descoberta em proteínas histônicas. Esse processo é bastante dinâmico e regulado pela atividade de classes de enzimas com ações opostas. As histonas acetiltransferases (HATs) correspondem à classe que transferem grupos acetila ao N-terminal das histonas. Por outro lado, existe o complexo de histonas desacetilases (HDACs) que exercem função oposta removendo este grupo acetila da cauda das histonas (Bernstein et al., 2007; Smith & Denu, 2009).

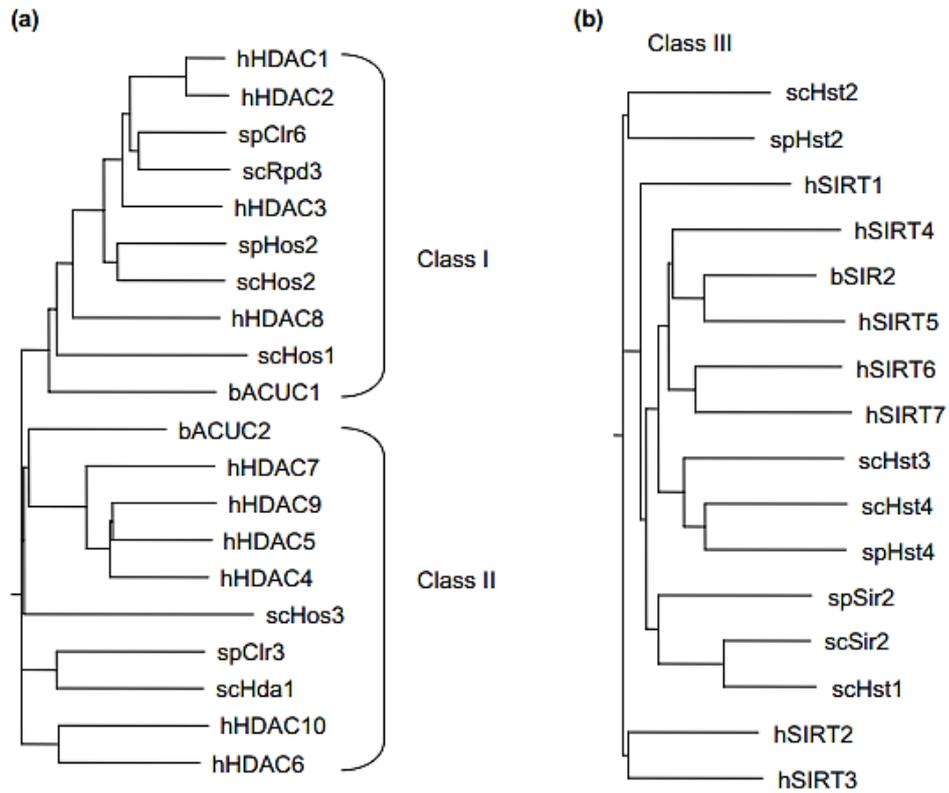
A alternância entre os estados acetilado/desacetilado das histonas geram mudanças na estrutura da cromatina, que se relacionam com a replicação e reparo do DNA, silenciamento e expressão de genes, além de progressão do ciclo celular (Bernstein et al., 2007). A acetilação é realizada pelas HATs que geram uma neutralização da carga positiva da cauda da histona diminuindo a afinidade dessas ao DNA, o qual possui carga negativa (Roth & Denu, 2001; Smith & Denu, 2009). Deste modo, acontece um relaxamento da cromatina permitindo que proteínas responsáveis pela remodelação e pelo reconhecimento de sítios específicos acetilados possam então ativar a transcrição (Sanchez & Zhou, 2009; Izzo & Schneider, 2010). Por outro lado, as HDACs removem os grupos acetila e são encontradas associadas a complexos co-repressores que ocasionam a compactação da cromatina (Minucci & Pelicci, 2006). Normalmente se aceita que acetilação levava a ativação da transcrição enquanto desacetilação levava à repressão. Entretanto, recentes estudos vêm mostrando que a

hiperacetilação pode levar não apenas ao aumento da expressão gênica, como também pode ter efeitos em sua repressão ou inativação, assim como regiões onde HDAC atuem, podem também apresentar transcrição (Duan et al., 2005; Rada-Iglesias et al., 2007).

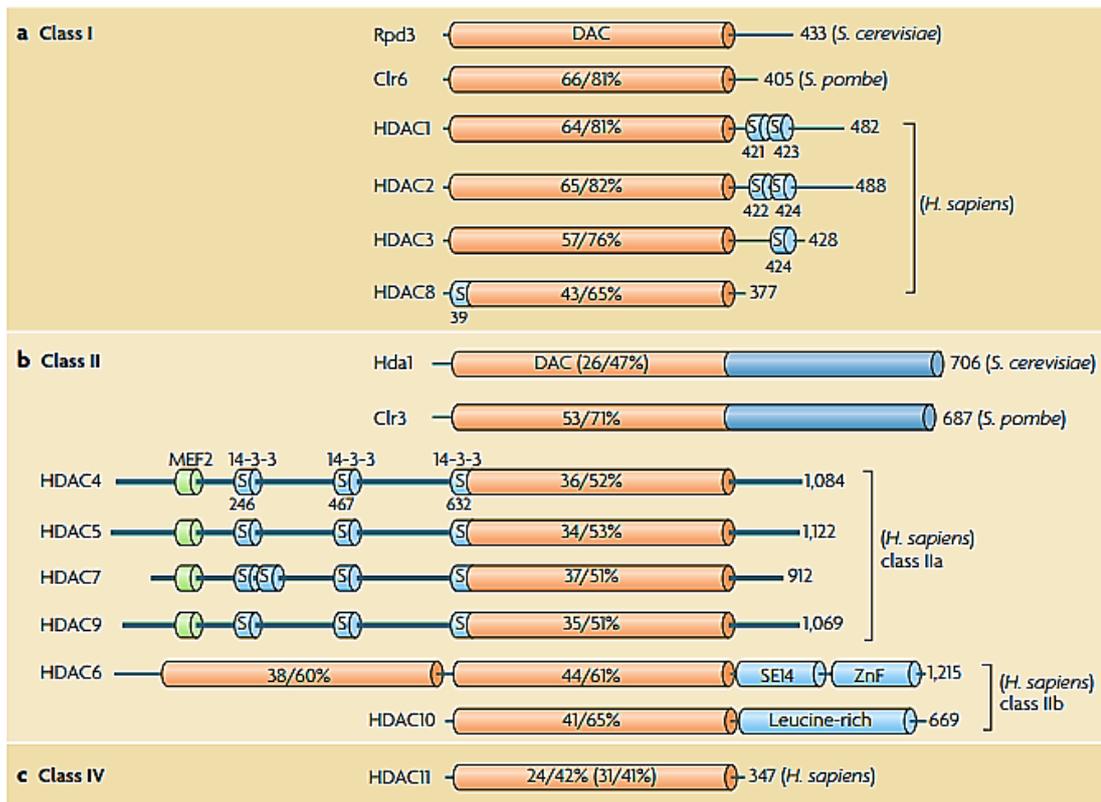
As HDACs fazem parte de uma família ancestral de enzimas bem conservadas, encontradas tanto em plantas, animais, fungos bem como em arqueas e bactérias (Leipe & Landsman, 1997) (**Figura 4**). Devido ao fato das HDACs serem bem conservadas, suas funções básicas vêm sendo estudadas em modelos de organismos como as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*. Estas duas espécies de leveduras são evolutivamente distantes, deste modo, abordagens comparativas que assumem alto grau de homologia, como acontece com as análises filogênicas das HDACs, permitem definir funções conservadas em eucarióticos. Em *S. cerevisiae* existem três HDACs pertencentes a classe I (Rpd3, Hos2 e Hos1) e duas HDACs classe II (Hda1 e Hos3), enquanto em *S. pombe* existem duas HDACs pertencentes a classe I (Clr6 e Hos2) e uma única HDAC classe II (Clr3) (Ekwall, 2005). As HDACs em mamíferos são classificadas filogeneticamente dentro de 4 classes principais de acordo com a similaridade de cada grupo presente na sua contraparte em leveduras (Gregoretto IV et al., 2004) (**Figura 4**). As classes I, II e IV são aquelas que dependem de zinco ( $Zn^{+2}$ ) para suas atividades de desacetilases. A classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8) está relacionada à Rpd3 em *S. cerevisiae*, e Clr6 em *S. pombe*. A classe II corresponde a Hda1 / Clr3, esta é dividida, em mamíferos, em duas subclasses: IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9) e IIb (HDAC6 e HDAC10) (Martin et al., 2007) (**Figura 5 - 6**). A classe IV (HDAC11) compartilha similaridades tanto com as HDAC de classe I quanto com as de classe II, sendo assim designada como classe distinta (Gregoretto IV et al., 2004). A classe III consiste de 1-7 sirtuínas que requerem  $NAD^+$  como co-fator, diferentemente das HDAC de classe I e II que tem um átomo de zinco ( $Zn^{+2}$ ) coordenando suas atividades (Tanner et al., 2000) (**Figura 5**).



**Figura 4: Arvore filogenética das sequências de HDAC em Eucariotos.** O conjunto de proteínas analisadas e seus números de acesso correspondentes são: *Arabidopsis thaliana*, AtHDA2 gi21105771, AtHDA6 gi15242626, AtHDA7 gi10176806, AtHDA8 gi18390898, AtHDA9 gi15230483, AtHDA14 gi18418220, AtHDA15 gi18401915, AtHDA19 gi2318131, At9759454; *Caenorhabditis elegans*, CeF41H10, gi17540334, CeRpd3like gi17561978, Ce17508561, Ce17534739, Ce10E2 gi17550310, Ce17537347, Ce17533993; *Danio rerio* Dr33416863; *Drosophila melanogaster*, DmCG10899 gi7301219, DmHDAC2 gi18860039, DmRpd3 gi7292522, DmHDAC3 gi7296744, DmCG1770 gi18860041; *Homo sapiens*, HsHDAC1 gi13128860, HsHDAC2, gi21411359, HsHDAC3 gi13128862, HsHDAC4 gi5174481, HsHDAC5 gi4885531, HsHDAC6 gi13128864, HsHDAC7 gi13259524, HsHDAC8 gi8923769, HsHDAC9 gi15590680, HsHDAC10 gi15213867 ou gi15213865, HsHDAC11 gi13376228; *Mus musculus*, MmHDAC1 gi6680193, MmHDAC2 gi6680195, MmHDAC3 gi12643653, MmHDAC5, gi6911182, MmHDAC6 gi20983042, MmHDAC7 gi20903371, MmHDAC8 gi20984875, MmHDAC10 gi20903151, MmHDAC11 gi20828622; *Saccharomyces cerevisiae*, ScRpd3 gi6323999, ScHos2 gi6321244, ScHos1 gi6325325, ScHda1, gi6324307, ScHos3 gi6325141; *Schizosaccharomyces pombe*, Sp19112125, Sp19114991, Sp19111896. Adaptado de Gregorreti, 2004.



**Figura 5: Dendrograma representando a relação filogenética entre as HDACs de leveduras e humanos.** A) Classes I e II de HDAC. B) A família de classe III de HDAC. As espécies são indicadas antes dos nomes das proteínas. Abreviações: **h:** *Homo sapiens*; **sc:** *Saccharomyces cerevisiae*; **sp,** *Schizosaccharomyces pombe*. Adaptado de (Ekwall, 2005).

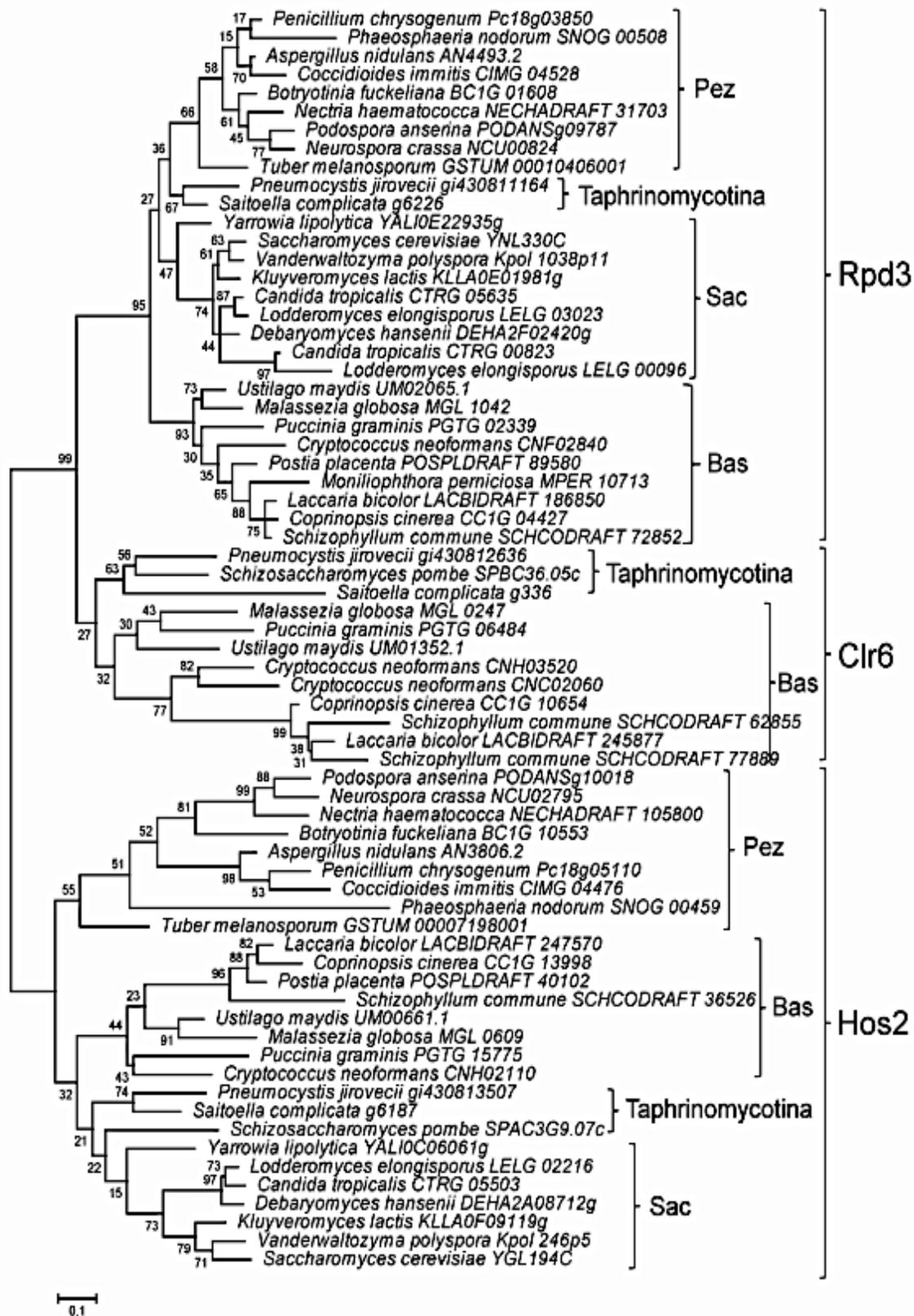


**Figura 6: Organização dos domínios das HDAC classe I e II em leveduras e humanos.** A figura mostra os domínios das desacetilases (DAC) e seu grau de identidade/similaridade (em porcentagem) comparada as seqüências de Rpd3 (classe I) e Hda1 (Classe II e IV) dentro dos cilindros em laranja. O número dos resíduos de aminoácidos (aa) é mostrado à direita de cada figura. Muitas desacetilases têm isoformas como resultado de *splicing* alternativo, para simplificar, nesta figura, são apresentados apenas o número de aa da isoforma mais longa. O domínio C- terminal (cinza) de Hda1 e Clr3 são homólogos (identidade/similaridade: 26/57%). As linhas mais espessas representam o domínio N-terminal e C-terminal das caudas das HDACs classe IIa. O *Myocyte enhancer factor-2* (MEF2) domínio de ligação é descrito como um curto cilindro verde, 14-3-3 descritos como cilindros azul e 'S': Ser, são motivos de ligação presentes nas estruturas das HDACs. **Clr3**, *cryptic locus regulator-3*; **Hda1**, *histone deacetylase-1*; *H. sapiens*, *Homo sapiens*; **Rpd3**, *reduced potassium dependency-3*; *S. cerevisiae*, **SE14**, Ser-Glucontaining tetradecapeptide repeats; *S. pombe*; **ZnF**, ubiquitin-binding zinc finger. Adaptado a partir de: Yang, Seto, 2008.

Embora o termo “histonas desacetilases” seja empregado devido à atividade dessas enzimas inicialmente ter sido descoberta em histonas, as HDACs são evolutivamente mais antigas que as histonas e atualmente se sabe que muitos outros tipos de proteínas não-histônicas, como fatores transcripcionais, proteínas envolvidas no reparo, recombinação e replicação do DNA, bem como chaperonas entre outras, também são alvos das HATs / HDACs (Glozak et al., 2005; Spange et al., 2009). Em humanos estudos mostraram que mais de 1.700 proteínas possuem sítios de acetilação e que o processo de acetilação de lisinas está implicado na regulação da maioria das proteínas nucleares e em muitos outros processos no citoplasma (Choudhary et al., 2009).

### 1.2.1 HDAC em fungos.

As HDACs em fungos, como mencionado anteriormente, são altamente conservadas entre as espécies, o que viabiliza uma análise comparativa bem como estudo evolutivo (Nishida, 2009). Dados de análises filogenéticas mostraram que Clr6, Hos2 e Rpd3 pertencem à família classe I, porém dentro desta classe essas enzimas são separadas de forma que filogeneticamente se possa comparar HDACs mais próximas a Rpd3 ou Clr6 por exemplo. Interessantemente, análises usando as HDACs Clr6 de *S. pombe* ou Rpd3 de *S. cerevisiae* como marcadores filogenéticos para estudo comparativo, mostraram que Clr6 de *S. pombe* está distante da Rpd3 de ascomicetos, porém mais próxima das proteínas dos basidiomicetos, *Pneumocystis jirovecii* e *Saitoella complicata* (Nishida et al., 2014). Muito embora Clr6 de *S. pombe* tenha diversas similaridades funcionais com a Rpd3 de *Saccharomyces* (Wirén et al., 2005), estes dados (**Figura 7**) fortemente sugerem que proteínas do tipo Clr6 são funcionalmente diferentes das do tipo Rpd3 em ascomicetos e basidiomicetos. O sub-reino *Dikarya* possui três homólogos à Clr6, homólogos a Hos2 e a Rpd3 (Nishida et al., 2014). *P. jirovecii* e *S. complicata* foram os primeiros ascomicetos descritos que possuem as três HDACs desses homólogos, sugerindo que o ancestral de *Dikarya* tivesse os três tipos de HDAC. Durante a evolução dos ascomicetos, *Pezizomycotina* e *Saccharomycotina* parecem ter perdido seus homólogos à Clr6 enquanto *Schizosaccharomyces* teria perdido seus homólogos à Rpd3 (Nishida et al., 2014).



**Figura 7: Relação Filogenética entre Hos2, Rpd3 e suas proteínas homólogas.** Clr6 de *S. pombe* é SPBC36.05c. Hos2 e Rpd3 de *S. cerevisiae* são YGL194C e YNL330C, respectivamente. **Bas, Pez,** e **Sac** indicam *Basidiomycota*, *Peizizomycotina*, e *Saccharomycotina*, respectivamente. Adaptado de Nishida et al., 2014.

Em *C. albicans* as HDAC foram associadas a regulação dos traços de virulência relacionados a resistência a antifúngicos, transição entre os fenótipos branco-opaco e adesão às células do pulmão (Klar et al., 2001; Smith & Edlind, 2002). Sobre a transição levedura-hifa de *C. albicans*, o trabalho de Zacchi et al., 2010, mostrou que as HDACs *HOS2* e *HDA1* tem importante papel na regulação deste fenótipo, sendo o primeiro um repressor e o segundo um indutor da filamentação. O complexo desacetilases Set3/Hos2 regula a morfogênese e virulência em *C. albicans* (Hnisz et al., 2010).

As HDACs *HDA1* e *RPD3* de *S. cerevisiae* e *C. albicans* mostraram importante papel na resistência a antifúngicos por regularem a acetilação chaperona Hsp90 (Robbins et al., 2012).

Em *S. pombe*, as regiões subteloméricas, centroméricas e o lócus *MAT* são enriquecidos em heterocromatina (Cam et al., 2005). Clr3 (*cryptic locus regulator-3*) pertence à classe II de HDAC presente em *S. pombe*, importante fator para regulação do silenciamento do lócus *MAT* nesse fungo (Bjerling et al., 2002). Estudos mais recentes apontam Clr3 como importante componente do complexo *transcriptional gene silencing* (TGS) requerido para inibir o *turnover* de histonas, promovendo deste modo a estabilidade da heterocromatina, um padrão de herança epigenética (Aygün et al., 2013). Em outro estudo, a HDAC Clr3 atuou em conjunto com fator Set1 para mediar a montagem de heterocromatina que resulta em repressão global de diversos transcritos, incluindo *Tf2* retrotransposons, RNA não codificantes, genes de desenvolvimento e de resposta ao estresse (Lorenz et al., 2014).

Em algumas leveduras a HDAC Hda1 forma um complexo com Hda2 e Hda3 importante para sua atividade de desacetilase. Este complexo é importante em *C. albicans*, mas não em *S. pombe*. Já Clr3 forma um complexo quaternário em *S. pombe* recrutado tanto para eucromatina como para heterocromatina para silenciamento transcricional. Isso ocorre devido aos componentes presentes no complexo, como exemplo a subunidade Mit1 que contem um PHD *finger* e um domínio helicase, conferindo ao complexo a função de desacetilase e levando a remodelagem da cromatina. Fazem parte deste complexo o homólogo ao gene *HPI* (*heterochromatin protein-1*) e *telomere-binding protein* (Yang, 2008).

Em *C. neoformans* somente dois dos genes de HDAC foram descritos pelo grupo do Dr. Madhani (Liu et al., 2008). Os genes *HOS2* e *RPD3* foram deletados e se

mostraram importantes à infecção em camundongos, além disso, o mutante de *HOS2* apresentou um decréscimo na produção de melanina.

### 1.2.2 Inibidores de histonas desacetilases (HDACi).

Inibidores de histonas desacetilases (HDACi) vêm sendo empregados como drogas terapêuticas no tratamento de câncer e da infecção por HIV (Kotaro Shirakawa et al, 2013; Wightmana et al, 2014), além de diversos estudos envolvendo a regulação gênica em diferentes tipos celulares. A resposta celular aos HDACi é complexa e provavelmente envolve fenômenos transcricionais e não-transcricionais. Uma variedade de HDACi estruturalmente diversos, vem sendo isolados de fontes natural ou sinteticamente desenvolvidos, sendo que atualmente 11 destes estão em fase de desenvolvimento para uso clínico (**Figura 8**).

Os inibidores são divididos em grupos com base em suas diferenças estruturais incluindo os ácidos hidroxâmicos, peptídeos cíclicos, ácidos alifáticos e benzamidas (**Figura 8**). Em 1978 o Butirato de sódio (NaBut) foi identificado inicialmente como um inibidor de HDAC não específico (Candido et al., 1978). NaBut é um ácido graxo de cadeia curta, pertencente ao grupo dos ácidos alifáticos, produzido pela fermentação de bactérias anaeróbicas (Hinnebusch et al., 2002, Marks et al. 2004). Foi inicialmente proposto como agente anti-cancer devido sua capacidade em induzir diferenciação celular (Leder & Leder, 1975). A correlação entre a atividade de HDACi associada a inibição do crescimento de células tumorais e a sobrevida, se deu em meados dos anos 90 (Richo et al., 1998). Ainda nos anos 90, a Tricostatina A (TSA) foi o primeiro ácido hidroxâmico identificado como inibidor específico de HDAC (Yoshida et al., 1990). Trata-se de um antibiótico isolado inicialmente de *Streptomyces higroscopicus* (Dokmanovic et al. 2005). Geralmente os ácidos hidroxâmicos exercem uma atividade não específica afetando todas as classes de HDACs (Schneider-Stock & Ocker 2007; Marks, 2010). NaBut por sua vez, afeta especificamente HDACs de classe I e IIa (Hu et al., 2003) (**Figura 9**).

A estrutura molecular geral do sítio ativo das HDAC consiste de um arcabolso tubular com dois resíduos de histidina adjacentes, dois resíduos de ácido aspártico, um resíduo de tirosina/histidina e um íon de  $Zn^{2+}$  no fundo do arcabolso, todos formando

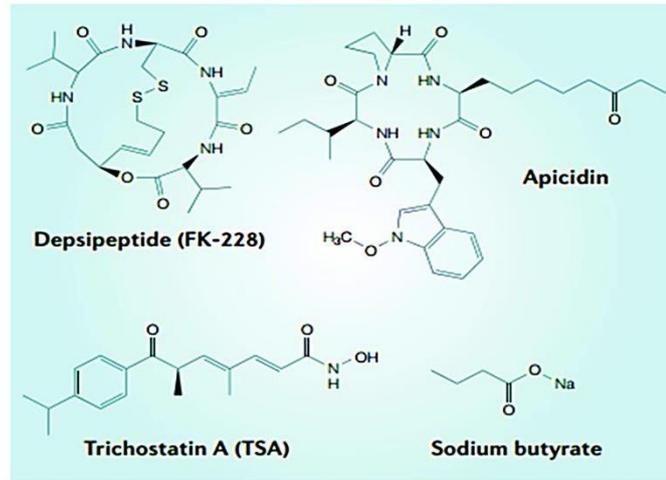
um sistema de revezamento de cargas (Finnin et al., 1999). Os HDACi usados em estudos clínicos ou aprovados para uso em tratamento, encaixam dentro deste sítio ativo e exercem atividade farmacológica quelante de  $Zn^{2+}$ , além de bloquearem a entrada do sítio ativo por interagirem com a superfície externa das HDAC (Smith et al., 2009).

**Tabela 1:** Inibidores de HDAC em fase de desenvolvimento clínico.

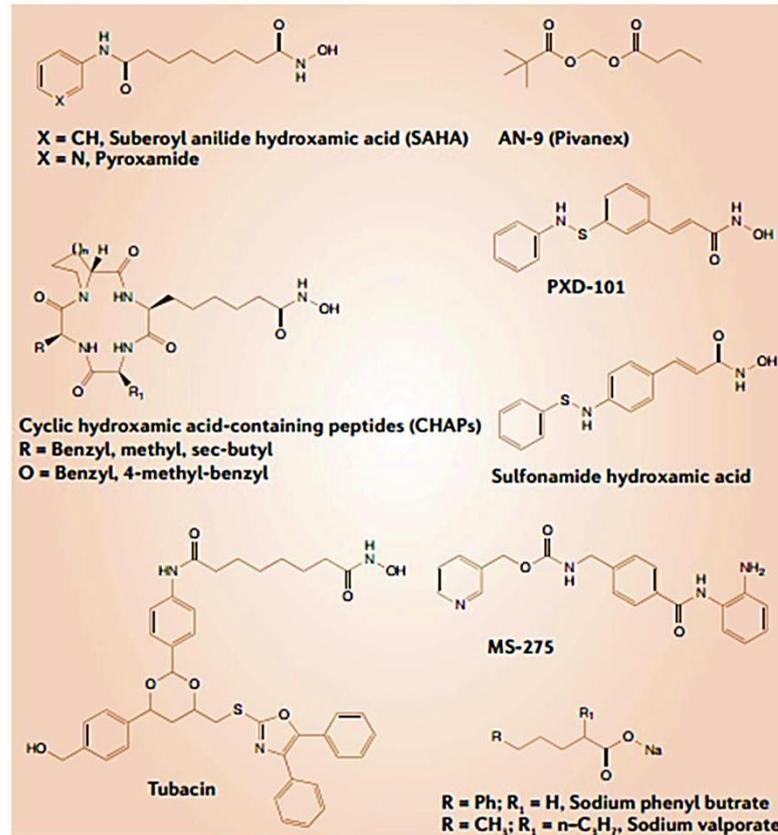
Estrutura Química	Nome	Especificidade da HDAC	Fase de Estudo
Hidroxiâmicos	SAHA (vorinostat)	Pan-inibitor	Aprovado pelo CTCL, fase III sozinho ou combinado
	PXD101 (belinostat)	Pan-inibitor	Fase II sozinho ou combinado
	LBH589 (panobinostat)	Classes I and II	Fase III sozinho ou combinado
	ITF2357 (givinostat)	Pan-inibitor	Fase II sozinho ou combinado
	4SC-201 (resminostat)	Pan-inibitor	Fase II sozinho ou combinado
	PCI 24781 (abexinostat)	Classes I and II	Fase II sozinho ou combinado
Peptídeos cíclicos	Depsipeptide/FK228 (romidepsin)	Class I	Aprovado pelo CTCL e PCTL, fase III sozinho ou combinado
Benzamidas	MS-275 (entinostat)	Class I	Fase II sozinho ou combinado
	MGCD0103 (mocetinostat)	Class I	Fase II sozinho ou combinado
Ácidos graxos alifáticos	Ácidos Valpróico	Classes I and IIa	Fase II sozinho ou combinado (aprovado para epilepsia e algumas doenças não-malignas).
	Butirato	Classes I and IIa	Fase II sozinho ou combinado

Adaptado de Hrabeta et al., 2014

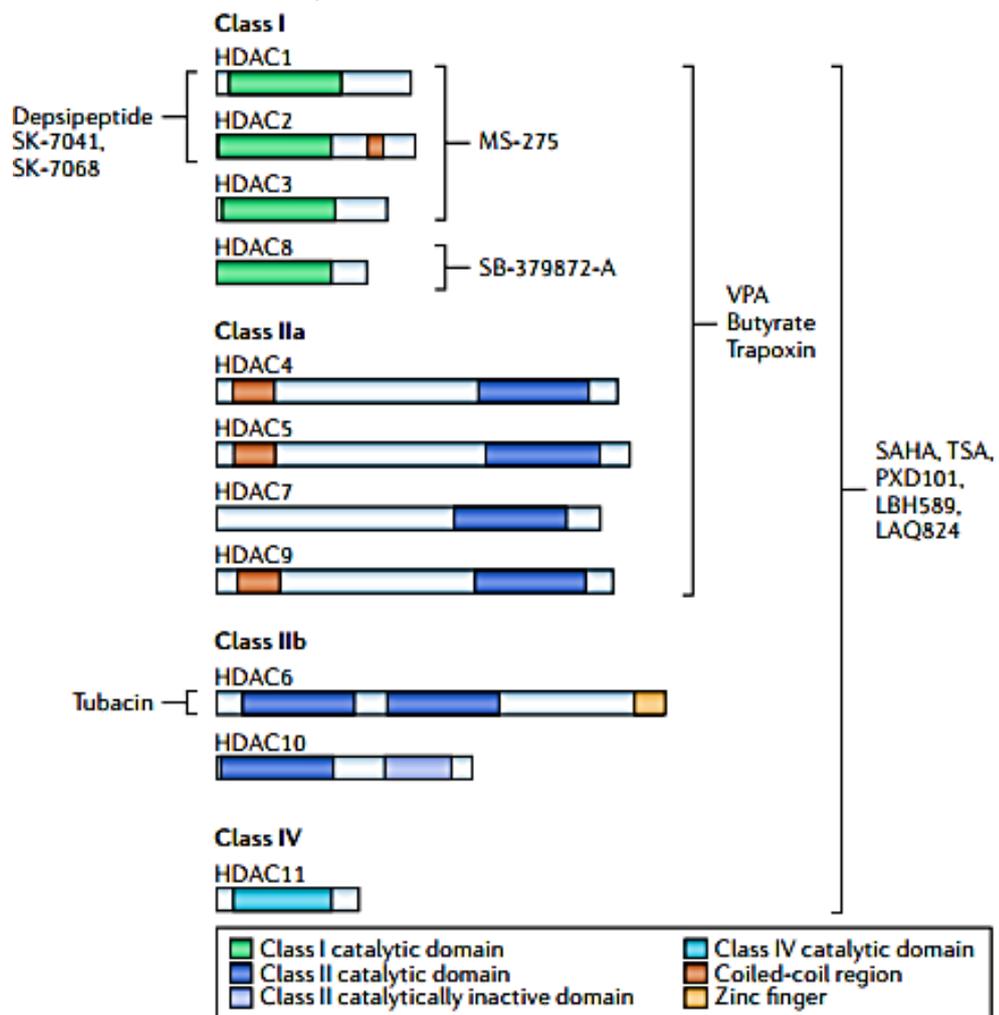
A) Inibidores de HDAC a partir de fontes naturais



B) Inibidores de HDAC sintéticos



**Figura 8: Inibidores de HDAC:** Estrutura representativa das principais classes de HDACi, ambos de fontes naturais (A) ou sintéticas (B). Adaptado de Minucci & Pelicci, 2006.



**Figura 9: Classes de HDAC sobre as quais os inibidores atuam.** A figura mostra as classes de HDAC com seus domínios, bem como seus possíveis inibidores. Retirado de Bolden et al., 2006.

Uma importante e promissora correlação que vem sendo estudada é a combinação de HDACi com anti-retrovirais no tratamento da infecção por HIV. Em meados dos anos 90, a introdução do uso de combinados anti-retrovirais conhecido como ART (*Antiretroviral therapy*) atuando em diferentes fases do ciclo viral, diminuiu drasticamente os índices de mortalidade e morbidade associadas ao HIV (Perelson et al., 1997). Muito embora a ART reduza a carga viral e combatam a replicação do vírus, a infecção pelo HIV ainda persiste, e a interrupção do tratamento leva a aumento nos títulos de partículas virais entre 3-4 semanas (Finzi, et al., 1997). Um fato importante que permite o HIV persistir dentro das células do hospedeiro, é a capacidade de permanecer em latência, escapando da ação dos ARTs, que falham em eliminar o vírus.

Novas abordagens terapêuticas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de promover a reativação do vírus que se “esconde” dentro das células do hospedeiro. O uso de HDACi no tratamento de pacientes com HIV, vem mostrando promissores resultados, justamente por permitirem o estado acetilado por mais tempo, abrindo a cromatina e favorecendo a transcrição global, incluindo do vírus HIV que estava latente (Shirakawa et al., 2013). Uma vez que somente o uso de antirretrovirais não é capaz de curar pacientes, estudos recentes vêm sendo desenvolvidos com uso combinado de HDACi e o sucesso deste tipo de tratamento tem chamado a atenção mundial, pois potencialmente podem levar à cura dos pacientes (Kotaro Shirakawa et al, 2013; Wightmana et al, 2014). Os dados apresentados no presente trabalho claramente mostram que *C. neoformans* tem seus principais atributos de virulência atenuados pelo tratamento com HDACi. O conjunto dos dados gerados neste estudo em *C. neoformans* podem apontar um promissor tratamento para pacientes portadores de HIV e que apresentam co-infecção com *C. neoformans*, reforçando a importância desta linha de pesquisa no estudo de micoses severas.

## 2. JUSTIFICATIVA

---

O campo de estudo envolvendo as HDAC vem crescendo de forma exponencial, e isto se deve no mínimo a quatro fatores. Primeiro, as pesquisas que exploram a cromatina como ponto regulatório vem crescendo exponencialmente nos últimos 15 anos, e as HDAC tem papel chave na desacetilação do nucleossomo, interagindo com outros fatores regulatórios da cromatina, correlacionando o panorama epigenético a possibilidades terapêuticas (Millar et al., 2006; Goldberg et al., 2007). Segundo, além das proteínas histônicas, estas enzimas desacetilam uma vasta quantidade de outras proteínas envolvidas nos mais diversos processos celulares tanto em sistemas eucariotos como em procariotos (Yang et al., 2008). Terceiro, os inibidores das HDAC vêm mostrando um enorme potencial terapêutico contra o câncer e outras doenças entre elas mais recentemente a *AIDS*, que sabidamente é o principal quadro que favorece a infecção e morbidade causada por *C. neoformans* (Marks & Breslow, 2007; Shirakawa et al., 2013; Wei et al., 2014). E por último, como citado anteriormente na revisão bibliográfica deste trabalho, os genes de HDAC são altamente conservados entre as espécies, permitindo deste modo, estudos em espécies estrutural e funcionalmente menos complexas como fungos, e posteriormente possibilitando comparações que podem elucidar funções ainda desconhecidas e abrir possíveis abordagens terapêuticas em humanos.

### 3. OBJETIVOS

---

Com base em todas essas informações até aqui apresentadas sobre a importância de novos estudos abordando aspectos epigenéticos, bem como da necessidade que se faz presente no momento, de estudos voltados a estes aspectos na virulência de fungos patogênicos, em particular para o fungo oportunista *C. neoformans*, para o qual esta área de conhecimento é ainda pobremente explorada, este trabalho se propõe:

- 1- Estudar os efeitos dos inibidores de histona desacetilases Tricostina A e Butirato de Sódio sobre a expressão dos principais fenótipos de virulência em *C. neoformans* var *grubii* sorotipo A.
- 2- Identificar e elucidar o papel dos genes de HDAC sobre a virulência do patógeno oportunista *C. neoformans*.

---

## *Capítulo 1*

---

Efeito dos inibidores de HDAC  
Tricostatina A e Butirato de Sódio  
sobre os principais fenótipos de  
virulência do fungo *Cryptococcus*  
*neoformans*.

## 4. Materiais e métodos

---

### 4.1 Linhagens, condições de crescimento e preparo das drogas.

As linhagens H99 de *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A), KN99a e KN99α foram usadas neste estudo. As leveduras foram crescidas por 24 h em meio líquido YPD (extrato de levedura 1%, glicose 2%, bacto-peptona 2% pH 7.2) a 30 °C, para posterior preparo de estoques da cultura em glicerol 35%, os quais foram mantidos a -80 °C. Para os experimentos, uma fração do estoque foi descongelada e inoculada em meio YPD líquido, sendo as leveduras cultivadas durante a noite a 30 °C sob agitação. O Butirato de sódio (Cayman Chemical Company) foi preparado em água destilada na concentração de 500 mM e filtrado em seringa 0,22 μM. A Tricostatina A (Sigma-Aldrich) foi preparada em DMSO 100% na concentração de 6.7 μM. Ambas as soluções, após o preparo, foram aliquotadas em tubos de prolipopileno de 1,5 mL e estocadas a -20 °C.

### 4.2 Curvas de crescimento

As leveduras foram contadas em câmara de Neubauer e a densidade celular ajustada para  $10^6$  células/mL em meio YPD. As células foram crescidas na presença de diferentes concentrações de NaBut ou TSA a 30 °C ou 37 °C a 150 rpm. Como controle, as células foram crescidas nas mesmas condições sem adição de droga (controle para NaBut) ou adicionando DMSO nas mesmas concentrações empregadas para o tratamento com TSA, tomando-se sempre o cuidado de não ultrapassar a concentração máxima de 0,5% de DMSO. Para avaliação da viabilidade celular,  $10^6$  células/mL foram tratadas com NaBut 10 mM ou TSA 10 μM a 30 ou 37 °C (150 rpm) por 24 e 72 h. Para análise qualitativa foram realizados ensaios de diluição seriada das células de  $10^5$  a  $10^2$ , por ponto de 10 μL, e inoculados em ágar YPD, para cada intervalo de tempo. Cada ponto representa uma diluição, iniciando com  $10^5$  no primeiro ponto, em seguida as placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. Para o ensaio de unidade formadora de colônia (UFC), as leveduras foram crescidas na presença das drogas por um total de 60 h, sendo realizadas coletas do inóculo a cada 12 h para análise. Foram realizados ensaios de diluição seriada (500, 5.000 ou 50.000 vezes) para cada intervalo de 12 h, e

para cada diluição foram inoculados 100 µL em ágar YPD, em triplicata, e as placas incubadas por 48 h 30 °C para contagem das células.

### **4.3 Indução da Cápsula**

As leveduras de linhagem H99 foram crescidas em YPD durante a noite, e em seguida foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS) A densidade celular foi ajustada para  $10^6$  células/mL em meio mínimo (MM), meio quimicamente definido (15 mM dextrose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 29.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13 mM glicina e 3 µM tiamina; pH5.5). A suspensão celular foi alíquotada em placa de 24 poços e juntamente foram adicionadas diferentes concentrações de NaBut ou TSA. A placa foi então incubada a 30 °C a 150 rpm por 24h. Respektivos controles foram realizados.

### **4.4 Análise da expansão da cápsula**

Para mensurar a cápsula, sobre a superfície de uma lâmina foram misturados 10 µL da suspensão celular com 5 µL de nanquim (Becton Dickinson, NJ) e em seguida a lâmina foi observada sob microscópio de luz (Axiovert 100, Carl Zeiss) na magnitude de 35x. No mínimo quatro diferentes campos aleatórios foram escolhidos e fotografados. Para calcular o tamanho da cápsula, foi avaliada a dimensão total da célula (corpo da célula + cápsula) e do corpo celular (região delimitada pela parede celular) usando o programa AxionVS 40x64 V 4.8.3.0 (Carl Zeiss MicroImaging). A largura da cápsula foi definida como a diferença entre o diâmetro total das células menos o diâmetro do corpo celular. Entre 20 a 40 células foram contadas para cada concentração das drogas e seus respectivos controles.

### **4.5 Análise do tamanho das células por Citometria de fluxo.**

Uma densidade de  $10^6$  células/mL de leveduras foi inoculada em MM na presença de NaBut (1mM ou 10 mM) ou TSA (1 µM ou 10 µM) seguindo-se incubação a 30 °C / 150 rpm por 24 h. Após, as células foram lavadas com PBS, fixadas com 0.1% de formaldeído e  $10^6$  leveduras foram suspensas em 1 mL de PBS. O tamanho celular foi mensurado usando o citômetro BD FACS Calibur com base nos parâmetros de *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC). Os dados foram analisados com auxílio

do programa *FlowJo* (Three Star Inc.). O total de células analisadas foi dividido dentro de dois quadrantes, com base no tamanho. A média da porcentagem de células foi expressa dentro de cada quadrante.

#### **4.6 Detecção da atividade de Fosfolipases**

A habilidade das células em produzir fosfolipases foi avaliada em meio ágar sólido preparado com emulsão de gema de ovo na concentração de 8% (0.8% peptona, 1.6% dextrose, 0,84 M NaCl, 42 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 % ágar). Em placa de 6 poços foram adicionados 3 mL de meio e diferentes concentrações de NaBut ou TSA. Previamente, às células foram crescidas em YPD a 30 °C / 150 rpm / 24 h, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para 10<sup>8</sup> células/ mL. Foram colocados 5 µL da suspensão celular sobre o meio e droga, então as placas foram incubadas a 30 °C ou 37 °C, de acordo o ensaio, sem agitação. A atividade de fosfolipase foi detectada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia após 48 h de incubação. As colônias foram fotografadas digitalmente. A atividade de fosfolipase foi avaliada proporcionalmente a razão entre o diâmetro da colônia / diâmetro da colônia + zona de precipitação, resultando no valor de Pz de acordo com Price et al. (1982). As placas foram monitoradas diariamente e fotografadas digitalmente.

#### **4.7 Ensaio de acasalamento**

Linhagens de tipos de opostos de acasalamento (KN99a e KN99α) foram crescidas durante a noite em YPD/150 rpm. As células foram lavadas e a densidade celular ajustada para 10<sup>8</sup> células/mL em PBS. As linhagens foram misturadas e 5 µL do par de acasalamento foram colocados sobre o poço em placa de 6 poços contendo 3 mL de meio ágar *Filament* (6.7 g / L YNB-AS, 0.5% glicose e 4% Bacto-agar; pH 5.0) suplementado com diferentes concentrações de NaBut ou TSA. As placas foram armazenadas a temperatura ambiente, protegidas da luz. As primeiras hifas de acasalamento começaram a aparecer após três dias de incubação. As imagens foram adquiridas no 5 ° e 15° dias de incubação usando o microscópio de luz invertido Axiovert 100 (Carl Zeiss) no aumento de 5x.

#### **4.8 Ensaio de melanização**

As leveduras foram crescidas previamente em meio YPD como anteriormente. Em seguida as células foram lavadas três vezes com PBS e a densidade celular ajustada para  $10^6$  células/ mL em MM suplementado com 1 mM L-DOPA (Sigma-Aldrich). Em placa de 24 poços foram adicionados 1 mL da suspensão de células, então as placas foram incubadas a 30 °C / 150 rpm protegidas da luz. As placas eram monitoradas diariamente no intuito de acompanhar a produção do pigmento escuro correspondente a produção de melanina. Após constatação da produção de melanina as placas foram fotografadas digitalmente.

#### **4.9 Análise do Ciclo Celular**

As células foram crescidas em YPD a 30 °C / 150 rpm por 24 h na presença de 1 mM ou 10 mM de NaBut. As células foram lavadas e fixadas com etanol 70% a 4 °C por 24 h. Após fixação a densidade celular foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células/mL em PBS. O DNA foi corado com 1 µL SYBR Green (10.000 x) e tratado com 0,5 mg/mL de RNase (Sigma). Em seguida, as células foram incubadas por 2 h a 37 °C sob agitação e protegidas da luz. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur™) em escala linear. As populações foram separadas dentro das fases do ciclo celular correspondendo a G1 / G0, S ou G2 / M. Para cada condição foram analisados 20.000 eventos.

#### **4.10 Teste de virulência em *Galleria mellonella***

Lagartas da espécie *G. mellonella* foram usadas como modelo de infecção neste estudo (Mylonakis et al., 2005). No intuito de induzir a expansão da cápsula, as células foram crescidas em MM por 48 h na presença de NaBut 10 mM ou TSA 10 µM a 30 °C / 150 rpm. Em seguida, as células foram lavadas três vezes, contadas e ressuspensas em PBS na densidade de  $10^7$  células / mL. Foram escolhidas randomicamente de 9 a 10 lagartas para cada grupo experimental e 10 µL da suspensão de leveduras em PBS foram injetados diretamente na hemolinfa, na última proclita esquerda, usando-se uma seringa Hamilton de 10 µL. Para prevenir contaminação com bactérias, foram coadministrados ampicilina 20 mg / Kg do peso médio do corpo das lagartas. As lagartas foram incubadas em placas de petri esteril a 37 °C e monitoradas visualmente a

cada 24 h. Como controles, foram usadas células de *C. neoformans* que não receberam nenhum tipo de tratamento com drogas, cultivadas nas mesmas condições. Um controle apenas com PBS também foi realizado para demonstrar que as lagartas não morreram pelo processo de manipulação.

#### **4.11 Análises estatísticas**

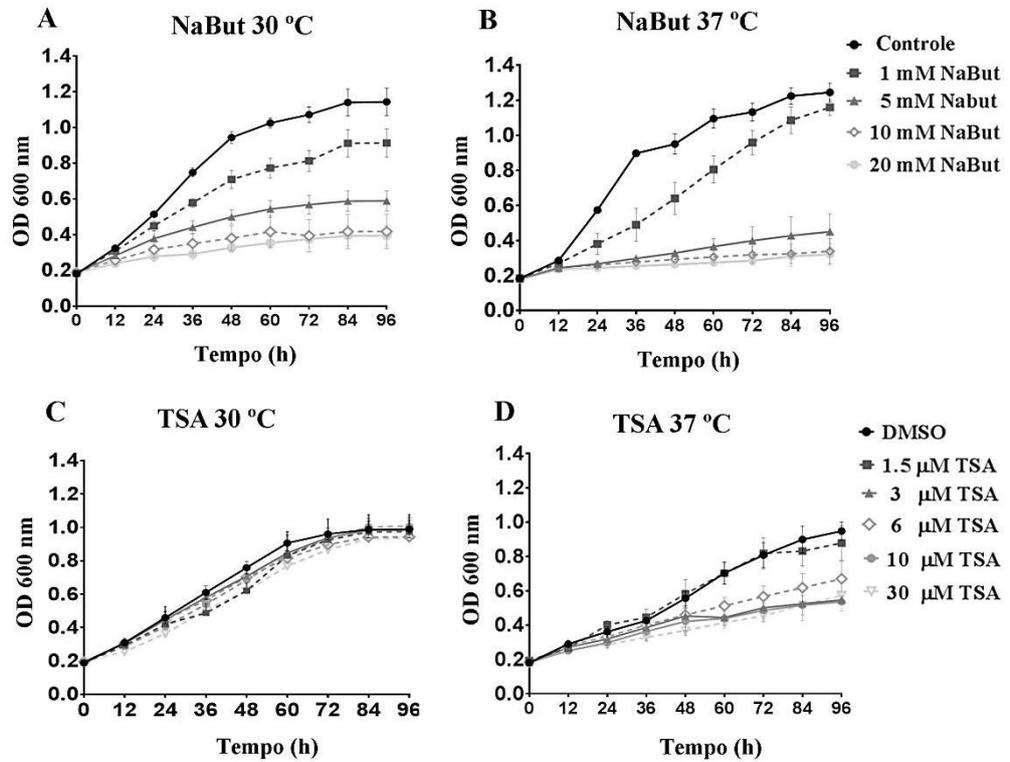
Aos dados foram analisados empregando-se o programa *GraphPad Prism* versão 6.01 para Windows (*GraphPad Programa*). A normalidade e variância assumidas foram verificadas por meio do teste *Shapiro-Wilk*. O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* e o pós-teste de *Dunn's* foram aplicados para comparar as variâncias entre grupos quando estes não eram normalizados. Os testes paramétricos *Two-way ANOVA* com pós-teste de *Tukey* foram empregados para comparar grupos com mais de uma variável. O teste *t-student* foi aplicado em análises de quantificação relativa comparando amostras controles versus tratamento. Todos os dados neste estudo apresentam as médias com seu desvio padrão e o intervalo de confiança empregado em todas as análises foi de 95%. O valor de *P* foi considerado significativo quando era  $\leq 0.05$ .

## 5. Resultados

---

### 5.1 Os inibidores de histona desacetilases interferem no crescimento de *C. neoformans*

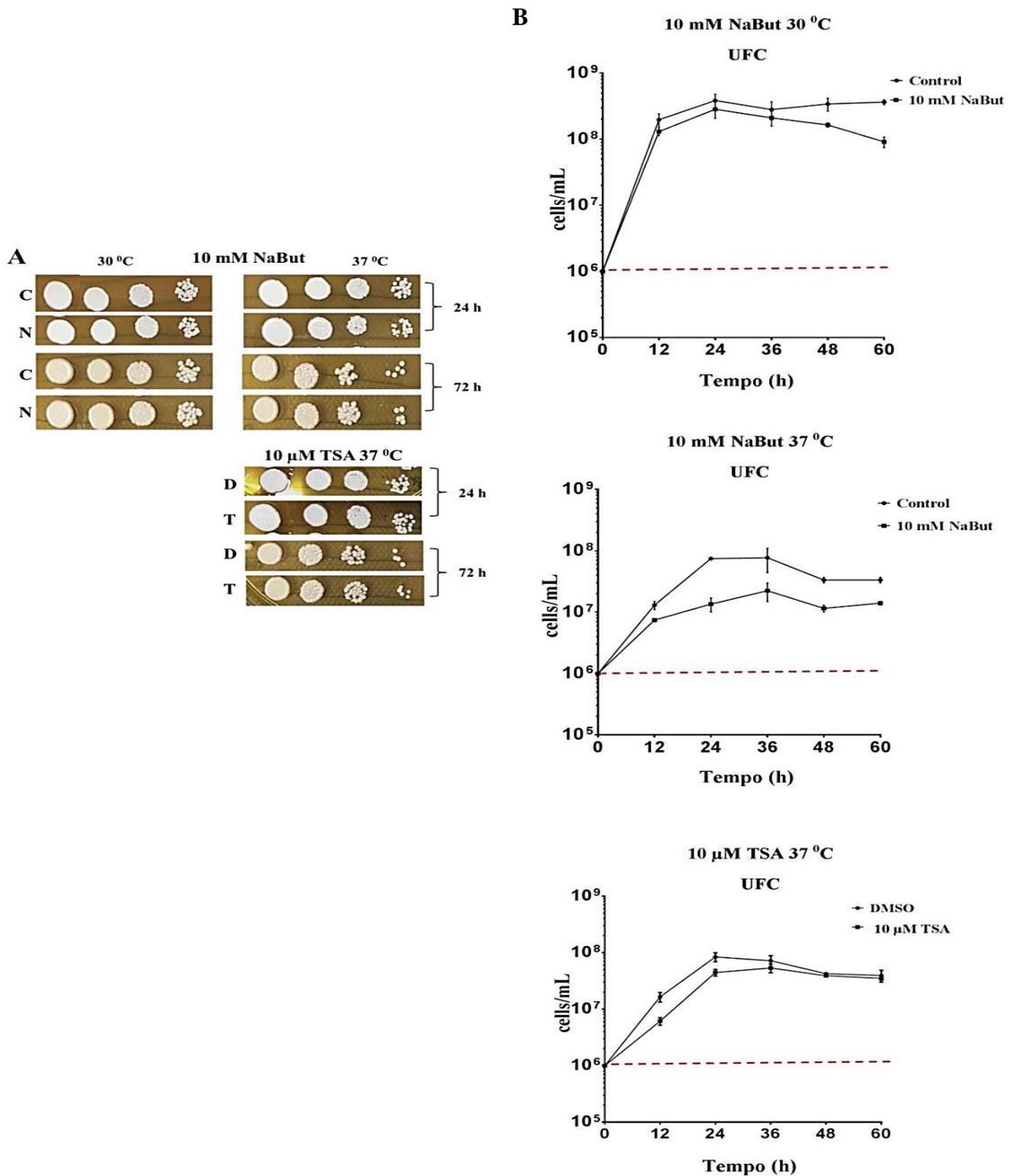
Inicialmente, foi avaliado o efeito de NaBut e TSA em uma ampla faixa de concentração sobre o crescimento de *C. neoformans* a 30 °C, temperatura padrão para o crescimento das leveduras de *C. neoformans*, e a 37 °C pois como descrito na Introdução, a capacidade de crescer a essa temperatura constitui um fator de virulência que possibilita a infecção de hospedeiros mamíferos. O crescimento das leveduras foi acompanhado por um total de 96 horas sendo mensurado em intervalos de 12 h. As curvas de crescimento demonstraram que a concentração de 20 mM de NaBut reduziu significativamente o crescimento de *C. neoformans* já nas primeiras 12 h de cultura a 30 °C (  $p < 0,05$  ) (**Figura 10A**). A partir de 24 e 36 h, as concentrações de 5 mM e 1 mM, respectivamente, foram capazes de reduzir o crescimento do fungo (  $p < 0,001$  ) e este efeito inibitório se manteve ao longo do tempo. À temperatura de 37 °C, a concentração de 1 mM de NaBut foi suficiente para interferir com o crescimento de *C. neoformans* a partir de 24 h de cultura (  $p < 0,001$  ) ( **Figura 10B** ). De um modo geral, o efeito mais pronunciado observado para o NaBut foi a 37 °C (**Figuras 10A-B**). Para TSA, nas primeiras 12 h de cultivo apenas a concentração de 30  $\mu$ M foi capaz de interferir no crescimento celular (  $p < 0,001$  ) (**Figura 10C**). No intervalo de 36 a 48 h, concentrações a partir de 3  $\mu$ M de TSA foram capazes de reduzir significativamente o crescimento das leveduras (  $p < 0,05$  ); no entanto, este efeito não foi mantido ao longo do tempo. Similarmente ao NaBut, a TSA apresentou um efeito mais pronunciado a 37 °C do que a 30 °C (**Figuras 10C-D**). A 37 °C, as concentrações a partir de 3  $\mu$ M de TSA afetaram o crescimento de *C. neoformans* no intervalo de tempo de 48 h e este efeito persistiu ao longo do tempo (**Figura 10D**).



**Figura 10: Efeito dose dependente dos inibidores de HDAC sobre crescimento de *C. neoformans* linhagem H99.** Leveduras de *C. neoformans* ( $10^5$  cel./ mL) foram inoculadas em meio YPD, na presença de 1 ; 5 ; 10 ou 20 mM de NaBut ou 1.,5 ; 3 ; 6 ; 10 ou 30  $\mu$ M de TSA, sendo cultivadas a 30 ou a 37 ° C . O crescimento celular foi determinado por meio da densidade óptica a 600 nm ( OD 600 ) a cada 12 horas. Controles foram realizados sem adição de droga (para NaBut ) e apenas com DMSO a 0,1% ( para TSA ). **A:** NaBut 30 ° C ; **B:** NaBut 37 ° C ; **C:** TSA 30 ° C e **D:** TSA 37 ° C . As barras de erro representam o desvio padrão. Resultados semelhantes foram obtidos em três experimentos independentes. Teste estatístico: *Two-way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*.

## 5.2 HDACi não afetam a viabilidade celular

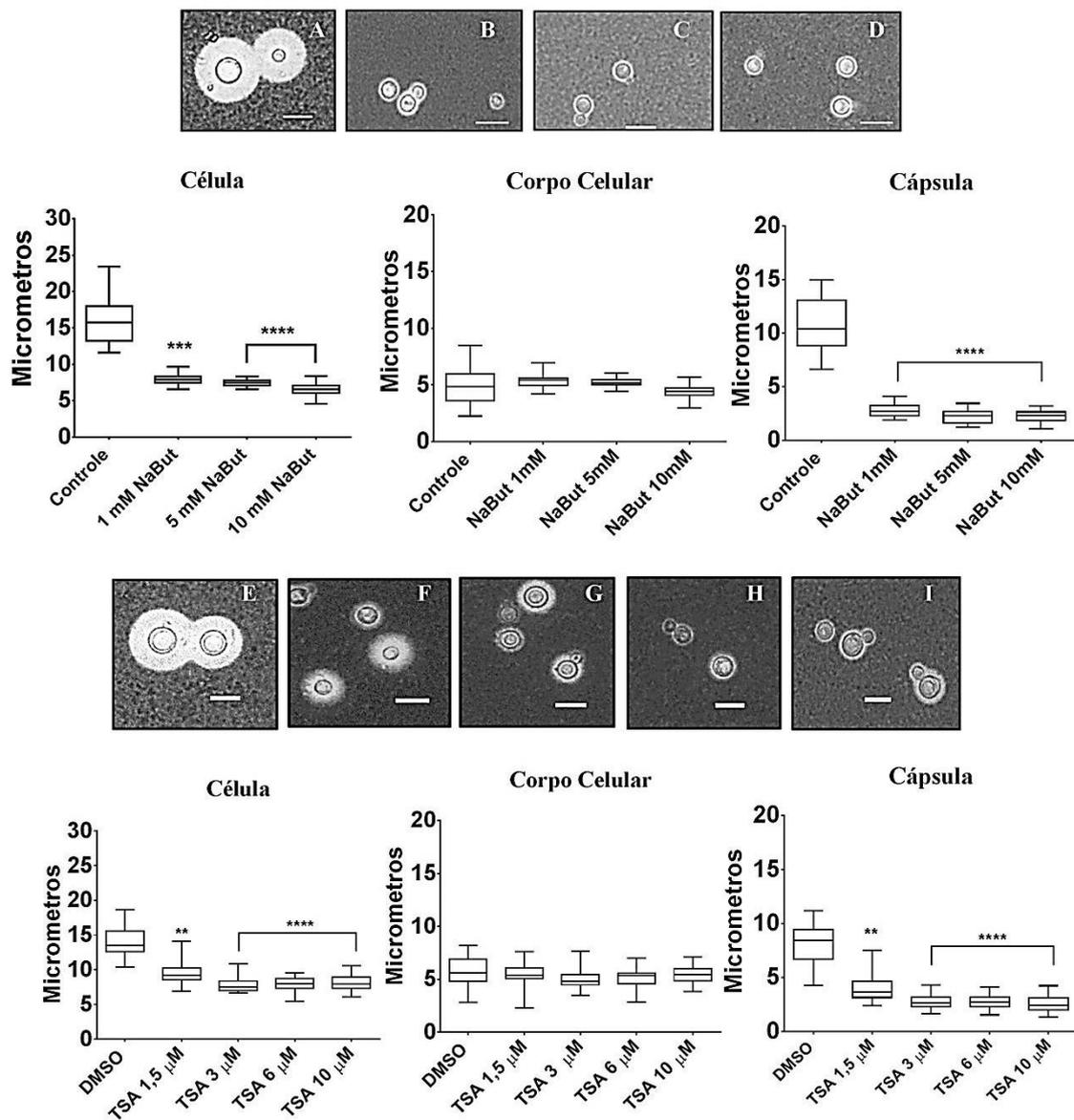
Uma vez que os HDACi interferiram no crescimento de *C. neoformans* (**Figura 9**), decidiu-se avaliar a viabilidade celular após o tratamento com as drogas. Em um primeiro momento, as leveduras foram crescidas na presença de 10 mM de NaBut e 10  $\mu$ M de TSA por 24 e 72 h, pois estas foram as concentrações mais altas empregadas na maioria dos testes. A seguir, para análises qualitativas, as células foram lavadas, para remoção dos HDACi, a densidade celular foi ajustada ( $10^6$  células/mL), para então as leveduras serem diluídas ( $10^7$  a  $10^4$ /mL) e inoculadas em ágar YPD. As placas foram incubadas e o crescimento celular foi monitorado por 48 h, após a remoção dos HDACi (**Figura 11A**). Para TSA a viabilidade das células foi avaliada apenas a 37 °C, desde que nenhuma alteração significativa no crescimento foi observada a 30 °C (**Figura 10C**). Como mostrado na **figura 11A**, as células previamente tratadas com os HDACi cresceram semelhantemente ao controle. Para mensurar o número de UFC (Unidade formadora de colônia) as leveduras foram crescidas na presença das mesmas concentrações anteriores (10 mM NaBut ou 10  $\mu$ M TSA) por até 60 h. Alíquotas foram coletadas a cada 12 h de crescimento tanto a 30 quanto a 37 °C, e semeadas para contagem das UFC. A quantificação das UFC claramente mostrou que embora as leveduras cresçam ligeiramente menos que os controles, as células tratadas mantiveram o crescimento sempre acima do limiar inicial, a linha vermelha paralela ao eixo x do gráfico (**Figura 11B**), indicando que as leveduras se mantem viáveis após o tratamento.



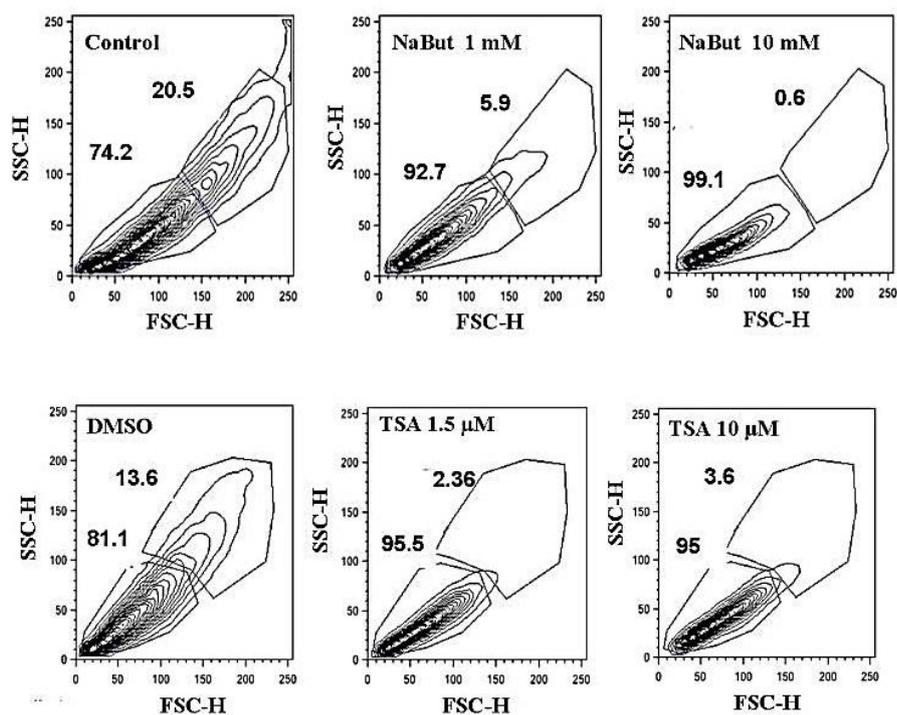
**Figure 11.** As células de *C. neoformans* permanecem viáveis após tratamento com HDACi. **A)**  $10^6$  células/mL foram inoculadas em meio YPD na presença de 10 mM NaBut ou 10  $\mu$ M TSA e crescidas em ambas temperaturas de 30 °C e 37 °C, a 150 rpm, por 24 ou 72 h. As células foram lavadas, contadas e 5  $\mu$ L de uma diluição seriada de 10x ( $10^7$ /mL -  $10^4$ /mL) foi inoculada em ágar YPD. As placas foram em seguida incubadas a 30 °C por 48h. **C:** controle; **N:** NaBut; **D:** 0,1% DMSO; **T:** TSA. **B)**  $10^6$  células/mL foram inoculadas em YPD na presença de 10 mM de NaBut ou 10  $\mu$ M de TSA, então crescidas a 30 e 37 °C/150 rpm/60 h. A cada 12 horas de incubação, alíquotas foram coletadas e diluídas (500, 5.000 e 50.000x) e subsequentemente inoculadas em ágar YPD para contagem do UFC. A linha vermelha pontilhada representa o limiar inicial do inóculo. Teste estatístico: *two-way* ANOVA com pós-teste de *Tukey*.

### **5.3 Efeito dos inibidores de histona desacetilase sobre a expansão da cápsula e o tamanho celular.**

O efeito de diferentes concentrações dos HDACi sobre a expansão da cápsula *C. neoformans* foi analisado. Os resultados mostraram que após 24 h de indução da cápsula, tanto NaBut (a partir de 1 mM ) quanto TSA (a partir de 1,5  $\mu$ M) inibiram significativamente a expansão da cápsula (  $p < 0,001$  ) (**Figura 12**). O diâmetro do corpo celular, por sua vez, não apresentou variação significativa entre os tratamentos e seus controles (**Figura 12**). As células tratadas com a menor e a maior concentração dos HDACi também foram analisadas por Citometria de fluxo. As células tratadas foram claramente menores quando comparadas aos controles (**Figura 13**).



**Figura 12: O tamanho da cápsula de *C. neoformans* é reduzido pelos inibidores de HDAC.** A cápsula foi detectada por meio da zona de exclusão, após a coloração com nanquim (barra, 10 μm). Imagens representativas das células observadas em cada condição. A: controle, B: NaBut 1 mM; C: NaBut 5 mM; D: NaBut 10 mM; E: 0,1% DMSO; F: 1,5 μM TSA ; G: TSA 3 μM; H: TSA 6 μM e I: TSA 10 μM. As caixas representam 75% da distribuição dos dados e as linhas horizontais representam as medianas. As barras indicam os valores mínimos e máximos. Teste estatístico: *Kruskal -Wallis* e pós-teste de *Dunn*. \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Aumento: 35x. Escala: 10 μm. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos independentes.

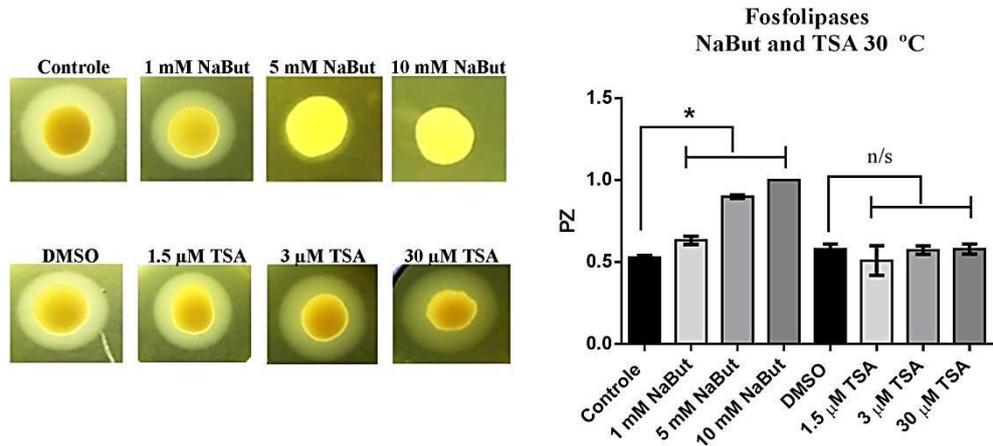


**Figura 13: O tamanho das células de *C. neoformans* é alterado pelos HDACi .** As leveduras ( $10^6$  células / mL) foram cultivadas em MM na presença de NaBut (1 mM e 10 mM) ou TSA (1,5 mM e 10 mM) a 30 °C a 150 rpm durante 24 h. As células foram fixadas, contadas e a densidade foi ajustada a  $10^6$  / mL em PBS. Os parâmetros FSC- H e SSC- H foram ajustados e 10.000 eventos foram contados para cada condição. A população de células foi separada em duas lacunas. Os números dentro do quadrante indicam a percentagem de células contadas dentro de cada área. A figura é representativa de dois experimentos diferentes, com resultados semelhantes.

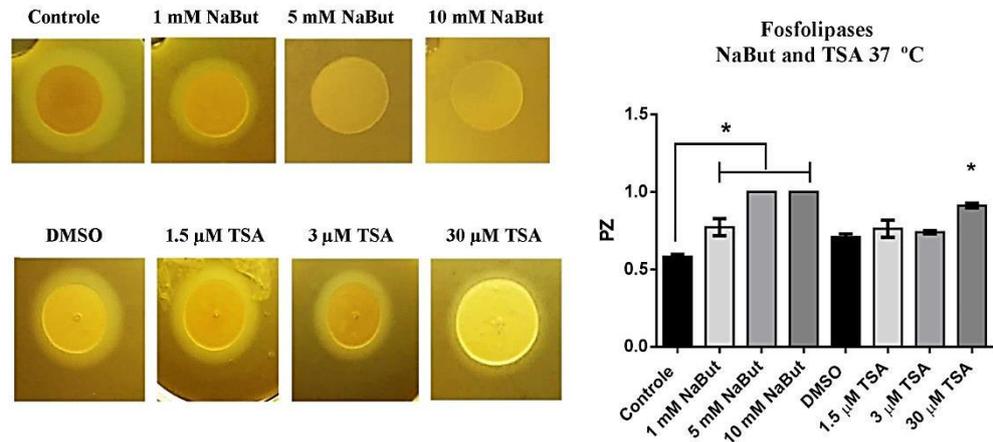
#### 5.4 Os inibidores de HDAC afetam a atividade de fosfolipase

Investigou-se o efeito dos HDACi sobre a atividade de fosfolipase secretada em meio de cultivo próprio para essa análise, contendo ágar misturado com emulsão de gema de ovo. Após 48 h de cultivo a 30 °C e 37 °C, a presença de um halo translúcido ao redor da colônia indica a atividade de fosfolipase. NaBut inibiu a formação do halo de uma forma dose dependente em ambas as temperaturas testadas (**Figura 14 A-B**). Para TSA, apenas na concentração de 30 μM a 37 °C pode-se perceber uma significativa redução na formação do halo (**Figura 14B**).

A



B

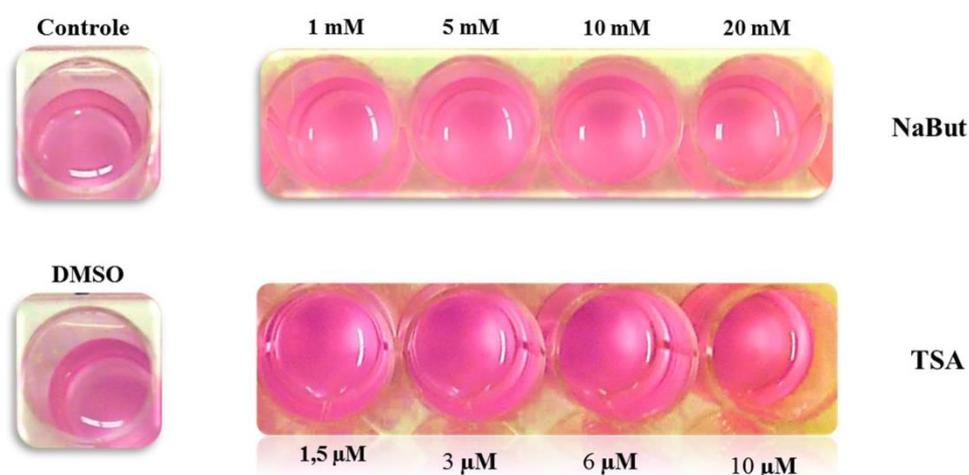


**Figura 14: O efeito dos HDACi sobre a atividade de fosfolipase.** As células foram cultivadas durante 48 h a 30 °C e 37 °C em meio ágar contendo gema de ovo, na presença de diferentes concentrações das drogas. Os controles foram realizados nas mesmas condições: sem adição de droga (para NaBut) e 0,1 % de DMSO (para TSA). A presença de um halo translúcido ao redor das colônias indica atividade de fosfolipase. A atividade de fosfolipase (Pz) foi mensurada de acordo com Price et al. (1982). Teste estatístico: *Two-way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*. \* denota  $p < 0.01$ ; *n/s*: não significativo. As barras de erro representam o desvio padrão da amostra. Experimento representativo de três com resultados similares entre eles.

## 5.5 HDACi não afetaram a atividade de urease.

A urease também é um fator de virulência secretado ao meio extracelular.

Avaliou-se o efeito dos HDACi sobre a atividade de urease secretada em meio de cultivo ágar *Christiansen's*, contendo ágar misturado com solução de uréia e vermelho de fenol, indicador de pH. O racional deste ensaio é que à medida em que as células liberam urease, esta degrada a ureia e os produtos desta degradação, como carbamato, aumentam o pH do meio tornou-se rosa. Após 48 h de cultivo a 30 °C, os poços se tornaram completamente rosado (**Figura 15**), a presença desta coloração indica atividade positiva de urease. Os HDACi não interferiram na atividade de urease em nenhuma das concentrações empregadas neste estudo.

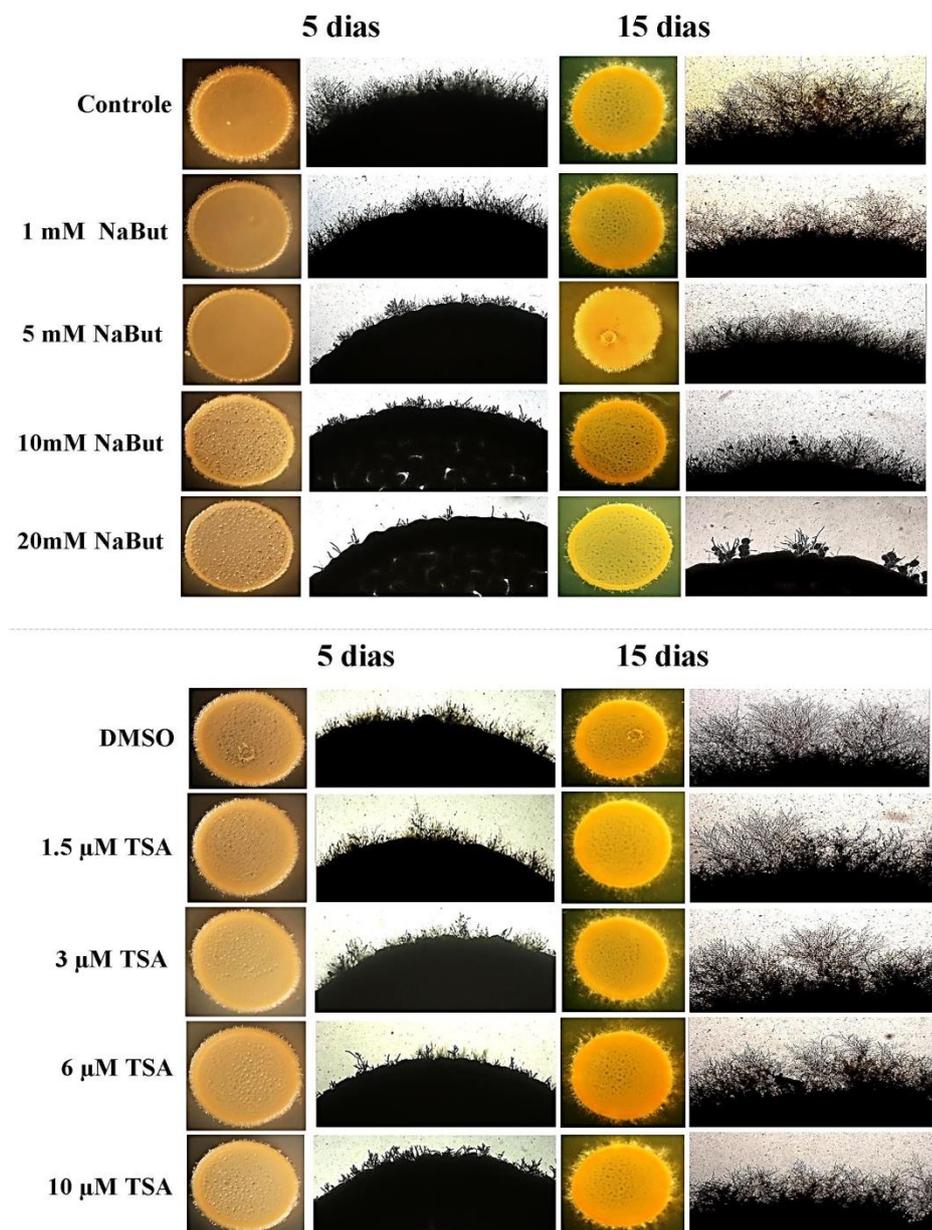


**Figura 15: HDACi não afetaram a atividade de urease:** As células foram cultivadas durante 48 h a 30 °C em meio ágar contendo indicador de pH vermelho de fenol e solução de ureia, na presença de diferentes concentrações das drogas. Os controles foram realizados nas mesmas condições, porém sem adição de droga (para NaBut) e contendo 0,1 % de DMSO (para TSA). A coloração rosada indica atividade de urease.

## 5.6 Inibidores de histonas desacetilases interferem na formação das hifas de acasalamento.

Células de *C. neoformans* com tipos de acasalamento opostos (KN99a e KN99α) foram incubadas em conjunto para induzir a formação das hifas que, normalmente, surgem de forma

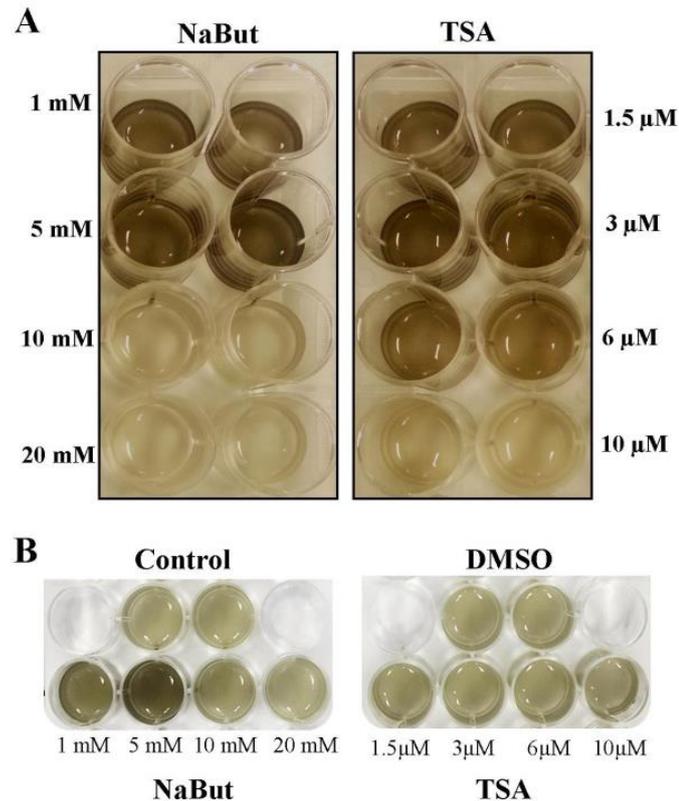
homogênea em torno das colônias a partir de dois dias de co-cultivo. A **Figura 16** mostra o crescimento das hifas nos tempos de 5 e 15 dias de incubação. No quinto dia, já é perceptível que nos controles, a formação de hifas é mais numerosa do que em colônias tratadas com ambos os HDACi. NaBut mostrou um efeito mais acentuado e dependente da dose, afetando o desenvolvimento das hifas de acasalamento em concentrações tão baixas quanto 1 mM, enquanto que TSA tem um efeito inibitório perceptível em concentrações superiores a 3  $\mu$ M .



**Figura 16: Efeito dose-dependente dos HDACi na formação de hifas de acasalamento em *C. neoformans*.** Linhagens de tipos opostos de acasalamento foram misturadas e cultivadas a temperatura ambiente, protegidas da luz, durante 15 dias. As imagens são representativas de dois ensaios independentes, com resultados semelhantes entre eles. As colônias foram observadas no aumento de 1,5x e as hifas em 100x.

## 5.7 Efeito dos HDACi sobre a produção de melanina.

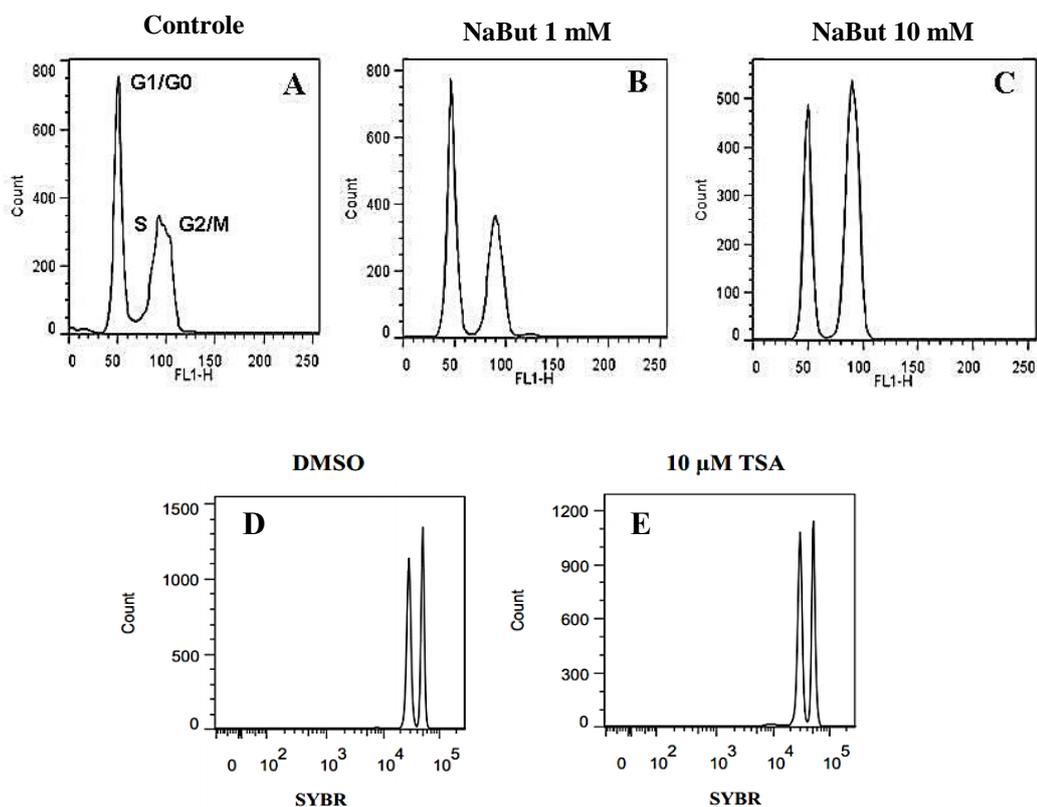
A produção de melanina está relacionada com a patogênese de alguns fungos e corresponde a outro fator virulência em *C. neoformans* muito importante. Foram empregadas concentrações diferentes das drogas no cultivo das leveduras em meio mínimo (MM) a 30 °C, com ou sem L-DOPA, sob agitação e ao abrigo da luz. A produção de melanina foi determinada pelo escurecimento do meio de cultura. Observou-se que as concentrações a partir de 10 mM de NaBut foram capazes de inibir a produção da melanina. Para TSA resultados semelhantes foram observados em concentrações a partir de 6 µM (**Figura 17A**). Este efeito inibitório foi observado quando as drogas foram adicionadas ao meio de cultura no momento da incubação. Para se evitar o viés do efeito dos inibidores sobre o crescimento celular, em um outro experimento, as células foram crescidas previamente em MM por cinco dias a 30 °C. Posteriormente, foram adicionados 1 mM de L-DOPA e os inibidores em diferentes concentrações, a incubação procedeu por mais de 24 - 48 h. Neste desenho experimental, os resultados se repetiram por diversas vezes, a concentração de 5 mM NaBut levou a um aumento na produção de melanina, enquanto TSA não apresentou nenhum efeito, em diferentes ensaios (**Figura 17B**).



**Figura 17:** A produção de melanina por *C. neoformans* é afetada pelos HDACi . A) As leveduras foram cultivadas em MM durante 5 dias a 30 °C / 150 rpm, com ou sem adição dos HDACi , na presença de 1 mM de L-DOPA , ao abrigo da luz. B) As células foram incubadas em MM durante cinco dias. Subsequentemente, 1 mM de L-DOPA e diferentes concentrações dos inibidores foram adicionados às culturas. As células foram incubadas por mais 48 h, no escuro. Resultados semelhantes foram obtidos por dois experimentos independentes.

### 5.8 NaBut aumenta a população de células na fase G2 / M do ciclo celular.

Devido ao retardo no crescimento das leveduras durante tratamento (**Figura 10**), decidiu-se investigar os efeitos dos HDACi sobre o ciclo celular de *C. neoformans* tratando-se as células com as drogas durante a fase de crescimento exponencial. Como mostrado na **figura 18**, NaBut na concentração de 10 mM apresentou um claro aumento no pico correspondente a população de células e G2 / M (**Figura 18C**). Não foram observadas diferenças significativas nas células tratadas com 10 μM de TSA (**Figura 18 D-E**).

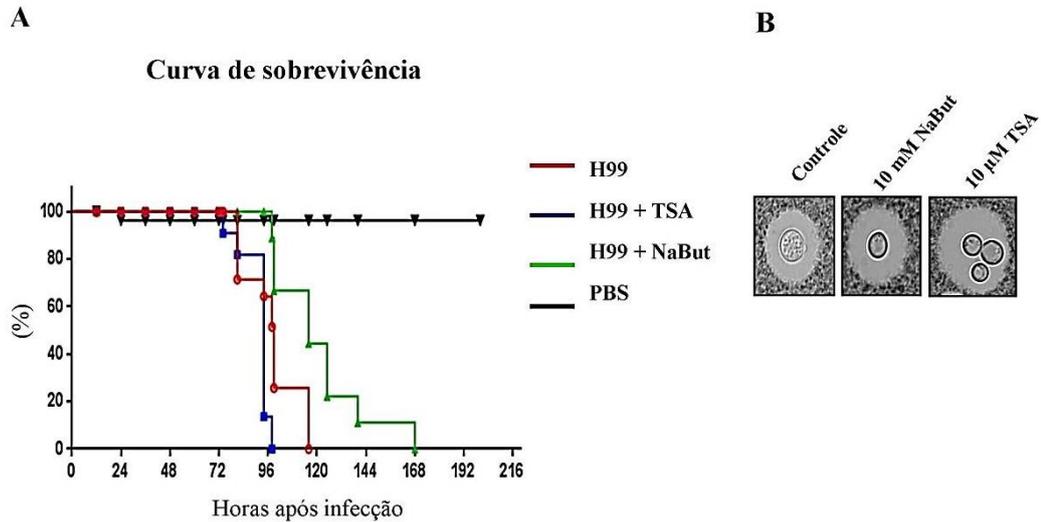


**Figura 18: NaBut provoca aumento na população de células de *C. neoformans* em G2 /M:** A) Células de *C. neoformans* H99 não tratadas. B) Células tratadas com 1 mM de NaBut durante 24 h. C) Células tratadas com 10 mM de NaBut durante 24 h. D) Células tratadas com DMSO 0,1% durante 24 h. E) Células tratadas com 10 μM de TSA durante 24 h Número de eventos adquiridos: 20.000. Resultados semelhantes foram obtidos em três ensaios independentes..

### 5.9 A capacidade de expansão da cápsula e a virulência são restauradas após a remoção dos HDACi.

A virulência entre as leveduras não tratadas e tratadas com HDACi e posteriormente lavadas para remoção das drogas foi comparada. Lagartas da espécie *G. mellonella* foram utilizadas como modelo de infecção nesta análise. Embora, no momento da infecção, se tenha verificado que as células pré-tratadas apresentavam cápsulas menores, a curva de sobrevivência das lagartas não apresentou diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle (**Figura 22A**). Decidiu-se então avaliar se após remoção das drogas, as células restauravam os fenótipos de virulência. As leveduras foram então cultivadas em meio mínimo para indução da cápsula na presença dos HDACi. Após 24 h, as células do grupo controle mostraram cápsulas maiores do que as células tratadas com as drogas, como observado

anteriormente. As células foram então lavadas e novamente inoculadas em **MM** sem as drogas por mais 24 h. Observou-se que as células previamente tratadas com HDACi recuperaram a capacidade de formação da cápsula após a remoção das drogas, apresentando tamanho de cápsulas semelhante ao controle não tratado (**Figura 22B**).



**Figura 19:** *C. neoformans* recupera a virulência *in vitro* e *in vivo* após remoção dos HDACi, Após a remoção dos inibidores de HDAC do meio de cultura. A) As leveduras foram incubadas durante 48 horas em meio **MM** com 10 mM de NaBut ou 10 μM de TSA . As células foram então lavadas e  $10^5$  leveduras foram inoculadas em cada lagarta de *G. mellonella*. Os grupos controle receberam células de *C. neoformans* não tratadas ou somente PBS. B). As leveduras foram incubadas por 48 h em **MM** com NaBut 10 mM (controle: células não tratadas) ou TSA 10 μM (controle: DMSO 0,1%). As células foram em seguida lavadas a fim de remover as drogas e cultivadas em **MM** durante 24 horas adicionais para a detecção da cápsula.

## 6. Discussão

---

HDACi são geralmente empregados como gentes terapêuticos em doenças como o câncer e desordens autoimunes (Patel et al., 2011). Devido ao fato dos mecanismos epigenéticos estarem se mostrando cada vez mais importantes, no contexto de regulação da expressão dos genes, estas drogas vêm sendo cada vez mais usadas em pesquisas com os mais diferentes organismos modelos. Diversos estudos têm mostrado a capacidade dos HDACi mudarem o perfil de expressão de genes chave envolvidos em muitos processos regulatórios, como apoptose, ciclo celular, diferenciação celular e resposta imune (Heerdt et al 1997; Groth et al, 2007; Shahbazian & Grunstein, 2007). Em fungos como *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *S. pombe*, o remodelamento da cromatina está relacionado à regulação de genes envolvidos com a resposta adaptativa a diferentes condições de estresse (Simonetti et al., 2007; Hnisz et al. 2010; Zacchi et al., 2010; Robbins et al. 2012). Neste contexto, o presente trabalho teve o interesse de avaliar os possíveis efeitos de NaBut e TSA sobre a expressão dos principais fenótipos de virulência do patógeno oportunista *C. neoformans*. Os resultados claramente indicam que os HDACi afetam fatores morfológicos e enzimáticos que são essenciais à habilidade de *C. neoformans* de infectar células hospedeiras.

A capacidade de crescer a 37 °C é muito importante para que patógenos possam se desenvolver dentro do hospedeiro mamífero e *C. neoformans* possui essa habilidade, que lhe é essencial para o processo de infecção (Perfect, 2006; Liu et al., 2008 ). Com base nisso, foi avaliado o efeito dos HDACi no crescimento de *C. neoformans* a 30 °C, temperatura esta que favorece um ótimo crescimento, e a 37 °C. Ambas as drogas interferiram negativamente no crescimento a 37 °C. No entanto, o retardo no crescimento a 30 °C, embora de modo menos pronunciado que a 37 °C, foi observado apenas na presença de NaBut (**Figura 10**). Nguyen e colaboradores (2011), em análises apenas a 30 °C, mostraram que NaBut foi capaz de interferir no crescimento de *C. neoformans* em concentrações variando de 10 a 60 mM. Em nossos experimentos, foi avaliado o efeito de concentrações menores (1 a 20 mM) e observamos que o crescimento é reduzido a partir de concentrações de 1 mM para NaBut e de 3 µM para TSA. Com base nestes dados podemos afirmar que a sensibilidade de *C. neoformans* ao

HDACi é menor que a previamente relatada. Embora os HDACi dramaticamente afetem o crescimento das células, a viabilidade é mantida, uma vez que as células previamente tratadas cresceram similarmente ao controle após remoção das drogas (**Figura 11**). A viabilidade não foi avaliada no estudo de Nguyen e colaboradores (2011).

A cápsula polissacarídica é considerada o principal fator de virulência em *C. neoformans*, uma vez que, contribui para a evasão das células do sistema imune e para a replicação dentro de fagócitos (Aksenov et al., 1973; Zaragoza et al., 2009; Jabon & Doering, 2011). Observamos, sob condições de indução *in vitro*, que a expansão da cápsula é significativamente inibida mesmo nas menores concentrações de NaBut (1 mM) e TSA (1,5 µM) testadas (**Figura 12**). Nguyen et al. (2011) demonstraram o efeito inibitório de NaBut nas concentrações de 20 e 40 mM de NaBut e de 9 mg / L de TSA. Devido às altas concentrações testadas por estes autores, é possível que os efeitos por eles observados sejam resultado de uma perda de viabilidade celular, ao invés de um efeito direto sobre a biossíntese da capsula.

Analizamos também o tamanho das células sob condições de indução da cápsula na presença dos HDACi pela técnica de Citometria de fluxo, que é muito mais sensível e precisa do que a análise morfométrica (**Figura 11**) e constatamos que há uma diminuição significativa no tamanho das células como um todo na presença dos HDACi. Em outros estudos, demonstrou-se que mutações nos genes *GCN5* e *ADA2*, pertencentes ao complexo *Spt-Ada-Gcn5* Acetiltransferase (SAGA) acarretou em um fenótipo hipocapsular na linhagem H99 de *C. neoformans* (O'Meara et al., 2010; Haynes et al., 2011). Por outro lado, a deleção dos genes de histona desacetilases *RPD304* e *HOS2* também resultou em problemas de crescimento e formação da cápsula (Liu et al., 2008). Estes dados, em conjunto com nossos resultados, apontam que interações entre acetilação/desacetilação de histonas são requeridas para a indução de cápsula em *C. neoformans*. García-Rodas et al (2014) demonstraram que o benomil, uma droga que pára o ciclo celular de *C. neoformans* em G2 / M, inibe o crescimento da cápsula. Nossos resultados também mostraram que NaBut ocasionou um aumento da população de células em G2 / M (**Figura 18**), um fato que pode estar relacionado ao efeito inibitório da expansão da cápsula observado.

Fosfolipases são enzimas que hidrolisam ésteres de glicerol dos fosfolipídios e alteram a conformação da membrana celular, deste modo facilitando a invasão por patógenos ao proporcionar a lise das células hospedeiras (Ma & May, 2009). Genes de

fosfolipases foram descritos para *C. neoformans*, sendo que os dois mais relacionados à virulência codificam as fosfolipase B e C (*PLB* e *PLC*). Nossos resultados mostraram que NaBut inibiu a atividade de fosfolipase de forma dose-dependente (**Figura 14**), enquanto que para TSA uma sutil redução da atividade de fosfolipase somente foi observada em concentrações acima de 30 $\mu$ M a 37 °C (**Figura 14B**). Esta diferença pode estar relacionada ao mecanismo de ação de cada droga. Os fenótipos observados parecem ser gene ou via específicos, deste modo, diferentes respostas podem ocorrer ao se empregar diferentes HDACi, e esta informação deve ser considerada na escolha de possíveis terapias alternativas combinando clássicos antifúngicos com os HDACi. Não podemos afirmar qual dos genes, se não todos, foram afetados pelo HDACi. Ensaios utilizando os mutantes para cada gene de fosfolipase poderiam auxiliar na elucidação desta questão. Ainda que estejamos assumindo que os HDACi estejam afetando a transcrição dos genes de fosfolipase, ou de seus reguladores, não podemos descartar a possibilidade de interferência direta na atividade enzimática.

A enzima urease é requerida para a evasão do sistema nervoso, no modelo de infecção de camundongos com *C. neoformans* (Singh et al., 2013). Tanto NaBut quanto TSA, nas concentrações testadas, não afetaram a atividade de urease (**Figura 15**). Neste contexto, podemos especular que os efeitos dos HDACi sobre os fenótipos de virulência são específicos e não decorrentes de uma disfunção metabólica geral.

A ocorrência do acasalamento foi definida como um fator de virulência para o gênero *Cryptococcus* (Kwon-Chung & Bennett, 1978; Nielsen et al., 2005). O locus *MAT* em *C. neoformans* ocorre em duas formas idiomórficas: tipos **a** e  **$\alpha$** . O acasalamento envolve a fusão de células haplóides de tipos opostos, produzindo uma hifa dicariótica que se desenvolve em um basídio no qual a meiose acontece (Kwon-Chung, 1975 e 1976). Os eventos de acasalamento podem ser mensurados a partir do número de filamentos formados após o co-cultivo de leveduras de acasalamento opostos. Na **figura 16**, demonstramos que os HDACi, em particular NaBut, drasticamente reduziram a formação das hifas de acasalamento de modo dose-dependente. De modo similar, a deleção do gene de acetil transferase *ADA2* das linhagens Kn99a e Kn99 $\alpha$  levaram a um acasalamento prejudicado e a uma redução na virulência (Haynes et al., 2012). Juntas, estas informações indicam que a remodelagem da cromatina possa estar envolvida na reprodução sexual de *C. neoformans*, atuando também nos processos de adaptação ao hospedeiro.

A produção de melanina permite que fungos patogênicos possam sobreviver em pH ácido, sob radiação e outras condições de estresse (Gomez & Nosanchuk, 2003). O processo de melanização em *C. neoformans* está diretamente relacionado à densidade populacional (Eisenman et al., 2011), muito provavelmente por meio de um mecanismo de *quorum sensing* (Albuquerque et al., 2014). Em nossos experimentos, os efeitos dos HDACi na síntese de melanina variaram conforme o momento no qual as drogas foram adicionadas ao meio de cultura. Quando os HDACi foram adicionados simultaneamente ao inóculo de leveduras, a produção de melanina foi reduzida (**Figura 17A**). Por outro lado, quando os HDACi foram adicionados à cultura após cinco dias de crescimento prévio, quando as células já se encontravam em fase estacionária, as menores concentrações de NaBut (1 e 5 mM) provocaram um aumento no conteúdo de melanina, enquanto que TSA não apresentou efeito (**Figura 17B**). Acreditamos que estes resultados estão relacionados à densidade populacional da cultura. Neste contexto, a redução na produção de melanina apenas foi constatada quando as drogas foram adicionadas juntamente com o inóculo, o que provavelmente acontece devido a um atraso no crescimento populacional, conforme dados apresentados na **figura 10** e um aumento da população de células em G2 / M no ciclo celular (**Figura 18C**). Por outro lado, quando a cultura é crescida antes da adição das drogas, o aumento da densidade populacional permite o disparo de mediadores químicos necessários a síntese de melanina. Em repetidos ensaios com este segundo desenho experimental, observamos um aumento na produção de melanina na presença de 1 e 5 mM de NaBut. Ainda não sabemos explicar como acontece este aumento, no entanto parece razoável especular que em baixas concentrações, após as leveduras alcançarem a fase estacionária de crescimento, NaBut poderia afetar a cromatina favorecendo a transcrição de lócus que controlam positivamente a produção de melanina.

Os efeitos dos HDACi sobre a progressão do ciclo celular foram descrito para distintos para tipos celulares (Darzynkiewicz et al., 1981; Siavoshian et al., 1997; Yoshida et al., 1988; Siavoshian et al., 2000; YAMASHITA et al., 2003). Estudos com células cancerígenas demonstraram que NaBut e TSA param o ciclo celular em G1 / G0 e G2 / M respectivamente (Heerdt et al. 1997; Lallemand et al. 1999). No entanto, o possível efeito de NaBut e TSA na divisão celular de *C. neoformans* não havia sido estudado ainda. Aqui relatamos que a concentração de 10 mM de NaBut levou ao

aumento da população de células em G2 / M (**Figura 18 A-C**). Entretanto, testes com TSA na concentração de até 10  $\mu$ M não afetaram o ciclo celular (**Figura 18 D-E**).

Tendo em vista que os HDACi afetaram a expressão de diferentes fatores de virulência de *C. neoformans in vitro* avaliamos, se a deficiência induzida por esses inibidores poderia ser epigeneticamente herdada e se isso poderia afetar a patogênese do fungo em modelo animal. Usamos o modelo de *G. mellonella*, já bem estabelecido para estudos de virulência em *C. neoformans* (Mylonakis et al., 2005). Cultivamos as leveduras de *C. neoformans* em meio mínimo para indução do fenótipo de cápsula, na presença de 10 mM NaBut ou 10  $\mu$ M TSA, por 48 h. Em seguida, as células foram lavadas para remoção das drogas e as lagartas foram infectadas. Intrigantemente, não observamos diferença significativa entre a curva de sobrevivência das lagartas que receberam as leveduras previamente tratadas com os HDACi e aquela das que receberam leveduras sem nenhum tratamento prévio (**Figura 19A**). Perguntamos-nos então se, após remoção dos HDACi as leveduras recuperam os fenótipos de virulência. Para avaliar essa questão, cultivamos as leveduras nas mesmas condições indutoras de cápsula na presença dos HDACi. Em seguida, lavamos as células para remoção dos inibidores e inoculamos em meio mínimo novamente. Observamos que as leveduras restauraram o fenótipo de capsula igual ao controle (**Figura 19B**), sugerindo que o efeito das drogas nas células fúngicas é transitório e não herdável.

Vale ressaltar que em *C. neoformans* existem genes reguladores que podem modular a expressão de genes de virulência distintos. Por exemplo, o fator de transcrição Set12 $\alpha$  está relacionado com a formação da cápsula, produção de melanina e os processos de acasalamento, e a transcrição deste gene regulador é modulada por uma histona acetil transferase (Chang et al., 2000; Haynes et al., 2012) Neste ponto de vista, é razoável assumir que a redução observada sobre os fenótipos virulência induzida por NaBut e TSA possa resultar da ação dessas drogas sobre a expressão de genes que atuam como reguladores comuns, em vez de diretamente sobre os genes de virulência de forma individual. Embora os efeitos dos HDACi estejam associados principalmente a remodelação da cromatina, consideramos também o fato destes inibidores poderem afetar proteínas não histônicas, envolvidas nos mais variados processos biológicos (Yang, 2007; Choudhary et al., 2009; Patel et al., 2011; Robbins et al. 2012).

Apesar de NaBut e TSA atuarem ambos como inibidores de histonas desacetilases, estas drogas diferem em vários aspectos, tais como a estrutura molecular,

a concentração molar necessária para uma atividade máxima e a dinâmica cinética. TSA é geralmente ativo em concentrações micromolares, enquanto que o NaBut requer concentrações milimolares. Esta diferença é explicada parcialmente pela acessibilidade ao núcleo celular e pelo fato de que NaBut provavelmente sofre  $\beta$ -oxidação antes de chegar ao centro ativo das HDAC (Arts et al. 1995; Siavoshian et al. 2000). Outra diferença é que NaBut parece ser mais estável e de efeito mais duradouro do que TSA (Waterborg, 2001 & 2001; Siavoshian et al. 2000). Essas propriedades distintas das drogas podem explicar alguns resultados diferentes observados para determinados fatores de virulência.

Modificações pós-traducionais de histonas são empregadas por diferentes espécies a fim de controlar a expressão de características necessárias para a sobrevivência dentro do hospedeiro ou no meio ambiente. Portanto, os produtos dos genes envolvidos na modulação da cromatina podem representar eficazes alvos para drogas antimicrobianas. Acreditamos que nossos dados contribuem com informações importantes sobre a expressão dos fenótipos de virulência associada com mudanças na estrutura cromatina em *C. neoformans*. Agora estamos interessados em investigar o papel de genes específicos associados à remodelação da cromatina e como estes regulam a expressão de genes de virulência em *C. neoformans*. Pretendemos gerar mutantes para genes de histonas desacetilases e avaliar o transcriptoma desses isolados por meio da técnica *high-throughput* RNA-seq.

---

## *Capítulo 2*

---

Estudo do papel dos genes de  
HDAC classe I e II sobre a  
virulência do fungo *Cryptococcus*  
*neoformans*.

## 7. Materiais e métodos

---

### 7.1 Linhagens, meios de cultura e condições de crescimento:

Os lócus gênicos analisados neste estudo são mostrados na **tabela 2**.

As linhagens de *C. neoformans* usadas neste estudo para deleção dos genes de HDAC foram: H99, KN99 *MAT $\alpha$*  e *MATa*, todas pertencentes ao sorotipo A, que é o sorotipo com maior prevalência em indivíduos imunocomprometidos (Dromer et al., 1996). Todas as linhagens usadas neste estudo estão listadas na **tabela 3**.

As leveduras foram crescidas em YPD (extrato de levedura 1%, glicose 2%, bacto-peptona 2% pH 7.2) a 30 °C por 12 h, ou durante a noite. As linhagens foram mantidas em estoque a -80 °C em glicerol 15%. Para os experimentos, alíquotas foram descongeladas e semeadas em placa contendo ágar YPD ou YPD acrescido dos marcadores de resistência neomicina (*NEO*), nourseotricina (*NAT*) no caso das linhagens mutantes, e estas foram mantidas a 4 °C com repiques quinzenais. Antes de cada ensaio, colônias isoladas em meio sólido, eram crescidas previamente por aproximadamente 12 h, em meio YPD a 30 °C.

**Tabela 2: Lócus gênicos analisados neste estudo.**

Genes	Número de acesso FungiDB
<i>CLR3</i>	CNAG_01563
<i>SAP128</i>	CNAG_04679
<i>HD3</i>	CNAG_05096
<i>CLR61</i>	CNAG_01699
<i>CLR62</i>	CNAG_05276
<i>HOS3</i>	CNAG_00660
<i>HOS2</i>	CNAG_05563
<i>RPD3</i>	CNAG_05690

**Tabela 3: Linhagens de *C. neoformans* usadas neste estudo:**

<b>Linhagens</b>	<b>Gene</b>	<b>Genótipos</b>	<b>Fonte</b>
H99	-	MAT $\alpha$	Perfect et al., 1908
KN99	-	MAT $\alpha$ – MAT $\alpha$	Nielsen et al., 2003
H99	<i>RAS1</i>	<i>ras1<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Alspaugh et al., 2000
FS3	<i>CLR3</i>	<i>clr3<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS5	<i>CLR3</i>	<i>clr3<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS4	<i>clr3+CLR3</i>	<i>clr3<math>\Delta</math>::NEO + CLR3 + pCH233 (NAT)</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS6	<i>SAP128</i>	<i>SAP128<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS7	<i>SAP128</i>	<i>SAP128<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS8	<i>HOS3</i>	<i>hos3<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS11	<i>HOS3</i>	<i>hos3<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS9	<i>HD3</i>	<i>hd3<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS10	<i>HOS2</i>	<i>hos2<math>\Delta</math>::NAT</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS12	<i>CLR62</i>	<i>clr62<math>\Delta</math>::NEO</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS13	<i>RPD3</i>	<i>rpd3<math>\Delta</math>::NAT</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS14	<i>CLR3/HOS2</i>	<i>clr3<math>\Delta</math>::NEO + hos2<math>\Delta</math>::NAT</i> MAT $\alpha$	Este estudo
FS15	<i>CLR3/RPD3</i>	<i>clr3<math>\Delta</math>::NEO + rpd3<math>\Delta</math>::NAT</i> MAT $\alpha$	Este estudo

## 7.2 Macrófagos murinos J774.1

Os macrófagos murinos da linhagem J774.1 (*murine BALB/c macrophage-like cell line derived from reticulum cell sarcoma*) foram mantidos em nitrogênio líquido em 90% de meio DMEM (Dulbeccos Modified Eagle's Medium – GibcoBRL#11965) suplementado com soro fetal bovino 20% (Gibco, USA), NCTC-109 10% (Gibco), solução de penicilina-estreptomicina (1x) (Gibco 15140-122) e 1% solução de aminoácidos não essenciais (Gibco#11140-050), e 10% de DMSO. Para utilização nos experimentos, os macrófagos foram submetidos a rápido processo de descongelamento: 30 segundos em banho a 37 °C e cultivados em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> para cultura de células (Falcon#1005) contendo meio DME suplementado com 10% soro fetal bovino, NCTC-109 10%, solução de penicilina-estreptomicina (1x) e 1% de solução de

aminoácidos não essenciais, o meio foi previamente esterilizado por filtração (membranas de poro de 0.2 µm). As células foram mantidas em estufa climatizada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

### 7.3 Análise da homologia entre as proteínas HDAC classes I e II.

As sequências codificantes para histonas desacetilases presentes em *C. neoformans*, foram identificadas e copiadas dos bancos genômicos de fungos Broadinstitute (<https://www.broadinstitute.org/>) e FungiDB (<http://fungidb.org/fungidb/>). Os possíveis homólogos destas sequências, foram primeiramente analisados com ajuda do *site* FungiDB e sequências de proteínas homólogas foram extraídas destes mesmos bancos genômicos para as espécies de *S. cerevisiae* e *S. pombe*. As análises comparativas entre as proteínas homólogas do complexo das HDAC classe II e II foram realizadas com o auxílio do programa MUSCLE 3.7 (*Multiple Sequence Comparison by Log-expectation*) disponível gratuitamente em: [http://phylogeny.lirmm.fr/phylo\\_cgi/one\\_task.cgi?task\\_type=muscle](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/one_task.cgi?task_type=muscle).

### 7.4 Extração de RNA e RT-qPCR

Células da linhagem H99, tipo selvagem, foram crescidas por 24 h em YPD / 30 °C / 150 rpm. Em seguida foram lavadas três vezes e contadas em hemocitômetro e densidade celular foi ajustada para  $1 \times 10^8$  / mL. As células foram inoculadas em meio mínimo (MM), quimicamente definido (dextrose 15 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 29.3 mM, glicina 13 mM e tiamina 3 µM; pH 5.5) nos intervalos de 0, 30, 60 e 180 minutos a 30 °C. Após estes períodos de incubação, as células foram coletadas por centrifugação (3.000 g / 5 min/ temperatura ambiente). O precipitado de células foi suspenso em 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) e submetido a lise mecânica com pérolas de vidro de 0.5-mm por 20 min no *vortex*. Após a lise, o RNA total foi extraído de acordo com o manual do reagente Trizol, com algumas modificações: centrifugação a 12.000g / 20min / 2 °C; a etapa de precipitação com isopropanol foi realizada a -20 °C por 1 h, seguida com centrifugação a 16.000g / 20min / 2 °C. Os RNAs foram quantificados com auxílio

do NanoDrop™ e a integridade foi verificada por análise eletroforética em gel de agarose 1%. A síntese de cDNA foi realizada usando 1-2 µg de RNA total, empregando-se *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems). As amplificações, usando cDNA como molde para a análise quantitativa de acúmulo de transcritos, foram realizadas usando-se o *Kit Fast SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), de acordo instruções do fabricante. O método para quantificação relativa de Livak (2001) foi empregado nas análises. Para evitar amplificação a partir de possíveis sequências de DNA contaminante, os oligonucleotídeos foram desenhados na junção *exon-exon* (**Tabela 4**). O controle endógeno escolhido foi o gene de actina, e as amostras do tempo zero foram usadas como calibradores.

**Tabela 4: Oligonucleotídeos usados para RT-PCR dos transcritos dos genes de HDAC em *C. neoformans*.**

Gene ID	5'-3' Sequência do Oligonucleotídeos
<i>RPD3</i> CNAG_05690 F	GCAAAGGTAAAGGATACGCT
<i>RPD3</i> CNAG_05690 R	CACCTGGTTGATACCATTTCG
<i>HOS2</i> CNAG_05563 F	ATG GGG AAC GCC ATC CTA T
<i>HOS2</i> CNAG_05563 R	AGG GGC ATG ATA CGA CAT TT
<i>CLR61</i> CNAG_01699 F	TCAGACCTCGTCGAGCAACT
<i>CLR61</i> CNAG_01699 R	CCTCTTGTCCCATTTCAGT
<i>CLR62</i> CNAG_05276 F	TTA AAC CTC GAA GGG CTA CC
<i>CLR62</i> CNAG_05276 R	TAA AGC ATC CGC AGT CTC C
<i>HOS3</i> CNAG_00660 F	TGGGCAGTACATCGAAAACATT
<i>HOS3</i> CNAG_00660 R	GGCTTCAGTCTGTTCCATGA
<i>HD3</i> CNAG_05096 F	ACA TAG AGC GCC TTC TAA AG
<i>HD3</i> CNAG_05096 R	GAT TGT CGT GCG AGA GAT T
<i>CLR3</i> CNAG_01563 F	CTCCTGAAGTCACCGAGCT
<i>CLR3</i> CNAG_01563 R	GGC CAA TGG TAT TTG GTA CA
<i>SAP128</i> CNAG_04679 F	CAGGTTTACGCTTGGCAAAC
<i>SAP128</i> CNAG_04679 R	CAT AAA CGT GTC GGA AGT GG

F: forward, R: reverse

## 7.5 Técnicas de Biologia Molecular

Todas as PCRs foram realizadas usando-se o termociclador T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad) e reagentes padrão da TaKaRa kit (Takara Clontech). As condições de PCR foram 95°C por 5 minutos seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50 - 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto para cada Kb (*Kilobase*) amplificado na reação.

Todos os oligonucleotídeos utilizados para se obter cada linhagem mutante deste estudo estão listados na **tabela 5**. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados usando-se o programa *Primer 3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e analisados usando-se o programa *OligoAnalyzer* 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Os cassetes de deleção foram desenhados com a ajuda do programa *SnapGene* versão 3.1.2.

Todas as enzimas e reagentes de clonagem utilizadas neste estudo foram da companhia *New England Biolabs Inc* (NEB).

As linhagens mutantes para os genes de HDAC *CLR3*, *SAP128*, *HD3*, *CLR62*, *HOS3* foram obtidas substituindo-se a ORF (*Open Reading Frame*) inteira pelo gene dominante de resistência a neomicina (*NEO*), de acordo com a metodologia de PCR *Double joint* (Kim et al., 2009). As regiões correspondendo às regiões imediatamente a montante e a jusante de cada ORF, foram amplificadas a partir do DNA genômicos da linhagem H99 tipo selvagem, usando-se os oligonucleotídeos listados na **tabela 5**. O cassete *NEO* foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pJAF1 (**Anexo II**) usando-se os oligonucleotídeos NSL e NSR. Para as etapas de sobreposição, uma única variação da técnica original foi introduzida: Os oligonucleotídeos 3 e 4 são o reverso complementar dos oligonucleotídeos 2 e 5 respectivamente. Estes oligonucleotídeos possuem em sua região 3' um pequena sequência homóloga à região codante do gene do marcador *NEO*, e na região 5' portam uma sequência homóloga à região da ORF do gene alvo para deleção, possibilitando deste modo uma melhor sobreposição entre o marcador *NEO* e a ORF alvo nas etapas de PCR de sobreposição para obtenção de cada cassete *knock out* (KO) (**Figura 20**): *clr3::neo*, *sap128::neo*, *hd3::neo* e *clr62::neo*; Os cassetes de deleção foram introduzidos na célula receptora através da técnica de transformação por biobalística (Toffaletti et al., 1993) (**Figura 20**).

As seguintes combinações de oligonucleotídeos foram usadas para criar os KO: HDAC fragmento alvo 5': oligonucleotídeos P1 + P2, HDAC fragmento alvo 3': oligonucleotídeos P5 + P6, NEO marcador de resistência 5': oligonucleotídeos P3 + AA3935 (NSL), NEO marcador de resistência 3': oligonucleotídeos P4 + AA3934 (NSR) (**Figura 20-1º Rodada**). Para os fragmentos de sobreposição (gene alvo + NEO) 5': P1 + AA3935 (M13 Rev) , fragmentos de sobreposição (gene alvo + NEO) 3': P6 + AA3934 (M13 F) (**Figura 20-2º Rodada**). Os pares de oligonucleotídeos P9 + P10 foram usados para confirmar a deleção das ORFs.

As linhagens mutantes para os genes de HDAC *CLR61*, *HOS2* e *RPD3* foram geradas a partir dos transformantes da biblioteca depositada pelo grupo do Dr. Madhani (Liu et al., 2008). A estratégia usada foi amplificar por PCR o cassete de deleção com a marca de resistência à nourseotricina (*NAT*), e introduzi-lo por biobalística em células de *C. neoformans* do tipo selvagem linhagem H99. Para aquisição dos cassetes de deleção, foram desenhados oligonucleotídeos aproximadamente 500 pares de base antes e depois da ORF. As seguintes combinações de oligonucleotídeos foram usadas para amplificação do cassete de deleção a partir dos mutantes *HOS2* e *RPD3*: oligonucleotídeos 1 + 6. Os oligonucleotídeos P9 + P10 foram usados para confirmar a deleção da ORF.

Os duplos mutantes *clr3Δ/hos2Δ* e *clr3Δ/rpd3Δ* foram obtidos por cruzamento com a linhagem *clr3Δ MATa* + *hos2Δ* ou *rpd3Δ MATα* em meio indutor de acasalamento MS (ver item 7.9 para detalhes). Os esporos destes cruzamentos foram isolados por microdissecção e semeados em placas contendo duplo marcador *NEO/NAT* de acordo com os parentais e confirmados por PCR para a dupla deleção.

Para reconstituir o mutante *clr3Δ*, os oligonucleotídeos P11 (AAGG AGATCT GACACTTACGCTCTTT) e P12 (GTAG TCTAGA AGTTGTGTTTCATCAGTCA) foram desenhados contendo a sequência de sítio de restrição para a endonuclease *BglIII*, devido a ausência deste sítio interno a ORF do gene *CLR3*. Este par de oligonucleotídeos foi usado para amplificar as sequências do promotor, gene e terminador do gene *CLR3* a partir de DNA gnômico extraído da linhagem H99 tipo selvagem, anelando aproximadamente 500 pb a montante e a jusante da ORF. Após amplificação, o fragmento foi purificados a partir do gel de agarose, usando-se o

reagente *Quiagen Gel extraction* (Quiagen) e clonado primeiramente no plasmídeo pCR2.1 (**Anexo II**). Em seguida o fragmento foi digerido com a enzima *BglIII* (NEB) e clonado adjacientemente ao marcador seletivo *NAT* em um único sítio do plasmídeo pCH233 (**Anexo III**), permitindo deste modo a seleção dos transformantes em meio contendo nourseotricina. O plasmídeo pCH233 foi previamente digerido com as endonucleases de restrição *BamHI* e *SpeI* (NEB) que permitem a ligação de fragmentos digeridos com *BglIII*, as digestões de DNA ocorreram conforme especificações do fabricante das enzimas. O plasmídeo digerido foi posteriormente tratado com *Antarctic Phosphatase* (NEB) de acordo com protocolo do fabricante, para evitar que as extremidades cortadas se religassem. O fragmento contendo o gene *CLR3* foi ligado no vetor pCH233 usando-se o *Kit T4 DNA Ligase* (NEB) seguindo especificações do próprio fabricante. O plasmídeo contendo o cassete com o gene *CLR3* bem como a marca de seleção *NAT* foi co-transformado na linhagem mutante *clr3Δ* (FS3) através de biobalística. As colônias que obtiveram o cassete de reconstituição foram capazes de crescer no meio seletivo contendo nourseotricina e foram submetidas a verificação por PCR.

Todos os transformantes foram selecionados com os antibióticos usados como marcadores seletivos (100 mg/ml de *NAT*, 100 mg/ml de *NEO*) e confirmados por PCR.

Após confirmação, os transformantes foram submetidos a diferentes condições de crescimento para determinação de seus fenótipos e virulência.

**Tabela 5: Lista de oligonucleotídeos usados neste estudo**

Gene	Oligos N°	Código	Sequencia 5'- 3'	Alvo	
<i>NEO</i>	NSL	AA3934	TCGATGCGATGTTTCGCT	NEO	
	NSR	AA3935	CCTGAATGAACTGCAGGA	NEO	
<i>CLR3</i>	P1	AA4379	CAAAGGCAACAGATCGGAAT	Região Flanqueadora 5'	
	P2	AA4380	CCAAGCTTGGCGTAATCATGCTTGCTGTGGGTTGAGTCG	Região Flanqueadora 5' + 5' NEO	
	P3	AA4385	CGACTCAACCCACAGCAAGCATGATTACGCCAAGCTTGG	Complemento reverso do P2	
	P4	AA4386	CCCCAGCCAGCTCGCTACATGAATTGTAATACGACTCAC	Complemento reverso do P5	
	P5	AA4387	GTGAGTCGTATTACAATTCATGTAGCGAGCTGGCTGGGG	Região Flanqueadora 3' + 3' NEO	
	P6	AA4387	TCTTGTTACAGCCAGCACAAACA	Região Flanqueadora 3'	
	P9	AA4396	CCGTTCTCCTTCTTCTCCAAC	Interno a ORF	
	P10	AA4397	TTTTCATCCTCCAATACCAC	Interno a ORF	
	P11	AA4419	AAGGAGATCTGACACTTACGCTCTTT	Região Flanqueadora 5' + sítio Bgl2	
	P12	AA4420	GTAGTCTAGAAGTTGTGTTTCATCAGTCA	Região Flanqueadora 3' + sítio Bgl2	
	<i>SAP128</i>	P1	AA4470	TAGACCGCTTTAACCATT	Região Flanqueadora 5'
		P2	AA4471	CCAAGCTTGGCGTAATCATGTCTCGATGGTTACTGAGCTT	Região Flanqueadora 5' + NEO
P3		AA4472	AAG CTC AGT AAC CAT CGA GA C ATG ATT ACG CCA AGC TTG G	Complemento reverso do P2	
P4		AA4473	TAT TCT TCT CTC TTC ACG ACC TGA ATT GTA ATA CGA CTC AC	Complemento reverso do P5	
P5		AA4474	GTGAGTCGTATTACAATTCAGGTCGTGAAGAGAGAAGAATA	Região Flanqueadora 3' + NEO	
P6		AA4475	GATCTTGAGCATACCACTCCTA	Região Flanqueadora 3'	
P9		AA4477	CACCGCACTTGATTAGGATATT	Interno a ORF	
P10		AA4478	CAGTGGTTTCTTCAATCTTC	Interno a ORF	
<i>HD3</i>		P1	AA4516	CCATGACATTAGGAGTAAGGAT	Região Flanqueadora 5'
		P2	AA4517	CCAAGCTTGGCGTAATCATGTCTCGTTGTCTGTTGAGTGTACATAC	Região Flanqueadora 5' + 5' NEO
	P3	AA4518	GTATGACACTCAACAGACAACCGACATGATTACGCCAAGCTTGG	Complemento reverso do P2	
	P4	AA4519	AAACCATCAGGAAACCATGTGAATTGTAATACGACTCAC	Complemento reverso do P5	
	P5	AA4520	GTGAGTCGTATTACAATTCACATGGTTTCTGATGGTTT	Região Flanqueadora 3' + 3' NEO	
	P6	AA4521	TATCGTGAGTTGTAATAATGGGTG	Região Flanqueadora 3'	
	P9	AA4522	CTACAGTATATCCCTATCCCTTGA	Interno a ORF	
	P10	AA4523	GATAAGAAGAGGGTAGAAGAGGTT	Interno a ORF	
	<i>CLR61</i>	P9	AA4491	GAATATCTTCTCGTAGTCCAGTG	Interno a ORF
		P10	AA4492	TACTGTTGCTCCTCCTACTATC	Interno a ORF
<i>CLR62</i>	P1	AA4554	TTTGCATCTTCTCCAGGA	Região Flanqueadora 5'	
	P2	AA4555	CCAAGCTTGGCGTAATCATGCGGACGTAACAAGGAGTTGAGA	Região Flanqueadora 5' + 5' NEO	
	P3	AA4556	TCTCAACTCCTTGTTACGTCCGCATGATTACGCCAAGCTTGG	Complemento reverso do P2	
	P4	AA4557	GAGACGTGATAGATAATAGGAGGAGAATTGTAATACGACTCAC	Complemento reverso do P5	
	P5	AA4558	GTGAGTCGTATTACAATTCCTCCTATTATCTATCACGTCTC	Região Flanqueadora 3' + 3' NEO	
	P6	AA4559	TTATCCTGCAAAGCGTCTAACCT	Região Flanqueadora 3'	
	P9	AA4568	GTGATGTCAGAGTGAGTCTTTT	Interno a ORF	

**Tabela 5: Continuação.**

	<b>P10</b>	AA4569	TTACTTGATACGCTCCAGATACT	Interno a ORF	
<b>HOS3</b>	<b>P1</b>	AA4479	TTGCCTGGATTGGTCTTTTC	Região Flanqueadora 5'	
	<b>P2</b>	AA4480	CCAAGCTTGGCGTAATCATGTCTCCCCCTTTTCCTCTTTC	Região Flanqueadora 5' + 5' NEO	
	<b>P3</b>	AA4481	GAAAGAGGAAAAGGGGAGACATGATTACGCCAAGCTTGG	Complemento reverso do P2	
	<b>P4</b>	AA4483	TATCCTCCTCAATTCCATAGTCGAATTGTAATACGACTCAC	Complemento reverso do P5	
	<b>P5</b>	AA4482	GTGAGTCGTATTACAATTCGACTATGGAATTGAGGAGGATA	Região Flanqueadora 3' + 3' NEO	
	<b>P6</b>	AA4484	GTTTGTGAGAAAGTCAGAAAGC	Região Flanqueadora 3'	
	<b>P9</b>	AA4489	CTTATGCGGATGATATACAGGT	Interno a ORF	
	<b>P10</b>	444490	GAGTGCAAGATATAGAGGGTAGAT	Interno a ORF	
	<b>HOS2</b>	<b>P1</b>	AA4560	CTTCCAATGTGAGACTTAAATA	Região Flanqueadora 5'
		<b>P6</b>	AA4561	TAAACTGGAGTTATCATCGTACC	Região Flanqueadora 3'
<b>P9</b>		AA4574	CTAACAAAAGACTGGACGAAAT	Interno a ORF	
<b>P10</b>		AA4575	AATAGTTGTTTGTGGGAGTTC	Interno a ORF	
<b>RPD3</b>	<b>P1</b>	AA4562	CGTCTAAATAGGATATGGATGAC	Região Flanqueadora 5'	
	<b>P6</b>	AA4563	CTATGCGTCTATTACCGTAAGTT	Região Flanqueadora 3'	
	<b>P9</b>	AA4572	TTTTGTACGTGTTTCAGCATATT	Interno a ORF	
	<b>P10</b>	AA4573	CGATTCCGTTATCTCTTACTTC	Interno a ORF	

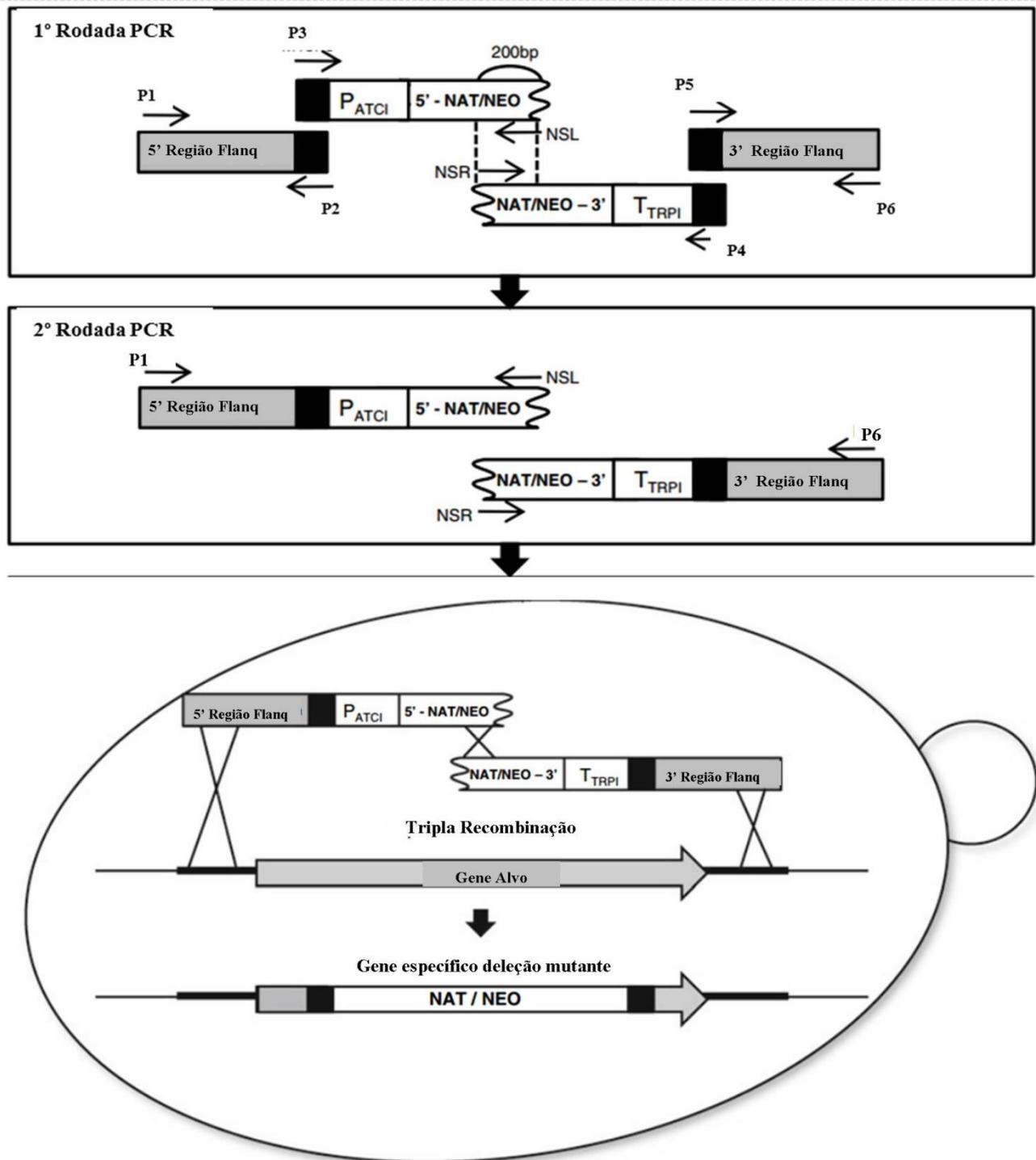


Figura 20: Diagrama esquemático do *double-joint* PCR com seletivo marcador dominante e transformação por biobalística para deleção de gene em *C. neoformans*. Adaptado de Kim et al., 2009.

## 7.6 Testes fenotípicos de crescimento

Todos os mutantes de HDAC gerados neste estudo foram submetidos a crescimento em diferentes condições estressoras e para indução dos fenótipos de virulência *in vitro*. Para os ensaios de diluição seriada, foram inoculados cinco pontos, cada um representando uma diluição seriada, iniciando-se com  $10^5$  células no primeiro ponto. Para ensaios com único ponto utilizou-se  $10^5$  células. Para a maioria dos ensaios, foi definida a temperatura de 30 °C, na qual todos os mutantes apresentaram crescimento ótimo. Nos ensaios de termotolerância foram avaliadas as temperaturas de 30, 37 e 39 °C. As células foram sempre crescidas previamente em YPD conforme item 7.1, em seguida centrifugadas (1.000 g /5 minutos/ temperatura ambiente) e lavadas, ressuspendidas em água deionizada estéril, e a densidade celular foi ajustada a partir de contagem em hemocítômetro.

Os mutantes foram avaliados sob as seguintes condições estressoras: meio ágar YPD contendo *Congo red* 0,5 %, *Calcofluor white* 1mg/mL (CFW) e SDS (dodessil sulfato de sódio) 0,06 %, ambos para avaliar possíveis danos de superfície celular.

## 7.7 Indução da Cápsula

Cada linhagem (mutantes e tipo selvagem) foi previamente crescida em meio YPD durante à noite a 30 °C com rotação a 150 rpm, em seguida as células foram lavadas três vezes com H<sub>2</sub>O destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) estéril e a densidade celular foi ajustada para  $10^7$  células / mL em meio mínimo (MM) quimicamente definido (dextrose 15 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 29.3 mM, glicina 13 mM e tiamina 3 µM; pH 5.5). Um volume de 3 mL da suspensão celular foi inoculado em *Erlenmeyer* de 50 mL e então incubado a 30 °C / 150 rpm por 24 h.

### 7.7.1 Análise da expansão da cápsula

Para mensurar a cápsula, sobre a superfície de uma lâmina foram misturados 1 µL da suspensão celular com 1 µL de tinta nanquim (Becton Dickinson, NJ) e em seguida a lâmina foi observada sob microscópio de luz na magnitude de 65x. No mínimo quatro diferentes campos aleatórios foram escolhidos e fotografados. Para calcular o tamanho da cápsula, foi medida a dimensão total da célula (corpo da célula + cápsula) e do corpo celular (região delimitada pela parede celular) usando-se o

programa *Fiji (Image J)*. O tamanho da cápsula foi definido como a diferença entre o diâmetro total das células menos o diâmetro do corpo celular. No mínimo 100 células foram contadas para cada grupo, e a razão cápsula da célula mutante / cápsula do tipo selvagem foi usada para normalização dos dados. Os dados obtidos a partir da razão mutante / tipo selvagem foram empregados para quantificação relativa e análise estatística.

Para a análise global da expansão da cápsula,  $10^7$  leveduras da suspensão celular com cápsula induzidas, foram ressuspendidas em 0.2 mL de MM. Em seguida, uma alíquota de cada suspensão concentrada foi colhida em tubo microcapilar e estes foram selados com cera e deixados em repouso vertical por até 12 h. Após esse período, o volume formado a partir da coluna de células precipitadas foi mensurado, e a medida da coluna de células para cada linhagem foi normalizada pela medida da coluna de células do tipo selvagem. A razão entre as médias para mutante / tipo selvagem foi plotada para quantificação relativa e análise estatística. Teste estatístico empregado: *One-way ANOVA* com pós-teste de *Dunnett*.

## **7.8 Teste de melanização**

Cada linhagem foi crescida previamente em meio YPD de acordo com o item 7.1. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril e a densidade celular ajustada para  $10^7$  células/ mL em MM suplementado com L-DOPA 1 mM (Sigma-Aldrich). Em placa de 24 poços foi adicionado 1 mL da suspensão de células, então as placas foram incubadas a 30 °C / 150 rpm protegidas da luz. As placas foram monitoradas diariamente no intuito de acompanhar a produção do pigmento escuro correspondente a produção de melanina. Após constatação da produção de melanina as placas foram fotografadas digitalmente. Para os ensaios em meio ágar *Niger seed* (*Guizotia abyssinica* 5%, Glicose 0,1 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%, Bacto-ágar 2%) a densidade celular de cada linhagem foi ajustada pela OD 600 nm e 5 µL de cada suspensão celular foram adicionados ao meio. As placas foram incubadas a 30 °C ao abrigo da luz por 48h.

## **7.9 Teste de acasalamento.**

As linhagens mutantes e selvagem tiveram a densidade celular ajustada pela OD 600 nm em PBS 1X estéril. Cada linhagem mutante no *background* do idiótipo de

acasalamento *MAT $\alpha$* , foi misturada com a mesma concentração de células no *background* do idiótipo de acasalamento *MAT $\alpha$*  selvagem. 10  $\mu$ L de cada mistura de células foram semeados em placa contendo meio ágar **MS** (Murashige & Skoog, 1962 - **MS** 4,4 %, Bacto-ágar 4%, pH 5.8). As placas foram incubadas a temperatura ambiente protegidas da luz. Para a linhagem mutante *clr3 $\Delta$*  foram incubados os seguintes pares: *clr3 $\Delta$  $\alpha$*  + *WT $\alpha$* , *clr3 $\Delta$  $\alpha$*  + *WT $\alpha$* , *clr3 $\Delta$  $\alpha$*  + *clr3 $\Delta$  $\alpha$*  e o reconstituído  $\alpha$  (*clr3+CLR3*) + *WT $\alpha$* . As placas foram monitoradas diariamente para acompanhar o crescimento das hifas. As hifas foram fotografadas nos dias 7 e 10 após incubação.

### **7.10 Avaliação da produção de urease.**

As leveduras foram previamente crescidas e semeadas em meio ágar de *Christiansen* para análise da produção de urease (peptona 0,2%, NaCl 86 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14,7 mM, uréia 333 mM, 45  $\mu$ M de vermelho de fenol, pH 6.9). Um inóculo de 10<sup>5</sup> leveduras para cada linhagem mutante foi semeado por poço de placa de 6 poços. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C e o crescimento do inóculo bem como a mudança na coloração do meio (de amarelo ao rosado) foi monitorada diariamente.

### **7.11 Avaliação da produção de proteases.**

Cada linhagem foi previamente crescida em YPD e então inoculada em meio ágar BSA (ágar 2%, meio YNB 1%, BSA 1%, glicose 0,4%). Um inóculo de 10<sup>5</sup> leveduras para cada linhagem mutante e do tipo selvagem foi semeado por poço de placa de 6 poços e incubado em estufa a 30 °C. Os inóculos foram monitorados diariamente e o surgimento do halo ao redor da colônia foi medido. A atividade de protease foi proporcional à medida do halo. O tamanho do halo foi definido como a diferença entre o (diâmetro do halo + colônia) menos (diâmetro da colônia). A razão halo da célula mutante / halo do tipo selvagem foi usada para normalização dos dados. Os dados obtidos a partir da razão mutante / tipo selvagem foram empregados para quantificação relativa e análise estatística. Teste estático empregado: *One-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnett*.

## 7.12 Teste de crescimento na presença dos HDACi Tricostatina A e Butirato de Sódio

As leveduras, previamente lavadas com H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril, tiveram a densidade celular ajustada pela OD 600 nm / mL em YPD previamente suplementado com 10 mM de NaBut ou 10 µM de TSA. Duzentos microlitros de cada suspensão de célula foram adicionados aos poços, em duplicata, de placa de 96 poços e incubados nas temperaturas de 30 e 37 °C / 150 rpm.

A densidade óptica de cada poço foi determinada por espectrofotometria (*EON Microplate*, Biotek Inc) no comprimento de onda de 600 nm a cada 24 h. As médias das OD referentes ao crescimento de cada linhagem com/sem tratamento com os HDACi foram analisadas e a razão entre não-tratado/tratado foi plotada em um mapa de calor com seus respectivos desvios. A coloração azul indica as amostras com menor crescimento em relação às leveduras que não receberam tratamento, enquanto que a coloração avermelhada indica maior crescimento. O teste estatístico empregado nesta análise foi o *t-student* não pareado de duas caudas.

## 7.13 Teste de viabilidade em macrófagos.

As linhagens mutantes para os genes de HDAC foram testadas para quantificar a habilidade de replicação e sobrevivência em macrófagos em comparação à linhagem selvagem. Macrófagos J774A.1 foram previamente inoculados em placas de 96 poços na concentração  $5 \times 10^4$  células / poço. As células foram cultivadas por 18 h em estufa a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente o sobrenadante das culturas foi removido, e os macrófagos foram pré-estimulados com 100 µL meio DMEM contendo 10 nM de PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) por 1 h. Durante o tempo de estimulação, foi preparada uma suspensão de meio DMEM + leveduras de cada linhagem separadamente (proporção de 1 levedura:1 macrófago) acrescida do anticorpo contra a GXM presente na cápsula de *C. neoformans* (mAb 18B7 IgG [1 µ/mL] – Zebedee et al., 1994) para opsonização. Esta suspensão foi incubada a 37 °C/150 rpm por 1h. Após os períodos de pré-estímulo dos macrófagos e opsonização das leveduras, as leveduras opsonizadas foram adicionadas à placa com macrófagos e a co-cultura incubada novamente a 37 °C/ 5% CO<sub>2</sub> por 2h. Após o período de incubação, o sobrenadante da cultura foi descartado e os poços lavados 3x com PBS estéril para remoção das leveduras que não haviam sido fagocitadas. Foram adicionados então 200 µL de meio DMEM por poço e a placa

incubada novamente a 37 °C/ 5% CO<sub>2</sub> por 12 h. Após o intervalo de 12 h, 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril foram adicionados a cada poço e a placa deixada por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante de cultura foi transferido a tubo *ependorf* estéril de 1,5 mL. Os poços foram lavados com 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril mais 3x e o sobrenadante armazenado no mesmo tubo. As células foram então diluídas 1:10, 1:100 e 1:1000, e as diluições foram semeadas em meio YPD e incubadas por 48h/30 °C. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado e a quantificação relativa entre as leveduras das linhagens mutantes versus o selvagem foi plotada em gráfico. O ensaio foi realizado em quadruplicata e o teste estatístico empregado nesta análise foi *One-way* ANOVA com pós-teste de *Dunnett*.

#### **7.14 Teste de virulência em *Galleria mellonella*.**

As leveduras foram lavadas e ressuspendidas em PBS pH 7,4 estéril, a densidade celular foi ajustada após contagem em hemocitometro para  $5 \times 10^6$  /mL. As lagartas pesavam entre 300-400 mg; foram escolhidas aleatoriamente 20 lagartas para cada grupo experimental. Destas, 15 foram monitoradas para sobrevivência e outras 5 separadas para posteriores análises de UFC e visualização da cápsula. As larvas de *G. mellonella* foram infectadas diretamente na hemolinfa, usando-se uma seringa Hamilton de 10 µL, com um volume de 10 µL da suspensão de leveduras em PBS ( $5 \times 10^4$  UFC) na última properna esquerda. Após a infecção, as lagartas foram adicionadas em placas de petri estéril a 30 ou 37 °C, conforme cada experimento, e monitoradas a cada 24 h por um total de 10 dias. Como controles foram usados o mutante de *C. neoformans*, hipovirulento em *G. mellonella ras1A* (Mylonakis et al., 2005) e um controle apenas com PBS para demonstrar que as lagartas não morreram pelo processo de manipulação. Após 4 dias de infecção, o grupo separado para análises de UFC e visualização da cápsula, foi sacrificado e a hemolinfa recuperada. As lagartas foram esmagadas em tubo falcon de 15 mL, contendo 1 mL de PBS estéril e a suspensão filtrada em *cell strainer* de 100 µm (BD Falcon, Erembodegem, Bélgica). Para visualização da cápsula, 1 µL da suspensão foi misturado a 1 µL de tinta nanquim em lâmina para microscopia óptica, coberto com lamínula e visualizado em microscópio de luz. Para os ensaios de UFC, seguiu-se com diluição seriada de 10x por 3 pontos. Em seguida, 100 µL de cada ponto foram semeados em placa de Petri contendo YPD + cloranfenicol (1 mg/mL) para evitar contaminação com bactérias. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h, e as unidades

formadoras de colônias foram contadas para cada grupo. A análise estatística da curva de sobrevivência das lagartas foi feita segundo o método *Kaplan-Meier*.

### **7.15 Teste de virulência em camundongos.**

Todo o trabalho com os animais foi realizado de acordo o *Duke University Institutional guidelines for animal experimentation*, no qual uma das normas obriga que os animais sejam monitorados diariamente para avaliar sinais de infecção, bem como que sejam pesados diariamente e, quando constatada a perda de 2 g semanal, os animais seguem para serem sacrificados com uso de CO<sub>2</sub>, acompanhando de um segundo método de eutanásia para assegurar a morte. As técnicas usadas para eutanásia dos animais foram aprovadas pela *IACUC-approved animal handling protocol- A217-11-08*.

A virulência do mutante de HDAC *clr3Δ* foi avaliada em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6. Para cada grupo experimental (*clr3Δ*, tipo selvagem e *clr3+CLR3*) 20 camundongos foram separados, 5 em cada caixa, pesados e numerados na região da cauda. Os camundongos foram anestesiados com o uso do isoflurano e infectados intranasalmente com 25 µL de suspensão de células (10<sup>5</sup> leveduras). O peso dos camundongos foi monitorado diariamente pela manhã, por um total de 40 dias após a infecção. Para as análises de UFC e histopatológica, cinco camundongos de cada grupo foram analisados nos dias 7 e 14 após infecção. A análise estatística da curva de sobrevivência dos camundongos foi feita segundo o método *Kaplan-Meier*.

### **7.16 Análise histopatológica e de unidades formadoras de colônia (UFC)**

Após os dias 7 e 14 de infecção, o pulmão e o cérebro dos camundongos foram removidos para análises. Os órgãos foram pesados após extração para normalização dos dados de UFC / mg de tecido.

As análises histopatológicas dos pulmões foram realizadas no *Duke histopathology core facility*. Os pulmões foram colhidos e inflados com 10% *neutral buffered formalina*. O tecido pulmonar foi embebido em parafina e foram realizados cortes de 5 µm, seguindo-se coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Todas as lâminas foram observadas em microscópio de luz e fotografadas para análises dos dados.

Para avaliação das UFC, os tecidos foram triturados em 1 mL de PBS estéril, seguindo-se diluição seriada de 10 x por cinco pontos ( $10^{-1} - 10^{-5}$ ). As diluições foram semeadas em placa contendo ágar YPD + cloranfenicol (1mg / mL) e incubadas por até 48 h. As UFC foram contadas e normalizadas pelo peso de cada tecido. O teste estatístico aplicado nestas análises foi o de *t student* não pareado.

### 7.17 Análise do Ciclo Celular

As linhagens *clr3Δ*, tipo selvagem e mutante reconstituído (*clr3+CLR3*) foram previamente crescidas conforme o item 7.1. Em seguida, a densidade celular foi ajustada para OD 600 nm em meio YPD. Os inóculos foram incubados a 37 °C / 150 rpm por intervalos de 6 e 24 h. Em seguida, as leveduras foram centrifugadas (1000g / 5 minutos) e ressuspendida em tampão NS 1x (10 mL 1M Tris-HCL pH 7.5; sacarose 85,6 g; 2 mL 0,5M EDTA pH 8; 0,095g MgCl<sub>2</sub>, 0,0147g CaCl<sub>2</sub>; 0,0136 g ZnCl<sub>2</sub>; 0,096 fenilmetilsulfonil fluoreto; 0,49 mL de 2-mercaptoetanol, 989 mL H<sub>2</sub>O) e novamente centrifugadas por 30 segundos. Seguiu-se ressusensão em 200 μL de solução *Master Mix* (180 μL 1x NS, 14 μL de RNase [15μg/ μL], 6 μL de Iodeto de propídio-PI [1μg/ μL]) e incubação à temperatura ambiente por 2h. Uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi adicionada a 500 μL de solução Tris-PI ( 428 μL 1M Tris pH 7.5, 18 μL de PI [1 μg/ μL]), incubada em gelo e enviada a *Duke Cell Cytometer facility* para análise em escala linear (BD FACS Calibur™). As populações foram separadas de acordo com as fases do ciclo celular (G1 / G0, S ou G2 / M). Para cada condição foram analisados 10.000 eventos. Os dados deste ensaio foram analisados com auxílio do programa *FlowJo* (versão para Macbook).

### 7.18 Sequenciamento do RNA (RNA-Seq)

As análises do RNA-Seq foram realizadas em meio mínimo (**MM**) por este se tratar de um meio quimicamente definido, simples de ser controlado, favorável à indução de cápsula e de melanina, dois dos principais fenótipos atenuados no mutante para o gene *CLR3*. As linhagens mutantes *clr3Δ*, e a linhagem selvagem, todos idiótipo **α**, foram crescidas previamente (item 7.1), ambas em triplicata distintas, para comparação do perfil de expressão dos genes. Em seguida, as células foram lavadas e inoculadas em meio YPD na concentração OD 600 nm, em um volume total de 50 mL e

incubadas por mais 6 h para atingirem a fase exponencial. Neste ponto, as células foram colhidas, lavadas e contadas em hemocítômetro. A densidade celular foi ajustada para  $10^7$ /mL em meio MM, seguindo-se incubação por 2 h / 30 °C/ 150 rpm. As amostras foram então centrifugadas (1000g/5 minutos/ 4 °C) e o sedimento foi imediatamente congelado em gelo seco por 30-40 minutos. Seguiu-se uma etapa de crio-dessecamento, usando-se liofilizador, durante a noite. Em seguida, o RNA foi extraído usando-se o protocolo do *RNEasy® Plant RNA Extraction Kit* (QIAGEN) com alterações: o uso de 500 µL de pérolas vidros (0,6 cm de diâmetro) na etapa inicial, antes de se adicionar o tampão de lise, 3 ciclos em *vortex* (velocidade máxima) de 30 segundos, com intervalo de 1 minuto no gelo entre os ciclos. Quando o sedimento celular alcançou a consistência de um fino pó, foram adicionados 750 µL do tampão RLT e seguiu-se o protocolo padrão.

O RNA total foi submetido ao *Duke University Center for Genomic and Computational Biology*, onde as amostras passaram por purificação do RNA poly-A<sup>+</sup> (KAPA Stranded mRNA-Seq Kit, Kapa Biosystems) e sequenciamento (*Illumina HiSeq 2000*, Illumina Inc). As linhas de dados foram montadas usando-se o programa Tophat 2 (Kim et al., 2013). A quantificação dos transcritos foi calculada usando-se *Cufflinks/Cuffdiff pipeline* (Trapnell et al., 2012). O genoma e transcriptoma utilizados como referência nesta análise tiveram como base o banco de dados *C. neoformans H99 Sequencing Project at the Broad Institute of MIT and Harvard*. As análises para descrição de função e localização dos genes relacionados à virulência (**Tabela 6**) foram realizadas por meio do *site FungiDB*.

### 7.19 Análises estatísticas

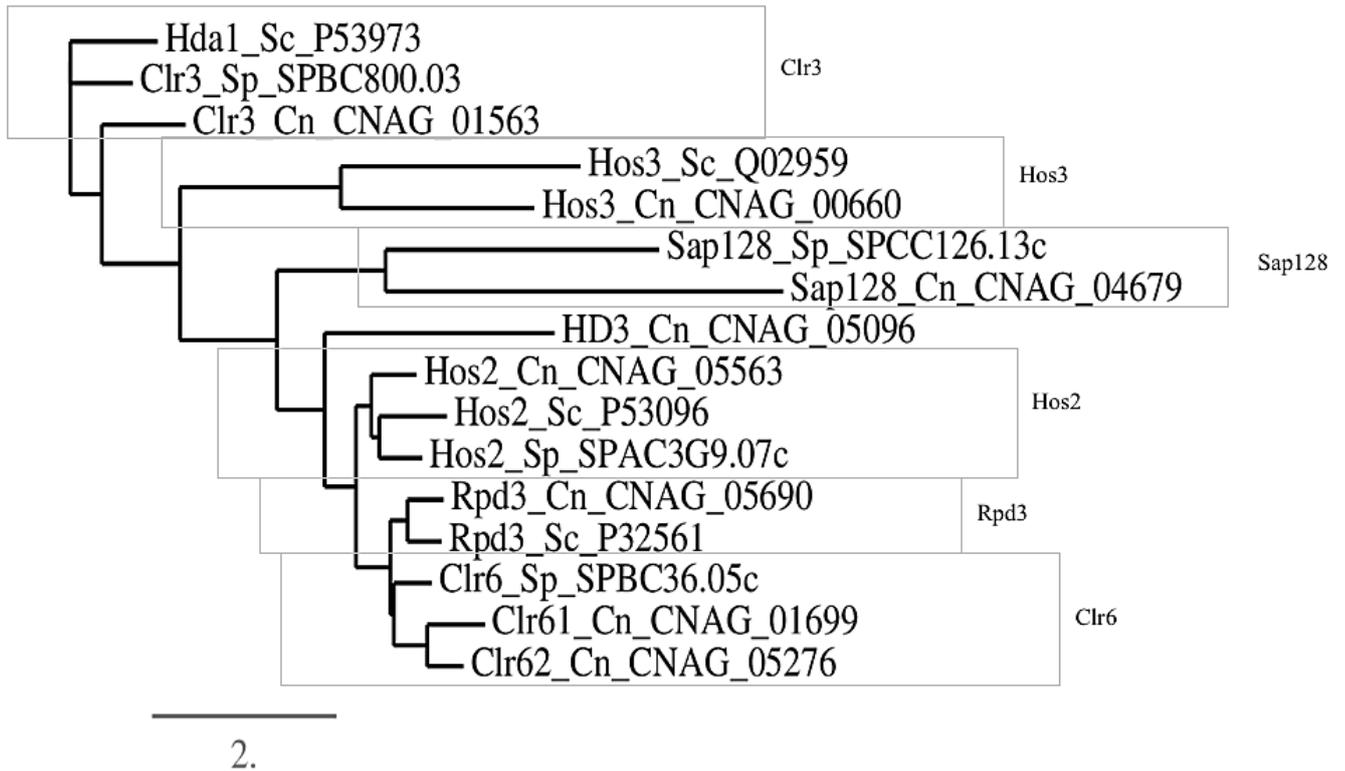
Aos dados foram analisados por meio do programa *GraphPad Prism* versão 6.01 para Windows ou Mac. O teste paramétrico *One-way ANOVA* e o pós-teste de *Dunnet* foram aplicados para comparar as variâncias entre grupos. O teste *t-student* foi aplicado em análises de quantificação relativa comparando-se amostras de linhagens mutantes versus tipo selvagem, ou no caso de uso de drogas: não-tratado versus tratado. O intervalo de confiança empregado em todas as análises foi de 95%. O valor de *P* foi considerado significativo quando  $\leq 0.05$ .

## 8. Resultados

---

### 8.1 *C. neoformans* possui oito genes de HDAC pertencentes às Classes I e II.

Com base em nosso trabalho anterior (Brandão et al., 2015) mostrando que os inibidores de HDAC NaBut e TSA, foram capazes de afetar negativamente os principais fenótipos de virulência em *C. neoformans*, seguiu-se os estudos sobre regulação da cromatina e virulência focados agora em encontrar os possíveis alvos destes inibidores. Com o auxílio do *Broadinstitute* (genome data base Broad Institute H99-[https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus\\_neoformans/MultiHome.html](https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html)) foram identificados oito genes anotados no genoma de *C. neoformans* H99 com domínio de HDAC (CNAG\_01563, CNAG\_04679, CNAG\_05096, CNAG\_01699, CNAG\_05276, CNAG\_00660, CNAG\_05563 e CNAG\_05690). As CNAG anotadas no genoma como HDAC, foram submetidas à análise buscando-se informações sobre funções caracterizadas e possíveis ortólogos e homólogos por meio do site do *FungiDB*. No *FungiDB* foram encontrados uma vasta homologia com várias espécies de fungos, desde as mais distantes do *Filobasidiella* até as mais próximas, como era esperado uma vez que as HDAC são altamente conservadas entre as espécies (Gregoreti et al., 2004). Vários estudos comparativos para as HDACs tomam como contraparte as espécies *S. cerevisiae* e *S. pombe*, cujas HDACs já são bem descritas na literatura. Foram realizadas análises comparativas entre a sequência de proteína de cada uma das oito HDACs descritas no genoma de *C. neoformans* e suas contrapartes em *S. cerevisiae* e *S. pombe*. Deste modo, foram classificados e nomeados neste trabalho cada HDAC de *C. neoformans* de acordo o grau de homologia (**Figura 21**).

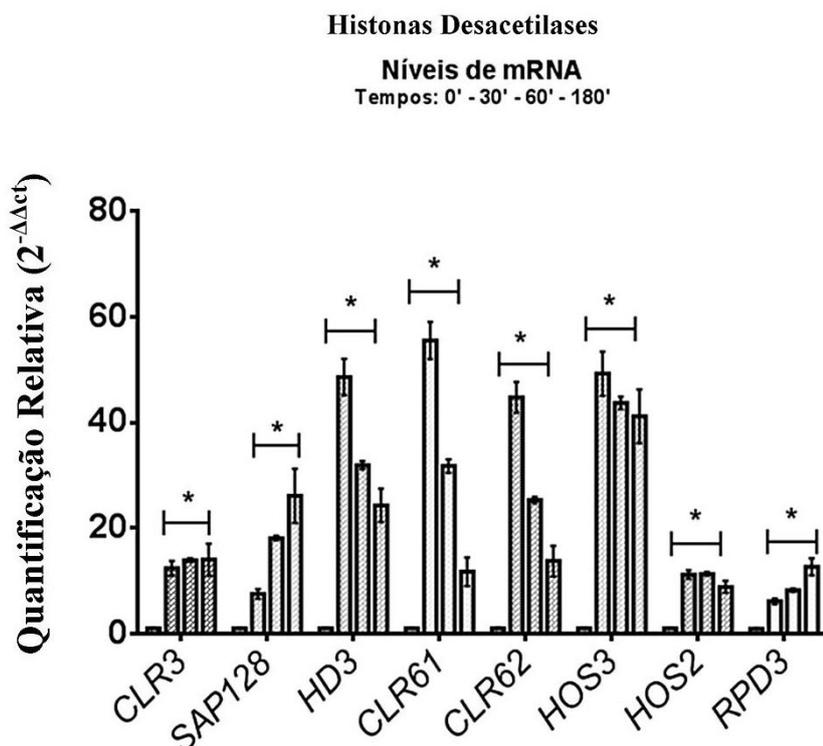


**Figura 21: Dendrograma representando a relação entre as HDACs de três espécies de fungos.** Sequências de proteínas correspondendo as classes I e II da subfamílias de HDACs de *C. neoformans* foram comparadas a suas contra-partes em *S. cerevisiae* e *S. pombe* por meio do programa MUSCLE: multiple sequence alignment. **Cn:** *Cryptococcus neoformans*, **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*, **Sp:** *Schizosaccharomyces pombe*.

Apenas dois dos oito genes de HDAC em *C. neoformans* foram previamente descritos (Liu et al., 2008). *HOS2* e *RPD3*, no trabalho de Liu e colaboradores, se mostram importantes em processos que envolveram virulência em camundongos, e apresentaram dificuldade no crescimento a 37 °C; o mutante para *hos2Δ* também apresentou redução na produção de melanina. Optou-se por recriar estes mutantes no laboratório do Dr. Alspaugh na Universidade de Duke (Durham, Carolina do Norte, EUA), a partir dos mutantes disponíveis na biblioteca do Dr. Madhani usados no estudo de Liu et al., 2008, para deste modo usá-los controle em nossos estudos. Na biblioteca do grupo do Dr. Madhani, encontramos também o mutante para *clr61Δ* (CNAG-01699) que ainda não havia sido estudado, esse mutante também foi obtido a partir do original presente na biblioteca. Além destes, nosso grupo realizou a deleção de mais cinco genes de HDAC pelo método de *Double-joint* (ver métodos).

## 8.2 Os genes de HDAC de *C. neoformans* são expressos sob condições de indução da cápsula.

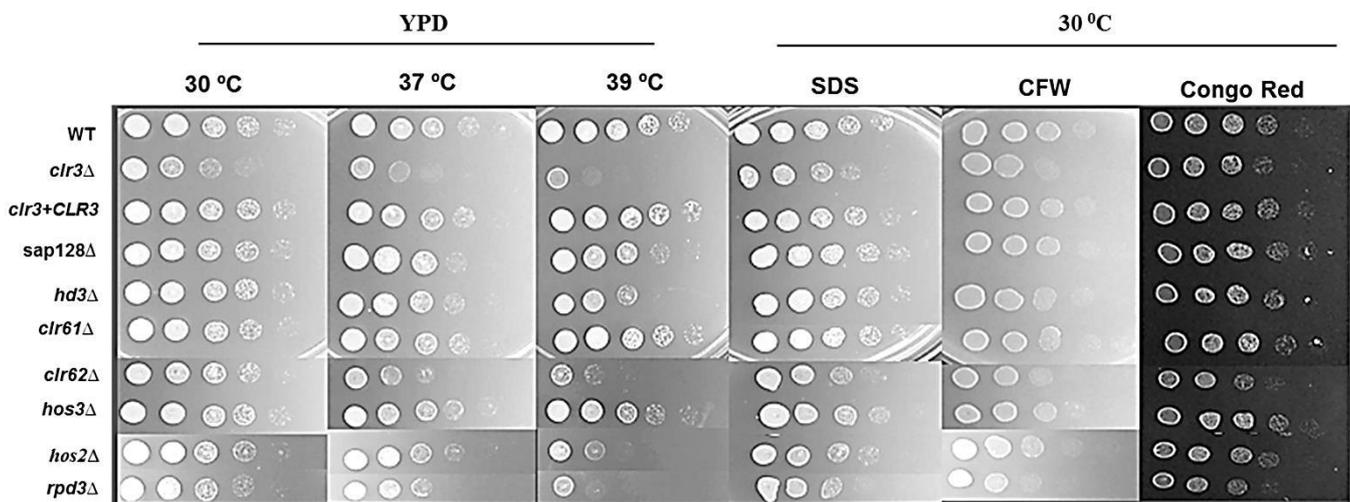
Uma vez que os genes de HDAC foram encontrados no genoma de *C. neoformans* e em nosso trabalho anterior (Brandão et al., 2015) o tratamento com HDACi reduziu a expansão da cápsula, decidiu-se avaliar se os genes de HDAC são expressos sob as condições de indução da cápsula. Em análise de PCR em tempo real constatou-se que todos os oito genes de HDAC tiveram o acúmulo dos transcritos aumentados em relação ao tempo zero, sem indução da cápsula (**Figura 22**). Para os genes *SAP128*, *HD3*, *CLR61* e *CLR62* o acúmulo de transcritos foi maior nos primeiros 30 minutos de indução; em seguida, houve redução desse acúmulo, no entanto os níveis de transcrito se mantiveram acima do nível basal, no tempo zero (**Figura 22**). *CLR3*, *HOS2* apresentaram o mesmo perfil de acúmulo de transcritos, aumentando nos primeiros 30 minutos e se mantendo estável durante o restante da análise. *RPD3* apresentou um aumento gradativo no acúmulo de transcrito a cada 30 minutos.



**Figura 22:** Análise por PCR em tempo real dos níveis dos transcritos dos genes de HDAC em *C. neoformans*: Leveduras de *C. neoformans* H99 foram inoculadas em meio mínimo (ver métodos) a 30 °C e cultivada por 0, 30, 60 e 180 minutos. Após cada intervalo, o RNA foi isolado e a quantificação relativa do acúmulo de transcritos foi analisada e comparada ao tempo zero. As barras de erro representam o desvio padrão. Resultados similares foram obtidos em dois experimentos independentes. Teste estatístico: *Two-way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*.

### 8.3 Os genes de HDAC são requeridos para crescimento sob certas condições de estresse.

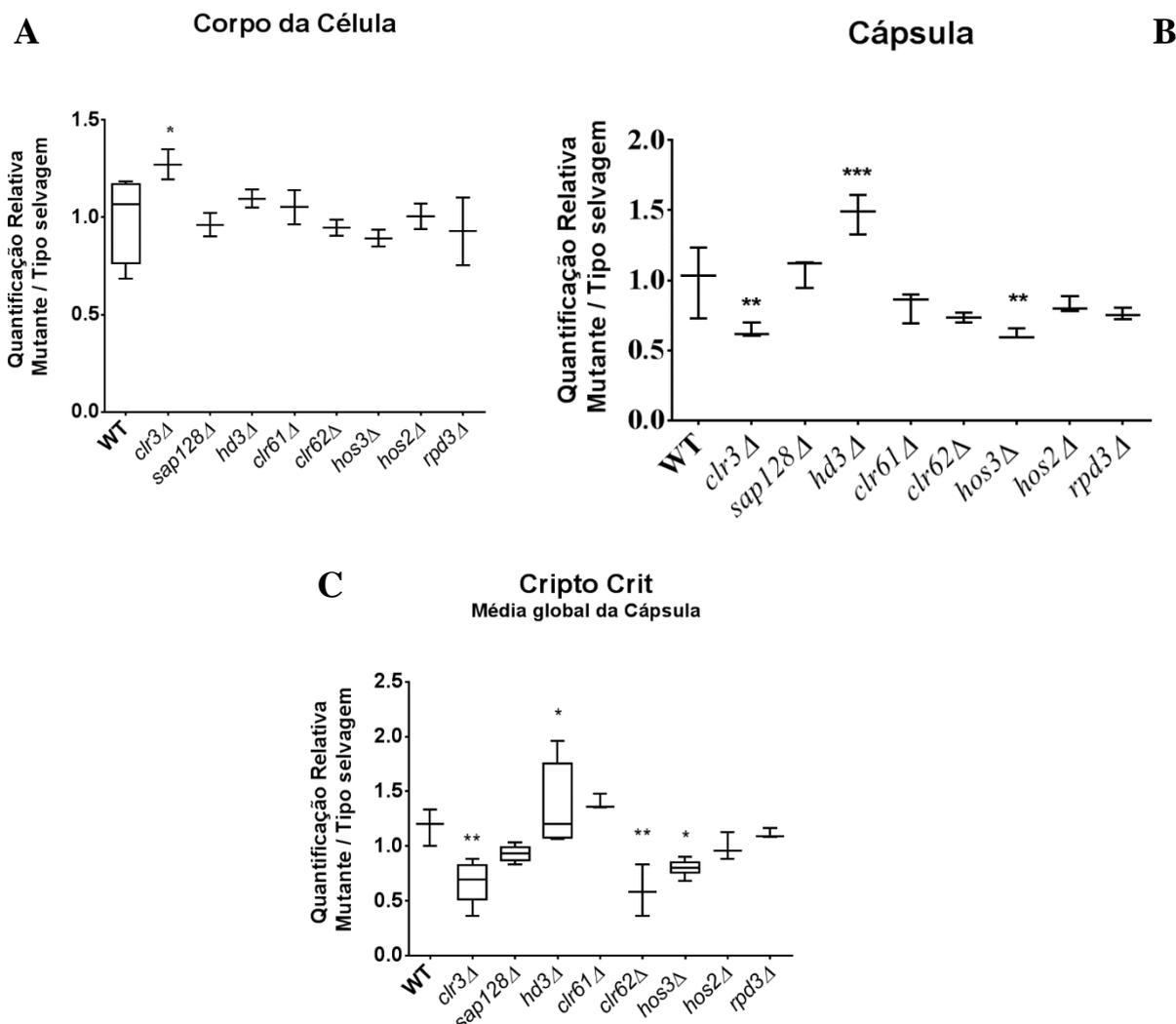
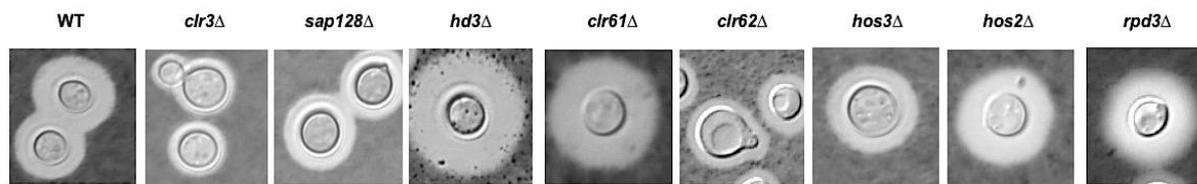
O painel abaixo mostra o perfil de crescimento de cada linhagem mutante gerada neste estudo, sob certas condições de estresse. A termotolerância foi bastante comprometida nos mutantes de *clr3Δ*, *hd3Δ*, *clr62Δ*, *hos2Δ* e *rp3Δ*, sendo mais pronunciada na temperatura de 39 °C (**Figura 23**). Observamos uma sutil redução no crescimento de *clr3Δ*, *clr62Δ* e *rp3Δ* na presença de SDS, *calcofluor-white* e *congo red* (**Figura 23**).



**Figura 23: Os genes de HDAC são requeridos para crescimento em certas condições de estresse.** A maioria dos genes de HDAC se mostra necessária para o crescimento em temperaturas acima de 30 °C ou em outras condições de estresse. As diferentes linhagens mutantes e o tipo selvagem foram diluídas em série (5x por ponto – ver métodos) e 3 µL de cada diluição foram semeados em meio ágar: YPD, dodecil sulfato de sódio (SDS), calcoflúor (CFW) e *Congo-Red*. Em seguida, as placas foram incubadas a 30, 37 ou 39 °C de acordo cada ensaio. A esquerda do painel, crescimento em meio nutritivamente rico (YPD) nas temperaturas indicadas acima das imagens; a direita, crescimento em placas de ágar contendo os estressores na temperatura indicada acima da imagem. WT: tipo selvagem.

#### 8.4 HDAC influenciam diferentemente a expansão da cápsula.

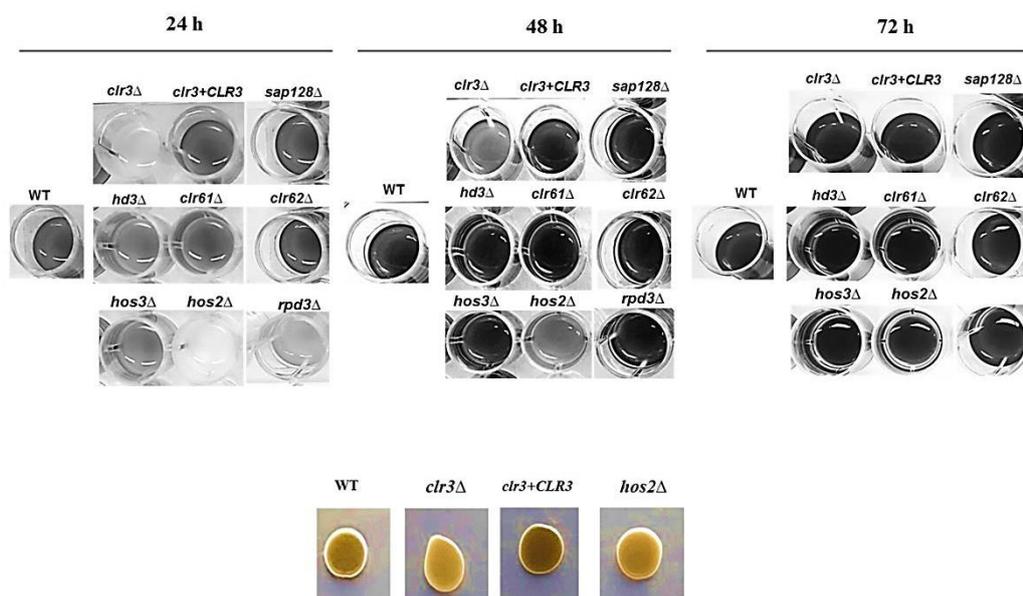
Uma vez que foi observado uma acentuada redução da cápsula na presença dos HDACi, surgiu a hipótese de que os mutantes de HDAC poderiam apresentar fenótipos semelhantes. Mensurou-se a expansão da cápsula para os oito mutantes de HDAC e comparamos ao tipo selvagem. Os mutantes *clr3Δ*, *clr62Δ* e *hos3Δ* apresentaram significativa redução na formação de cápsula (**Figura 24 B e C**). Por outro lado, o mutante *hd3Δ* apresentou um significativo aumento em relação ao tipo selvagem, enquanto os demais mutantes não apresentaram significantes alterações (**Figura 24 B e C**). Curiosamente *clr3Δ* também apresentou um sutil aumento no volume do corpo celular (**Figura 24A**) como será abordado com mais profundidade na discussão do ciclo celular. Embora esse aumento tenha sido significativo, não interferiu na análise do tamanho da cápsula, que é claramente reduzida quando se observa os gráficos e as respectivas imagens representativas (**Figura 24 B e C**).



**Figura 24: HDACs atuam diferentemente sobre a expansão da cápsula.** **A-B)** O diâmetro da cápsula foi mensurado pela zona de exclusão após coloração com nanquim (aumento de 65x). No mínimo 100 leveduras foram aleatoriamente escolhidas sob as mesmas condições de aquisição. O raio da cápsula foi calculado como a diferença entre o diâmetro celular e diâmetro do corpo celular. **C)** A medida da cápsula foi mensurada com base no volume da população de células, normalizadas pela densidade celular em um mesmo volume, ressuspensa em micro-capilar. A altura da coluna do capilar, correspondente à população de células global, foi apresentada em porcentagem (**ver métodos item 7.7.1**). Os gráficos mostram a quantificação relativa baseada na razão entre a medida da linhagem mutante / tipo selvagem. As barras representam o erro padrão. **WT:** tipo selvagem. Teste estático: *One-way ANOVA* com pós-teste de *Dunnett*  $p < 0,0001$ .

### 8.5 Os mutantes *clr3Δ* e *hos2Δ* apresentaram atraso na produção de melanina.

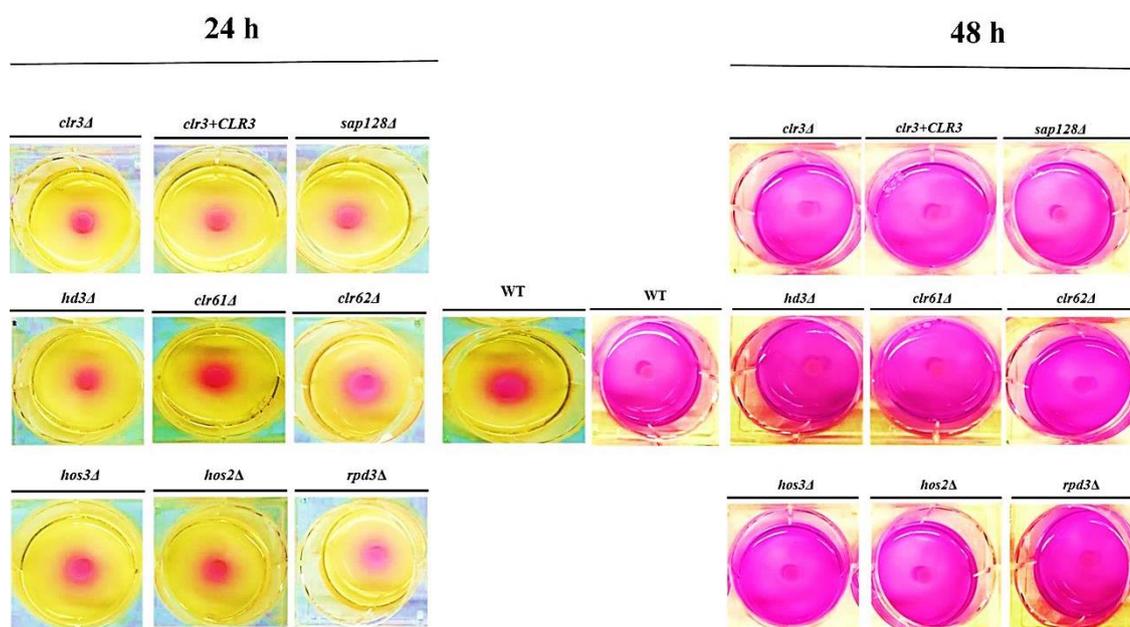
A produção de melanina foi avaliada para os mutantes de HDAC. Em ensaios em meio MM em placa de 24 poços ou em meio sólido *Niger seed*, observou-se uma nítida redução na produção de melanina para os mutantes *clr3Δ* e *hos2Δ* nas primeiras 24 h de indução em MM e após 48 h em meio sólido (**Figura 25**), ambos a 30 °C, uma vez que o crescimento para a maioria dos mutantes é comprometido a 37 °C. No entanto, após as leveduras alcançarem a fase estacionária de crescimento, no ponto de 72 h em MM, observamos que todos os mutantes tinham o mesmo tom escuro correspondente a produção de melanina (**Figura 25**) caracterizando a redução do fenótipo como temporária. A reversão do fenótipo de produção de melanina comprometida é facilmente observado no mutante reconstituído *clr3+CLR3* (**Figura 25**).



**Figura 25: Os mutantes *clr3Δ* e *hos2Δ* apresentaram atraso na produção de melanina.** As diferentes linhagens mutantes de HDAC foram crescidas sob condições de indução de melanina.  $10^7$  leveduras/mL de cada linhagem foram inoculadas em meio mínimo suplementado com 1 mM de L-DOPA a 30 °C/150 rpm, ao abrigo da luz, pelos tempos indicados acima de cada imagem. Cinco  $\mu$ L da suspensão de leveduras na densidade OD600 nm /mL em PBS 1x estéril, foram adicionados à placa contendo meio ágar *Niger seed* e incubados a 30°C ao abrigo da luz, por 48 h. WT: tipo selvagem.

## 8.6 Os mutantes de HDAC não afetaram a produção de urease.

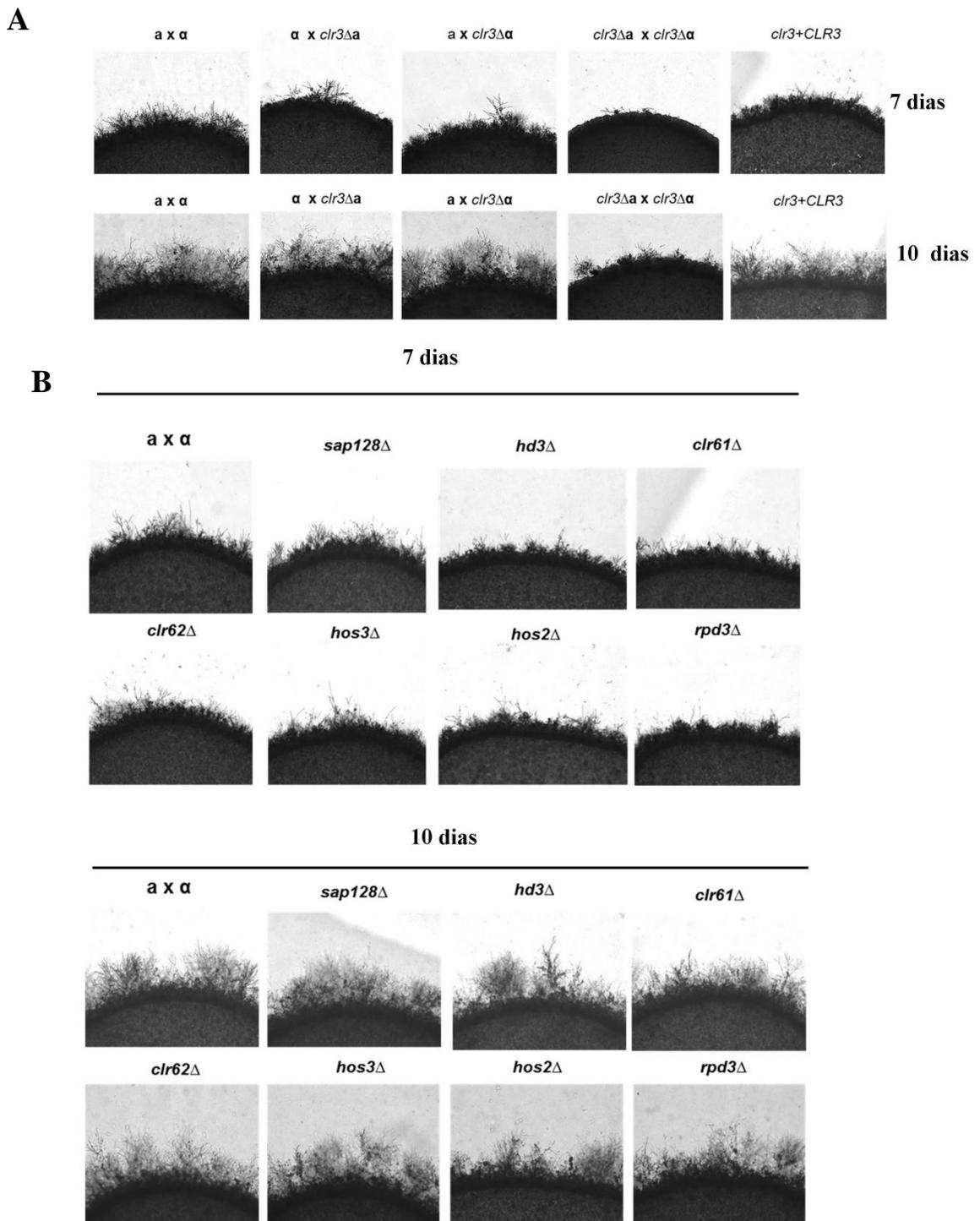
A produção de urease pelos mutantes também foi avaliada. Foi constatado que nenhum dos mutantes de HDAC apresentou alteração significativa da atividade de urease nos tempos e condições empregadas neste estudo (**Figura 26**). A atividade de urease foi avaliada proporcionalmente à mudança na coloração do meio ágar de *Christiansen*, do amarelo ao rosa, nos intervalos de 24 e 48 horas.



**Figura 26: Os mutantes de HDAC não tiveram a produção de urease afetada.** Cada linhagem de células (mutantes e tipo selvagem) foi cultivada durante 48 h a 30 °C em meio ágar contendo indicador de pH vermelho de fenol e solução de uréia. A coloração rosada indica atividade de urease positiva. **WT:** tipo selvagem

## 8.7 O gene *CLR3* é requerido para a correta formação de hifas de acasalamento.

Investigou-se o potencial papel dos genes de HDAC no desenvolvimento sexual de *C. neoformans*. Cada mutante de HDAC foi cruzado com o selvagem de idiótipo oposto e diariamente a formação de hifas de acasalamento foi monitorada. Somente o mutante *clr3Δ* apresentou uma redução perceptível na formação de hifas de acasalamento, tanto no cruzamento unilateral, e ainda mais no bilateral que apresentou uma drástica redução (**Figura 27A**), enquanto que a linhagem complementada *clr3+CLR3* teve comportamento similar ao tipo selvagem. Os demais mutantes apresentaram número de hifas similar quando comparados ao controle selvagem (**Figura 27B**).

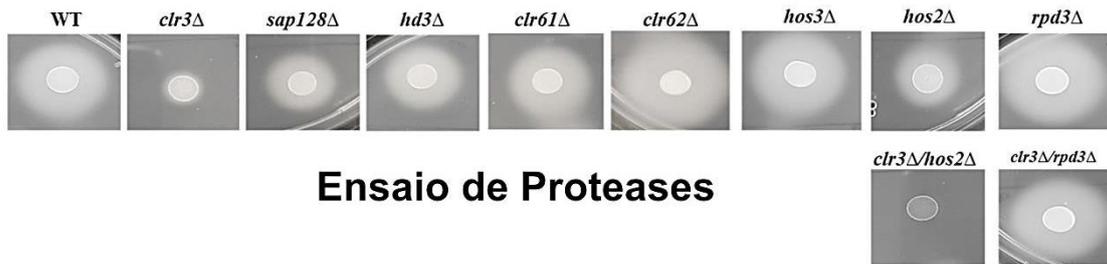


**Figura 27: O gene *CLR3* é requerido para correta formação de hifas de acasalamento.** Linhagens mutantes e selvagem tiveram a densidade ajustada pela OD 600 nm. As leveduras foram misturadas ao idiótipo selvagem oposto e 10  $\mu$ L da mistura foram inoculados em meio ágar MS e incubados a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Os inóculos foram monitorados diariamente e as colônias, com suas hifas ao redor, foram fotografados nos tempos de 7 e 10 dias de incubação. Cruzamento entre *MAT* opostos ao do selvagem foram tomados como controle: *a x α*. Cada linhagem mutante é mostrada acima da sua imagem correspondente. Imagens adquiridas em microscópio de luz no aumento de 10x.

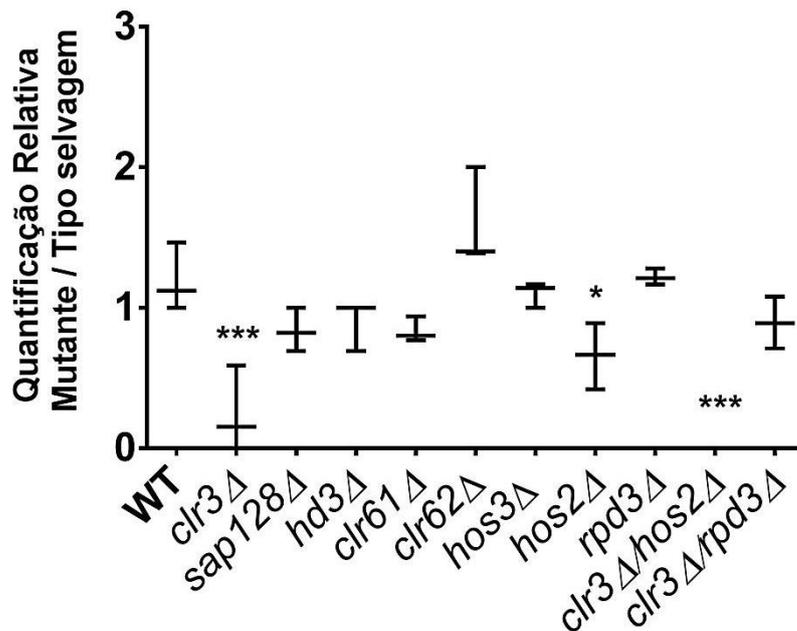
## 8.8 Os genes *CLR3* e *HOS2* são importantes para atividade de proteases.

Todos os mutantes testados apresentaram atividade de protease positiva, correspondendo à formação do halo periférico ao redor do inóculo inicial. Entretanto, a deleção dos genes *CLR3* e *HOS2* levou a uma significativa redução na atividade de proteases (**Figura 28**) quando comparados ao selvagem. O mutante *clr3Δ* apresentou o menor halo. De modo a avaliar se a combinação das mutações *clr3Δ* e *hos2Δ* poderia apresentar uma total ou ainda mais acentuada redução do tamanho do halo, realizou-se o cruzamento das linhagens mutantes *clr3Δ* com *hos2Δ* e *rpd3Δ* (ver métodos para detalhes), resultando nos duplos mutantes: *clr3Δ/ hos2Δ* e *clr3Δ/rpd3Δ*. O duplo mutante *clr3Δ/rpd3Δ* não apresentou alteração na atividade de protease, entretanto, a dupla deleção *clr3Δ/hos2Δ* provocou uma redução no crescimento e uma atividade de protease totalmente inibida (**Figura 28**).

A



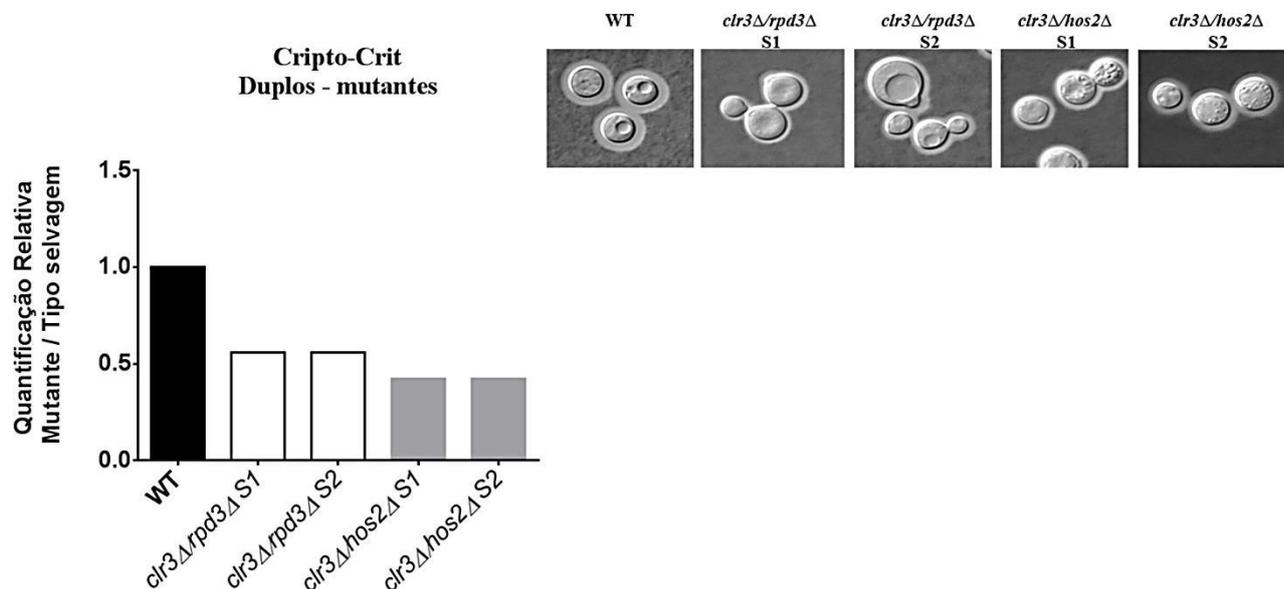
B



**Figura 28: Atividade de protease nos mutantes de HDAC.**  $10^5$  leveduras de cada linhagem mutante e do tipo selvagem foram semeadas em ágar BSA e incubadas em estufa a 30 °C. As culturas foram monitoradas diariamente e o surgimento do halo ao redor da colônia foi medido. A atividade de protease foi proporcional à medida do halo. O gráfico mostra a razão entre a medida do halo do mutante / halo do tipo selvagem. As barras representam erro padrão. WT: tipo selvagem. Teste estatístico empregado: *One-way ANOVA* com pós-teste de *Dunnnett*.  $p < 0,0001$ .

## 8.9 A combinação das deleções *clr3Δ/ hos2Δ* e *clr3Δ/rpd3Δ* provocou drástica redução na expansão da cápsula.

Em seguida, o perfil dos duplos mutantes *clr3Δ/ hos2Δ* e *clr3Δ/rpd3Δ* em condições de indução da cápsula foi avaliado. Observou-se que a dupla deleção em ambos os mutantes, levou a uma drástica redução do fenótipo de cápsula (**Figura 29**). O defeito no fenótipo de cápsula foi o mesmo observado para diferentes linhagens resultantes dos cruzamentos *clr3Δ* x *hos2Δ*, *clr3Δ* x *rpd3Δ* (S1= linhagem derivada do esporo 1, S2= linhagem derivada do esporo 2).



**Figura 29: Os duplos-mutantes apresentaram maior defeito na expansão da cápsula.** A combinação da deleção de genes *clr3Δ/rpd3Δ* e *clr3Δ/hos2Δ* provocou acentuada redução da cápsula. As leveduras foram inoculadas em meio mínimo por 24 h a 30 °C/ 150 rpm. A medida da cápsula foi determinada com base no volume da população de células, normalizadas pela densidade celular em um mesmo volume, ressuspensa em micro-capilar. A altura da coluna do capilar, correspondente à população de células global foi apresentada em porcentagem. O gráfico mostra a quantificação relativa baseada na razão mutante/tipo selvagem. As imagens das células e suas respectivas cápsulas foram adquiridas por coloração com tinta nanquim. A cápsula corresponde à zona de exclusão após coloração (aumento 65x). **S1:** linhagem derivada do esporo 1; **S2:** linhagem derivada do esporo 2. **WT:** tipo selvagem.

### 8.10 O mutante *clr3Δ* apresentou maior resistência ao tratamento com TSA.

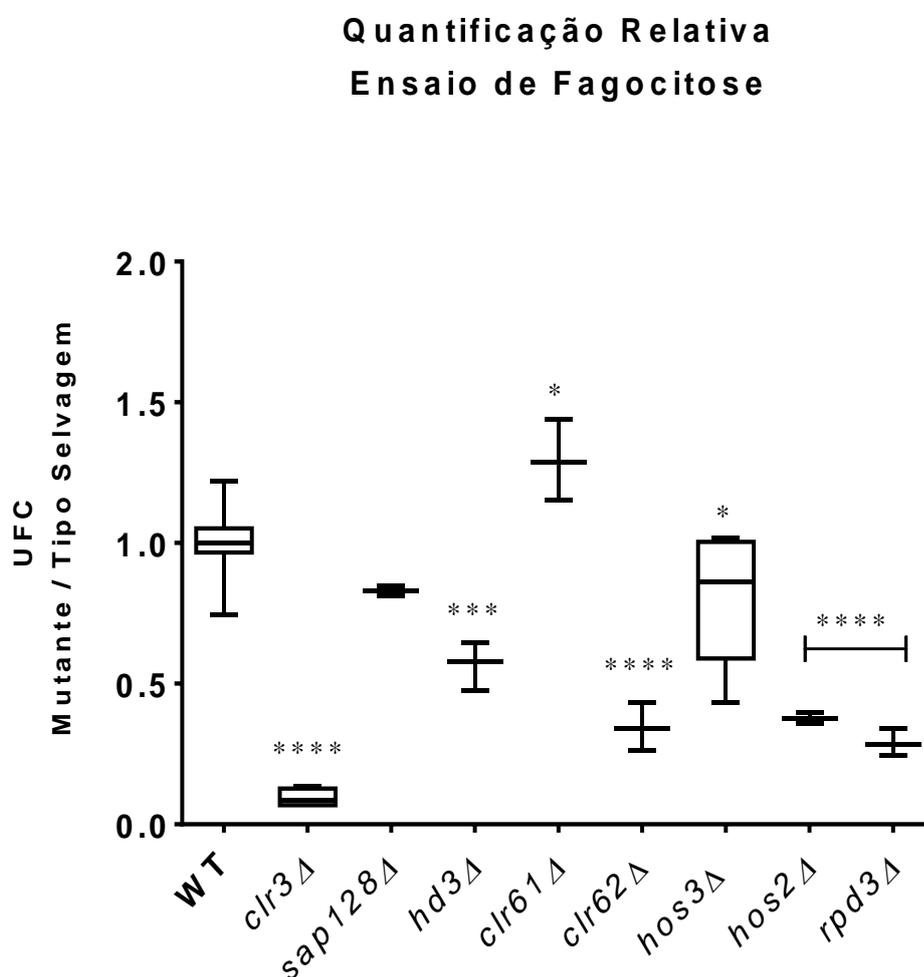
Testou-se a sensibilidade dos mutantes de HDAC a NaBut e TSA nas concentrações pré-estabelecidas, 10 mM e 10  $\mu$ M respectivamente, que demonstraram afetar o crescimento sem perda da viabilidade (Brandão et al., 2015; **Figura 10 e 11**). A hipótese a ser testada era se a deleção de algum dos genes de HDAC levaria a um aumento na resistência aos HDACi, uma vez que estes seriam os alvos destas drogas. O ensaio foi realizado nas temperaturas de 30 e 37 °C para ambos os HDACi. O painel abaixo mostra a fração de porcentagem referente ao crescimento de cada linhagem tratada com NaBut ou TSA em relação a mesma linhagem sem nenhum tratamento, ou tratada com DMSO a 0,1% solvente da TSA. O mapa de calor mostra em tons de azul os valores mais baixos e em vermelho os valores mais altos. O valor de 1,0 equivale a crescimento 100% igual entre tratado e não-tratado. Quanto mais próximo ao valor de 1,0 menos as células foram afetadas pelos HDACi, deste modo pode-se inferir quão resistente ou sensível cada linhagem mutante é em relação ao tipo selvagem (WT). Observou-se que para NaBut todos os mutantes foram mais afetados no tratamento que os não-tratados, em ambas as temperaturas. Interessantemente, os duplos mutantes também apresentaram um maior crescimento após tratamento em relação à maioria dos mutantes com deleção única (**Figura 30**). Para TSA se observou que o mutante *clr3Δ* apresentou níveis de crescimento muito próximos ao valor 1,0 em ambas as temperaturas, com valores de  $p > 0.05$ , indicando que não houve diferença significativa entre o tratado e não tratado (**Figura 30**). O duplo mutante *clr3Δ/rpd3Δ*, também apresentou um índice bem próximo de 1,0, porém somente na temperatura de 30 °C.

	30 °C		37 °C		30 °C		37 °C	
	NaBut		NaBut		TSA		TSA	
	Razão	SD	Razão	SD	Razão	SD	Razão	SD
WT	0,583645	0,00775	0,589041	0,028991	0,833333	0,0746	0,881011	0,010253
<i>clr3Δ</i>	0,467993	0,0305	0,610033	0,014496	0,957239	0,030759	0,927982	0,016263
<i>sap128Δ</i>	0,508392	0,0485	0,572098	0,028991	0,811008	0,025809	0,815772	0,028991
<i>hd3Δ</i>	0,472582	0,027	0,573913	0,010253	0,869281	0,005657	0,790333	0,045608
<i>clr61Δ</i>	0,629381	0,01525	0,612521	0,010253	0,862363	0,006364	0,797967	0,019799
<i>clr62Δ</i>	0,572184	0,04175	0,585942	0,018031	0,826266	0,018031	0,772527	0,021567
<i>hos3Δ</i>	0,54517	0,03975	0,626185	0,017324	0,799038	0,068589	0,917781	0,01591
<i>hos2Δ</i>	0,589224	0,03425	0,665848	0,039598	0,817937	0,022627	0,854718	0,008485
<i>rpd3Δ</i>	0,684932	0,01725	0,608387	0,014496	0,925776	0,02192	0,872322	0,002475
<i>clr3Δ/hos2Δ</i>	0,616992	0,017	0,716346	0,029345	0,858185	0,023688	0,885385	0,008132
<i>clr3Δ/rpd3Δ</i>	0,668849	0,017	0,672961	0,01096	0,969117	0,015556	0,871139	0,014142

**Figura 30: O efeito dos HDACi sobre o crescimento dos mutantes de HDAC.** As linhagens mutantes para os genes de HDAC e tipo selvagem (WT) foram crescidas ( $10^6$ /mL) em YPD por 48 h a 30 e 37 °C, na presença de 10 mM de NaBut ou de 10  $\mu$ M de TSA. A densidade óptica foi determinada no comprimento de onda de 600 nm (OD 600 nm). O mapa de calor mostra a média da razão entre a fração de porcentagem de crescimento, entre as amostras tratadas com os HDACi e as amostras não-tratadas. SD: desvio padrão. NaBut: Butirato de Sódio; TSA: Tricostatina A. Azul: valores mais baixos; Vermelho: valores mais altos.

### 8.11 As HDAC regulam a sobrevivência em Macrófagos.

As linhagens de *C. neoformans* mutantes foram co-incubadas com macrófagos J774A.1 para se avaliar a taxa de fagocitose e sobrevivência dos fungos. Após 12 h, os macrófagos foram lisados e as leveduras recuperadas, o número de UFC foi estimado por meio de diluição seriada do lisado, semeada em YPD. Como mostrado na **figura 31**, os mutantes *clr3Δ*, *hda3Δ*, *clr62Δ*, *hos3Δ*, *hos2Δ* e *rpd3Δ* apresentaram UFC em menor número em relação ao parental. O mutante *clr3Δ* apresentou os menores números de UFC, por outro lado, somente o mutante *clr61Δ* apresentou um número de UFC maior que o parental selvagem (**Figura 30**).

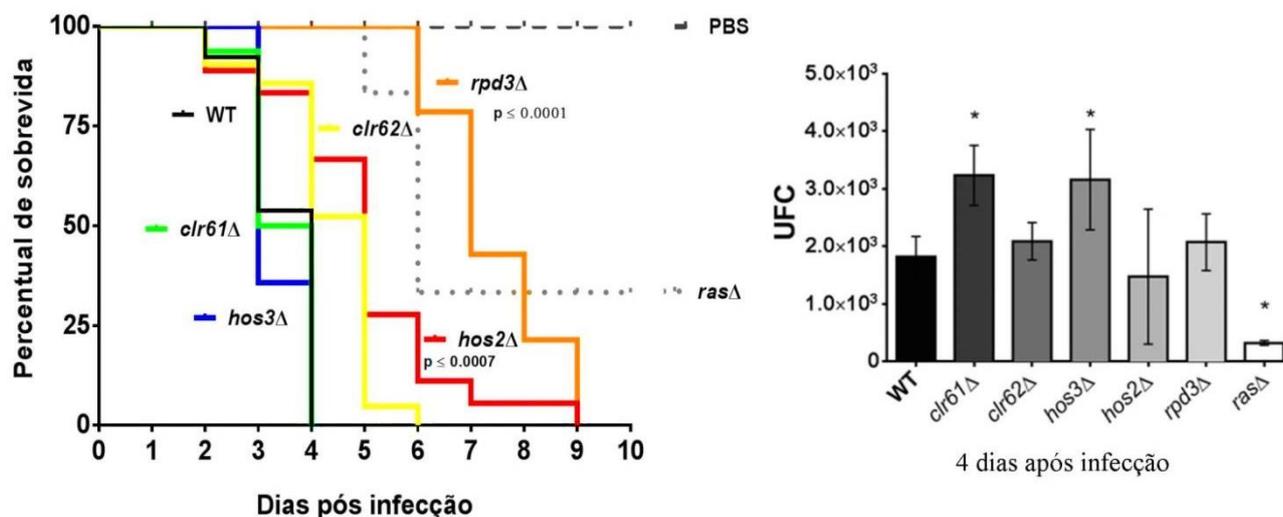


**Figura 31: O papel das HDAC na sobrevivência em macrófagos:** Macrófagos foram pre-ativados com PMA e as leveduras foram opsonizadas com o anticorpo 18B7. Quadruplicatas de cada linhagem foram adicionadas a placa de 96 poços contendo os macrófagos J774A.1 em um MOI (*multiplicity of infection*) de 1:1. Os números de UFC foram contados e o gráfico apresenta a quantificação relativa entre as médias das quadruplicatas do mutante / tipo selvagem. As barras de erro representam o desvio padrão. WT: tipo selvagem. Teste estatístico: *One-way ANOVA* com pós-teste de *Dunnnett*  $p < 0,0001$ .

## 8.12 Os mutantes *hos2Δ* e *rpd3Δ* mostraram-se hipovirulentos em *G. mellonella*.

Alguns dos mutantes que apresentaram UFC reduzido e aumentado nos ensaios com macrófagos foram escolhidos para se avaliar o papel dos genes de HDAC de *C. neoformans* em infecção de modelo animal. Como Liu et al., 2008 já haviam relatado que os mutantes *hos2Δ* e *rpd3Δ* tiveram a virulência atenuada em camundongos, decidiu-se testar estes mutantes, juntamente com os mutantes de *clr61Δ*, *clr62Δ*, *hos3Δ*, no modelo de infecção *G. mellonella*. O mutante *ras1Δ* (*RAS1-controlled signal transduction cascades*), descrito como hipovirulento para ensaios em *G. mellonella* (Milonakis et al., 2005), foi utilizado como controle. As lagartas foram infectadas com diferentes linhagens mutantes para HDAC ou com o tipo selvagem, e incubadas a 37 °C. No quarto dia após infecção, 5 lagartas de cada grupo foram sacrificadas para ensaios de UFC. Os dados mostraram que os mutantes *hos2Δ* e *rpd3Δ* foram hipovirulentos em *G. mellonella*, no entanto não se observou diferença significativa no número de UFC em relação ao tipo selvagem (**Figura 32**). Os demais mutantes (*clr61Δ*, *clr62Δ* e *hos3Δ*) não apresentaram diferenças significativas no tempo de sobrevivência das lagartas, embora as UFCs para *clr61Δ* e *hos3Δ* tenham sido maiores que a do selvagem (**Figura 32**).

## *G. mellonella* 37 °C



**Figura 32: Os genes *HOS2* e *RPD3* são importantes para virulência em *G. mellonella*.** As lagartas foram infectadas com  $5 \times 10^4$  leveduras/ animal e incubadas a 37 °C. O gráfico à esquerda mostra a curva de sobrevivência das lagartas durante 10 dias de infecção. Os valores de UFC, quando significativos, são mostrados junto à cor da linha que representa cada linhagem. O gráfico à direita mostra o número de unidades formadoras de colônia recuperadas após 4 dias de infecção. \*  $p < 0.05$ , as barras de erro representam o erro padrão. WT: tipo selvagem. Teste estatístico: *Kaplan-Meier*.

### 8.13 O gene *CLR3* é essencial para a virulência de *C. neoformans*.

O mutante *clr3Δ* apresentou redução na expansão da cápsula, redução no crescimento a 37 e 39 °C, no crescimento sob estressores de superfície, no número de hifas de acasalamento, na atividade de protease e no número de UFC após infecção em macrófagos. Postulou-se então que o mutante também atenuaria a virulência. Os testes de virulência em *G. mellonella* foram feitos inicialmente em ambas as temperaturas (30 e 37 °C), visto que o mutante apresentou problemas no crescimento a 37 °C. Em ambas as temperaturas o mutante *clr3Δ* mostrou-se hipovirulento quando comparado ao tipo selvagem (**Figura 33**). O número de UFC recuperadas a partir das lagartas, também foi significativamente reduzido em ambas às temperaturas (**Figura 33**). A característica de hipovirulência do mutante *clr3Δ* foi totalmente revertida na linhagem reconstituída para o gene (*clr3+CLR3*) em comparado ao selvagem.

Em teste de virulência em camundongos da linhagem C57BL/6, o mutante *clr3Δ* mostrou ser capaz de infectar os camundongos (**Figura 34**), como observado em análise

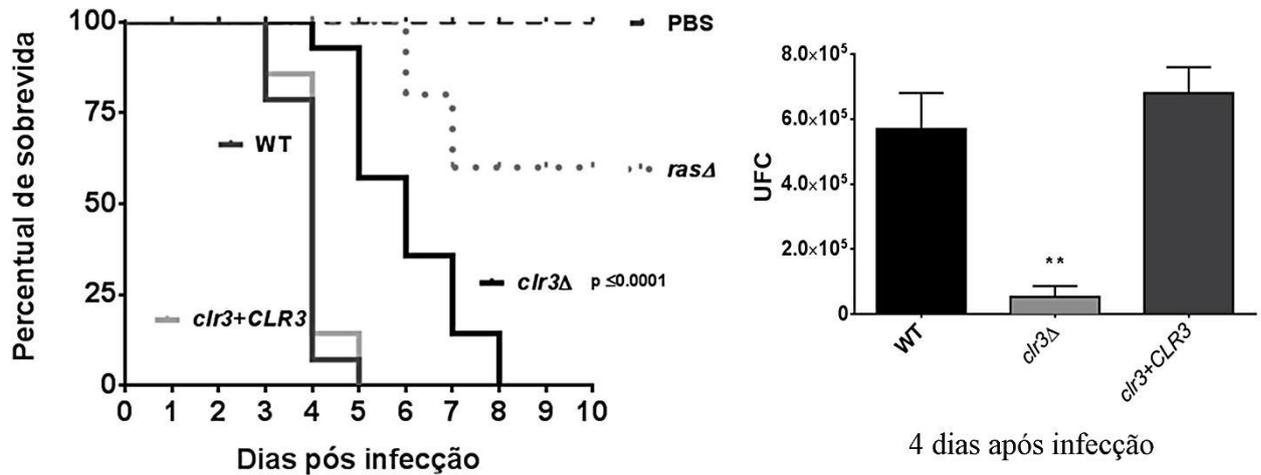
histopatológica do pulmão dos animais após 7 dias de infecção. Todavia, como pode ser observado nas imagens, a infecção no pulmão é mais branda e o número de UFC recuperadas a partir do pulmão de animais infectados, cinco por grupo, foi significativamente menor para o mutante quando comparado ao tipo selvagem. Pode-se observar um infiltrado de células do sistema imunológico mais pronunciado no tecido pulmonar de camundongos infectados com o tipo selvagem, como indicado nas imagens pelas setas vermelhas. Além de um maior número de células gigantes de *C. neoformans* delimitadas por um espaço claro nas imagens, que corresponde à região da cápsula (**Figura 34**). Foram realizados ensaios de UFC do cérebro dos camundongos infectados no dia 7 após infecção, porém neste momento da análise não foram detectadas leveduras presentes no cérebro.

Após 14 dias de infecção também foram realizadas análises histopatológicas de pulmão e do número de UFC recuperadas de pulmão e cérebro dos animais infectados, cinco animais por grupo. Os resultados mostraram um leve quadro inflamatório nas imagens do pulmão dos animais infectados com o mutante *clr3Δ*, no entanto, pouquíssimas leveduras puderam ser encontradas no pulmão dos animais nesta etapa (**Figura 35**). Na contagem de UFC do pulmão, observamos um número significativamente menor em comparação a infecção com o tipo selvagem e pelo mutante reconstituído (**Figura 35**). No cérebro dos camundongos, detectou-se para o tipo selvagem e o mutante reconstituído, porém não encontramos leveduras do mutante *clr3Δ*. O que se pode observar claramente é um forte infiltrado inflamatório (setas vermelhas) nos animais infectados pelo tipo selvagem e pelo mutante reconstituído, no pulmão, com o tecido praticamente tomado por células de *C. neoformans* gigantes com cápsulas maiores que usual (setas amarelas) (**Figura 35**). Nos animais infectados pela linhagem mutante se observa pouco infiltrado inflamatório e poucas leveduras.

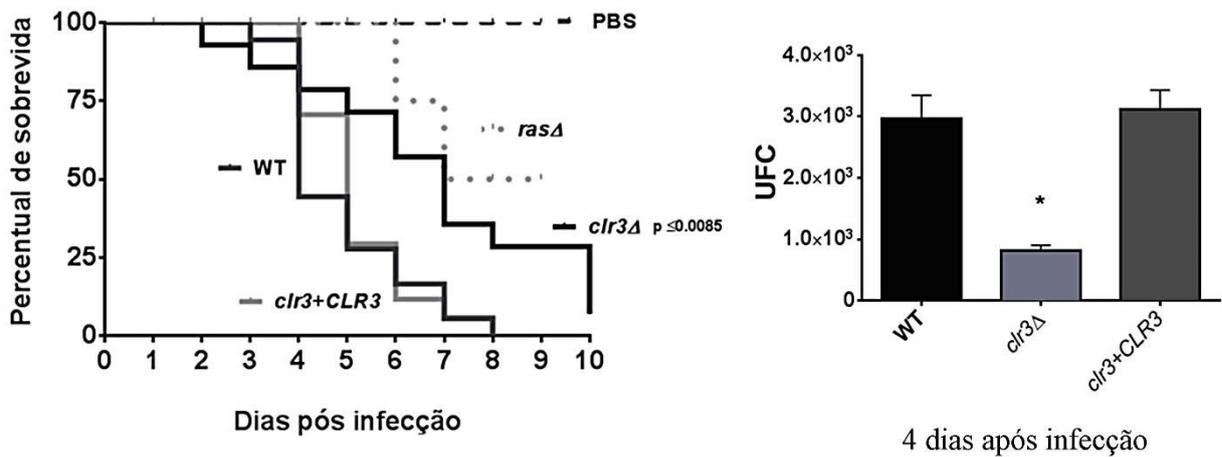
A curva de sobrevivência dos camundongos foi acompanhada por 40 dias, monitorando-se os animais diariamente. Os animais infectados com a linhagem selvagem e com o mutante reconstituído morreram todos entre a terceira e quarta semana após infecção (**Figura 36**). No entanto, os animais que foram infectados com o mutante *clr3Δ* sobreviveram até o final do ensaio (**Figura 36**). No final da curva, os animais sobreviventes foram sacrificados, conforme norma ética da Universidade de Duke, onde os experimentos foram realizados. Alguns animais foram recolhidos para autópsia, e foi possível observar uma infecção já bem avançada no pulmão,

caracterizando que os animais estavam desenvolvendo a doença, porém mais lentamente que aqueles infectados com a linhagem selvagem (dados não mostrados). Com base nesta observação, determinamos o mutante *clr3Δ* como significativamente hipovirulento no modelo de infecção de camundongos.

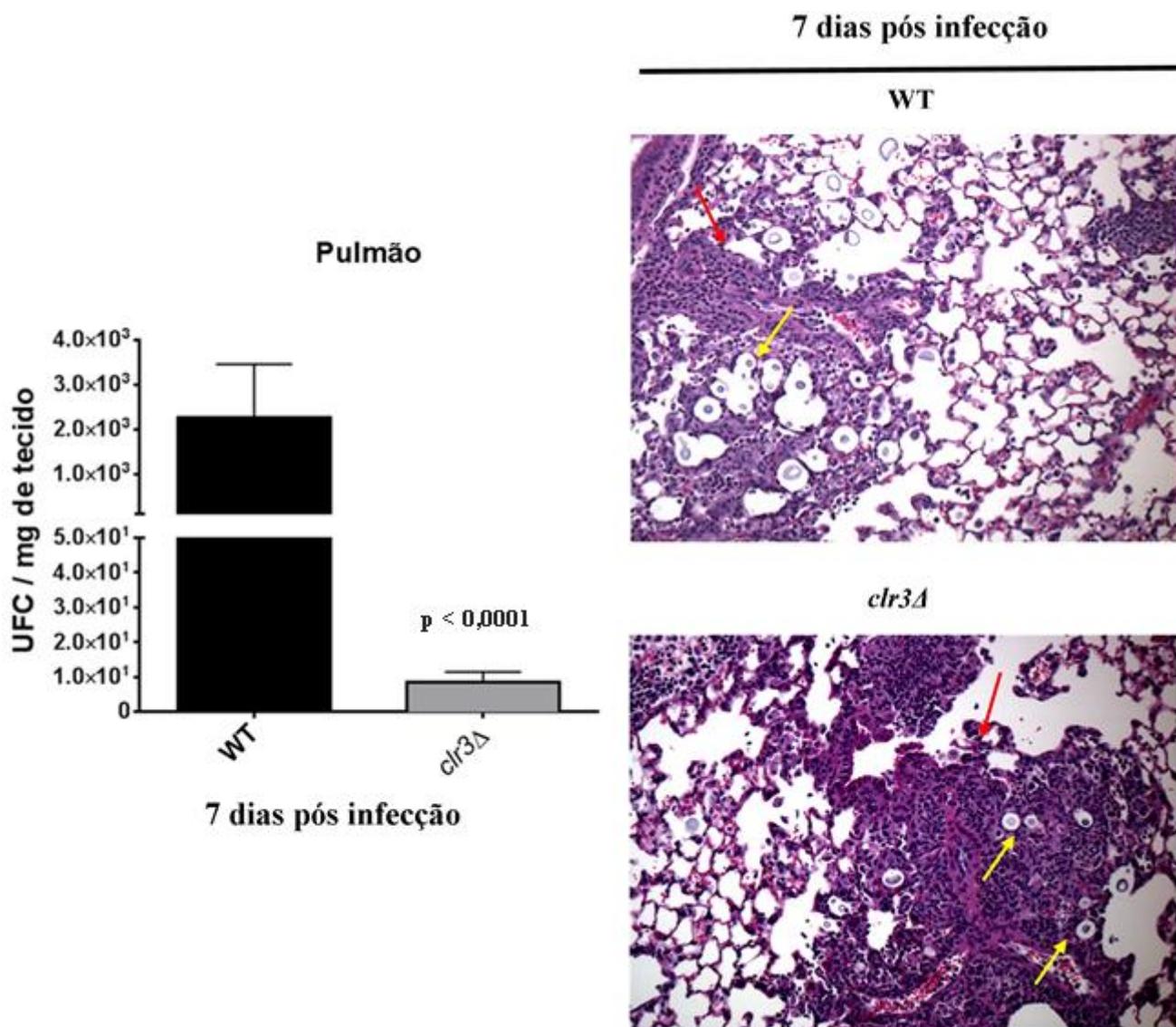
## *G. mellonella* 37 °C



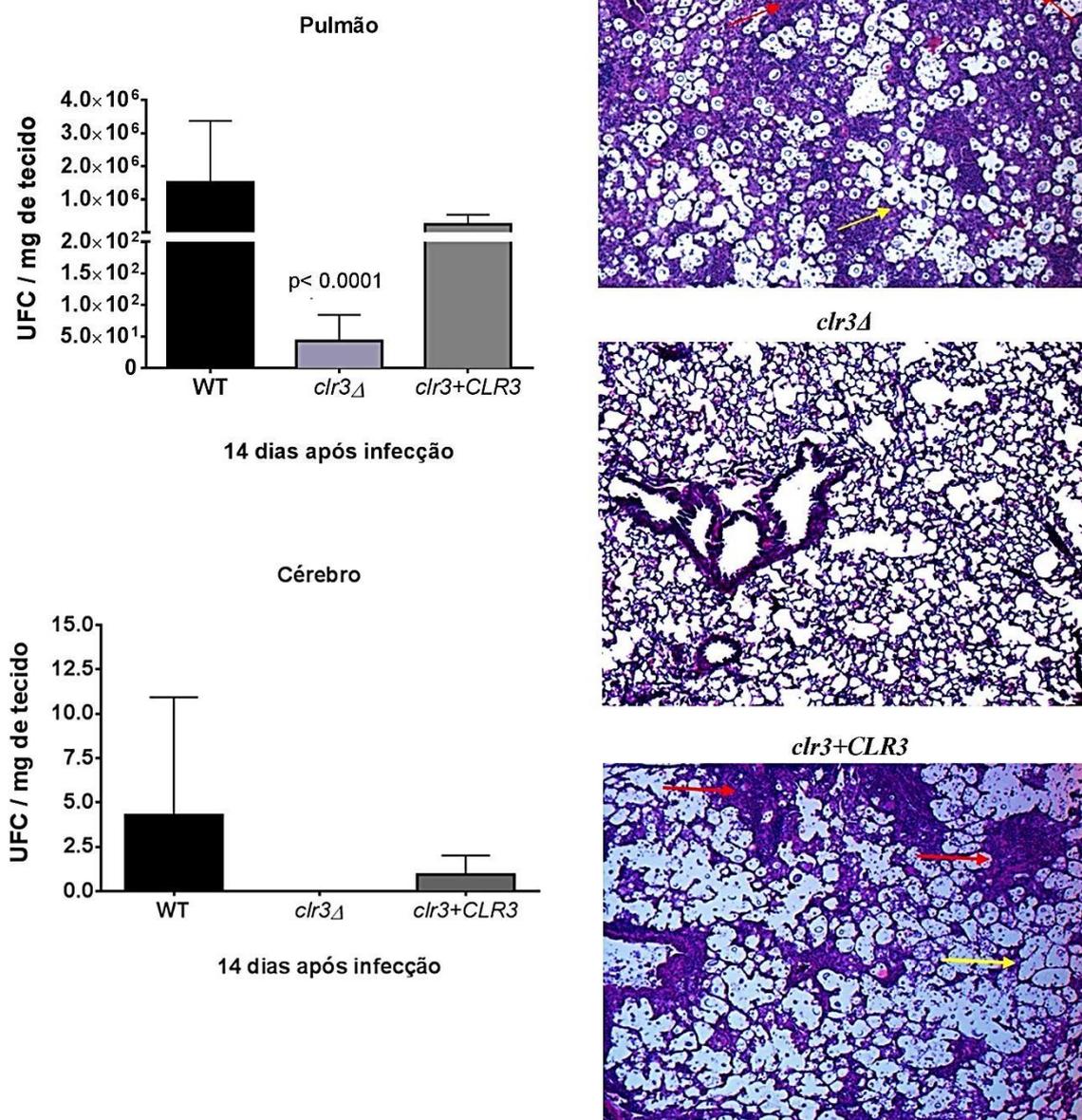
## *G. mellonella* 30 °C



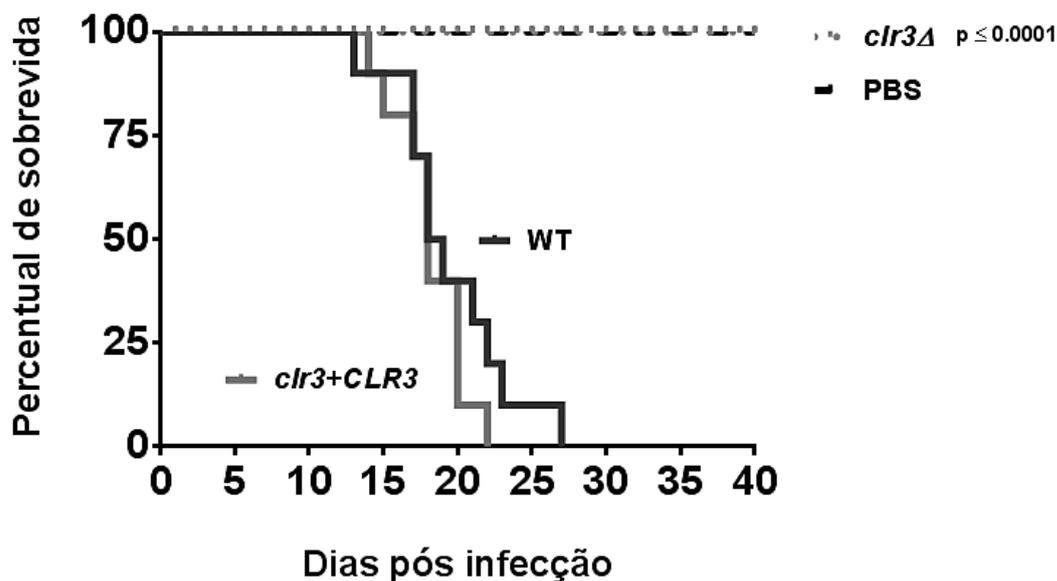
**Figura 33: A mutação *clr3Δ* atenua a virulência em *G. mellonella*.** Lagartas da espécie *G. mellonella* (20 por grupo) foram infectadas com  $5 \times 10^4$  leveduras do mutante *clr3Δ*, do mutante reconstituído (*clr3+CLR3*) e do tipo selvagem (WT). A sobrevivência dos animais foi monitorada por até 10 dias após infecção. Quatro dias após a infecção, 5 lagartas de cada grupo foram recolhidas para ensaio de UFC. Teste estatístico da curva de sobrevivência: Kaplan-Meier. Teste estatístico do número de UFC: *t student* \*  $p < 0,0309$  \*\*  $p < 0,0040$ .



**Figura 34: Efeito da mutação *clr3Δ* na virulência em camundongos.** O gráfico apresentado em escala logarítmica, representa o número de UFC recuperadas à partir do pulmão dos camundongos infectados com as diferentes linhagens de *C. neoformans*, indicadas acima das imagens, após 7 dias de infecção. As análises do histopatológico revelaram um aumento do infiltrado de células inflamatórias tanto para linhagem mutante *clr3*, quanto para o tipo selvagem (WT). As setas vermelhas indicam região com forte infiltrado inflamatório. As setas amarelas apontam as células do fungo no tecido, delimitadas por halo periférico correspondendo a região da cápsula. WT: tipo selvagem. O pulmão de camundongos C57BL/6 infectados foi colhido no dia 7 após infecção e análises de UFC e histopatológicas por coloração com hematoxilina e eosina (H &E) foram realizadas. Um grupo de 5 camundongos por linhagem de *C. neoformans* foi utilizado para estas análises. Aumento de 10x. Teste estatístico: *t student*.



**Figura 35: Efeito da mutação *clr3\Delta* sobre a virulência em camundongos.** Os gráficos apresentados em escala logarítmica representam o número de UFC recuperadas a partir do pulmão e cérebro de camundongos infectados com as diferentes linhagens de *C. neoformans* indicadas acima das imagens, após 14 dias de infecção. As análises histopatológicas revelaram ausência de células do mutante *clr3* e sutil processo inflamatório, porém um aumento do infiltrado de células inflamatórias no pulmão de animais infectados com a linhagem do tipo selvagem (WT) ou com o mutante *clr3+CLR3* reconstituído. As setas vermelhas indicam região com forte infiltrado inflamatório. As setas amarelas apontam a presença do fungo no tecido, delimitadas por halo periférico correspondendo à região da cápsula. **WT**: tipo selvagem. O pulmão de camundongos C57BL/6 infectados foi colhido no dia 7 após infecção e análises de UFC e histopatológicas por coloração com hematoxilina e eosina foram realizadas. Um grupo de 5 camundongos por linhagem de *C. neoformans* foi utilizado para estas análises. Aumento de 5x. Teste estatístico: *t student*.



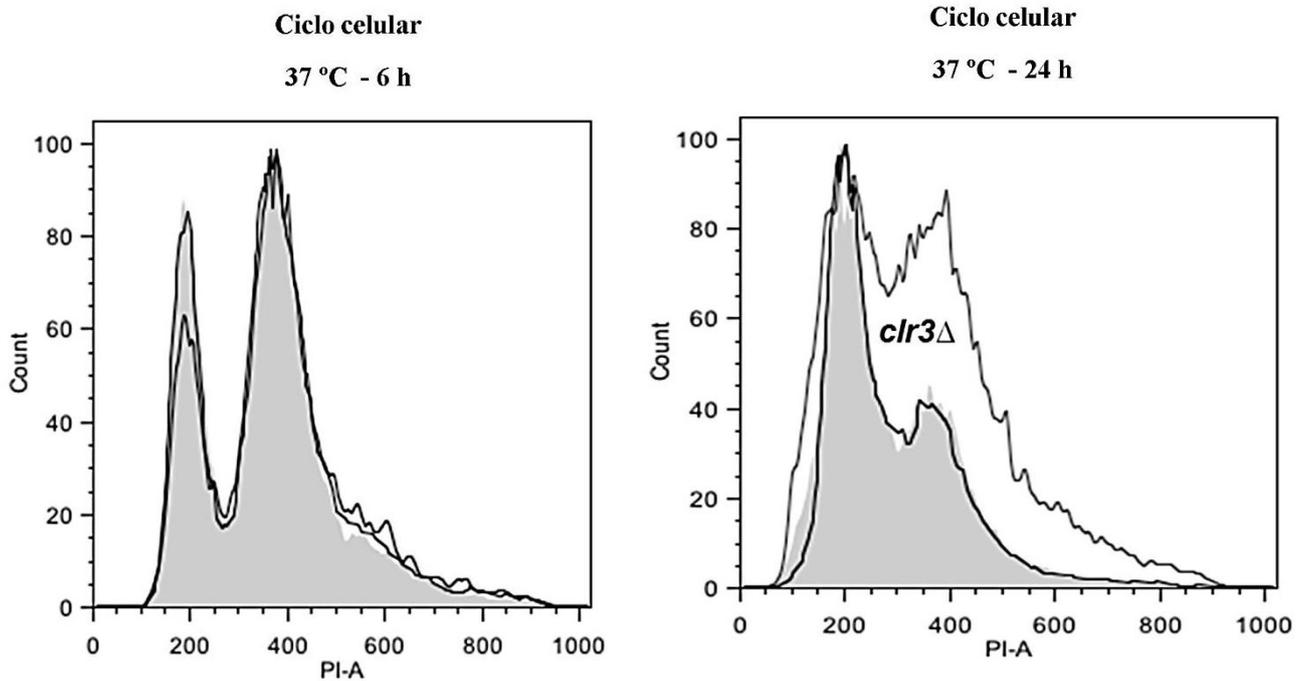
**Figura 36:** A mutação *clr3Δ* atenua a virulência em modelos murinho de criptococose. Camundongos da linhagem C57BL/6 (10 por grupo) foram infectados intranasalmente com  $1 \times 10^5$  células de *C. neoformans* de cada linhagem, e a sobrevivência dos animais foi monitorada por 40 dias após a infecção. Teste estatístico: Kaplan-Meier.

#### 8.14 O gene *CLR3* está envolvido no ciclo celular de *C. neoformans*.

Os dados mostrando um atraso no crescimento em temperaturas acima de 30 °C sugeriram que o gene *CLR3* poderia estar envolvido na regulação do ciclo celular em *C. neoformans*. Para se avaliar esta hipótese leveduras mutantes para *CLR3* e do tipo selvagem foram crescidas em meio mínimo (MM) a 37 °C pelos tempos de 6 ou 24 h. Após o crescimento, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

A deleção do gene *CLR3* levou a um aumento na população de células na fase do ciclo celular correspondente a G2/M (**Figura 36**). A alteração no ciclo celular só foi observada no intervalo de 24 h de crescimento. Durante as 6 primeiras horas, observou-se picos correspondendo a G1 e G2 que se sobrepõem para todos os grupos: *clr3Δ*, selvagem e *clr3/CLR3* reconstituído (**Figura 37 – 6h**). No intervalo de 24 h, observou-se um pico maior de células em G1 para a linhagem selvagem e o mutante reconstituído,

enquanto que para o mutante *clr3Δ* há um nítido aumento na distribuição de células correspondendo ao pico de G2/M (Figura 37 – 24h).



**Figura 37: O mutante *clr3Δ* apresentou aumento da população de células em G2/M.** As células foram cultivadas em meio mínimo (MM) pelo tempo e temperatura indicados acima dos gráficos (ver métodos para mais detalhes). O histograma mostra a sobreposição das populações de células dos grupos: tipo selvagem em cinza, o mutante *clr3Δ* em linha sólida sem preenchimento e o mutante reconstituído *clr3+CLR3* em linha sólida mais espessa. **PI:** Iodeto de propídio.

### **8.15 A HDAC Clr3 regula transcricionalmente genes requeridos para a adaptação no hospedeiro.**

Para a identificação de processos celulares regulados por Clr3, empregou-se a técnica de sequenciamento do RNA conhecida como RNA-Seq. Analisou-se o transcriptoma do mutante *clr3Δ* e do tipo selvagem cultivados sob condições de indução da cápsula e de melanina, em meio mínimo quimicamente definido (ver Métodos), com o qual também se observou uma alteração no ciclo celular deste mutante. Mais de 4.000 genes se mostraram regulados diferencialmente entre o mutante e o selvagem. Entretanto, a vasta maioria apresentou um *fold-change* muito pequeno, fazendo-se necessário um enriquecimento dos dados para análise. Para maior clareza e concisão dos dados, são apresentados: genes envolvidos na virulência (**Tabela 6**), genes regulados negativamente no mutante *clr3Δ* com *fold change*  $\leq -1$  (**Tabela 7**) e genes regulados positivamente no mutante *clr3Δ* com *fold change*  $\geq 1$  (**Tabela 8**).

**Tabela 6: Correlação da expressão de genes envolvidos na virulência em *C. neoformans* entre o mutante *clr3Δ* e a linhagem selvagem.**

Fenótipo	GENE ID	Descrição	Log2 Fold change
<i>Cápsula</i>			
	CNAG_03644	capsule related protein (CAS3)	-0.656548
	CNAG_00701	protein involved in gxm O-acetylation (CAS31)	-0.592768
	CNAG_01283	beta-1,2-xylosyltransferase (CAP5)	-0.580649
	CNAG_00697	UDP-glucose epimerase (UGE1)	-0.577653
	CNAG_03735	beta-1,2-xylosyltransferase (CAP4)	-0.555996
	CNAG_00124	capsule structure designer protein (CAS32)	-0.481096
	CNAG_00721	alpha-1,3-mannosyltransferase (CAP59)	-0.431493
	CNAG_02581	capsular associated protein (CAS33)	-0.410088
	CNAG_02885	capsule-associated protein (CAP64)	-0.391185
	CNAG_00746	capsular associated protein (CAS35)	-0.382597
	CNAG_05023	putative maltose o-acetyltransferase (CAS91)	-0.371088
	CNAG_03695	probable sugar phosphate/phosphate translocator; capsule biosynthetic protein (CAS41)	-0.313686
	CNAG_05222	transcription factor (NRG1)	-0.242412
	CNAG_05139	putative UDP-galactose transporter (UGT1)	0.168433
	CNAG_05431	C2H2 zinc finger transcription factor (RIM101)	0.208602
	CNAG_05264	alpha-amylase AmyA	-0.737415
	CNAG_02797	putative secreted protein (CPL1)	0.225613
	CNAG_04312	mannose-6-phosphate isomerase (MAN1)	-0.173343
<i>Melanina</i>			
	CNAG_03465	laccase (LAC1)	-0.49109
	CNAG_07734	About LAC	0.578943
	CNAG_03464	laccase (LAC2)	-0.221412
<i>Mating Type</i>			
	CNAG_07407	mating-type pheromone alpha (MFalpha3)	-1.02769
	CNAG_06808	a-factor pheromone receptor (STE3alpha)	-0.501336
	CNAG_06765	low mating performance protein (LMP1)	-0.494701
	CNAG_05465	G-protein beta-like rack1 protein homolog (GIB2)	-0.292177
	CNAG_04864	iron-responsive gata-type transcription factor (CIR1)	-0.254616
	CNAG_06980	mapkk kinase, ste/ste11 protein kinase (STE11alpha)	0.344868
	CNAG_03938	nonmating-type specific pheromone G-protein coupled receptor (CPR2)	0.61943
	CNAG_04323	hypothetical protein	-0.213656
	CNAG_04755	mitogen-activated protein (map) kinase kinase kinase (BCK1)	-0.315193
	CNAG_05752	kinesin microtubule motor protein (KAR3)	-0.915145
<i>Urease</i>			
	CNAG_00678	urease accessory protein (URE7)	0.184996
	CNAG_01166	urease accessory protein (URE4)	0.288785

Tabela 6: Continuação.			
	CNAG_05540	urease ( <i>URE1</i> )	0,162484
<i>Fosfolipase</i>			
	CNAG_06085	Phospholipase B ( <i>PLB1</i> )	-0,0595324
<i>Anti-fagocitose</i>			
	CNAG_06762	gata transcription factor, capsule-independent antiphagocytic protein ( <i>GAT204</i> )	-0.366332
	CNAG_06346	barwin-like protein domain ( <i>BLP1</i> )	-1.31535
<i>Oxidação</i>			
	CNAG_05265	hypothetical protein	-0.33917
	CNAG_05027	monoamine oxidase	0.266246
	CNAG_04508	hypothetical protein	0.587588
	CNAG_04415	oxidoreductase	0.969649
	CNAG_03848	glutathione transferase	-0.370548
	CNAG_03936	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV	-0.251938
	CNAG_00581	saccharopepsin	0.428232
<i>Cromatina</i>			
	CNAG_06591	histone deacetylase complex protein ( <i>SET302</i> )	-0.306472
	CNAG_01699	histone deacetylase 1/2 ( <i>CLR61</i> )	-0.14155
	CNAG_05276	histone deacetylase 1/2 ( <i>CLR62</i> )	-0.155206
	CNAG_00660	histone deacetylase <i>HOS3</i>	-0.518994
	CNAG_05096	histone deacetylase 1/2 ( <i>HD3</i> )	-0.081887
	CNAG_03188	histone-lysine N-methyltransferase ( <i>SET202</i> )	-0.226744
	CNAG_05622	histone demethylase ( <i>RPH1</i> )	0.442366
	CNAG_04158	nucleosome assembly complex protein ( <i>HIRA</i> )	-0.239474
	CNAG_03406	putative compass/set1c complex subunit ( <i>SPP101</i> )	-0.194619
	CNAG_00375	saga complex histone acetyltransferase ( <i>GCN5</i> )	-0.313686
<i>Transcrição</i>			
	CNAG_05392	putative zinc finger transcription factor ( <i>ZAP104</i> )	-0.346347
	CNAG_02115	nonhistone chromosomal protein ( <i>NHP6B02</i> )	-0.716932
	CNAG_04352	putative zinc finger transcription factor ( <i>ZAP103</i> )	0.1561

**Tabela 7:** Genes regulados negativamente no mutante *clr3Δ* com *fold change* ≤ -1

Gene ID	log2 <i>Fold_change</i>	Organismo	Cromossomo	Descrição
CNAG_07826	-3.11883	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_01527	-2.91022	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_02849	-2.84536	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	glutathione transferase
CNAG_05161	-2.76391	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_04773	-2.22479	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_01612	-2.21836	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	CAMK/CAMKL protein kinase
CNAG_05079	-1.8287	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_01849	-1.79405	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_02152	-1.60823	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_01609	-1.52795	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	cystathionine gamma- synthase
CNAG_03716	-1.52569	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	pr4/barwin domain protein (BLP6)
CNAG_02553	-1.41167	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	short-chain dehydrogenase
CNAG_06517	-1.40571	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	cytoplasmic protein
CNAG_04160	-1.39896	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_02561	-1.37586	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	spermine transporter
CNAG_05312	-1.3642	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_04355	-1.35392	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_06346	-1.31535	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	barwin-like protein domain (BLP1)
CNAG_03426	-1.2739	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	GDP-mannose transporter (GMT2)
CNAG_03239	-1.2612	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_03141	-1.25167	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_06891	-1.23088	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_06832	-1.23051	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	putative beta-glucan synthase (KRE62)
CNAG_06087	-1.21247	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	kinetochore protein Spc7/SPC105
CNAG_02052	-1.18526	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	dimeric dihydrodiol dehydrogenase
CNAG_00429	-1.1679	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	tRNA-dihydrouridine synthase 1
CNAG_00585	-1.13784	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_01333	-1.13312	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	Haspin protein kinase
CNAG_01525	-1.11727	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_01959	-1.11298	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	condensin complex subunit 1
CNAG_06126	-1.11107	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	Pin2-interacting protein X1
CNAG_07756	-1.10763	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	cell division control protein
CNAG_05757	-1.107	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_06117	-1.10006	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_05803	-1.09839	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	exo-beta-1,3-glucanase
CNAG_02479	-1.08762	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	monosaccharide transporter
CNAG_03056	-1.08757	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein

**Tabela 7: Continuação.**

CNAG_03966	-1.07284	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_03184	-1.06814	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	BUB protein kinase
CNAG_04175	-1.06256	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_04468	-1.06065	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	tartrate dehydrogenase
CNAG_01123	-1.05144	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	DRAP deaminase
CNAG_01772	-1.04903	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_05415	-1.04164	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_05565	-1.03584	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_00110	-1.02918	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_07407	-1.02769	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	mating-type pheromone alpha (MFalpha3)
CNAG_02721	-1.02694	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	leucine repeat containing protein
CNAG_02449	-1.02397	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	long-chain fatty acid CoA ligase
CNAG_01088	-1.01347	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_04521	-1.01257	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	oxidoreductase
CNAG_01898	-1.0048	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	protein MAK11
CNAG_01546	-1.0045	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	S-adenosylmethionine- dependent methyltransferase
CNAG_03822	-1.00425	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	monolysocardiolipin acyltransferase
CNAG_07381	-1.00226	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	ATP-dependent RNA helicase prh1

**Tabela 8:** Genes regulados positivamente no mutante *clr3Δ* com *fold change* ≥ 1

Gene ID	log2 Fold_change	Organismo	Cromossomo	Descrição
CNAG_06802	6.67609	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_04891	6.11659	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_07920	4.5908	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	hypothetical protein
CNAG_06524	4.43813	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	ferric reductase (FRE3)
CNAG_02381	4.33249	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_06873	4.11902	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	5-oxoprolinase
CNAG_03252	3.87902	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_07969	3.78501	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_07652	3.58354	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_01525	3.56226	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_05334	3.53764	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_00937	3.37491	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_06877	3.29045	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_02570	3.28562	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_03467	3.26114	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_06966	3.13889	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	alkaline phosphatase D
CNAG_04552	3.05845	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	putative inositol transporter (ITR1A)
CNAG_06527	2.96165	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	MFS transporter, SP family, general alpha glucoside:H <sup>+</sup> symporter
CNAG_05333	2.95651	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_02254	2.93494	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	quininate permease
CNAG_05666	2.91766	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_05341	2.8705	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_07895	2.82808	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_02768	2.77942	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_06527	2.7518	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	MFS transporter, SP family, general alpha glucoside:H <sup>+</sup> symporter
CNAG_05670	2.72412	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_00867	2.67163	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	myo-inositol transporter (ITR3A)
CNAG_07836	2.67147	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	NAD binding dehydrogenase
CNAG_05982	2.63541	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	MFS transporter, SP family, general alpha glucoside:H <sup>+</sup> symporter
CNAG_07785	2.59079	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_03906	2.54361	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_06518	2.52598	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	hypothetical protein
CNAG_03906	2.51106	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_04553	2.42636	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_04092	2.42359	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	sugar transporter
CNAG_00177	2.42136	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_03091	2.41721	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein

**Tabela 8: Continuação.**

CNAG_02558	2.38657	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_07829	2.36941	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_02438	2.3495	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_03759	2.34584	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	conidiation-specific protein 6
CNAG_03797	2.32948	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_03782	2.32879	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_03087	2.32623	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	maltose permease
CNAG_02253	2.31331	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_07026	2.31286	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_04100	2.31181	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_07729	2.29887	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_04098	2.29246	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	ATP-binding cassette transporter (PDR5-2)
CNAG_05383	2.2909	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_06209	2.26913	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_00870	2.25918	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_00446	2.22541	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_01668	2.21523	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_00133	2.20151	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_04915	2.17764	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_01446	2.16785	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	heat shock protein, 12Kda (HSP12)
CNAG_04092	2.14299	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	sugar transporter
CNAG_04916	2.13323	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_02047	2.12742	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_01560	2.12431	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_04556	2.0903	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	translocation protein SEC62
CNAG_06800	2.04874	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_01142	2.04239	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	endoplasmic reticulum protein
CNAG_07766	2.04225	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	DNA polymerase lambda subunit
CNAG_06453	2.01208	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	benzodiazapine receptor
CNAG_01787	2.00732	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_07811	1.99456	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_00932	1.98199	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_05412	1.9813	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_03095	1.96697	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_02483	1.96424	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_07819	1.96332	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_06936	1.93888	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	beta-glucosidase
CNAG_06973	1.93167	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_01605	1.92688	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	rossman fold oxidoreductase
CNAG_04461	1.92415	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	ATP-dependent DNA helicase (HFM1)
CNAG_07390	1.88378	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein

**Tabela 8: Continuação.**

CNAG_05256	1.87939	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	catalase 2 (CAT2)
CNAG_00005	1.87896	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	TPR repeat-containing protein
CNAG_04337	1.87486	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	cation diffusion facilitator
CNAG_05641	1.87143	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_07043	1.87067	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	hypothetical protein
CNAG_02397	1.86995	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_00588	1.86318	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_03460	1.85518	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	phosphoglycerate dehydrogenase
CNAG_06872	1.84769	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	5-oxoprolinase
CNAG_02217	1.84318	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	putative chitin synthase (CHS7)
CNAG_07960	1.84303	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_06976	1.79889	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	ferric reductase (FRE6)
CNAG_02241	1.79309	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_02219	1.78831	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_01538	1.77803	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_01611	1.77224	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	infection related protein of unknown function (LIV8)
CNAG_06253	1.75621	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	sugar transporter
CNAG_07916	1.75144	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_03650	1.74501	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_00033	1.74045	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_07643	1.74016	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_01604	1.73076	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	TIGR01458 family HAD hydrolase
CNAG_07707	1.73005	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	glycoside hydrolase family 3 domain-containing protein
CNAG_06956	1.72624	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_00091	1.72158	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_02525	1.72126	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_05256	1.71623	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	catalase 2 (CAT2)
CNAG_05345	1.71061	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	amino acid transporter
CNAG_02512	1.70237	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	DNA repair protein RAD16
CNAG_00984	1.67886	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	glucose and ribitol dehydrogenase
CNAG_07723	1.67275	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_00023	1.66561	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_02771	1.66303	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	DNA repair and recombination protein RAD54B
CNAG_05992	1.66237	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_03259	1.64262	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_07644	1.63798	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_04154	1.61058	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_03408	1.6101	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_06225	1.609	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_03754	1.59988	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	short-chain dehydrogenase/reductase SDR
CNAG_04163	1.59569	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein

**Tabela 8: Continuação.**

CNAG_04461	1.59116	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	ATP-dependent DNA helicase (HFM1)
CNAG_07666	1.58127	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_07789	1.57694	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_03838	1.57354	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_02311	1.57345	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_04322	1.56724	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_06245	1.56383	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_07455	1.56324	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_03873	1.5556	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_04457	1.55531	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_05697	1.55373	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_00995	1.5459	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_07666	1.53796	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_04175	1.53779	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_00315	1.53237	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	HHE domain-containing protein
CNAG_07573	1.53048	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	DNA ligase 4
CNAG_00848	1.52811	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_06389	1.52235	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	hypothetical protein
CNAG_03830	1.51995	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_00720	1.51914	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	DNA repair protein RAD51
CNAG_03058	1.51509	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_07775	1.51146	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_05212	1.50993	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_07588	1.50206	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_07391	1.49405	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_00827	1.49387	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	ribose 5-phosphate isomerase
CNAG_06152	1.4886	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_01735	1.48719	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_01862	1.48249	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hexose transporter
CNAG_01102	1.47508	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	oxidoreductase
CNAG_04106	1.47401	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_04461	1.47067	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	ATP-dependent DNA helicase (HFM1)
CNAG_04413	1.47037	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_06259	1.46586	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	MFS transporter, SP family, general alpha glucoside:H <sup>+</sup> symporter
CNAG_00868	1.45486	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_02255	1.45085	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	BNR/Asp-box repeat family protein
CNAG_03635	1.44959	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_01514	1.44597	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_06870	1.43853	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_03667	1.43401	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_02192	1.43299	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein

**Tabela 8: Continuação.**

CNAG_01896	1.4267	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	alcohol dehydrogenase (NADP+)
CNAG_00003	1.42616	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	drug transporter
CNAG_06827	1.4256	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_07687	1.42044	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_00178	1.41665	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	DNA repair protein REV1
CNAG_02129	1.41642	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_07306	1.41562	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_00465	1.40907	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_04546	1.40724	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	multidrug transporter
CNAG_03837	1.40501	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	protein-L-isoaspartate O- methyltransferase
CNAG_02118	1.40032	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_08026	1.40012	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_02499	1.39932	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_02023	1.39203	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_05031	1.38861	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	3-oxoacid CoA-transferase
CNAG_05426	1.388	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_01506	1.38277	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_01653	1.38202	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	cytokine inducing-glycoprotein (CIG1)
CNAG_02525	1.38113	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_06521	1.37441	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	hypothetical protein
CNAG_03292	1.37332	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_06027	1.37234	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	aryl-alcohol dehydrogenase
CNAG_06853	1.37108	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_07693	1.37043	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	high-affinity methionine permease
CNAG_01806	1.37021	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_01268	1.36923	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_07682	1.36534	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_02864	1.365	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_05220	1.36492	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	Tor-like phosphatidylinositol 3 kinase (TLK1)
CNAG_04102	1.36047	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_04766	1.35854	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_01056	1.35591	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_06935	1.35294	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	isochorismatase hydrolase
CNAG_04105	1.35042	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_02217	1.34715	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	putative chitin synthase (CHS7)
CNAG_01336	1.34184	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_02087	1.33801	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	acyl-CoA-dependent ceramide synthase
CNAG_06027	1.33316	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	aryl-alcohol dehydrogenase
CNAG_03408	1.33106	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_05220	1.32772	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	Tor-like phosphatidylinositol 3 kinase (TLK1)
CNAG_07661	1.32075	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein

**Tabela 8: Continuação.**

CNAG_07401	1.32061	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_00844	1.31841	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_01570	1.31553	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_03107	1.30721	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_00866	1.30311	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	transketolase
CNAG_05377	1.30301	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	myo-inositol transporter (ITR3)
CNAG_05201	1.29914	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	DNA mismatch repair protein MSH4
CNAG_05167	1.29538	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_04657	1.29484	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	short-chain dehydrogenase
CNAG_00686	1.29309	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_05192	1.28992	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_05305	1.28887	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_01065	1.28858	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_02734	1.28688	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_07972	1.28639	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_00627	1.28151	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	specific transcriptional repressor
CNAG_06868	1.27772	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	phosphopyruvate hydratase
CNAG_05676	1.276	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	tyrosine aminotransferase
CNAG_03688	1.27544	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_07516	1.27435	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_02596	1.26958	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_02707	1.26574	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_04598	1.25887	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_03114	1.25572	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_06724	1.25196	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	DNA repair and recombination protein RAD52
CNAG_07176	1.25074	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_03713	1.24767	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	efflux protein EncT
CNAG_00093	1.24721	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_07188	1.24676	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_01052	1.24607	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_07369	1.24458	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_04085	1.23867	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	oxidoreductase
CNAG_03113	1.23795	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	trehalose synthase
CNAG_04585	1.23471	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_03060	1.23414	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	multiple drug resistance protein
CNAG_01244	1.23239	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_03143	1.22854	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_06672	1.22821	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	formate dehydrogenase
CNAG_07188	1.22702	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_07722	1.22103	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	pumilio domain-containing protein c
CNAG_03980	1.21959	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein

**Tabela 8: Continuação.**

CNAG_06905	1.2164	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	cytoplasmic protein
CNAG_02660	1.21639	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_05651	1.20756	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_02160	1.20721	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_01751	1.2054	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_07610	1.20521	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_00915	1.2013	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_01121	1.20127	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_03873	1.1986	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_06267	1.19664	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	hypothetical protein
CNAG_07393	1.19615	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_07725	1.1954	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	HMG box factor
CNAG_01534	1.18964	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_02604	1.18901	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_06576	1.18497	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	cAMP-regulated gene 1 (CAR1)
CNAG_03084	1.18221	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	endoribonuclease L-PSP
CNAG_04314	1.17929	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	NAD+ kinase
CNAG_06577	1.17747	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_07471	1.17635	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_03500	1.1753	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	osmosensor
CNAG_04956	1.17341	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	high-affinity nicotinic acid transporter
CNAG_00378	1.17218	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_06396	1.17123	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	hypothetical protein
CNAG_01223	1.17095	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_01954	1.16968	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	aldo-keto reductase
CNAG_05866	1.16862	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	putative plasma membrane fusion protein (PRM1)
CNAG_00586	1.1681	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_06502	1.16711	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	solute carrier family 25 (mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter), member 20/29
CNAG_07457	1.16591	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_04076	1.16567	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_04938	1.16137	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_01994	1.16062	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_05201	1.16018	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	DNA mismatch repair protein MSH4
CNAG_00925	1.15798	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_03597	1.15642	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_03495	1.15586	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_05728	1.15135	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_07876	1.14869	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_05487	1.14834	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_06718	1.14741	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_01796	1.14424	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein

**Tabela 8: Continuação.**

CNAG_07456	1.14369	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_05915	1.13771	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_06075	1.13417	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_06652	1.13293	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	allantoate permease
CNAG_04416	1.12952	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	major facilitator superfamily transporter
CNAG_03597	1.12764	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_06574	1.12493	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	secreted antiphagocytic protein (APP1)
CNAG_05987	1.12457	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_05654	1.1223	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	14	hypothetical protein
CNAG_07564	1.12063	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_01873	1.12049	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_01743	1.12009	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_00800	1.11817	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	nicotinamidase
CNAG_00575	1.11296	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	catalase 3 (CAT3)
CNAG_04138	1.10945	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_00637	1.10315	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	cystathionine beta-synthase
CNAG_00961	1.10293	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_05184	1.10273	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	glycosyl transferase family 8 protein
CNAG_07482	1.10242	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	SCF-associated factor 1
CNAG_06593	1.10034	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	rhamnogalacturonan lyase
CNAG_06539	1.09887	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	monocarboxylic acid transporter
CNAG_02016	1.09454	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	hypothetical protein
CNAG_03307	1.09425	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_06102	1.09282	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	ADP,ATP carrier protein
CNAG_01417	1.0926	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_00921	1.0916	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	glutathione transferase
CNAG_02673	1.09137	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	NAD dependent epimerase/dehydratase
CNAG_05279	1.08367	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_01341	1.08127	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	mannose-6-phosphate isomerase
CNAG_03233	1.07776	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	hypothetical protein
CNAG_07188	1.07522	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_02312	1.07456	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	patatin-like phospholipase domain-containing protein
CNAG_06791	1.07361	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein
CNAG_00002	1.07322	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_06525	1.07286	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	nuclear protein
CNAG_06181	1.07253	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_02537	1.07185	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_06066	1.0716	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	nucleoside-diphosphate-sugar epimerase
CNAG_00522	1.07144	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	C2 domain-containing protein
CNAG_02892	1.07016	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	phosphatidylinositol glycan, class B
CNAG_07076	1.06862	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	hypothetical protein

**Tabela 8: Continuação.**

CNAG_02182	1.0681	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	D-lactaldehyde dehydrogenase (GRE2)
CNAG_02747	1.06611	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	chaperone protein DNAJ
CNAG_05746	1.06361	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	Swi5-dependent recombination DNA repair protein 1
CNAG_02877	1.06347	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_04116	1.06179	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_01210	1.06093	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	5	hypothetical protein
CNAG_05042	1.06077	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	carnitine acetyltransferase
CNAG_02556	1.05374	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	phytanoyl-CoA dioxygenase
CNAG_05168	1.05115	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_04067	1.0482	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	2	haloacid dehalogenase, type II
CNAG_04413	1.04355	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_07781	1.04322	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	ATP-dependent bile acid transporter
CNAG_05015	1.04265	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	catalase 4 (CAT4)
CNAG_07840	1.0377	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	10	hypothetical protein
CNAG_04404	1.0333	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	hypothetical protein
CNAG_06145	1.03291	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_06251	1.03057	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	ser/Thr protein phosphatase
CNAG_03563	1.02857	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	aspartate-tRNA(Asn) ligase
CNAG_03040	1.02802	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	transketolase
CNAG_06003	1.02676	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	12	hypothetical protein
CNAG_05091	1.0265	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	4	hypothetical protein
CNAG_02694	1.02373	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_07552	1.02231	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	DNA repair protein Rad8
CNAG_03160	1.01744	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	8	DNA cross-link repair 1A protein
CNAG_06321	1.01657	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	hypothetical protein
CNAG_01542	1.01222	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	11	taurine catabolism dioxygenase TauD
CNAG_02589	1.01198	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	3	hypothetical protein
CNAG_05738	1.00903	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_05938	1.00876	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_00834	1.00839	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	phosphatidylserine decarboxylase
CNAG_07992	1.00657	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	7	hypothetical protein
CNAG_02188	1.00521	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	hypothetical protein
CNAG_02542	1.00345	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	fructosamine kinase
CNAG_07779	1.00258	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	9	D-glycerate 3-kinase
CNAG_00229	1.0009	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein
CNAG_02133	1.00045	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	6	6-phosphogluconolactonase (SOL3)
CNAG_06290	1.00041	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	13	high-affinity glucose transporter SNF3
CNAG_00851	1.00036	<i>C. neoformans var. grubii</i> H99	1	hypothetical protein

## 9. Discussão

---

A herança epigenética é definida como mudanças herdadas na expressão dos genes que não são baseadas em alterações na sequência do DNA. Muitos autores apontam que, dentre os mais importantes mecanismos destacam-se a acetilação e desacetilação das histonas processo reversível controlado pelas famílias de enzimas conhecidas como HAT e HDAC respectivamente. Em espécies de fungos como *Aspergillus nidulans*; *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *S. pombe*, o papel das HDAC na regulação de genes em resposta à adaptação ao hospedeiro e modulação da virulência vem sendo abordado (Tribus et al., 2005; Hnisz et al., 2010; Zacchi et al., 2010; Robbins et al., 2012; Li et al., 2015). Liu et al. (2008) demonstraram que a deleção dos genes de duas das HDAC de *C. neoformans* (*HOS2* e *RPD3*) levaram a uma redução na infectividade. O envolvimento das HDAC na virulência de *C. neoformans* foi corroborado quando se evidenciou que HDACi foram capazes de afetar negativamente os principais fenótipos de virulência deste fungo (Brandão et al., 2015) e devido a resultados prévios do grupo do Dr. Madhani (Liu et al., 2008) onde foi evidenciado que a deleção de duas das HDAC de *C. neoformans*, *HOS2* e *RPD3*, levaram a uma redução na infectividade.

Neste estudo, identificamos no genoma de *C. neoformans* oito genes correspondentes às famílias de HDAC classe I e II, diferentemente de outras espécies como *S. cerevisiae* e *S. pombe* que apresentam respectivamente quatro e três HDAC classes I e II. Em análise comparando a homologia dos genes contendo os domínios de HDAC presentes em *C. neoformans*, estes foram reagrupados de acordo suas contrapartes nas espécies de fungo *S. cerevisiae* e *S. pombe* (**Figura 21**) e classificados como: *CLR3*, *SAP128*, *HD3*, *CLR61*, *CLR62*, *HOS3*, *HOS2* e *RPD3*. O gene *HD3* não apresentou uma contraparte em *S. cerevisiae* ou *S. pombe*, o que nos levou a pensar como sendo um gene parálogo, logo este foi classificado como histona desacetilase 3, de acordo com os dados disponíveis no banco FungiDB. Foram realizadas deleções para cada um dos oito genes de HDAC em *C. neoformans* e avaliou-se individualmente cada um dos mutantes gerados, sob diferentes condições de crescimento, no intuito de identificar possíveis papéis regulatórios na expressão dos fenótipos relacionados à adaptação e virulência. Os resultados fortemente sugerem um importante papel regulatório das HDAC sobre os atributos de virulência de *C. neoformans*.

Neste trabalho demonstrou-se que a maioria dos genes de HDAC foi requerida ao crescimento sob condições de estresse (**Figura 23**). A termotolerância foi fortemente reduzida nos mutantes para os genes *CLR3*, *CLR62*, *HOS2* e *RPD3* (**Figura 23**). A capacidade de crescer na presença de agentes estressores de superfície como *Calcofluor White* e *Congo red* também foi reduzida, em relação ao tipo selvagem, para estes mutantes, porém de forma mais branda. Liu e colaboradores (2008) haviam observado defeitos no crescimento a 37 °C para os mutantes de *HOS2* e *RPD3*, no entanto estes não haviam sido testados nas condições estressoras aqui avaliadas. Ainda o mutante *rdp3Δ*, que no trabalho deste grupo não havia apresentado fenótipo adicional além de termotolerância reduzida, em nosso estudo mostrou uma redução do crescimento na presença dos agentes estressores, indicando um possível dano de superfície. Para o mutante *hd3Δ* só foi possível perceber uma redução no crescimento na temperatura de 39 °C. Já os mutantes *sap128Δ* e *clr61Δ* não apresentaram nenhuma alteração quanto ao crescimento, sob as condições aqui testadas.

Para o fenótipo de cápsula, os mutantes *clr3Δ* e *clr62Δ* mostraram as mais significativas reduções sobre a expansão desta em relação ao selvagem, seguidos de *hos3Δ* que também apresentou uma diminuição significativa (**Figura 24**). Curiosamente *clr3Δ* também apresentou um sutil aumento no volume do corpo celular (retomaremos este fato na discussão do ciclo celular); entretanto, como as análises do tamanho da cápsula foram normalizadas pela medida do corpo celular, este aumento não foi relevante. Embora seja nítida a diminuição na cápsula, não se observou nenhuma ausência total do fenótipo, o que sugere alguma redundância entre os genes de HDAC sobre a regulação da cápsula, o que é bastante plausível já que a formação da cápsula resulta da interação de diferentes genes (Bose et al., 2003; Loftus et al., 2005; Alspaugh 2014; Ots et al., 2015). Interessantemente, a deleção de genes envolvidos na acetilação de histonas (HTAs) em *C. neoformans* também resultou na redução da cápsula (Haynes et al., 2011; O'mera et al., 2010). Mesmo as HATs e HDACs apresentando funções opostas, o conjunto desses dados reforça o importante papel dos estados acetilados/desacetilado da cromatina sobre a regulação da expansão da cápsula. Neste contexto, pode-se afirmar, com base em nossos dados, que as HDACs em *C. neoformans* desempenham funções regulatórias distintas sobre a formação cápsula, visto que o mutante *hd3Δ* mostrou uma expansão significativamente maior que o tipo selvagem (**Figura 24**). Era esperado que *C. neoformans*, por apresentar oito genes

HDAC classe I e II, mais que o dobro das HDAC em *S. pombe*, mostrasse um a sobreposição ou até mesmo funções opostas sobre determinados fenótipos, visto que para *C. albicans* foi relatado que *HOS2* e *HDA1* têm papéis opostos sobre a morfogênese (Zacchi et al., 2010).

A produção de melanina foi atrasada nos mutantes *clr3Δ* e *hos2Δ*, tanto em meio mínimo quanto em meio *Niger seed* (**Figura 25**). Optou-se por realizar esta análise somente a 30 °C, pois a produção da melanina é dependente da densidade populacional (Albuquerque et al., 2014) e como observado neste estudo, a maioria dos mutantes para HDAC são termo sensíveis. Deste modo, seria possível observar alterações no fenótipo sem o viés do crescimento celular. Duas diferentes condições de crescimento levaram aos mesmos resultados, quanto a produção de melanina, para dois dos mutantes aqui estudados. Liu e colaboradores (2008) haviam observado a redução na produção de melanina para o mutante *hos2Δ*, o que vem ao encontro dos nossos dados para este mutante. No entanto, eles não haviam observado que o defeito na produção de melanina era temporário. Esta transitoriedade do fenótipo de melanina, novamente nos leva a acreditar que a deleção individual dos genes de HDACs não é suficiente para a total perda do fenótipo, visto que outras HDAC podem em determinado momento atuarem juntas e interferirem na análise isolada de um gene. O mesmo comportamento foi observado também para o fenótipo de formação de hifas de acasalamento, que será abordado mais adiante. Embora na **figura 25** o mutante *rpd3Δ* aparentemente apresente redução na produção de melanina, isto não foi observado em outros ensaios, especialmente em meio ágar.

O papel dos genes de HDAC na formação de hifas em diferentes espécies de fungos é pobremente explorado. Em trabalho anterior deste grupo (Brandão et al., 2015) foi o primeiro a explorar o papel dos HDACi sobre este fenótipo em *C. neoformans*. Neste contexto, decidiu-se por avaliar todos os oito mutantes, criados neste estudo, no cruzamento com o idiótipo oposto ao do tipo selvagem e acompanhamos a formação das hifas de acasalamento resultantes deste cruzamento. Os dados mostraram que a deleção do gene *CLR3* levou a uma redução no número de hifas de acasalamento, que foi ainda mais pronunciada no cruzamento bilateral (**Figura 27A e 27B**). A HDAC classe II *CLR3* já havia sido relacionada à regulação do silenciamento do locus *MAT* em *S. pombe* (Karl Ekwall & Tarmo Ruusala, 1994). Mais recentemente que esta HDAC é necessária à inibição do *turnover* de histonas no silenciamento do locus *MAT* (Aygün et

al, 2013), atuando também sobre a montagem de heterocromatina nestas regiões (Lorenz et al, 2014). Elías-Villalobos et al. (2015) também demonstraram que *Clr3* é requerido para normal expressão dos genes de *mating-type* no fungo *Ustilago maydis*. Nossos dados, em conjunto com estes estudos, apontam que *CLR3* também atue na regulação do locus *MAT* em *C. neoformans*. Muito embora ainda não saibamos os mecanismos por trás desta regulação, no entanto, pode-se afirmar que há repressão transcricional, no mutante *clr3*, de vários fatores que favorecem o acasalamento em *C. neoformans* como, por exemplo, os genes *MFa3* (*mating-type pheromone alpha 3*) e *SET a3* (*a-factor pheromone receptor*) (**Tabela 6**). Esta discussão será retomada mais adiante quando abordarmos os dados do RNA-Seq. Sabe-se também, que embora o número de hifas esteja reduzido na linhagem mutante *clr3Δ*, esta é capaz de gerar esporos viáveis, uma vez que os duplos mutantes *clr3Δ/hos2Δ* e *clr3Δ/rpd3Δ* foram resultados do cruzamento entre as linhagens com deleção individual.

Os fenótipos seguintes avaliados neste estudo foram a atividade de urease e de proteases, dois atributos importantes e necessários a virulência de *C. neoformans* (Singh et al., 2013; Cox et al., 2001). Interessantemente, não foram encontradas alterações na atividade de urease para nenhum dos mutantes neste estudo (**Figura 26**), este resultado corrobora dados anteriores já que, durante o tratamento com os HDACi (**Capítulo 1 – Figura 15**) também não houveram diferenças. Sugere-se com base nestes dados que a atividade de urease não seja regulada pelas HDACs da classe I e II, embora não se possa descartar outras vias de regulação como, por exemplo, as HDACs de classe III, que não são afetadas pelo inibidores neste estudo empregados. Embora não conheçamos ainda todos os mecanismos que atuam sobre a expressão da urease, existem dados na literatura que mostram que *C. neoformans* transporta muitos dos seus fatores de virulência dentro de vesículas, e estas são divididas em grupos (Rodrigues et al., 2008). Não é descartada a hipótese de esta enzima ser regulada durante o processo de transporte destas vesículas, este é um ponto que futuramente será analisado. Interessantemente, para o mutante *clr3Δ*, os transcritos de urease estão regulados positivamente (Ver **tabela 6** adiante). Curiosamente, para atividade de protease todos os mutantes apresentaram atividade positiva; no entanto, os mutantes *clr3Δ* e *hos2Δ* tiveram uma redução significativa neste fenótipo (**Figura 28**), sugerindo um papel regulatório destas HDAC na atividade de protease.

Como discutimos anteriormente, o fato de *C. neoformans* possuir em seu genoma oito genes de HDAC classe I e II, levou logo no início a ponderar a possibilidade de redundância de função entre eles. Nossos resultados reforçam esta hipótese visto que para alguns dos fenótipos, deleções individuais não aparentaram nenhuma alteração ou quando presentes, as alterações foram parciais. Decidiu-se neste ponto criar linhagens com dupla deleção de genes, optando por combinar as deleções *clr3Δ/ hos2Δ* e *clr3Δ/rpd3Δ* visto que o mutante *clr3Δ* apresentou deficiência na maioria dos fenótipos aqui estudados. Ainda, *HOS2* e *RPD3* são os genes mais estudados em outras espécies, e já haviam apresentado papel na virulência de *C. neoformans* em estudo anterior (Liu et al., 2008). A dupla deleção *clr3Δ/hos2Δ* aboliu a atividade de protease, que possivelmente pode ser explicado pela combinação justamente das duas deleções nas quais este fenótipo foi claramente reduzido (**figura 28**). Entretanto, este duplo mutante tem sérios problemas de crescimento, como pode ser visto na **figura 28**, o que dificulta uma análise comparativa. Todavia, este ensaio foi repetido por três vezes e as placas foram mantidas por longos períodos após coleta dos dados, e ainda assim não observamos formação do halo periférico correspondente à atividade de protease (dados não mostrados). Os duplos mutantes *clr3Δ/hos2Δ* e *clr3Δ/rpd3Δ* apresentaram também uma drástica redução sobre a expansão da cápsula (**Figura 29**), confirmando que esses genes atuam em conjunto na manifestação de determinados fenótipos. Recentemente um estudo sobre o papel das HDAC mostrou que as proteínas Hos2 e Clr3 atuam na virulência de *U. maydis* regulando genes relacionados ao *mating-type* (Elías-Villalobos et al., 2015). Corroborando nossos dados, Elías-Villalobos et al. (2015) também evidenciaram que a dupla deleção de *Hos2* e *CLR3* resultou em uma maior perda da virulência em *U. maydis*.

Foi investigado ainda se algum dos mutantes poderiam apresentar uma maior resistência aos HDACi, uma vez que a deleção do alvo deveria tornar a célula não responsiva ao tratamento. Conforme mostrado no mapa de calor, apresentando os dados da razão de crescimento entre as linhagens mutantes e a selvagem, foi observado que NaBut fortemente prejudica o crescimento tanto das linhagens mutantes quanto da selvagem em ambas as temperaturas, corroborando os dados no capítulo 1 deste trabalho (**Figura 30**). No entanto, os duplos mutantes foram os que apresentaram um crescimento maior em relação aos respectivos controles sem tratamento. Para TSA, observou-se que apenas o mutante *clr3Δ* apresentou os níveis de crescimento muito

próximos ao valor 1,0 (100%) em relação ao respectivo controle sem tratamento, para ambas as temperaturas (**Figura 30**). O mutante de *rpd3Δ* também apresentou resistência no tratamento com TSA, especialmente na temperatura de 30 °C, bem como a dupla deleção *clr3Δ/rpd3Δ*. Rpd3 é sabidamente sensível ao tratamento com TSA (Carmen et al., 1999) e esperávamos observar uma resistência maior no duplo mutante de *clr3Δ/rpd3Δ* em relação à mutação individual. De fato, a 30 °C foi o que se constatou: um crescimento muito similar ao crescimento do mutante sem tratamento, porém o mesmo não aconteceu na temperatura de 37 °C, para qual a razão do crescimento sofre uma leve diminuição. TSA é um inibidor específico de HDAC classes I e II (Bolden et al., 2006); até o momento, somente a HDAC Hos3 foi descrita como sendo resistente ao TSA (Carmen et al., 1999), logo não era esperado ver alteração durante o tratamento para o mutante de *hos3Δ*, no entanto observou-se que o crescimento entre o tratado e não-tratado foi significativamente diferente neste mutante (**Figura 30**). A maioria dos mutantes teve seu crescimento afetado na presença dos HDACi, *clr3Δ* foi o que apresentou o maior crescimento, o que sugere que Clr3 seja o principal alvo com atividade de desacetilase bloqueada pelo tratamento de *C. neoformans* com TSA (**Figura 30**).

É bem estabelecido que leveduras de *C. neoformans* são capazes de sobreviver e proliferar dentro de macrófagos (Feldmesser et al., 2000). Neste contexto, a avaliação sobre a interação das linhagens mutantes para HDAC com macrófagos fez-se necessária. Nossos resultados mostraram que os mutantes *clr3Δ*, *hda3Δ*, *clr62Δ*, *hos3Δ*, *hos2Δ* e *rpd3Δ* apresentaram número de UFC reduzido em relação ao parental (**Figura 31**). Coincidentemente, esses foram os mesmos mutantes que apresentaram diminuição na termotolerância (**Figura 23**), com exceção do mutante *hos3Δ*. A deleção do gene *CLR61* levou a um aumento na sobrevivência e proliferação das leveduras recuperadas de macrófagos (**Figura 31**). A deleção do gene *CLR3* ocasionou a maior redução na sobrevivência das células de *C. neoformans* após fagocitose por macrófagos, seguida da deleção do gene *CLR62*. Ambos mutantes tiveram também o menor crescimento em temperaturas acima de 30 °C, o que sugere que os dois fenótipos estejam relacionados. No entanto, não descartamos a influência do estresse nutricional e as inúmeras alterações que requerem que o fungo se adapte dentro do ambiente inóspito que é o macrófago. O mutante *hos3Δ*, apresentou redução significativa no número de UFC, entretanto a diferença foi muito pequena em relação ao tipo selvagem e não acreditamos

que, no contexto geral de infecção, seja realmente representativa, uma vez que no modelo animal se observou o contrário. O ensaio em macrófagos demonstra claramente que os genes de HDAC participam do processo de adaptação, sobrevivência e proliferação em macrófagos, podendo atuar antagonicamente.

Após os estudos dos fenótipos *in vitro*, prosseguiu-se com ensaios *in vivo* usando inicialmente o modelo de infecção de larvas de *G. mellonella*, já bem estabelecido para *C. neoformans* (Mylonakis et al., 2005). Foi avaliada a sobrevivência das lagartas após infecção com as linhagens mutantes que apresentaram uma sobrevida em macrófagos diferentes do tipo selvagem. Foram utilizados, como parâmetros para análise neste modelo de infecção, os mutantes *hos2Δ* e *rpd3Δ*, previamente descritos como hipovirulentos em camundongos (Liu et al., 2008), bem como o mutante *ras1Δ* que, embora seja avirulento em camundongos (Alspaugh et al., 2000), se mostrou hipovirulento em ensaios com *G. mellonella* (Mylonakis et al., 2005). Os dados mostraram que os mutantes *hos2Δ* e *rpd3Δ* foram significativamente menos virulentos que o tipo selvagem, concordando os resultados de Liu e colaboradores (2008) (**Figura 32**). Embora as lagartas infectadas com o mutante *clr62Δ* tenham sobrevivido por mais tempo, esta diferença não foi significativa, e o número de leveduras recuperadas das lagartas no ensaio de UFC também não apresentou diferença. Os mutantes *hos3Δ* e *clr61Δ* não apresentaram diferença significativa na curva de sobrevivência das lagartas, entretanto um número significativamente maior de leveduras foi recuperado nos ensaios de UFC (**Figura 32**). O mutante *ras1Δ* mais uma vez se mostrou hipovirulento em *G. mellonella*, apresentando ainda um menor número de leveduras recuperadas (**Figura 32**).

Dos mutantes que nunca haviam sido testados em *G. mellonella*, *clr3Δ* apresentou significativa redução da virulência neste modelo, assim como um menor número de leveduras recuperadas para ambas as temperaturas de 30 °C e 37 °C em comparação ao tipo selvagem e o mutante reconstituído (**Figura 33**). Esse dado subsidia a hipótese levantada anteriormente de que, embora a termotolerância seja um ponto importante a ser considerado na redução da virulência deste mutante, esta não é o único fator relevante. Os dados *in vitro* e *in vivo* sugerem que a HDAC Clr3 seja a principal responsável por controlar diferentes atributos de virulência em *C. neoformans* relacionados à sua patogenicidade. Assim, seguiu-se esse estudo focando no mutante

*clr3Δ*. O gene *CLR3*, até a realização deste trabalho, não havia sido estudado ou relacionado a nenhum mecanismo de virulência em *C. neoformans*.

A etapa seguinte deste estudo foi avaliar a patogenicidade do mutante *clr3Δ* em modelo de infecção usando camundongos. Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 para esta análise e o progresso da infecção foi acompanhado ao longo de 40 dias. Nos dias 7 e 14 após infecção, cinco camundongos representantes de cada grupo: *clr3Δ*, WT (selvagem) e *clr3+CLR3* (mutante reconstituído) foram sacrificados e tiveram o pulmão e cérebro extraídos para análises de UFC e histopatológica. Nas análises do sétimo dia, cometemos um erro durante a infecção dos animais que foram separados para UFC e histopatológica. Ao invés de serem infectados com a linhagem *clr3+CLR3*, esses foram infectados inadvertidamente com a linhagem mutante *clr3Δ* e tiveram de ser eliminados da análise, que seguiu apenas com os grupos WT e *clr3Δ*. No sétimo dia, a análise histopatológica mostra um forte infiltrado de células do sistema imune no pulmão dos camundongos infectados com a linhagem selvagem e mutante, bem como a presença de células de *C. neoformans* gigantes por todo o tecido (**Figura 34**). O número de leveduras recuperadas do pulmão dos camundongos infectados com a linhagem selvagem foi muito maior do que os infectados com o mutante (**Figura 34**). Não foram encontradas leveduras no cérebro nos animais neste período da infecção, isto explica a ausência do gráfico de dados para cérebro. No 14º dia de infecção. Um intenso processo infeccioso foi detectado nos pulmões de animais infectados com as linhagens selvagem e mutante reconstituído, apresentando infiltrado de células de defesa bastante denso e inúmeras leveduras gigantes encapsuladas, tomando todo o tecido pulmonar. Nos pulmões dos animais infectados com o mutante *clr3Δ*, o infiltrado de células imunes e o número de células de *C. neoformans* foi bastante reduzido em comparação aos camundongos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 35**). Os resultados de UFC neste período novamente mostraram um número significativamente menor de leveduras viáveis recuperadas do pulmão dos animais infectados com o mutante *clr3Δ* em relação aos infectados com a linhagem selvagem e com o mutante reconstituído, além de uma total ausência de células do mutante no cérebro dos animais (**Figura 35**). Nossos resultados indubitavelmente mostraram que, na ausência da HDAC Clr3, *C. neoformans* se torna altamente hipovirulento, apresentando dificuldade de estabelecer uma infecção letal nos camundongos quando comparado ao tipo selvagem e ao mutante reconstituído (**Figura**

36). Não foi observado um *clearance* total de células do mutante, visto que, embora em escala bem menor, este foi capaz de causar um processo infeccioso. Ao final do experimento, aos 40 dias de infecção, os animais sobreviventes foram sacrificados e analisados; constatou-se um processo infeccioso bem estabelecido, com lesões aparentes no tecido pulmonar (dados não mostrados).

O ciclo celular do mutante *clr3Δ* de *C. neoformans* foi investigado. Foi questionado se o ciclo celular estaria de fato alterado com base em nossos dados mostrando um retardo no crescimento em temperaturas acima de 30 °C e ao atraso na produção de melanina, que é sabidamente influenciada pela densidade celular em *C. neoformans* (Eisenman, et al., 2011; Albuquerque et al., 2015). Foi encontrado um aumento da população de células em G2/M após 24 h de crescimento em meio mínimo a 37 °C (**Figura 37**). Do mesmo modo, foi encontrado um aumento da população de células em G2/M quando da presença de 10 mM de NaBut (Capítulo 1 – **Figura 18**). Clr3 também está envolvida no ciclo celular de *S. pombe*, por meio de uma conexão entre dinâmica de microtúbulos e regulação epigenética da cromatina em regiões centroméricas (George & Walworth, 2015). Juntos estes dados reforçam a ideia de que HDACs participam na regulação do ciclo celular em *C. neoformans* e mais ainda, o tratamento com NaBut (**Figura 18**) reproduziu uma exata fenocópia no mutante *clr3Δ* (**Figura 37**), indicando que esta HDAC pode ser de fato a principal afetada por esse inibidor.

Por Clr3 se tratar de uma HDAC, e estas geralmente possuem um amplo espectro de atuação no genoma das células, e também pelo fato desta HDAC especificamente, ter se mostrado essencial para a correta expressão de fenótipos variados e mais ainda à virulência de *C. neoformans*, optou-se pela técnica de sequenciamento do RNA para avaliar o perfil global de expressão gênica na ausência desta proteína em comparação ao parental selvagem. Acreditamos que com esses dados, poderíamos em grande parte elucidar aos possíveis alvos diretos ou indiretos de Clr3. Decidiu-se realizar esta análise em meio mínimo, um meio quimicamente definido e pobre em nutrientes, que desde o início de nosso estudo foi usado para a indução de cápsula e melanina. Os dados de PCR em tempo Real para a expressão das HDAC (**Figura 22**) também foram obtidos neste meio. As análises geraram um total de 4.744 genes regulados diferencialmente com valor de *p* significativo entre o mutante *clr3Δ* e seu parental selvagem.

Interessantemente, praticamente a mesma proporção de genes *up* (2.356) e *down* (2.388) regulados foi verificado, o mesmo foi observado no trabalho de Lorenz e colaboradores (2014) com o mutante de *clr3Δ* em *S. pombe*. No entanto, a vasta maioria destes genes apresentou um valor de *fold change* ( $\text{Log}_2$ ) muito baixo, que muito provavelmente não tem significativo impacto no processo biológico estudado. Decidiu-se então analisar mais cuidadosamente genes que se encaixavam em três categorias. Primeiramente buscou-se um panorama de genes relacionados à virulência e usamos o site do *FungiDB* para predizermos as funções destes (**Tabela 6**). Em seguida, fizemos um enriquecimento com base nos genes com *fold change*  $\leq -1$  (**Tabela 7**) e *fold change*  $\geq 1$  (**Tabela 8**); com o auxílio do *FungiDB* foi possível identificar os genes e suas funções, além da localização dos mesmos no genoma de *C. neoformans*. Os dados do RNA-Seq corroboram os resultados observados para os fenótipos do mutante *clr3Δ*, com a grande maioria dos genes responsáveis pela formação de cápsula, melanina, acasalamento, anti-fagocitose, e até mesmo as demais HDAC estudadas neste trabalho sendo *down* regulados (**Tabela 6**). Concordando com o fenótipo de urease que não mostrou alteração, os níveis de transcritos para os genes *URE4* e *URE7*, no mutante *clr3Δ* foram sutilmente *up* regulados. Vários destes genes são descritos no banco *FungiDB* como hipotéticos. Acreditamos que uma análise de *gene ontology* poderá revelar mais sobre as vias que estão sendo alvo da regulação por essa HDAC, e este é um passo a ser avaliado em breve. O que os dados mostram é que há um efeito global resultante de uma ausência desta HDAC, não somente em alguns locos ou regiões pontuais, mas um amplo efeito no genoma como um todo. É possível que outras regiões ou mesmo promotores sejam mais afetados que outros, e pretende-se avaliar esta hipótese, por meio de análises de *chip-seq*. Como proposto para *S. pombe*, Clr3 atua em complexo com outras proteínas em regiões de heterocromatina, reprimindo a reposição das histonas, especialmente em regiões do locus de acasalamento (Aygün et al., 2013). Lorenz e colaboradores também discutiram o papel de Clr3 em complexos repressores, que atuam na manutenção da heterocromatina, e no silenciamento de retrotransposons, RNA não codificantes e de genes de resposta ao estresse. Deste modo, os dados destes dois grupos sobre um papel mais global de regulação para Clr3 corroboram nossos dados de RNA-seq, que apontam um amplo espectro de atuação para essa HDAC.



## 10. CONCLUSÃO

---

Os resultados desta pesquisa indubitavelmente apontam a cromatina como um importante ponto regulatório sobre a plasticidade fenotípica do patógeno *C. neoformans*, sendo as HDAC importantes para correta expressão dos principais traços associados à virulência.

No primeiro capítulo desse trabalho, foi estudado o efeito dos inibidores de histona desacetilases (HDACi) Tricostatina A (TSA) e butirato de sódio (NaBut), sobre os principais fenótipos de virulência de *C. neoformans*. Os dados claramente demonstraram que ambos HDACi foram capazes de afetar os principais atributos de virulência do fungo, como a capacidade de crescimento a 37 °C, a expansão da cápsula polissacarídica, a produção de melanina, a atividade de fosfolipases e a formação de hifas de acasalamento. NaBut aumentou a população de células de *C. neoformans* na fase G2/M do ciclo celular. Tais dados apontam para a potencialidade de utilização dos HDACi como drogas adjuvantes no tratamento da criptococose e de outras micoses sistêmicas.

No segundo capítulo, foram avaliados os efeitos da deleção de oito genes (*SAP128*, *HD3*, *CLR3*, *CLR61*, *CLR62*, *HOS2*, *HOS3* e *RPD3*), correspondentes às famílias de HDAC Classe I e Classe II, sobre a virulência de *C. neoformans*. Seis desses genes foram estudados pela primeira vez nessa espécie. Os dados indicam claramente que os genes de HDAC participam da regulação dos principais fenótipos de virulência em *C. neoformans*:

- a termotolerância foi bastante comprometida nos mutantes *clr3Δ*, *hd3Δ*, *clr62Δ*, *hos2Δ* e *rpd3Δ*, sobretudo na temperatura de 39 °C.

- detectou-se uma leve redução no crescimento dos mutantes *clr3Δ*, *clr62Δ* e *rpd3Δ* na presença dos agentes estressores SDS, *calcofluor-white* e *Congo-red*.

- os mutantes *clr3Δ*, *clr62Δ* e *hos3Δ* apresentaram significativa redução na formação de cápsula; a combinação de deleções *clr3Δ/hos2Δ* e *clr3Δ/rpd3Δ* também provocou efeito na redução da cápsula, indicando que a deleção de *CLR3* tem efeito dominante sobre este fenótipo.

- a produção de melanina foi reduzida transitoriamente (primeiras 24 h de cultivo) nos mutantes *clr3Δ* e *hos2Δ*.

- a deleção dos genes *CLR3* e *HOS2* levou a uma significativa redução na atividade de proteases secretadas.

- todos os mutantes tiveram o crescimento diminuído pelo tratamento com NaBut, em relação aos controles sem tratamento. O mutante *clr3Δ* apresentou resistência ao tratamento com TSA.

- em experimento de infecção de macrófagos *ex-vivo*, os mutantes *clr3Δ*, *hd3Δ*, *clr62Δ*, *hos3Δ*, *hos2Δ* e *rpd3Δ* apresentaram, após recuperação de dentro das células fagocitárias, UFC em menor número em comparação ao parental selvagem.

- a deleção do gene *CLR3* levou a um aumento na população de células na fase G2/M do ciclo celular.

Nos experimentos de infecção *in vivo*, os mutantes *hos2Δ* e *rpd3Δ* mostraram-se hipovirulentos no modelo de infecção de larvas de *G. mellonella*. O gene *CLR3* mostrou-se essencial para a virulência de *C. neoformans* em *G. mellonella* e no modelo de infecção intranasal de camundongos.

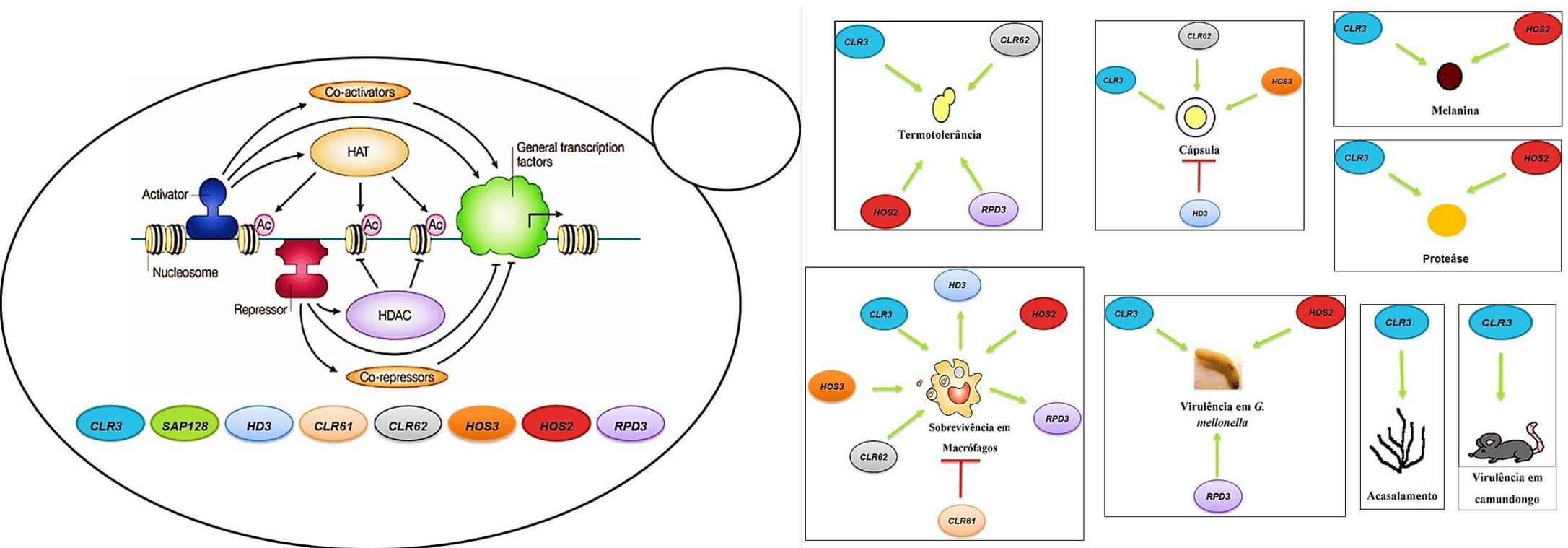
Como o mutante *clr3Δ* apresentou defeitos na grande maioria dos fenótipos avaliados, esse foi escolhido para análise transcriptômica por RNA-seq em meio mínimo quimicamente definido e pobre em nutrientes, condição compatível com a

formação da cápsula e a produção de melanina. A maioria dos genes envolvidos na formação de cápsula, melanização, acasalamento, resposta anti-fagocitária, assim como os genes das demais HDAC, mostraram-se reprimidos nessa análise.

Nossos dados são inéditos no tocante ao papel das HDACs na virulência e adaptação do patógeno oportunista *C. neoformans*, apontando claramente Clr3 como a principal HDAC relacionada a patogenicidade desse fungo. Contribuímos, dessa forma, com os estudos sobre a regulação da virulência em *C. neoformans*, o patógeno com maior número de casos de morbidade e mortalidade em paciente acometidos pelo HIV, que na atualidade vêm sendo tratados com o uso de HDACi como adjuvantes. Acreditamos que este trabalho, ao correlacionar estudos de regulação epigenética e virulência, colabore na compreensão de processos biológicos e na proposição de novas abordagens terapêuticas para infecções fúngicas.



**Figura 38: Esquema representando o modelo proposto para o papel das HDAC sobre os fenótipos de virulência de *C. neoformans*. A seta em verde indica indução do fenótipo, enquanto a linha em vermelho representa inibição.**



**Tabela 9: Correlação dos fenótipos testados na presença dos HDACi e o mutante *clr3Δ*.** As setas: redução no fenótipo; traço: sem alteração no fenótipo; (-/?): sem alteração na concentração testada, mas não se exclui possibilidade de efeito em maiores concentrações.

**Fenótipos**

	Termotolerancia	Cápsula	Melanina	Protease	Ureáse	Acasalamento	Ciclo celular
<b>NaBut</b>	↓	↓	↓	↓	—	↓	↓
<b>TSA</b>	↓	↓	↓	↓	—	↓	-/?
<b><i>clr3Δ</i></b>	↓	↓	↓	↓	—	↓	↓

## 11. PERSPECTIVAS

---

Durante o desenvolvimento deste trabalho, dados apontando o uso de HDACi no tratamento de HIV começaram a ganhar destaque na literatura (Ay et al., 2013; Bridle et al., 2013; Wei et al., 2014; Shirakawa et al., 2013; Barton et al., 2014; West et al., 2014). Tais dados vieram de encontro ao nosso trabalho, visto que claramente demonstramos quão importantes as HDAC são para a virulência do patógeno oportunista *C. neoformans*. Nosso grupo está no momento interessado em avaliar, *in vivo*, o efeito dos HDACi, incluindo os que estão sendo usados no tratamento da infecção por HIV, em combinação com antifúngicos usados para o tratamento de criptococose. Estamos também interessados em avaliar o papel da cromatina na virulência de outros fungos patogênicos, ainda muito pouco estudados, como: *Fonsecaea pedrosoi* e *Paracoccidioides brasiliensis*, patógenos estes de altos índices de morbidade no Brasil.

# Anexo I

## Artigo Publicado

This article was downloaded by: [Duke University Medical Center]  
On: 12 August 2015, At: 10:12  
Publisher: Taylor & Francis  
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: 5 Howick Place,  
London, SW1P 1WG

**Virulence**  
Taylor & Francis Group



[Click for updates](#)

### Virulence

Publication details, including instructions for authors and subscription information:  
<http://www.tandfonline.com/loi/kvir20>

### Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes

Fabiana AS Brandão<sup>a</sup>, Lorena S Derengowski<sup>a</sup>, Patrícia Albuquerque<sup>bc</sup>, André M Nicola<sup>cd</sup>, Ildinete Silva-Pereira<sup>a</sup> & Marcio J Poças-Fonseca<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Molecular Biology; Department of Cell Biology; Institute of Biological Sciences; University of Brasília; Brasília, DF, Brazil

<sup>b</sup> Faculty of Ceilandia; University of Brasília; Brasília, DF, Brazil

<sup>c</sup> Graduate Program in Tropical Medicine; University of Brasília; Brasília, DF, Brazil

<sup>d</sup> Graduate Program in Genomic Sciences and Biotechnology; Catholic University of Brasília; Brasília, DF, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Gene Regulation and Mutagenesis; Department of Genetics and Morphology; Institute of Biological Sciences; University of Brasília; Brasília, DF, Brazil

Accepted author version posted online: 23 Jun 2015. Published online: 23 Jun 2015.

To cite this article: Fabiana AS Brandão, Lorena S Derengowski, Patrícia Albuquerque, André M Nicola, Ildinete Silva-Pereira & Marcio J Poças-Fonseca (2015): Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes, *Virulence*, DOI: [10.1080/21505594.2015.1038014](https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1038014)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1038014>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

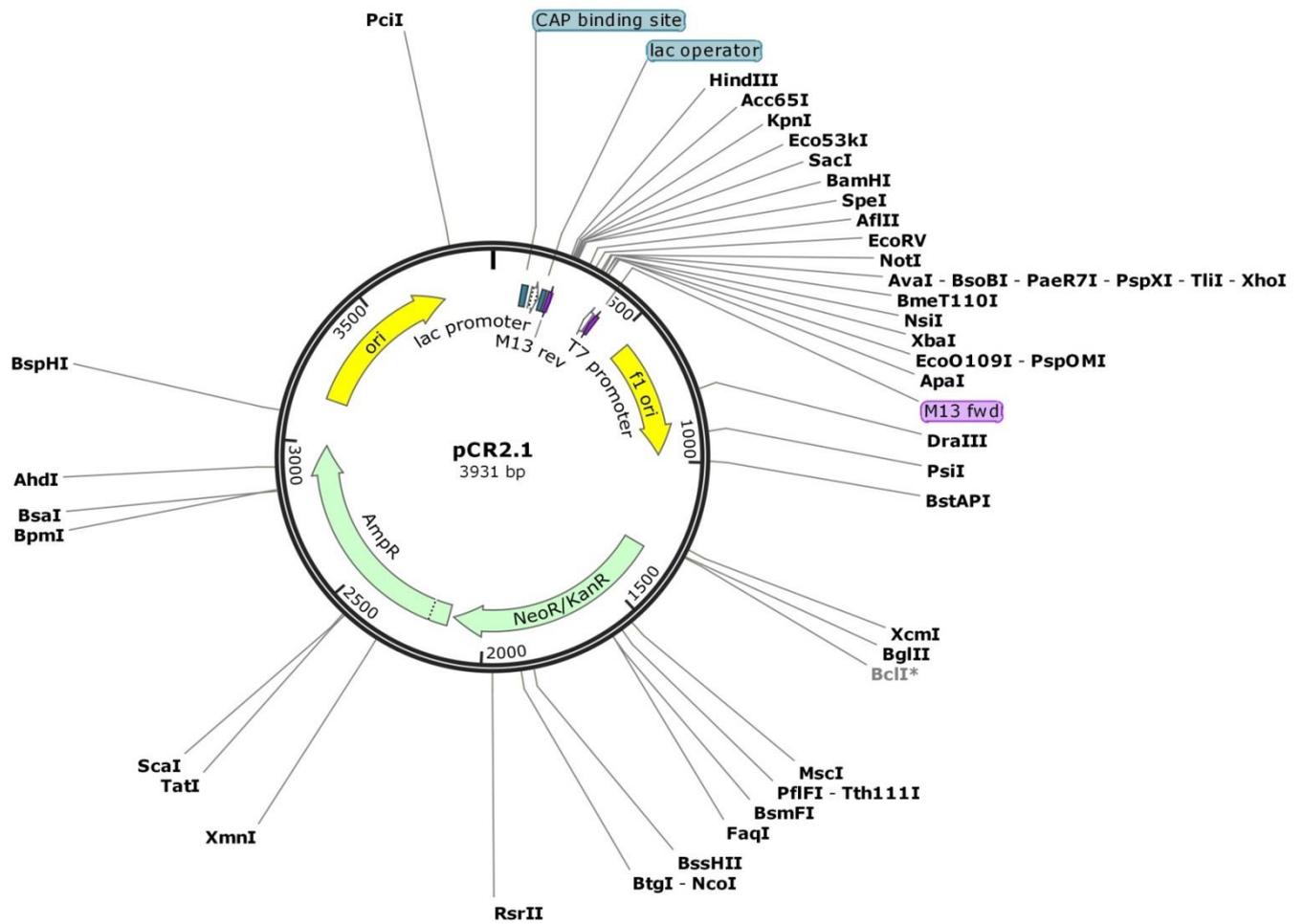
Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

## ANEXO II

### Plasmídeo TA cloning pCR2.1

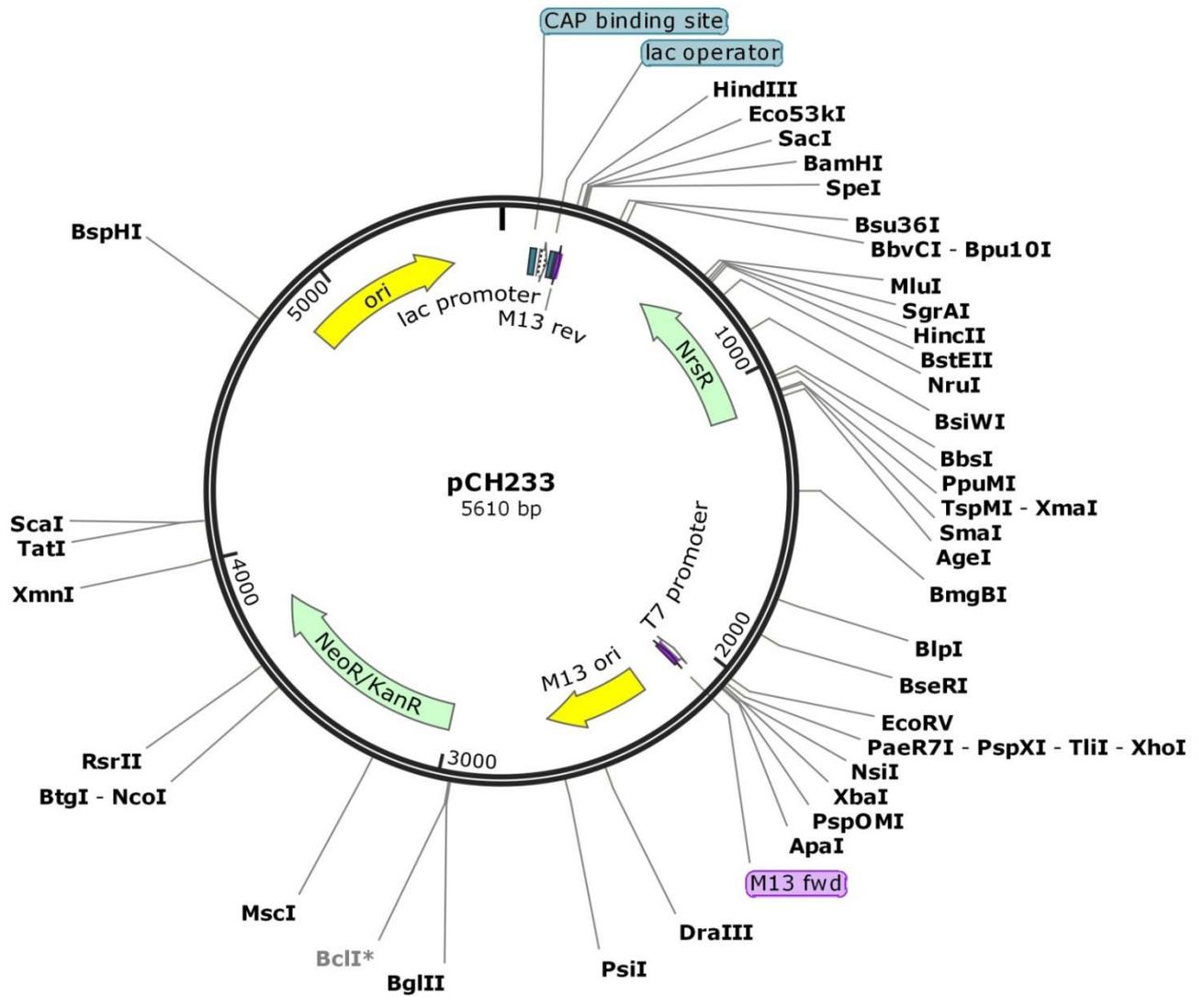
Created with SnapGene®



# ANEXO III

## Plasmídeo pCH233

Created with SnapGene®





## 12. REFERÊNCIAS

---

Albuquerque, P., Nicola, A.M., Nieves, E., Paes, H.C., Williamson, P.R., Silva-Pereira, I., and Casadevall, A. (2014). Quorum Sensing-Mediated, Cell Density-Dependent Regulation of Growth and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* 5, e00986–13 – e00986–13.

Alspaugh, J.A. (2015). Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology* 78, 55–58.

Alspaugh, J.A., Cavallo, L.M., Perfect, J.R., and Heitman, J. (2000). RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 36, 352–365.

Alspaugh, J.A., Perfect, J.R., and Heitman, J. (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein  $\alpha$  subunit GPA1 and cAMP. *Genes & Development* 11, 3206–3217.

Ay, E., Banati, F., Mezei, M., Bakos, A., Niller, H.H., Buzás, K., and Minarovits, J. (2013). Epigenetics of HIV infection: promising research areas and implications for therapy. *AIDS Rev* 15, 181–188.

Aygün, O., Mehta, S., and Grewal, S.I.S. (2013). HDAC-mediated suppression of histone turnover promotes epigenetic stability of heterochromatin. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 547–554.

Bahn, Y.-S., and Jung, K.-W. (2013). Stress Signaling Pathways for the Pathogenicity of *Cryptococcus*. *Eukaryotic Cell* 12, 1564–1577.

Barchiesi, F., Cogliati, M., Esposto, M.C., Spreghini, E., Schimizzi, A.M., Wickes, B.L., Scalise, G., and Viviani, M.A. (2005). Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. *J. Infect.* 51, 10–16.

Barton, K.M., Archin, N.M., Keedy, K.S., Espeseth, A.S., Zhang, Y., Gale, J., Wagner, F.F., Holson, E.B., and Margolis, D.M. (2014). Selective HDAC Inhibition for the Disruption of Latent HIV-1 Infection. *PLoS ONE* 9, e102684.

Bennett J E, Kwon-Chung K J, Theodore T S. (1978). Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia*.16, 167–174.

Bjerling, P., Silverstein, R.A., Thon, G., Caudy, A., Grewal, S., and Ekwall, K. (2002). Functional Divergence between Histone Deacetylases in Fission Yeast by Distinct Cellular Localization and In Vivo Specificity. *Molecular and Cellular Biology* 22, 2170–2181.

Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 769–784.

- Bose, I., Reese, A.J., Ory, J.J., Janbon, G., and Doering, T.L. (2003). A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2, 655–663.
- Bradner, J.E., West, N., Grachan, M.L., Greenberg, E.F., Haggarty, S.J., Warnow, T., and Mazitschek, R. (2010). Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nature Chemical Biology* 6, 238–243.
- Brandão, F.A., Derengowski, L.S., Albuquerque, P., Nicola, A.M., Silva-Pereira, I., and Poças-Fonseca, M.J. (2015). Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. *Virulence* 6, 618–630.
- Bridle, B.W., Chen, L., Lemay, C.G., Diallo, J.-S., Pol, J., Nguyen, A., Capretta, A., He, R., Bramson, J.L., Bell, J.C., et al. (2013). HDAC Inhibition Suppresses Primary Immune Responses, Enhances Secondary Immune Responses, and Abrogates Autoimmunity During Tumor Immunotherapy. *Molecular Therapy* 21, 887–894.
- Brown, J.C.S., Nelson, J., VanderSluis, B., Deshpande, R., Butts, A., Kagan, S., Polacheck, I., Krysan, D.J., Myers, C.L., and Madhani, H.D. (2014). Unraveling the Biology of a Fungal Meningitis Pathogen Using Chemical Genetics. *Cell* 159, 1168–1187.
- Buchanan KL, Murphy JW. (1998). What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? *Emerg Infect Dis.*, Jan-Mar; 4 (1):71-83.
- Burt, A. (2000). Perspective: Sex, recombination, and the efficacy of selection—was Weismann right? *Evolution Int. J. Org. Evolution* 54, 337–351
- Butlin, R. (2002). Opinion—evolution of sex: The costs and benefits of sex: New insights from old asexual lineages. *Nat. Rev. Genet.* 3, 311–317.
- Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., FitzGerald, P.C., and Grewal, S.I.S. (2005). Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat. Genet.* 37, 809–819.
- Carmen, A.A., Griffin, P.R., Calaycay, J.R., Rundlett, S.E., Suka, Y., and Grunstein, M. (1999). Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12356–12361.
- Chang YC, Wickes BL, Miller GF, Penoyer LA, KwonChung KJ. (2000). *Cryptococcus neoformans* STE12a regulates virulence but is not essential for mating. *J Exp Med*; 191(5):871-82; PMID:10704467; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.191.5.871>
- Chiu, J.F., Wang, S., Fujitani, H., and Hnilica, L.S. (1975). DNA-binding chromosomal non-histone proteins. Isolation, characterization, and tissue specificity. *Biochemistry* 14, 4552–4558.
- Choi, J., Jung, W.H., and Kronstad, J.W. (2015). The cAMP/protein kinase A signaling pathway in pathogenic basidiomycete fungi: Connections with iron homeostasis. *Journal of Microbiology* 53, 579–587.

- Cogliati, M. (2013). Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica* 2013, 1–23.
- Congiu, M., Slavin, J.L., and Desmond, P.V. (2011). Expression of common housekeeping genes is affected by disease in human hepatitis C virus-infected liver: Housekeeping genes in HCV-infected liver. *Liver International* 31, 386–390.
- Cox, G.M., McDade, H.C., Chen, S.C., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., Sorrell, T.C., Leidich, S.D., Casadevall, A., Ghannoum, M.A., et al. (2001). Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 39, 166–175.
- Davie, J.R. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *The Journal of Nutrition* 133, 2485S – 2493S.
- Dokmanovic, M., Clarke, C., and Marks, P.A. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives. *Molecular Cancer Research* 5, 981–989.
- Duan, H., Heckman, C.A., and Boxer, L.M. (2005). Histone Deacetylase Inhibitors Down-Regulate bcl-2 Expression and Induce Apoptosis in t(14;18) Lymphomas. *Molecular and Cellular Biology* 25, 1608–1619.
- Eisenman, H.C., Chow, S.-K., Tsé, K.K., McClelland, E., and Casadevall, A. (2011). The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. *Virulence* 2, 329–336.
- Eisenman, H.C., Duong, R., Chan, H., Tsue, R., and McClelland, E.E. (2014). Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. *Virulence* 5, 611–618.
- Ekwall, K. (2005). Genome-wide analysis of HDAC function. *Trends in Genetics* 21, 608–615.
- Elías-Villalobos, A., Fernández-Álvarez, A., Moreno-Sánchez, I., Helmlinger, D., and Ibeas, J.I. (2015). The Hos2 Histone Deacetylase Controls *Ustilago maydis* Virulence through Direct Regulation of Mating-Type Genes. *PLOS Pathog* 11, e1005134.
- Evans, R.J., Li, Z., Hughes, W.S., Djordjevic, J.T., Nielsen, K., and May, R.C. (2015). Cryptococcal Phospholipase B1 Is Required for Intracellular Proliferation and Control of Titan Cell Morphology during Macrophage Infection. *Infection and Immunity* 83, 1296–1304.
- Fan, W., Kraus, P.R., Boily, M.-J., and Heitman, J. (2005). *Cryptococcus neoformans* Gene Expression during Murine Macrophage Infection. *Eukaryotic Cell* 4, 1420–1433.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P. & Casadevall, A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Immun.* 68, 4225–4237.

Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. (1999): Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 401:188-193.

Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., et al. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295–1300.

Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 172–183.

Franzot, SP, Salkin, IF, Casadevall, A. (1999). *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol.* Mar;37(3):838-40.

Fraser, J.A., Subaran, R.L., Nichols, C.B., and Heitman, J. (2003). Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryotic Cell* 2, 1036–1045.

Gal-Yam, E.N., Saito, Y., Egger, G., and Jones, P.A. (2008). Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu. Rev. Med.* 59, 267–280.

Garcia-Rodas, R., Cordero, R.J.B., Trevijano-Contador, N., Janbon, G., Moyrand, F., Casadevall, A., and Zaragoza, O. (2014). Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* Is Coordinated with Cell Cycle Progression. *mBio* 5, e00945–14 – e00945–14.

George, A.A., and Walworth, N.C. (2015). Escape from Mitotic Arrest: An Unexpected Connection Between Microtubule Dynamics and Epigenetic Regulation of Centromeric Chromatin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 201, 1467–1478.

Geurts, B., and Van Tiel, B. This is an open-access article distributed under the terms of a Creative Commons Non.

Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635–638.

Granger, D.L., Perfect, J.R., Durack, D.T. (1985). Virulence of *Cryptococcus neoformans*: regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J. Clin. Invest.* 76, 508–516.

Gregoretto, I., Lee, Y.-M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Biology* 338, 17–31.

Grijpstra, J., Gerwig, G.J., Wosten, H., Kamerling, J.P., and de Cock, H. (2009). Production of Extracellular Polysaccharides by CAP Mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 8, 1165–1173..

Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., Falk, R., Parnmen, S., Lumbsch, H.T., and Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in

the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 78, 16–48.

Haynes, B.C., Skowrya, M.L., Spencer, S.J., Gish, S.R., Williams, M., Held, E.P., Brent, M.R., and Doering, T.L. (2011). Toward an Integrated Model of Capsule Regulation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens* 7, e1002411.

Hnisz, D., Majer, O., Frohner, I.E., Komnenovic, V., and Kuchler, K. (2010). The Set3/Hos2 Histone Deacetylase Complex Attenuates cAMP/PKA Signaling to Regulate Morphogenesis and Virulence of *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 6, e1000889.

Hrabeta, J., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., and Eckschlager, T. (2014). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 158, 161–169.

Janbon, G., Ormerod, K.L., Paulet, D., Byrnes, E.J., Yadav, V., Chatterjee, G., Mullapudi, N., Hon, C.-C., Billmyre, R.B., Brunel, F., et al. (2014). Analysis of the Genome and Transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* Reveals Complex RNA Expression and Microevolution Leading to Virulence Attenuation. *PLoS Genetics* 10, e1004261.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the Histone Code. *Science* 293, 1074–1080.

Jones, P.A., and Takai, D. (2001). The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science* 293, 1068–1070.

Jung, K.-W., Yang, D.-H., Maeng, S., Lee, K.-T., So, Y.-S., Hong, J., Choi, J., Byun, H.-J., Kim, H., Bang, S., et al. (2015a). Systematic functional profiling of transcription factor networks in *Cryptococcus neoformans*. *Nature Communications* 6, 6757.

Jung, K.-W., Yang, D.-H., Maeng, S., Lee, K.-T., So, Y.-S., Hong, J., Choi, J., Byun, H.-J., Kim, H., Bang, S., et al. (2015b). Systematic functional profiling of transcription factor networks in *Cryptococcus neoformans*. *Nature Communications* 6, 6757.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14, R36.

Kim, H., Jung, K.-W., Maeng, S., Chen, Y.-L., Shin, J., Shim, J.E., Hwang, S., Janbon, G., Kim, T., Heitman, J., et al. (2015). Network-assisted genetic dissection of pathogenicity and drug resistance in the opportunistic human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Scientific Reports* 5, 8767.

Kim, M.S., Kim, S.-Y., Jung, K.-W., and Bahn, Y.-S. (2012). Targeted Gene Disruption in *Cryptococcus neoformans* Using Double-Joint PCR with Split Dominant Selectable Markers. In *Host-Fungus Interactions*, A.C. Brand, and D.M. MacCallum, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 67–84.

- Klar AJ, Srikantha T, Soll DR (2001) A histone deacetylation inhibitor and mutant promote colony-type switching of the human pathogen *Candida albicans*. *Genetics* 158: 919–924;
- Kong, Q., Wu, M., Wang, Z., Zhang, X., Li, L., Liu, X., Mu, Y., and Liu, Z. (2011). Effect of trichostatin A and 5-Aza-2'-deoxycytidine on transgene reactivation and epigenetic modification in transgenic pig fibroblast cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 355, 157–165.
- Kronstad, J.W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C.A., Griffiths, E.J., Geddes, J.M.H., Hu, G., Jung, W.H., Kretschmer, M., et al. (2011a). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews Microbiology* 9, 193–203.
- Kronstad, J.W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D'Souza, C.A., Griffiths, E.J., Geddes, J.M.H., Hu, G., Jung, W.H., Kretschmer, M., et al. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews Microbiology* 9, 193–203.
- Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck, and T. J. Popkin (1982). Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J. Bacteriol.* 150:1414-1421.
- Kwon-Chung, K.J. (1975). A new genus, *filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 67, 1197–1200.
- Kwon-Chung, K.J. (1976). A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* 68, 943–946.
- Lamoth, F., Juvvadi, P.R., Soderblom, E.J., Moseley, M.A., Asfaw, Y.G., and Steinbach, W.J. (2014). Identification of a Key Lysine Residue in Heat Shock Protein 90 Required for Azole and Echinocandin Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 1889–1896.
- Lauffer, B.E.L., Mintzer, R., Fong, R., Mukund, S., Tam, C., Zilberleyb, I., Flicke, B., Ritscher, A., Fedorowicz, G., Vallero, R., et al. (2013). Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Kinetic Rate Constants Correlate with Cellular Histone Acetylation but Not Transcription and Cell Viability. *Journal of Biological Chemistry* 288, 26926–26943.
- Leder, A., Orkin, S., and Leder, P. (1975). Differentiation of erythroleukemic cells in the presence of inhibitors of DNA synthesis. *Science* 190, 893–894.
- Lengeler, K.B., Cox, G.M., and Heitman, J. (2001). Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect. Immun.* 69, 115–122.
- Li, X., Cai, Q., Mei, H., Zhou, X., Shen, Y., Li, D., and Liu, W. (2015). The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1993–2003.

- Licciardi, P., Ververis, Hiong, and Karagiannis (2013). Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics: Targets and Therapy* 47.
- Lin, X., and Heitman, J. (2006). The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annual Review of Microbiology* 60, 69–105.
- Lin, X., Litvintseva, A.P., Nielsen, K., Patel, S., Floyd, A., Mitchell, T.G., and Heitman, J. (2007).  $\alpha$ AD $\alpha$  Hybrids of *Cryptococcus neoformans*: Evidence of Same-Sex Mating in Nature and Hybrid Fitness. *PLoS Genetics* 3, e186.
- Liu, O.W., Chun, C.D., Chow, E.D., Chen, C., Madhani, H.D., and Noble, S.M. (2008). Systematic Genetic Analysis of Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell* 135, 174–188.
- Liu, T.-B., Wang, Y., Stukes, S., Chen, Q., Casadevall, A., and Xue, C. (2011). The F-Box Protein Fbp1 Regulates Sexual Reproduction and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 10, 791–802.
- Loftus, B.J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., Vamathevan, J., Miranda, M., Anderson, I.J., Fraser, J.A., et al. (2005). The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307, 1321–1324.
- Lohse, M.B., and Johnson, A.D. (2010). Temporal anatomy of an epigenetic switch in cell programming: the white-opaque transition of *C. albicans*: Temporal anatomy of an epigenetic switch in *C. albicans*. *Molecular Microbiology* 78, 331–343.
- Lombardi, P.M., Cole, K.E., Dowling, D.P., and Christianson, D.W. (2011). Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 21, 735–743.
- Lorenz, D.R., Meyer, L.F., Grady, P.J.R., Meyer, M.M., and Cam, H.P. (2014). Heterochromatin assembly and transcriptome repression by Set1 in coordination with a class II histone deacetylase. *eLife* 3.
- Mahmoudabadi, A.Z., Zarrin, M., and Miry, S. (2010). Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. *Jundishapur Journal of Microbiology* 3, 169–173.
- Maier, E.J., Haynes, B.C., Gish, S.R., Wang, Z.A., Skowyra, M.L., Marulli, A.L., Doering, T.L., and Brent, M.R. (2015). Model-driven mapping of transcriptional networks reveals the circuitry and dynamics of virulence regulation. *Genome Research* 25, 690–700.
- Marks, P.A., and Breslow, R. (2007). Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.* 25, 84–90.
- Millar, C.B., and Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 657–666.

- Minucci, S., and Pelicci, P.G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 38–51.
- Minucci, S., and Pelicci, P.G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 38–51.
- Morrow, C.A., Lee, I.R., Chow, E.W.L., Ormerod, K.L., Goldinger, A., Byrnes, E.J., Nielsen, K., Heitman, J., Schirra, H.J., and Fraser, J.A. (2012). A Unique Chromosomal Rearrangement in the *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* Type Strain Enhances Key Phenotypes Associated with Virulence. *mBio* 3, e00310–e00311 – e00310–e00311.
- Murashige T, Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*. Blackwell Publishing Ltd; 15(3):473–97
- Murphy, J.W., Hidore, M.R., and Wong, S.C. (1993). Direct interactions of human lymphocytes with the yeast-like organism, *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Investigation* 91, 1553.
- Nguyen, L.N., Lopes, L.C.L., Cordero, R.J.B., and Nosanchuk, J.D. (2011). Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 2573–2580.
- Nichols, C.B., Ost, K.S., Grogan, D.P., Pianalto, K., Hasan, S., and Alspaugh, J.A. (2015). Impact of Protein Palmitoylation on the Virulence Potential of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 14, 626–635.
- Nielsen, K. (2005). Interaction Between Genetic Background and the Mating-Type Locus in *Cryptococcus neoformans* Virulence Potential. *Genetics* 171, 975–983.
- Nielsen, K., and Heitman, J. (2007). Sex and Virulence of Human Pathogenic Fungi. In *Advances in Genetics*, (Elsevier), pp. 143–173.
- Nielsen, K., Cox, G.M., Litvintseva, A.P., Mylonakis, E., Malliaris, S.D., Benjamin, D.K., Giles, S.S., Mitchell, T.G., Casadevall, A., Perfect, J.R., et al. (2005). *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect. Immun.* 73, 4922–4933.
- Nielsen, K., Cox, G.M., Wang, P., Toffaletti, D.L., Perfect, J.R., and Heitman, J. (2003). Sexual Cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and Virulence of Congenic a and Isolates. *Infection and Immunity* 71, 4831–4841.
- Nishida, H. (2009). Evolutionary Conservation Levels of Subunits of Histone-Modifying Protein Complexes in Fungi. *Comparative and Functional Genomics* 2009, 1–6.
- Nishida, H., Matsumoto, T., Kondo, S., Hamamoto, M., and Yoshikawa, H. (2014). The early diverging ascomycetous budding yeast *Saitoella complicata* has three histone deacetylases belonging to the Clr6, Hos2, and Rpd3 lineages. *The Journal of General and Applied Microbiology* 60, 7–12.

Nosanchuk, J.D., Ovalle, R., Casadevall, A. (2001). Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *J Infect Dis.* Apr 1;183(7):1093-9.

O'Meara, T.R., Hay, C., Price, M.S., Giles, S., and Alspaugh, J.A. (2010). *Cryptococcus neoformans* Histone Acetyltransferase Gcn5 Regulates Fungal Adaptation to the Host. *Eukaryotic Cell* 9, 1193–1202.

O'Meara, T.R., Holmer, S.M., Selvig, K., Dietrich, F., and Alspaugh, J.A. (2013). *Cryptococcus neoformans* Rim101 Is Associated with Cell Wall Remodeling and Evasion of the Host Immune Responses. *mBio* 4, e00522–12 – e00522–12.

Odom, A., Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D.L., Perfect, J., and Heitman, J. (1997) Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 16: 2576±2589.

Ost, K.S., O'Meara, T.R., Huda, N., Esher, S.K., and Alspaugh, J.A. (2015). The *Cryptococcus neoformans* Alkaline Response Pathway: Identification of a Novel Rim Pathway Activator. *PLOS Genetics* 11, e1005159.

Park, B.J., Wannemuehler, K.A., Marston, B.J., Govender, N., Pappas, P.G., and Chiller, T.M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23, 525–530.

Patel, J., Pathak, R.R., and Mujtaba, S. (2011). The biology of lysine acetylation integrates transcriptional programming and metabolism. *Nutrition & Metabolism* 8, 1.

Patel, R.D., Lodge, J.K., and Baker, L.G. (2010). Going green in *Cryptococcus neoformans*: The recycling of a selectable drug marker. *Fungal Genetics and Biology* 47, 191–198.

Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., and Ho, D.D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387, 188–191.

Perfect, J.R., Lang, S.D., and Durack, D.T. (1980). Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am. J. Pathol.* 101, 177–194.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Georgopapadakou, N., Martell, L.A., Besterman, J.M., and Diekema, D.J. (2009). Activity of MGCD290, a Hos2 Histone Deacetylase Inhibitor, in Combination with Azole Antifungals against Opportunistic Fungal Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3797–3804.

Piscasia, A., Grimaldi, V., Iannone, C., Soricelli, A., and Napoli, C. (2015). Innate and adaptive immune response in stroke: Focus on epigenetic regulation. *Journal of Neuroimmunology* 289, 111–120.

Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q.D., Kraus, P.R., Boily, M.-J., Davis, M.J., Giles, S.S., Cox, G.M., Heitman, J., and Alspaugh, J.A. (2005). Transcriptional Network of

Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus neoformans* Cyclic AMP Cascade. *Eukaryotic Cell* 4, 190–201.

Ramos, M.G., Rabelo, F.L.A., Duarte, T., Gazzinelli, R.T., and Alvarez-Leite, J.I. (2002). Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 161–173.

Richon, V.M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R.A., and Marks, P.A. (1998). A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3003–3007.

Robbins, N., Leach, M.D., and Cowen, L.E. (2012). Lysine Deacetylases Hda1 and Rpd3 Regulate Hsp90 Function thereby Governing Fungal Drug Resistance. *Cell Reports* 2, 878–888.

Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., and Casadevall, A. (2008). Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. *Eukaryot Cell* 7, 58–67.

Rosas, AL, Nosanchuk, JD, Feldmesser, M, Cox, GM, McDade, HC, Casadevall, A. (2000). Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infect Immun.* May;68(5):2845-53.

Salas, S. D., J. E. Bennett, K. J. Kwon-Chung, J. R. Perfect, and P. R. Williamson (1996). Effect of the laccase gene, CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Exp. Med.* 184:377-386.

Shareck, J., and Belhumeur, P. (2011). Modulation of Morphogenesis in *Candida albicans* by Various Small Molecules. *Eukaryotic Cell* 10, 1004–1012.

Shirakawa, K., Chavez, L., Hakre, S., Calvanese, V., and Verdin, E. (2013). Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends in Microbiology* 21, 277–285.

Shirakawa, K., Chavez, L., Hakre, S., Calvanese, V., and Verdin, E. (2013). Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends in Microbiology* 21, 277–285.

Smith KT, Workman JL. (2009): Histone deacetylase inhibitors: anticancer compounds. *Int J Biochem Cell Biol*, 41:21-25.

Simonetti, G., Passariello, C., Rotili, D., Mai, A., Garaci, E., and Palamara, A.T. (2007). Histone deacetylase inhibitors may reduce pathogenicity and virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research* 7, 1371–1380.

Singh, A., Panting, R.J., Varma, A., Saijo, T., Waldron, K.J., Jong, A., Ngamskulrungraj, P., Chang, Y.C., Rutherford, J.C., and Kwon-Chung, K.J. (2013). Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* 4, e00220–13 – e00220–13.

Slade Oliveira, C., Zoccolaro Oliveira, L., Zoccal Saraiva, N., Morato Monteiro, F., and Mansano Garcia, J. (2011). Efeitos da tricostatina A sobre a acetilação de histonas, proliferação celular e diferenciação de células tronco embrionárias murinas. *Acta Scientiae Veterinariae* 39.

Smith, W.L., and Edlind, T.D. (2002). Histone Deacetylase Inhibitors Enhance *Candida albicans* Sensitivity to Azoles and Related Antifungals: Correlation with Reduction in CDR and ERG Upregulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3532–3539.

Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A.J.S., and Soll, D.R. (2001). The Histone Deacetylase Genes HDA1 and RPD3 Play Distinct Roles in Regulation of High-Frequency Phenotypic Switching in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 183, 4614–4625.

Steenbergen, J.N., Shuman, H.A., Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 15245–15250

Tefsen, B., Grijpstra, J., Ordonez, S., Lammers, M., van Die, I., and de Cock, H. (2014). Deletion of the CAP10 gene of *Cryptococcus neoformans* results in a pleiotropic phenotype with changes in expression of virulence factors. *Research in Microbiology* 165, 399–410.

Tintelnot, K., Lemmer, K., Losert, H., Schar, G., and Polak, A. (2004). Follow-up of epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates. *Mycoses* 47, 455–464

Toffaletti, D.L., Rude, T.H., Johnston, S.A., Durack, D.T., and Perfect, J.R. (1993). Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J. Bacteriol.* 175, 1405–1411.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7, 562–578.

Tribus, M., Galehr, J., Trojer, P., Brosch, G., Loidl, P., Marx, F., Haas, H., and Graessle, S. (2005). HdaA, a Major Class 2 Histone Deacetylase of *Aspergillus nidulans*, Affects Growth under Conditions of Oxidative Stress. *Eukaryot Cell* 4, 1736–1745.

Trojer, P. (2003). Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts. *Nucleic Acids Research* 31, 3971–3981.

Tucker SC, Casadevall A. (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of

vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99(5):3165-70.

van Duin, D., Cleare, W., Zaragoza, O., Casadevall, A., and Nosanchuk, J.D. (2004). Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2014–2020.

Vartivarian, S.E., Anaissie, E.J., Cowart, R.E., Sprigg, H.A., Tingler, M.J., Jacobson, E.S. (1993). Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J. Infect. Dis.* 167, 186–190.

Voelz, K., and May, R.C. (2010). Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. *Eukaryotic Cell* 9, 835–846.

Wang, L., Zhai, B., and Lin, X. (2012). The Link between Morphotype Transition and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens* 8, e1002765.

Warkentien T, Crum-Cianflone NF. (2010). An update on *Cryptococcus* among HIV-infected patients. *Int J STD AIDS*;21(10):679-684.

Waterborg, J.H., and Kapros, T. (2002). Kinetic analysis of histone acetylation turnover and Trichostatin A induced hyper- and hypoacetylation in alfalfa. *Biochemistry and Cell Biology* 80, 279–293.

Wei, D.G., Chiang, V., Fyne, E., Balakrishnan, M., Barnes, T., Graupe, M., Hesselgesser, J., Irrinki, A., Murry, J.P., Stepan, G., et al. (2014). Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin Induces HIV Expression in CD4 T Cells from Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy at Concentrations Achieved by Clinical Dosing. *PLoS Pathogens* 10, e1004071.

West, A.C., Smyth, M.J., and Johnstone, R.W. (2014). The anticancer effects of HDAC inhibitors require the immune system. *OncoImmunology* 3, e27414.

West, A.C., Smyth, M.J., and Johnstone, R.W. (2014). The anticancer effects of HDAC inhibitors require the immune system. *OncoImmunology* 3, e27414.

Williamson, P. R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J. Bacteriol.* 176:656-664

Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters* 277, 8–21.

Yang, X.-J., and Gregoire, S. (2005). Class II Histone Deacetylases: from Sequence to Function, Regulation, and Clinical Implication. *Molecular and Cellular Biology* 25, 2873–2884.

Yang, X.-J., and Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 206–218.

Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265, 17174–17179.

Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y., and Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41, 973–981.

Zacchi, L.F., Schulz, W.L., and Davis, D.A. (2010). HOS2 and HDA1 Encode Histone Deacetylases with Opposing Roles in *Candida albicans* Morphogenesis. *PLoS ONE* 5, e12171.

Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2009). The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol.* 68, 133–216.

Zebedee, S.L., Koduri, R.K., Mukherjee, J., Mukherjee, S., Lee, S., Sauer, D.F., Scharff, M.D., and Casadevall, A. (1994a). Mouse-human immunoglobulin G1 chimeric antibodies with activities against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1507–1514.

Zebedee, S.L., Koduri, R.K., Mukherjee, J., Mukherjee, S., Lee, S., Sauer, D.F., Scharff, M.D., and Casadevall, A. (1994b). Mouse-human immunoglobulin G1 chimeric antibodies with activities against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1507–1514.

Zhang, L., Ma, N., Liu, Q., and Ma, Y. (2013). Genome-Wide Screening for Genes Associated with Valproic Acid Sensitivity in Fission Yeast. *PLoS ONE* 8, e68738.

Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., et al. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327, 1000–1004.







