

Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Dissertação de Mestrado

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE Cryptococcus neoformans COM DELEÇÃO DE GENES DAS VIAS BIOSSÍNTÉTICAS DE FOSFATIDILCOLINA

FILIPE DOS SANTOS TIMBONI

Brasília-DF

2024

FILIPE DOS SANTOS TIMBONI

Construção e caracterização de mutantes de *Cryptococcus neoformans* com deleção de genes das vias biossíntéticas de fosfatidilcolina

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana.

Orientadora: Dr^a. Larissa Fernandes Matos

Brasília-DF

2024

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof^a Larissa Fernandes Matos- UnB Departamento de Biologia Celular

Membro titular interno: Prof. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares Universidade de Brasília – Faculdade UnB Ceilândia

> Membro titular externo: Prof. Marcelo Afonso Vallim Universidade Federal de São Paulo

Suplente: Dr. Raffael Júnio Araújo de Castro Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre me apoiou e me ajudou ao longo desta desafiadora jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família. À minha mãe, por toda a paciência, apoio e carinho. Ao meu pai, por tudo o que já fez por mim e os valores que me ensinou. Às minhas irmãs, pelo companheirismo, amizade e apoio. E às minhas avós, tios, tias, e primos que fizeram parte da minha criação e cuja distância só aumenta a saudade.

À minha orientadora Larissa Fernandes, pela paciência, dedicação e conhecimento necessários para minha orientação.

Aos meus amigos de longa data, Alan, Bruno, Diego, Eduardo, Gonzaga, Ishida, Lara, Lucas, Rafael, Reinaldo e Robson, que proporcionaram momentos de distração e alegria, tornando mais leve os momentos difíceis.

Às pessoas incríveis que conheci nesta jornada, incluindo companheiros de laboratório que se tornaram parte da minha vida e cotidiano: Amanda, Clara, Dan, Isabella, Luísa, Nathália, Pasqua, Pedro, Raffael, Tatiana (saudades, Tati), Thaís e Vitória. Aos colegas que não estão mais presentes ou que conheci mais recentemente, mas por quem tenho muita consideração, Elias, Sofia, Viviann, Cecília, Júlia, Jessé, Guilherme e Ana Paula.

Aos professores e colaboradores que foram essenciais na realização deste trabalho, incluindo a professora Anamélia Bocca que esteve presente desde o início da minha jornada acadêmica e que possibilitou que eu me juntasse ao LIA, acreditando no meu potencial. À professora Patrícia Albuquerque, pelos conselhos e apoio na realização deste projeto. A todos os outros professores e alunos colaboradores que auxiliaram na realização dos experimentos e construção desse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana e seus professores que me proporcionaram o conhecimento fundamental que tenho hoje, incluindo as professoras Ana Flávia e Cecília que me guiaram na escrita deste trabalho.

Aos membros da banca, pelo tempo e esforço dedicados para análise deste trabalho.

À UnB e às agências de fomento cujo apoio material permitiu a realização deste trabalho.

RESUMO

Os fosfolipídios são moléculas fundamentais para a estrutura e função da membrana plasmática de células eucarióticas e procarióticas, além de estarem envolvidos no processo de adaptação ao meio ambiente e sinalização celular. Atualmente, diversos estudos exploram as vias de biossíntese de fosfolipídios como potencial alvo terapêutico contra fungos patogênicos, sendo assim, esse estudo teve por objetivo investigar o papel das vias de biossíntese de fosfatidilcolina na virulência do fungo Cryptococcus neoformans, através da construção e caracterização de mutantes deletados para os genes OPI3 e PCT1 que codificam as enzimas das vias CDP-DAG e Kennedy, respectivamente. Os mutantes foram obtidos através de técnicas moleculares de deleção gênica por Double Joint-Polymerase Chain Reaction (DJ-PCR) e biobalística, e submetidos a testes fenotípicos para avaliar os principais atributos associados à virulência de C. neoformans. O mutante com deleção do gene OPI3, da via de novo, possui crescimento significativamente afetado na ausência de colina no meio de cultura, enquanto o duplo mutante para as duas vias, $opi3\Delta pct1\Delta$, consegue crescer apenas na presença de extrato de levedura, ou em ágar gema de ovo, possivelmente pela assimilação de substratos utilizados por uma terceira via. Ambos os mutantes induzem cápsulas polissacarídicas maiores que o selvagem KN99a, enquanto em testes de sucetibilidade a antifúngicos, o mutante $pct \Delta$ apresentou maior suscetibilidade aos azóis, fluconazol e itraconazol. Os resultados indicam que essas vias podem estar associadas com mecanismos celulares que regulam a síntese de cápsula polissacarídica, além de papel na virulência e integridade da membrana plasmática.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*; Virulência; Deleção gênica; Vias biossintéticas; fosfatidilcolina.

ABSTRACT

Phospholipids are fundamental molecules for the structure and function of the plasma membrane in both eukaryotic and prokaryotic cells, as well as being involved in environmental adaptation processes and cell signaling. Currently, various studies explore phospholipid biosynthesis pathways as potential therapeutic targets against pathogenic fungi. Thus, this study aimed to investigate the role of phosphatidylcholine biosynthesis pathways in the virulence of the fungus Cryptococcus neoformans through the construction and characterization of knockou mutants for the OPI3 and PCT1 genes, which encode the enzymes of the CDP-DAG and Kennedy pathways, respectively. The mutants were obtained through molecular gene deletion techniques using Double Joint-Polymerase Chain Reaction (DJ-PCR) and biolistics, and were subjected to phenotypic tests to evaluate the main attributes associated with C. neoformans virulence. The mutant deleted for the OPI3 gene, from the de novo pathway, showed significantly affected growth in the absence of choline in the culture medium, while the double mutant for both pathways, $opi3\Delta pct1\Delta$, was able to grow only in the presence of yeast extract or on egg yolk agar, possibly due to the assimilation of substrates used by a third pathway. Both $opi3\Delta$ and $opi3\Delta pct1\Delta$ mutants induced larger polysaccharide capsules than the wild-type KN99 α , while in antifungal susceptibility tests, the *pct1* Δ mutant showed greater susceptibility to the azoles, fluconazole, and itraconazole. The results indicate that these pathways may be associated with cellular mechanisms that regulate polysaccharide capsule synthesis, as well as play a role in virulence and plasma membrane integrity.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; Virulence; Gene deletion; Biosynthetic pathways; phosphatidylcholine.

Lista de Abreviaturas e Siglas

- 5-FC 5-Fluorocitosina
- AIDS Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AF Atividade Fungicida
- AmB Anfotericina B
- BHE Barreira Hematoencefálica
- BMDM Macrófagos Derivados de Medula Óssea
- CDP-DAG Citidina-difosfato-diacilglicerol
- CIM Concentração Inibitória Mínima
- Cn Cryptococcus neoformans
- CTP Citidina-trifosfato
- DJ-PCR Reação em Cadeia da Polimerase de Dupla Junção
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- dNTP Desoxirribonucleosídeo trifosfato
- EDTA Ácido Etileno Tetra-acético
- EtOH Álcool etílico
- FLC Fluconazol
- GalXM-Galactoxilomanana
- GM-CSF Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- GPC Glicerofosfocolina
- GXM Glicoronoxilomanana
- HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
- IF Índice Fagocítico
- $IFN-\gamma-Interferon-gama$
- MAPK Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
- MC Meningoencefalite criptocócica
- MM Meio Mínimo
- MOI Multiplicidade de Infecção
- MOPS Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

- NCBI National Center for Biotechnology Information
- OD Desvio Ótico
- pb Pares de base
- PC-Fosfatidilcolina
- PCR Reação em Cadeia da Polimerase
- PE-Fosfati diletano lamina
- PI-Fosfati dilinositol
- PS-Fosfatidilserina
- Pz Zona de precipitação
- ® Marca registrada
- **RPMI** Roswell Park Memorial Institute
- SDS Dodecil Sulfato de Sódio
- SNC Sistema Nervoso Central
- TM *Trademark*
- UFC Unidades Formadoras de Colônia
- UTP Uridina trifosfato
- YPD Dextrose Peptona Extrato de levedura

Lista de Figuras

Figura 1: Infecção por propágulos contaminantes de C. neoformans e o desenvolvimento da criptococose. 14
Figura 2: Principais aspectos relacionados à virulência de <i>C. neoformans</i> e suas interações com o hospedeiro
Figura 3: Mecanismo de ação dos antifúngicos azóis e polienos19
Figura 4: Estrutura química do fosfolipídio 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina (Fosfatidilcolina).
Figura 5: Polimorfismo lipídico e o efeito da forma-estrutura molecular na formação de fases ou arranjos
Figura 6: Síntese das principais moléculas de fosfolipídios nas células de leveduras23
Figura 7: Esquema da síntese de fosfatidilcolina (PC) pela via de reacilação de glicerofosfocolina (GPC), em <i>Candida albicans</i> 25
Figura 8: Procedimento para transformação do C. neoformans utilizando fragmentos da marca de seleção HYG. 33
Figura 9: Iniciadores e fragmentos de DNA utilizados para a reconstituição e confirmação de deleção e reconstituição por PCR
Figura 10: CNAG_00424 codifica Pct1 na linhagem H99 de <i>C. neoformans</i> 49
Figura 11: CNAG_06543 codifica Cept1 na linhagem H99 de <i>C. neoformans</i> 50
Figura 12: CNAG_06839 codifica Opi3 na linhagem H99 de <i>C. neoformans.</i> 51
Figura 13: Etapas da construção do cassete de deleção do gene <i>PCT1</i> na linhagem KN99α. 52
Figura 14: Deleção do gene PCT1 confirmada nos transformantes da linhagem KN99α52
Figura 15: Deleção do gene PCT1 confirmada nos transformantes de linhagem mutante <i>opi3</i> ∆
Figura 16: Reconstituição dos genes <i>PCT1</i> e <i>OPI3</i> confirmada nos mutantes $pct1\Delta$, $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$
Figura 17: Os mutantes da via de síntese de PC têm crescimento normal em YPD a 30°C e 37°C

Figura 18: O duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$ tem crescimento celular inibido em MM, enquanto
$opi3\Delta$ cresce somente na presença de colina
Figura 19: O duplo mutante $opi3\Delta/pct1\Delta$ é mais sensível a estresse de membrana plasmática.
Figura 20: O mutante $opi3\Delta$ recupera completamente a capacidade de melanização em meio
suplementado com colina
Figura 21: O mutante <i>opi3</i> Δ e duplo mutante <i>opi3</i> Δ <i>pct1</i> Δ produzem cápsula mais espessa em
condição indutora
Figura 22: O mutante <i>opi3</i> Δ e duplo mutante <i>opi3</i> Δ <i>pct1</i> Δ são capazes de crescer em ágar gema
de ovo através da secreção de fosfolipases61
Figura 23: Os mutantes das vias de fosfatidilcolina secretam urease
Figura 24: BMDMs estimulados com GM-CSF e ou IFN- γ são mais eficientes em eliminar as
leveduras dos mutantes $opi3\Delta$, e duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$ 65
Figura 25: O mutante $opi3\Delta pct1\Delta$ possui virulência reduzida em modelo de infecção de G.
mellonella
Figura 26: Vias de biossíntese de fosfatidilcolina em <i>C. neoformans</i>

Lista de Tabelas

Tabela 1: Linhagens do fungo C. neoformans utilizadas neste estudo	29
Tabela 2: Sequências genéticas das vias de síntese de PC de <i>C. neoformans</i> , utili	izadas neste
estudo, e genes equivalentes em outras leveduras	
Tabela 3: Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste estudo e os respec	tivos alvos.
Tabela 4: Agentes estressores, concentração e mecanismos de estresse	42
Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diferentes antifúngicos n	os mutantes
dos genes das vias de PC e seus reconstituídos	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Cryptococcus neoformans e a criptococose	14
1.2 Atributos associados à virulência de <i>C. neoformans</i>	16
1.3 A membrana plasmática como alvo antifúngico	18
1.4 A biossíntese de fosfolipídios	20
1.4.1 Fosfolipídios e suas funções	20
1.4.2 Fosfatidilcolina e suas vias biossintéticas	23
1.5 Síntese de fosfolipídios como alvo terapêutico	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Linhagens e inóculo	29
4.2. Sequências genéticas dos genes que codificam as enzimas hipotéticas das via	ıs de 20
4.3 Extração de DNA genômico	
4.5 Extração de DINA genomico	
1/1 Amplificação dos fragmentos do cassate de deleção	
4.4.1. Amplificação dos cassatas da dalação aôvica	,
4.4.2 Construção dos casseles de deleção genica	,
4.4.5 Deleção genica por biobalistica	36
4.5 Reconstituição dos initiantes por 1 CR	
4.0 Communação da deleção e da reconstituição genica dos transformantes	
4.7. Caracterização tenotípica dos initiantes	41
4.7.1 Curvas de crescimento	41
4.7.2 Teste de suscendinadae à agentes estressores	41
4.7.5 Ensaio de secreção de josjoupase	43
4.5.5 Ensaio ae melanização	
4.5.4 Inaução de capsula polissacariaica	
4.5.5. Analise de secreção de urease	
4.6. Ensaio de suscetibilidade a antifungicos	
4.7. Ensaio de interação com macroiagos murinos derivados de medula ossea	
4.7.1 Obtenção de macrojagos derivados de medula ossea de camundongos	
4.7.2 Avaliação da atividade fagocifica dos macrófagos	
4./.3 Avaliaçao da atividade fungicida dos macrófagos	

4.8 Teste de infecção em modelo Galleria mellonella	47
4.9 Análise estatística	47
5. RESULTADOS	48
5.1 Sequências dos genes que codificam as enzimas da biossíntese de	PC48
5.1.2 CNAG_00424 codifica Pct1 em linhagem H99	
5.1.3 CNAG_06543 codifica Ept1 bifuncional em linhagem H99	
5.1.4 CNAG_06839 codifica Opi3 em linhagem H99	
5.2 Construção das cepas mutantes e reconstituídos	51
5.3 Caracterização fenotípica dos mutantes	55
5.3.1 Biossíntese de fosfatidilcolina é importante para crescimento ce condições	lular em diferentes 55
5.3.2 O mutante opi $3\Delta pct1\Delta$ é mais sensível a estresse de membrana.	
5.3.3 Mutante opi 3Δ tem a capacidade de melanização restaurada con colina	m a presença de 58
5.3.4 Deleção do gene OPI3 aumenta expansão da cápsula polissaca	rídica59
5.3.5 Mutantes das vias de PC secretam fosfolipases	61
5.3.6 Mutantes da via de PC secretam urease	
5.4 Diminuição da CIM de antifúngicos convencionais na cepa muta	nte <i>pct1</i> Δ
5.5 A via CDP-DAG é importante para a sobrevivência no interior d	le macrófagos63
5.6 Ο duplo mutante <i>opi3Δpct1Δ</i> é hipovirulento em <i>G. mellonella</i>	65
6. DISCUSSÃO	
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cryptococcus neoformans e a criptococose

O *Cryptococcus neoformans* é um fungo basidiomiceto dimórfico, presente no ambiente de forma ubíqua, sendo encontrado em árvores, plantas em decomposição, e principalmente em excreta de aves, como no guano de pombos. Este organismo possui um ciclo de vida com duas formas distintas: a forma teleomórfica, distinguida por hifas mono ou dicarióticas formadas a partir da fusão de leveduras com alelos sexuais compatíveis (*MATa/MATa*), e a forma anamórfica, caracterizada por leveduras encapsuladas haplóides, que se reproduzem por brotamento (Casadevall e Perfect, 1998; Kwon-Chung et al., 2014; Zhao et al., 2019).

Além de saprófita, *C. neoformans* também pode ser um patógeno oportunista, com a possibilidade de seus esporos ou leveduras dessecadas serem inaladas por seres humanos o que propicia o início de um quadro infeccioso, a criptococose, visualizado na **Figura 1** (Kwon-Chung et al., 2014; Zhao et al., 2019). Essa doença afeta inicialmente os pulmões, mas devido ao neurotropismo do fungo *C. neoformans*, a infecção pode se agravar pela sua disseminação para o sistema nervoso central (SNC) do paciente, evoluindo para um quadro de meningoencefalite criptocócica (MC) (Bicanic e Harrison, 2004).



Figura 1: Infecção por propágulos contaminantes de *C. neoformans* e o desenvolvimento da criptococose. Leveduras dessecadas ou esporos são dispersados pelo ar e podem ser aspirados pelo hospedeiro. A infecção se

inicia no tecido dos alvéolos pulmonares onde ocorre a proliferação das células fúngicas ocasionando um quadro inflamatório de pneumonia criptocócica. Caso o organismo do hospedeiro não consiga conter a infecção, o fungo pode se disseminar pela corrente sanguínea e cruzar a barreira hematoencefálica (BHE), progredindo para um grave quadro clínico de meningoencefalite criptocócica. Figura adaptada de Kwon-Chung et al., 2014.

Para tratamento da criptococose, utiliza-se três medicamentos antifúngicos principais: Anfotericina B (AmB), Fluconazol (FLC) e 5-Fluorocitosina (5-FC), dependendo da forma da doença e das condições do paciente (Perfect et al., 2010). Para os pacientes não imunossuprimidos com criptococose pneumocócica, é recomendada a utilização de FLC, porém, voriconazol, itraconazol, ou posaconazol, também são alternativas possíveis (Spadari et al., 2020; Perfect et al., 2010). Entretanto para pacientes com MC é recomendado terapia com AmB junto com 5-FC, e para consolidação e manutenção do tratamento, deve-se utilizar FLC por no mínimo 6 meses (Spadari et al., 2020; Perfect et al., 2010). O tratamento da MC possui várias dificuldades, como a barreira hematoencefálica (BHE), que dificulta a difusão de moléculas grandes como AmB para o SNC, as bombas de efluxo que reduzem a concentração dos medicamentos no SNC, a hepatotoxicidade e os efeitos adversos desses antifúngicos, além do aumento da incidência de cepas resistentes ao FLC (Bongomin et al., 2018; Spadari et al., 2020; Wirth et al., 2018).

Apenas no ano de 2020, mais de 110.000 mortes por MC foram relatadas em todo o mundo, e a maioria delas são de pessoas com alguma imunodeficiência, principalmente pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Aguda (AIDS) (Zhao et al., 2023). Além disso, o surgimento de variantes resistentes à medicamentos antifúngicos e o aumento da infectibilidade em pacientes imunocompetentes tornam a criptococose uma preocupação para a saúde pública (Pyrgos et al., 2013; Zhao et al., 2023), tanto que *C. neoformans* está no grupo de prioridade crítica da lista de fungos patogênicos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022).

Um fator importante na patologia e epidemiologia da criptococose é a imensa variabilidade genética e fenotípica do fungo *C. neoformans*, que possui três sorotipos diferentes, A, D, e AD, determinados pela reatividade imunológica de suas cápsulas polissacarídicas (Franzot, Salkin, Casadevall, 1999). O sorotipo A, *C. neoformans var. grubii*, é o mais prevalente em infecções nos seres humanos, presente em um total de 95% dos infectados por todo o mundo, e em mais de 99% dos pacientes também infectados com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (Casadevall, Perfect, 1988; Franzot, Salkin, Casadevall, 1999). Já o sorotipo D, *C. neoformans var. neoformans*, é mais prevalente no norte da Europa, e tende a

afetar pacientes idosos ou em tratamentos com corticosteroides (Bennett, Kwon-Chung, Howard, 1977; Dromer et al., 1996; Franzot, Salkin, Casadevall, 1999).

O último sorotipo, AD, é uma variedade híbrida, surgida a partir de múltiplos eventos de hibridização, possuindo uma significativa heterogeneidade adquirida das cepas parentais A e D (Xu, et al., 2002). Já os sorotipos B e C, são pertencentes ao complexo *C. gattii*, e mais prevalente em zonas tropicais ou subtropicais (Kwon-Chung; Bennett, Theodore, 1978; Franzot, Salkin, Casadevall, 1999). Além disso, *C. gattii* é notório na capacidade de infectar indivíduos imunocompetentes, ao contrário de sua espécie irmã, porém, são menos prevalentes os casos de meningoencefalite, com a infecção ficando restrita aos pulmões (Galanis et al., 2010).

Por fim, foi descoberto que existe uma correlação do tipo sexual com a severidade da infecção, sendo o tipo sexual α mais prevalente em infecções sistêmicas com disseminação para o sistema nervoso central (SNC) (Nielsen et al., 2003; Nielsen et al., 2005). Vale ressaltar que existe uma prevalência do tipo α no sorotipo A, porém a descoberta do isolado clínico da Tanzânia, 125.91 (sorotipo A, *MAT*a), permitiu a geração da cepa laboratorial de referência, KN99a (Langeler et al., 2000; Nielsen et al., 2003). Para isso, foi realizado o cruzamento da cepa referencial advinda de isolado clínico, H99 (sorotipo A, *MAT* α), com KNA14 (sorotipo A, *MAT* α), a progênie de 125.91 e 8-1 (sorotipo A, *MAT* α) (Nielsen et al., 2003). Posteriormente, dez retrocruzamentos de KNA14 com a cepa H99 resultaram na cepa KN99 α e KN99a, ambas congênicas à H99, possuindo genoma idêntico com exceção do *locus* sexual *MAT*, o que auxiliou na discussão da patogenicidade e sua relação com o tipo sexual (Nielsen et al., 2003; Nielsen et al., 2003).

1.2 Atributos associados à virulência de C. neoformans

Quanto à virulência e patogenicidade do *C. neoformans* em seres humanos, ou seja, sua capacidade de causar doença em um indivíduo e as interações com o hospedeiro que determinam a gravidade da mesma, existem certos fenótipos que estão associados e que auxiliam o fungo a resistir e evadir à resposta imunológica do hospedeiro (Alspaugh, 2015), características mostradas na **Figura 2**. Um fator essencial para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro humano é a capacidade de persistir e se reproduzir a 37°C, superando a barreira térmica dos mamíferos (Brown, Campbell e Lodge, 2007).



Figura 2: Principais aspectos relacionados à virulência de *C. neoformans* e suas interações com o hospedeiro. A cápsula polissacarídica de glucoronoxilomanana (GXM) presente externamente à parede celular, auxilia o fungo a evadir o sistema imunológico. A enzima lacase converte L-DOPA presente no citoplasma, em melanina, acumulada em grânulos entre a parede celular e a membrana, formando um revestimento protetor. Fragmentos de quitina, polissacarídio presente na parede celular fúngica, alteram resposta imunológica adaptativa. A secreção extracelular de enzimas e proteínas, como a fosfolipase PLB1, urease, e proteína CPL1, são importantes para disseminação no organismo do hospedeiro, passagem pela barreira hematoencefálica (BHE), e imunomodulação. Figura adaptada de Chen et al., 2022.

Outro atributo importante está presente na estrutura de sua célula, a cápsula polissacarídica, formada por polímeros de glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), ancorados na parede celular, permitindo *C. neoformans* evadir o sistema imunológico do hospedeiro, mascarando componentes imunogênicas da parede como as β -glucanas, modular a resposta imune com o GalXM, tornando-a menos eficiente, e se proteger mecanicamente de ser fagocitado por macrófagos (Decote-Ricardo et al., 2019 ; Zaragoza, 2009). A presença de melanina na parede celular do fungo, que permite a adaptação a ambientes com alta incidência de raios ultravioleta, também contribui para sua virulência, ajudando o patógeno a sobreviver ao ataque oxidativo no interior de fagolisossomos e modificando a resposta de macrófagos (Alspaugh, 2015; Yang et al., 2002).

Além disso, a secreção de enzimas extracelulares como a fosfolipase e urease, é essencial para a invasão do epitélio pulmonar e sobrevivência nos fagolisossomos (Cox et al., 2001; Fu et al., 2018). A liberação de vesículas extracelulares que possuem metabólitos e enzimas que auxiliam na sobrevivência do fungo, também podem modular a resposta imunológica do hospedeiro (Oliveira et al., 2010; Rodrigues et. al, 2008). Por fim, esses atributos, e possivelmente outros ainda não relatados, aliados a uma ineficiente resposta imunológica, são

essenciais para que *C. neoformans* infecte e invada o tecido pulmonar, sobreviva no interior de macrófagos, se dissemine pela corrente sanguínea e atravesse a barreira hematoencefálica (BHE), ocasionando um quadro infeccioso de difícil resolução (Kwon-Chung et al., 2014).

1.3 A membrana plasmática como alvo antifúngico

Doenças causadas por fungos patogênicos, como a criptococose, têm se tornado emergentes com o desenvolvimento de tratamentos para imunossupressão de pacientes com diferentes condições médicas, aliado ao surgimento de variantes resistentes pela utilização prolongada de medicamentos antifúngicos (Friedman e Schwartz, 2019). As reduzidas opções de tratamento dessas doenças pressionam pesquisadores a desenvolverem novas estratégias terapêuticas, podendo-se mencionar a busca por novos compostos antifúngicos, o estudo da interação entre patógeno-hospedeiro, e a compreensão da biologia desses fungos através de técnicas de manipulação e deleção gênica (Vandeputte et al., 2012).

Algumas estratégias terapêuticas já utilizadas têm como alvo a membrana plasmática fúngica, devido a presença do ergosterol. A composição dessa estrutura essencial para a célula é afetada por diferentes classes de antifúngicos utilizados na medicina clínica, entre eles, os polienos, azóis e as alilaminas. Os polienos, como a AmB, são compostos produzidos e isolados de culturas de bactéria, *Streptomyces nodosus*, e são utilizados como antifúngicos. O principal mecanismo de ação dessas moléculas, demonstrado na **Figura 3**, ocorre pela associação com o ergosterol, esterol presente na membrana fúngica, ocasionando a formação de poros na membrana (Holz, 1974; Lemke; Kiderlen, Kayser, 2005; Vandeputte et al., 2012). Outros estudos também demonstraram uma possível ação pró-oxidante no interior das células fúngicas induzindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mesa-Arango; Scorzoni e Zaragoza, 2012). Entretanto, apesar dos polienos terem como alvo um esterol presente apenas em fungos, esses compostos ainda possuem afinidade ao colesterol presente em humanos, explicando a toxicidade e os efeitos colaterais associados ao uso desses antifúngicos (Laborín e Vargas, 2009; Lemke; Kiderlen, Kayser, 2005).

Enquanto os polienos agem diretamente no ergosterol, os azóis, classe de agentes fungistáticos mais utilizada no tratamento clínico, possuem ação indireta, inibindo a síntese do esterol (Nozawa e Morita, 1986; Vandeputte et al., 2012). Os azóis podem ser divididos em categorias conforme sua estrutura molecular, como por exemplo, os imidazóis com dois átomos de nitrogênio no anel azólico e os triazóis com três (Nozawa e Morita, 1986). Os imidazóis,

como o cetaconazol, afetam a atividade de diferentes enzimas de membrana e síntese lipídica, enquanto os triazóis, como o fluconazol, inibem uma enzima do citocromo P-450, lanosterol 14 α -demetilase, codificada pelo gene *ERG11* (Carrillo-Munoz et al., 2006; Nozawa e Morita, 1986). A inibição dessa enzima (**Figura 3**) afeta a síntese de ergosterol, importante para a manutenção da estrutura da membrana plasmática, além de gerar acúmulos de compostos tóxicos como o 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3,6-diol, inibindo o crescimento fúngico (Akins, 2005).



Figura 3: Mecanismo de ação dos antifúngicos azóis e polienos. (a) Azóis interrompem a síntese de ergosterol pela inibição da enzima 14α -demetilase (ERG11) que converte lanosterol em ergosterol. (b) Polienos se associam com o ergosterol alterando a estrutura da membrana plasmática e facilitando a formação de poros e extravasamento de conteúdo celular. Figura adaptada de Ruiz-Baca et al., p. 39, 2021.

Apesar da enzima lanosterol 14α -demetilase não ser encontrada em células de mamífero, os azóis ainda possuem uma pequena, mas significativa, afinidade pelas enzimas do citocromo P-450 que sintetizam colesterol no fígado de humanos, causando efeitos adversos (Carrillo-Munoz et al., 2006). Os triazóis mais recentes possuem uma especificidade mais alta para Erg11p, mas outros estudos utilizando estratégias de deleção gênica, investigaram o papel da enzima Erg6, que não está envolvida com o P-450, tornando-se um alvo promissor (Akins, 2005). A deleção de *ERG6* em *Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans* e *C. neoformans*,

afetam diversos aspectos fenotípicos, além de aumentar a suscetibilidade a diferentes antifúngicos, principalmente azóis em *C. neoformans* (Gaber et al., 1989; Jensen-Pergakes et al., 1998; Oliveira et al., 2020).

Outra classe de antifúngicos que interrompem a síntese de ergosterol são as alilaminas e seus derivados, como por exemplo, a terbinafina. Esses compostos possuem ação fungicida contra diversos fungos patogênicos, principalmente em dermatófitos, sendo utilizados majoritariamente para o tratamento de micoses subcutâneas (Georgopoulos et al., 1981; Ryder, 1992). A sua ação fungicida ocorre pela inibição da enzima esqualeno epoxidase, interrompendo a síntese de lanosterol e, consequentemente, ergosterol (Ryder, 1992). Assim, induz-se um acúmulo de esqualeno no interior da célula, além da redução dos níveis de ergosterol, afetando a estrutura e função da membrana plasmática (Hammoudi Halat et al., 2022).

É importante ressaltar que a membrana plasmática possui em sua composição diversas proteínas e lipídios além do ergosterol. Outros componentes e vias essenciais têm sido alvos de estudos, como por exemplo, a biossíntese de fosfolipídios, principal classe de lipídios que compõe a membrana plasmática e de organelas (Lösel, 1990, p. 125). Esses lipídios são um alvo promissor para o desenvolvimento de antifúngicos e compreensão do papel desses metabólitos e suas vias na virulência e patogenicidade dos fungos (Pan; Hu, Yu, 2018; Sant et al., 2016; Van Meer; Voelker, Feigenson, 2008). Seguindo essa trilha, este estudo pretende investigar o papel dos fosfolipídios, mais especificamente a fosfatidilcolina (PC), em aspectos patobiológicos de *C. neoformans*.

1.4 A biossíntese de fosfolipídios

1.4.1 Fosfolipídios e suas funções

Os fosfolipídios estão presentes nas células de todos os organismos eucarióticos e procarióticos e são moléculas formadas a partir da ligação éster de cadeias de ácidos graxos saturados ou insaturados a um grupamento glicerofosfato que pode estar ou não associado a um aminoálcool por ligação fosfodiéster, conforme mostrado na **Figura 4** (Pichot; Watson, Norton, 2013). Devido ao seu caráter anfipático, os fosfolipídios são os principais componentes de

membranas celulares e de organelas, mas também possuem papel no metabolismo e sinalização celular (Carman e Henry, 1999).



Figura 4: Estrutura química do fosfolipídio 1-palmitoil-2-oleil-*sn***-glicero-3-fosfocolina (Fosfatidilcolina).** A molécula utilizada como exemplo de fosfolipídio pode ter outros grupos polares na cabeça hidrofílica: fosfatidiletanolamina (PE) com o aminoálcool etanolamina; fosfatidilglicerol (PG) com glicerol; fosfatidilinositol com o álcool inositol; fosfatidilserina com o aminoácido serina (Ser). Figura adaptada de Drescher e Van Hoogevest, v. 12, n. 12, p. 1235, 2020.

Para cumprir seu papel, os fosfolipídios assumem diversas estruturas moleculares com cadeias de ácidos-graxos longas ou curtas, saturadas ou insaturadas, e cabeças hidrofílicas de diferentes composições, tudo isso alterando a fluidez da membrana, sua permeabilidade, curvatura e arquitetura (Wang e Tontonoz, 2019). Cada classe de fosfolipídio pode exercer diversas funções, mas possuem uma atuação principal na célula, por exemplo, a estrutura molecular da PC permite o controle da fluidez, permeabilidade, e curvatura da membrana plasmática da célula (McMaster, 2017), ao passo que a fosfatidiletanolamina (PE), possui papel fundamental na integração e conformação de proteínas de membrana a partir da formação de fases hexagonais na membrana plasmática (**Figura 5**) (Killian, 2004).



Figura 5: Polimorfismo lipídico e o efeito da forma-estrutura molecular na formação de fases ou arranjos. Moléculas com forma cônica como a fosfatidiletanolamina (PE) tendem a não formar estruturas em bicamadas e se reúnem em fases hexagonais invertidas (H_{II}), conforme mostrado na figura. A forma cilíndrica das moléculas de fosfatidilcolina (PC) tende a formar estruturas em bicamada, e essas se reúnem em uma fase lamelar cristalina (L α), conforme figura. Figura adaptada de Basu Ball, Neff e Gohil, 2018.

Outro papel importante dos fosfolipídios é a transdução de sinais na célula, cuja função é exercida, principalmente, pelo fosfatidilinositol (PI). PI é o precursor da molécula fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂), cuja hidrólise gera metabólitos essenciais em diversas vias de sinalização celular (Zhang, 1998). Vale notar que as vias de sinalização envolvendo inositol e PI estão intimamente associadas com regulação da síntese de outros fosfolipídios como a PC (Carman e Henry, 1999), ressaltando a importância dos estudos dessas vias regulatórias para melhor entendimento da biossíntese fosfolipídica.

Os fosfolipídios são sintetizados a partir da conversão de uridina-trifosfato (UTP) em citidina-trifosfato (CTP) por uma CTP-sintetase, e posteriormente a partir de CTP e ácido fosfatídico, há a formação de citidina-difosfato-diacilglicerol (CDP-DAG) pela CDP-DAG sintase. Este composto é um dos principais substratos para as reações formadoras de fosfolipídios nas células, como mostrado na **Figura 6** (Kent, 1995).



Figura 6: Síntese das principais moléculas de fosfolipídios nas células de leveduras. Ácido fosfatídico (PA), síntentizado a partir de glicerol-3-fosfato por uma reação de duas etapas, é a molécula precursora da síntese de citidina-difosfato-diacilglicerol (CDP-DAG) e diacilglicerol (DAG). Além de participar da síntese de fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS), CDP-DAG é o principal precursor da via de novo de biossíntese de fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC) (representada pelas setas amarelas). DAG é utilizado nas últimas reações da via alternativa Kennedy (representada pelas setas azuis), que assimila etanolamina e colina livres para a biossíntese de PE e PC, respectivamente. MME, monometil fosfatidiletanolamina. DME, dimetil-fosfatidiletanolamina. Etn, etanolamina. P-Etn, fosfoetanolamina. CDP-Etn, citidina difosfoetanolamina. Cho, colina. P-Cho, fosfocolina. CDP-Cho, citidinadifosfocolina. Em vermelho, estão representados os genes das enzimas envolvidas na biossíntese de fosfolipídios. Figura criada pelo autor no biorender.com, utilizando como referência Carman e Han (2009).

1.4.2 Fosfatidilcolina e suas vias biossintéticas

Um dos mais abundantes fosfolipídios das células eucarióticas, a PC, é sintetizada por diferentes vias metabólicas, entre elas: a via CDP-DAG, e a via Kennedy (Gibellini e Smith, 2010; Kent, 2005). Em leveduras, a produção de PC pela via CDP-DAG é realizada a partir da síntese de fosfatidilserina (PS) (**Figura 6**), com a utilização de CDP-DAG e serina pela enzima sintase Cho1, e subsequente conversão desse fosfolipídio em PE pelas enzimas descarboxilases Psd1 e Psd2, que sofrerá então a ação das metilases Cho2 e Opi3 obtendo-se PC (**Figura 6 e 7**) (Carman e Han, 2009).

Por outro lado, a via Kennedy é conhecida por ser uma via alternativa em fungos, mas em mamíferos é a principal via utilizada para síntese de PC (McMaster, 2017). A síntese de PC por tal via, observada na **Figura 6 e 7**, ocorre pela assimilação de colina advinda do meio externo para efetuar a síntese em três reações: cloreto de colina importado para o interior da célula pelo transportador Hnm1 e fosforilado em fosfocolina pela enzima colina quinase (Cki), posteriormente, CTP e fosfocolina serão os precursores utilizados pela citidiltransferase (Pct1) para a síntese de CDP-colina, e na última etapa, uma fosfotransferase (Cpt1/Cept1/Ept1), que detém afinidade tanto para colina quanto para etanolamina, utiliza os precursores CDP-colina e diacilglicerol para obtenção da PC (Carman, Han, 2009; McMaster, 2018). Vale ressaltar que essa via está associada com a regulação do tráfego de vesículas intracelulares, mais especificamente com a inibição pela proteína transportadora de PC/PI, Sec14p, possibilitando a formação de vesículas pela redução de PC na membrana do complexo golgiense (Howe, McMaster, 2001).

Existe ainda uma terceira via de síntese de PC presente em fungos (**Figura 7**) que utiliza uma aciltransferase recentemente caracterizada, que faz parte de uma família própria de proteínas que consegue converter glicero-3-fosfocolina (GPC) em lisofosfatidilcolina, molécula que a enzima Ale1 utiliza para sintetizar PC (Głąb et al., 2016). Essa via de acilação ou desacilação da PC utiliza GPC produzido internamente na célula, pela ação da fosfolipase Plb1 na PC, ou GPC exógeno, importando essa molécula pelo transportadores Git3/4 presentes na membrana plasmática. A deleção do gene *GPC1* contribui com a síntese de PC da membrana plasmática e na transição dimórfica do fungo *C. albicans*, com a delecao do gene *GPC1* alterando a viabilidade celular e virulência (King et al., 2024). Vale ressaltar que vários grupos de organismos, incluindo clorófitas, plantas, fungos e animais invertebrados não-artrópodes, possuem essa via, o que não se confirma em mamíferos como o ser humano (Głąb et al., 2016).



Figura 7: Esquema da síntese de fosfatidilcolina (PC) pela via de reacilação de glicerofosfocolina (GPC), em *Candida albicans*. As setas vermelhas indicam as etapas da via de desacilação/reacilação de PC. GPC pode ser internalizado pelo transportador Git3 ou Git4 ou desacilado pela fosfolipase Plb1. A ação da enzima Gpc1 converte GPC em lisofosfatidilcolina (LPC) que sofre ação da Lpt1 para formar PC. Contribuindo para biossíntese de PC, também estão representadas a via Kennedy e a via de metilação de fosfatidiletanolamina (PE) (via CDP-DAG). MME, monometil fosfatidiletanolamina. DME, dimetil-fosfatidiletanolamina. Cho, colina. P-Cho, fosfocolina. CDP-Cho, citidinadifosfocolina. Figura adaptada de King et al., 2024.

1.5 Síntese de fosfolipídios como alvo terapêutico

A síntese de fosfolipídios como alvo terapêutico em fungos patogênicos é um campo que vem sendo consolidado com o tempo. As enzimas fosfatidilserina sintase Psd1 e Psd2, e fosfatidiletanolamina N-metiltransferases, Cho2/Pem1 e Opi3/Pem2, são os principais alvos de estudos por não possuírem enzimas com mesmas funções em mamíferos ou representarem uma pequena parcela da síntese, como é o caso da metiltransferase, Pemt, que participa de 30% da síntese de PC no fígado de mamíferos. Consequentemente, medicamentos antifúngicos teriam mais especificidade contra as células fúngicas devido às diferenças dessas vias entre fungos e mamíferos (Cassily e Reynolds, 2018). Alguns compostos são promissores como a hidroxolamina (inibidor de PS sintase) e etionina (análogo de metionina) que tem como alvo a PE N-metiltransferase. Além disso a síntese de PE e PC pela via CDP-DAG é observada apenas no fígado dos mamíferos, em uma taxa menor que pela via Kennedy, enquanto o resto do organismo utiliza estritamente a via Kennedy para sua biossíntese de PC (McMaster, 2017; Pan et al., 2018).

Outros estudos também confirmam que a biossíntese de fosfolipídios possui funções além da composição e homeostase da membrana plasmática, por exemplo, deleção de *CHO2* e *OPI3* afeta a capacidade de *Fusarium graminearum* de crescer em meio pobre em nutrientes,

alterando também a morfologia das colônias e a virulência em infecção do trigo (Wang et al., 2019). Em *C. albicans*, foram demonstradas alterações no perfil dos fosfolipídios quando o fungo realizava sua transição dimórfica, alterando as concentrações de FC, FE e FI/FS, e o grau de insaturações dessas moléculas, principalmente na FC, indicando o papel fisiológico desses metabólitos e vias associadas na modulação da fluidez e curvatura da membrana para transformação da levedura em hifa (Yano et al., 1982).

Ademais, ainda em *C. albicans*, foi observado que na ausência da enzima sintetizadora de PE pela via CDP-DAG, existe uma relevante redução da virulência do patógeno, que não consegue obter etanolamina suficiente do hospedeiro para a formação do fosfolipídio pela via Kennedy, mas a complementação de etanolamina retorna o mutante ao fenótipo original, sendo que o aumento da produção de fosfolipídios por essa via de biossíntese aumenta a virulência do fungo (Davis et al., 2018; Tams et al., 2019).

O estudo da via alternativa em fungos também demonstrou resultados interessantes. Por exemplo, em *Metarhizium robertsii*, fungo patogênico de insetos, quando deletado o gene análogo ao da enzima Opi3, foram observadas alterações fenotípicas visíveis na produção de conídios, incluindo redução na concentração de PC, mas sem alteração na virulência. Em contrapartida, o oposto é observado com a deleção do gene da citidiltransferase, cujo mutante não possui alterações fenotípicas aparentes, mas virulência atenuada (Chen et al., 2018). Segundo Chen e colaboradores (2018), esses resultados refletem diferentes funções de cada via na biogênese de corpos lipídiocs, autofagia e síntese de diferentes espécies de PC. Apesar de não representarem alvos terapêuticos primários, as enzimas da via Kennedy de biossíntese de PC em fungos, e suas vias regulatórias associadas, possuem proteínas presentes apenas nesses organismos, como a proteína Sec14, e sua associação com a fosfotransferase Cpt1 (Howe e McMaster, 2016; McMaster, 2017).

Por fim, estudos nessa área com *C. neoformans* estão em seu início, mas Konazerwska e colaboradores (2019) conseguiram provar que a síntese de PS pela enzima Cho1 (**Figura 6**) é essencial para a viabilidade deste fungo e função mitocondrial, e esses resultados só puderam ser observados pela inibição com sulfato de cobre (CuSO₄), pois o mutante com deleção gênica de *CHO1* era inviável. Além do mais, foi descoberto que a bleomicina, um medicamento quimioterápico, altera a síntese desse fosfolipídio pela inibição de Cho1 (Pokharel et al., 2022). Dessa forma, este estudo pretende explorar se a biossíntese de fosfatidilcolina pela via CDP-DAG e via Kennedy possuem papel nos fenótipos associados à virulência desse organismo.

2. JUSTIFICATIVA

C. neoformans é um dos primeiros fungos na lista de prioridades de fungos patógenos da OMS (2022), sendo agente etiológico de uma das doenças fúngicas que mais matam pessoas por ano. A criptococose, principalmente a MC, é uma infecção persistente, de difícil resolução e existem poucas opções efetivas de antifúngicos, entre elas a AmB, que está no mercado há mais de 50 anos e possui efeitos colaterais nocivos ao paciente. Devido aos obstáculos apresentados no tratamento da MC, faz-se necessário ampliar os estudos e conhecimentos sobre a biologia celular de *C. neoformans*, à procura de novos alvos terapêuticos. Assim, baseando-se em estudos que demonstram o envolvimento da biossíntese de fosfolipídios na virulência de fungos patogênicos, e considerando que essas vias foram pouco estudadas em *C. neoformans*, esse estudo investiga o papel das vias biossintéticas de PC na patobiologia desse fungo.

3. OBJETIVOS

Analisar o impacto da interrupção gênica de diferentes vias da biossíntese de PC na biologia celular e virulência do fungo patogênico *C. neoformans*.

Objetivos específicos:

1. Procurar em bancos de dados os genes das enzimas chaves que catalisam as últimas reações da síntese de PC pela via CDP-DAG e via alternativa Kennedy.

2. Construir mutantes, utilizando técnica de deleção gênica por biobalística, que possuem deleção nos genes de cada via ou das duas simultaneamente.

3. Realizar ensaios para averiguar o impacto da deleção dos genes das vias de biossíntese de PC nos fenótipos associados à virulência do fungo.

4. Averiguar suscetibilidade dos mutantes a antifúngicos convencionais, principalmente da classe dos azóis e poliênicos que afetam a estabilidade da membrana plasmática.

5. Avaliar interação patógeno-hospedeiro aplicando as cepas mutantes em ensaios *in vitro* com macrófagos de camundongos e *in vivo* com modelo de infecção em *Galleria mellonella*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens e inóculo

As linhagens de fungo utilizadas neste estudo estão descritas na **Tabela 1**. Os fungos foram armazenados a -80°C em tubos com uma mistura de 75% YPD e 25% glicerol. Para utilização em experimentos, salvo exceções, as cepas eram retiradas do freezer -80°C, a cada 15 dias, e cultivadas em placas de YPD sólido (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% dextrose, 1,5% ágar, pH 5,6) a 30°C por 48 h a 72 h. As colônias isoladas de cada cepa foram utilizadas para inóculo em YPD líquido 24 h antes de cada experimento.

Linhagem	Descrição e código GenBank	Origem
KN99a	Linhagem selvagem (<i>Wt</i>)	Biblioteca de mutantes do (Brown et al., 2014)
pct1 Δ	Mutante deletado para PCT1 (CNAG_00424)	Mutante construído neste estudo
ept1 \Delta	Mutante deletado para <i>EPT1</i> (CNAG_06543)	Biblioteca de mutantes do (Brown et al., 2014)
opi3 A	Mutante deletado para OPI3 (CNAG_06839)	Biblioteca de mutantes (Brown et al., 2014)
opi $3\Delta pct1\Delta$	Duplo mutante deletado para <i>PCT1</i> e <i>OPI3</i> (CNAG_00424 e CNAG_06839)	Mutante construído neste estudo
<i>pct1</i> ∆::NEO::PCT1	Reconstituído $pct1\Delta + PCT1$	Reconstituído construído neste estudo
opi3∆::NEO::OPI3	Reconstituído $opi3\Delta + OPI3$	Reconstituído construído neste estudo
<i>орі3Δрсt1</i> Δ::NEO::PCT1	Reconstituído $pct1\Delta opi3\Delta + PCT1$	Reconstituído construído neste estudo
opi3Apct1A::NEO::OPI3	Reconstituído $pct1\Delta opi3\Delta + OPI3$	Reconstituído construído neste estudo

Tabela 1: Linhagens do fungo C. neoformans utilizadas neste estudo

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2. Sequências genéticas dos genes que codificam as enzimas hipotéticas das vias de PC e oligonucleotídeos utilizados

Obteve-se inicialmente as sequências previamente anotadas dos genes relacionados à síntese de PC da cepa H99 que estão presentes no banco de dados FungiDB

<<u>http://fungidb.org</u>>, sequências genéticas encontradas de *C. neoformans* e genes equivalentes em leveduras estão indicadas na **Tabela 2**. A partir da sequência de nucleotídeos, CNAG_00424 (*Cn PCT1*), foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores de reação de polimerase em cadeia (PCR) (**Tabela 3**) com a ferramenta Primer3 <<u>https://primer3.ut.ee/></u>, para executar a deleção gênica na cepa parental e no mutante com deleção em *Cn OPI3*. Foram encontrados mutantes com deleção das sequências CNAG_06543 e CNAG_06839 na biblioteca de mutantes do laboratório de Hiten Madhani (Brown et al., 2014).

 Tabela 2: Sequências genéticas das vias de síntese de PC de C. neoformans, utilizadas neste estudo, e genes

 equivalentes em outras leveduras.

C. neoformans (Código GenBank)	S. cerevisiae (Código GenBank)	C. albicans (Código GenBank)
CNAG_00424	<i>PCT1</i> (YGR202C)	<i>PCT1</i> (C4_00570C_A)
CNAG_06543	CPT1/EPT1 (YHR123W)	<i>EPT1</i> (C7_02690C_A)
CNAG_06839	<i>OPI3</i> (YJR073C)	<i>PEM2</i> (C3_06570C_A)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3: Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste estudo e os respectivos alvos.

(continua)

Iniciador	Nome	Sequência 5'-3'	Alvo
1	LF583	TCCAGCCTCTGAGAATAGTT	DJ-PCR (PCT1)
			Reconstituição (PCT1)
2	LF584	ATCATGTCATAGCTGTTTCCTGGCAGT GATAGTATAGAGCTG	DJ-PCR (PCT1)
3	LF20	CAGGAAACAGCTATGACATGAT	DJ-PCR (PCT1)
4	LF585	CACAGTTTGCCAGTGATAC	DJ-PCR (PCT1) Confirmatório
5	LF586	CTGACCTATTGCATCTCCCGC	DJ-PCR (PCT1) Confirmatório
6	LF21	GTAAAACGACGGCCAGTGC	DJ-PCR (PCT1)

Tabela 3: Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste estudo e os respectivos alvos.

(conclusão)

_			
7	LF587	<i>GCACTGGCCGTCGTTTTAC</i> CTGTACT	DJ-PCR (PCT1)
		ACTCGCTATCGTT	
			DJ-PCR (PCT1)
8	LF588	GGTGTTTATCCTGAAGTGG	Reconstituição (PCT1)
	1.5500		
9	LF589	CTACCAGAAGCCCTTTAATC	Confirmatorio externo ao locus (PCTT)
10	1.540.5		
10	LF495	CCATCICICAACGCCATCITC	Confirmatório interno (PCTI)
	LEADE		
11	LF496	TCGACCCTCAGATGTTCCTGT	Confirmatório interno (PCTI)
10	1 1500		
12	LF590	CICCCIAICCACACIAACC	Confirmatorio externo ao locus (PCTT)
13	LF575	ATTCCCTTCCCTTCCCGTCTA	Reconstituição (OPI3)
14	LF576	CCGAGATAAGTGCCAGTGACA	Confirmatório interno (OPI3)
15	LF577	TTGTACGCCTTTGTTGCCATG	Confirmatório interno (OPI3)
16	LF578	GAGAAATGTCGGTAGGCGGAT	Reconstituição (OPI3)

As caudas de nucleotídeos dos iniciadores 2 e 7, necessárias para fusão dos fragmentos da região flanqueadora com os fragmentos da marca de seleção, estão representadas em vermelho. Fonte: Elaborada pelo autor.

Por conseguinte, a partir das sequências de aminoácidos dos genes presentes na Tabela 2, foram realizados alinhamentos utilizando a ferramenta BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) <<u>https://blast.ncbi.nlm.nih.gov</u>> para se obter sequências similares em outras espécies. Também foi feita análise de domínios conservados utilizando o banco de dados do National Center for *Biotechnology* Information (NCBI) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi. A visualização dos alinhamentos foi executada com o programa Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> em conjunto com Jalview v.2.11.2 (Waterhouse et al., 2009), utilizando-se as sequências do respectivo gene da via de biossíntese de PC, encontrados em C. neoformans, C. albicans, Aspergillus fumigatus, S. cerevisiae, e Homo sapiens. As sequências alinhadas foram utilizadas programa Sequence *Manipulation* Suite: Ident and Sim no <<u>https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html</u>>, e no SIM - Alignment Tool for *Protein Sequences – Expasy* <https://web.expasy.org/cgi-bin/sim/sim.pl?prot>, para análise de identidade e similaridade dos domínios conservados das sequências.

4.3 Extração de DNA genômico

As extrações de DNA genômico das células de C. neoformans foram realizadas conforme protocolo adaptado Smash and Grab (Hoffman, Winston, 1987). Células de culturas crescidas a 30°C por 24h a 48h em 5 mL de YPD líquido foram lavadas três vezes, centrifugando (velocidade $2000 \times g$) por 5 min, descartando o sobrenadante e ressupendendo em salina (NaCl 0,9%), e na última lavagem, foram ressuspendidas em tubos de 1,5 mL com 500 µL de tampão TENTS (Tris HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM; Triton 2%; SDS 1%) e 200 µL de pérolas de vidro (diâmetro: 400 µm - 600 µm, Sigma). Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, 25:24:1 (Bioagency), e os tubos foram agitados em vórtex por 10 min. Após agitação, os tubos foram centrifugados (13 $300 \times g$) por 15 min para ser coletado o sobrenadante contendo o DNA. Foram adicionados aos sobrenadantes 50µL de acetato de sódio (NaOAc) 3 M e 1 mL de álcool etílico (EtOH) 100%, para precipitação do DNA. Em seguida, os tubos foram centrifugados (13.000×g) por 15 min, descartado o sobrenadante e adicionados 200 µL de EtOH para lavar o DNA. Após leve agitação, os tubos foram novamente centrifugados $(13.000 \times g)$ por 5 min, retirando-se com pipeta o excesso de álcool e mantendo-se os tubos abertos para secar. Por fim, foram adicionados aos tubos 50 µL de H₂O milliQ com 150 µg/mL de RNAse A para serem incubados a 37°C por 4 a 12 h. A concentração do DNA foi avaliada em nanoespectrofotômetro (NanoDrop) e a integridade analisada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 μg/mL.

4.4. Construção dos mutantes

Para a construção dos mutantes $pct1\Delta$ e $opi3\Delta$ $pct1\Delta$, na linhagem parental KN99 α , foram utilizados os cassetes de deleção gênica, que substituiriam a região codificadora (*Open Reading Frame* - ORF) dos genes alvos a partir da recombinação gênica homóloga, que utiliza biobalística para levar ao núcleo da célula os fragmentos de DNA flanqueadores do gene de interesse contendo a marca de seleção. Esse cassete de deleção foi construído conforme **Figura 8**, constituído pelas regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene *PCT1* por uma sequência genética composta pelo gene da marca de seleção de resistência ao antibiótico Higromicina B, *HYG^R*, presente no plasmídeo pPZP-HYG2 (Contendo gene *HPH*, controlado por promotor de actina e terminador *TrpC* de *C. neoformans. Walton* et al., 2005). A deleção gênica foi realizada em três etapas, conforme o protocolo de Kim et al., 2009.



Figura 8: Procedimento para transformação do *C. neoformans* utilizando fragmentos da marca de seleção HYG. Inicialmente, as regiões flanqueadores 5' e 3', do gene alvo, foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores 1 (LF584) e 2 (LF584), e, 7 (LF587) e 8 (LF 588), respectivamente. Os fragmentos 5' e 3' do marcador HYG, também foram amplificados com os iniciadores 3 (LF20) e 4 (LF585), e, 5 (LF586) e 6 (LF21), respectivamente. Na segunda etapa, o fragmento 5' da região flanqueadora e 5' do marcador HYG, foram fusionados e amplificados através de reação de PCR utilizando os iniciadores 1 e 4 (*Double joint* PCR). O mesmo foi feito com a região 3' dos fragmentos utilizando os iniciadores 5 e 8. Os dois fragmentos foram reunidos e inseridos no núcleo da célula pela técnica de biobalística, onde três eventos de recombinação homóloga substituíram o gene desejado pelo cassete com a marca de seleção. PCT1, gene da colina citidiltransferase. HPH, gene de resistência à Higromicina B. *PACT*, promotor do gene da síntese de actina, ACT. *TTRPC*, região terminadora do gene da síntese de triptofano, TRPC. Figura adaptada de Kim et al., 2009.

4.4.1. Amplificação dos fragmentos do cassete de deleção

Conforme **Figura 8**, os quatro fragmentos iniciais do cassete de deleção, constituído pela região flanqueadora 5' do gene alvo (1 + 2), região 5' da marca de seleção HYG^R (3 + 4), região 3' da marca de seleção HYG^R (5 + 6), e região flanqueadora 3' do gene alvo (7 + 8), foram amplificados através de reação polimerase em cadeia (PCR), utilizando os iniciadores

necessários (Figura 8 e Tabela 2) para a enzima Taq DNA polimerase iniciar a reação em cadeia.

As PCRs foram realizadas com cinco unidades (5U) da enzima EasyTaq DNA Polymerase (TRANS), dNTPs 0,4 μ M, 100 ng de DNA genômico/50 ng de DNA plasmidial, e 0,4 μ M dos pares de iniciador em cada tubo. Foi utilizado o termociclador (Applied Biosystems Veriti, Thermo Fisher) com o seguinte ciclo de reação:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	2 minutos	1×
94°C	30 segundos	
53°C	30 segundos	35×
72°C	1:40 segundos	
72°C	5 minutos	1×
4°C	Indeterminado	-

Após as reações de amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, fotografando-se o gel em um fotodocumentador com luz ultravioleta (302 nm). Em seguida, os fragmentos foram purificados utilizando-se o Kit de Purificação de PCR, de acordo com as instruções do fabricante (MEBEP Bio Science). A concentração de cada fragmento foi verificada em nanoespectrofotômetro.

4.4.2 Construção dos cassetes de deleção gênica

Os cassetes com a marca de seleção de resistência à Higromicina B, utilizados na deleção gênica, foram preparados a partir da união dos fragmentos iniciais da etapa anterior, pela técnica de *Double-Joint Polymerase Chain Reaction* (DJ-PCR). Esse procedimento permite utilizar como molde em uma PCR, fragmentos amplificados, 1 + 2 e 3 + 4 (**Figura 8**), para amplificação de um só fragmento, 1 + 4 (**Figura 8**), compondo a metade 5' da marca de seleção, sendo realizado o mesmo com as sequências, 5 + 6 e 7 + 8 (**Figura 8**), para construir a metade 3', 5 + 8 (**Figura 8**). Essa reação é possível devido à presença de uma cauda nos iniciadores 2 e 7

(**Tabela 3**), formada por uma sequência de aproximadamente 20 nucleotídeos reversamente complementares às regiões terminais 5' e 3' do gene *HPH*, respectivamente, possibilitando a união desses fragmentos pela polimerização do DNA.

A amplificação dos cassetes de deleção 1 + 4 e 5 + 8 (**Figura 8**) para deleção do gene CNAG_00424 em *background* KN99 α , foi efetuada por DJ-PCR a partir de 20ng de cada par dos fragmentos iniciais (1 + 2 e 3 + 4; 5 + 6 e 7 + 8), utilizando-se 5U da enzima LongAmp[®] *Hot Start* Taq DNA Polimerase (NEB), 0,4 μ M de cada iniciador e 0,4mM de dNTPs em cada tubo.

Ciclo de reação:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	30 segundos	1×
94°C	30 segundos	
53°C	1 minuto	35×
65°C	2:05 segundos	
65°C	10 minutos	1×
4°C	Indeterminado	-

Os fragmentos desejados foram isolados de gel de agarose 1,5% e purificados utilizandose o kit, *Gel DNA Purification*, conforme instruções do fabricante (MEBEP Bio Science). Após purificação, os fragmentos foram analisados por eletroforese para se avaliar a integridade e pureza, e em seguida, averiguou-se a concentração de DNA das amostras em nanoespectrofotômetro para fazer ajuste de aproximadamente 1000 ng de cada fragmento por tiro de biobalística.

4.4.3 Deleção gênica por biobalística
A deleção dos genes das enzimas de biossíntese de PC por biobalística foi realizada utilizando o protocolo adaptado de Toffaletti et al., 1993. Esse método exige a precipitação de 1000 ng de cada fragmento do cassete de deleção em micropartículas de tungstênio estéreis pipetadas sobre uma membrana de ruptura inserida em um disco carreador. O disco é encaixado na máquina de biobalística PDS-1000/He (Bio-Rad), que utiliza gás Hélio (He) para gerar pressão alta o suficiente (aproximadamente 1300 psi) para romper a membrana e projetar as partículas em alta velocidade sobre o fungo posicionado em uma placa de Petri abaixo da membrana.

As cepas utilizadas para biobalística, KN99 α e *opi3* Δ , foram crescidas por 48h em 80mL de YPD, e as células dos cultivos foram lavadas com solução salina (NaCl 0,9%), sendo ressuspendidas em 5 mL de salina, utilizado para inocular toda a superfície das placas de Petri com 20 mL de YPD + D-Sorbitol 1M (necessário como estabilizante osmótico), suplementadas ou não, com 100 μ M de fosfocolina (Sigma-P0378), 100 μ g/mL de fosfatidilcolina (Sigma-P5394), ou 1% lecitina de soja em álcool. Após os tiros, as placas foram incubadas a 30°C por 24 h e posteriormente a superfície das placas com o fungo foi lavada com solução salina, transferindo-se a suspensão para cada placa contendo 50 mL de YPD + 200 μ g/mL de Higromicina B suplementadas ou não, como descrito anteriormente, e incubando-as por aproximadamente uma semana a 30°C. A Higromicina B possui a função de selecionar apenas as células que tiveram o gene de resistência recombinado e inserido em seu genoma, permitindo o crescimento apenas dos transformantes.

4.5 Reconstituição dos mutantes por PCR

Para reconstituição dos mutantes $pct1\Delta$, $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$, foram amplificados por PCR os genes PCT1 e OPI3 utilizando os iniciadores 1 + 8 e 13 + 16, respectivamente (**Figura 9** e **Tabela 3**). Nos tubos de reação, foram adicionados 100 ng de DNA genômico da cepa KN99 α , 5U da enzima LongAmp[®] *Hot Start* Taq DNA Polimerase (NEB), 0,4 μ M dos respectivos pares de iniciador e 0,4mM de dNTPs. Ciclo de reação:

Temperatura	Femperatura Tempo	
94°C	2 minutos	1×
94°C	30 segundos	
52°C	30 segundos	35×
65°C	3:30 segundos	
65°C	10 minutos	1×
4°C	Indeterminado	-

Foi avaliada a concentração e integridade dos cassetes conforme descrito previamente. A biobalística foi executada conforme descrita anteriormente, realizando-se uma cotransformação, utilizando 1000 ng do cassete 1 + 8 e 1000 ng do plasmídeo pJAF1 (plasmídeo que contém o gene de resistência a neomicina ou G418, *Neo^R*, controlado por promotor e terminador de actina de *C. neoformans*. Fraser et al., 2003) para cada tiro de biobalística. As placas de transformação foram incubadas por 24h e lavadas para transferência das células para placas de seleção (YPD ágar + 200 µg/mL de Neomicina). As colônias que cresceram em meio seletivo foram utilizadas para triagem.

A triagem dos reconstituídos foi realizada utilizando ágar YPD + Neomicina 200 μ g/mL para selecionar os transformantes resistentes. Ademais, para selecionar os reconstituídos *opi3* Δ ::OPI3 e *opi3* Δ *pct1* Δ ::OPI3, foram utilizadas placas com ágar meio mínimo (MM) quimicamente definido (ágar 1,5%, Dextrose 15 mM, MgSO₄ 10 mM, Glicina 13 mM, KH₂PO₄ 29,4 mM e Tiamina 3 μ M, pH 5,5), pois foi verificada anteriormente a inibição do crescimento dessas cepas em meio mínimo não suplementado. Também foi utilizadas placas de MM ágar suplementadas com cloreto de colina 1mM para recuperar a síntese pela via Kennedy conforme McGraw e Henry (1989), selecionando as colônias que cresceram nessa condição.



Figura 9: Iniciadores e fragmentos de DNA utilizados para a reconstituição gênica e confirmação de deleção e reconstituição por PCR. (a) Os iniciadores 1 (LF583) + 8 (LF588), foram utilizados para amplificação do gene *PCT1* para reconstituição. A confirmação de deleção e reconstituição de *PCT1* foi realizada utilizando os iniciadores 11 (LF496) + 10 (LF495) para amplificação do fragmento interno do gene. (b) A confirmação de deleção e inserção do cassete da marca de seleção HYG foi realizada com a amplificação dos fragmentos externos ao *locus*, utilizando os iniciadores 9 (LF589) + 4 (LF585) e 5 (LF586) + 12 (LF590). (c) Para reconstituir o gene *OP13*, foi amplificado o gene com a utilização dos iniciadores 13 (LF575) + 16 (LF578). A confirmação de reconstituição foi realizada com a amplificação do fragmento interno do gene com os iniciadores 15 (LF577) + 14 (LF576). Figura elaborada pelo autor.

4.6 Confirmação da deleção e da reconstituição gênica dos transformantes

Para confirmação da deleção gênica dos transformantes, foi realizada a passagem das colônias das placas de transformação para placas com ágar YPD sem Higromicina B e incubadas a 30°C por dois dias. Em seguida, outra passagem para placas com ágar YPD + 200µg/mL de Higromicina B foi efetuada, testando assim a estabilidade mitótica da marca de seleção. Por conseguinte, foram selecionados transformantes para extração de DNAg, previamente descrita, e subsequente realização das PCRs de confirmação de deleção. Foi

necessário efetuar duas etapas de confirmação: a primeira com amplificação de um fragmento interno do gene alvo utilizando os iniciadores 10 + 11 (**Figura 9** e **Tabela 3**), e depois, a partir do DNA dos transformantes que não amplificaram, foi efetuada mais uma reação com os iniciadores 9 + 4 e 5 + 12 (**Figura 9** e **Tabela 3**), cujos fragmentos resultantes indicariam a presença da marca de seleção inserida corretamente no lócus do gene deletado.

A confirmação de deleção do gene PCT1 em KN99 α e no mutante *opi3* Δ , foi executada com PCR confirmatória, utilizando em cada tubo de reação: 2,5 U da enzima EasyTaq DNA Polymerase (TRANS); aproximadamente 200 ng de DNA dos transformantes, cepa selvagem ou mutante *opi3* Δ , como controle positivo; dNTPs 0, 2mM; e 0,4 µM dos pares de iniciador 10 + 11 (**Tabela 3**).

Temperatura	iperatura Tempo Ciclos	
94°C	2 minutos	1×
94°C	30 segundos	
60°C	30 segundos	35×
72°C	15 segundos	
72°C	5 minutos	1×
4°C	Indeterminado	-

Ciclo de reação:

Foram escolhidos os DNAs dos transformantes que não amplificaram o fragmento 10 + 11 para a etapa seguinte de confirmação da recombinação homóloga das regiões 5' e 3' da marca de seleção. Para esse fim, foram utilizados em cada tubo de reação: 5 U da enzima LongAmp[®] *Hot Start* Taq DNA Polimerase (NEB); 200 ng de DNA de cada transformante, cepa selvagem ou mutante *opi3* Δ , como controle negativo; 0,3 mM de dNTPs e 0,4 μ M dos pares de iniciadores 9 + 4 ou 5 + 12 (**Tabela 3**).

Ciclo de reação:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	2 minutos	1×
94°C	30 segundos	
54°C	30 segundos	35×
65°C	2:05 segundos	
65°C	10 minutos	1×
4°C	Indeterminado	-
4°C	Indeterminado	-

Como descrito, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose, e foram escolhidos os transformantes que amplificaram ambos os fragmentos do cassete de deleção, confirmando deleção gênica dos mutantes $pct1\Delta$ e duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$.

Para confirmação de reconstituição dos genes PCT1 nas cepas $pct1\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$, e OPI3 nas cepas $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$, foram extraídos os DNAs dos transformantes e executadas PCRs com os iniciadores do fragmento interno dos genes, 10 + 11, para PCT1, e 14 + 15, para OPI3 (**Tabela 3**). Cada tubo de PCR continha a enzima EasyTaq DNA Polymerase (TRANS) 2,5 U, dNTPs 0,4 µM, aproximadamente 200 ng de DNA genômico dos transformantes e dos mutantes, como controle negativo, além de 0,4 µM dos pares respectivos de iniciadores.

Ciclo de reação:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	2 minutos	1×
94°C	30 segundos	
52°C	30 segundos	35×
72°C	32 segundos	
72°C	5 minutos	1×
4°C	Indeterminado	-

Após análise das PCRs por eletroforese, foram escolhidos os transformantes que amplificaram o fragmento interno do gene, confirmando reconstituição.

4.7. Caracterização fenotípica dos mutantes

Os mutantes descritos na **Tabela 1** foram utilizados nos testes de caracterização fenotípica. Para execução dos ensaios as cepas foram cultivadas e lavadas com salina conforme descrito anteriormente, e a concentração celular era obtida por contagem em Câmara de Neubauer, tendo a densidade celular ajustada para utilização específica em cada teste.

4.7.1 Curvas de crescimento

Investigou-se a taxa de crescimento de cada mutante em meio YPD líquido e em MM líquido, em diferentes temperaturas, 30 °C e 37 °C. As células dos mutantes e suas linhagens selvagens foram inoculadas no meio de cultura a ser utilizado, com densidade celular final de 5 x 10^4 células/mL. Posteriormente foram transferidos 200µL de cada inóculo para poços de microplaca de 96 poços. Foram realizadas duplicatas ou triplicatas técnicas para cada cepa e duas replicatas biológicas.

As placas foram incubadas em espectrofotômetro de microplacas (Epoch 12, software Gen5 v.3.11, Biotek), em temperatura de 30 °C ou 37 °C, agitadas a 180 cpm ao longo de 96 h a 120 h, com intervalos de leitura de densidade ótica (OD 600 nm) de 30 minutos. As análises estatísticas foram realizadas com os resultados de OD 600 nm em pontos específicos da curva, utilizando o programa GraphPad Prism versão 8 para Windows < <u>https://www.graphpad.com/</u>>. Foram aplicados o teste de análise de variância de uma via (*One-Way* ANOVA), com correção de Tukey para múltiplas comparações.

4.7.2 Teste de suscetibilidade a agentes estressores

As células lavadas e ressuspensas em solução salina foram ajustadas para densidade celular inicial de 2×10^8 ou 2×10^7 células/mL e subsequentemente foram diluídas seriadamente a concentrações de 2×10^3 ou 2×10^2 células/mL, sendo inoculados 5 µL de cada diluição em placas de YPD ágar (pH 5,6) com diferentes agentes estressores (**Tabela 4**). As placas foram

incubadas a 30°C e foram visualmente observadas a cada 24 horas e fotografadas após surgimento das colônias (Hu e Kronstad, 2010).

Para a preparação dos diferentes meios estressores, adicionou-se o Vermelho do Congo (Sigma), Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28, Sigma) ou cloreto de sódio (NaCl), diretamente no preparo do YPD ágar antes de autoclavar por 15 minutos, enquanto o nitrito de sódio (NaNO₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou dodecil sulfato de sódio (SDS), foram previamente solubilizados em água destilada e esterilizados por filtração, adicionando-se essas soluções ao YPD ágar derretido, já autoclavado. As concentrações de uso de cada composto estão indicadas na **Tabela 4**.

Agente estressor	Concentração em meio YPD	Mecanismo de ação
H_2O_2	3 mM	Estresse oxidativo
NaNO ₂	2 mg/mL	Estresse oxidativo
Vermelho do Congo	0,5%	Estresse de parede celular
Calcofluor White	1,5 mg/mL	Estresse de parede celular
SDS	0,02%	Estresse de membrana plasmática
NaCl	1 M	Estresse osmótico

Tabela 4: Agentes estressores, concentração e mecanismos de estresse

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5.3 Ensaio de melanização

O fenótipo de melanização foi avaliado conforme protocolo adaptado de Eisenman e colaboradores (2011). Foram inoculadas 1×10^7 células de cada cepa em placas de MM ágar suplementado com L-DOPA 1mM (Sigma-Aldrich) com ou sem cloreto de colina 1 mM. As placas foram incubadas a 30°C por uma semana e protegidas da luz. As placas foram fotografadas nas mesmas condições de local e luminosidade em intervalos de tempo definidos, 72 h, 96 h e 120 h.

4.5.4 Indução de cápsula polissacarídica

A capacidade de expansão de cápsula polissacarídica foi determinada a partir da inoculação de 2×10^7 células em 2 mL de meio indutor de cápsula, em placa de cultivo de 12 poços. O meio de indução é composto de Sabouraud Difco líquido (receita DifcoTM : peptona 0,5%, extrato de carne 0,5%, dextrose 4%, pH 5,6) diluído em proporção 1:10 em tampão de sal sódico de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS 50mM, pH 7,3), conforme Zaragoza e Casadevall (2004). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, e, posteriormente, foram retirados 1mL de cada cultivo para observação da cápsula com tinta nanquim (células em 80 µL de solução salina + 20 µL de tinta nanquim, proporção 1:5). A tinta nanquim é um pigmento com propriedades iônicas que não consegue se difundir pela cápsula polissacarídica não-iônica, possibilitando a visualização de sua estrutura em contraste com o meio.

As lâminas foram preparadas com 5µL da suspensão de células com tinta nanquim e fotografadas em microscópio Nikon (ECLIPSE Si), com câmera acoplada (RoHS, BC1200), em objetiva de 100×. O diâmetro capsular de 100 células por cepa foi medido a partir do diâmetro total deduzido do diâmetro do corpo celular. As medições foram executadas com auxílio da ferramenta de análise e processamento de imagens, ImageJ v.1.53r < <u>https://imagej.net/ij/</u>>, e para as análises estatísticas, aplicou-se teste *One Way* ANOVA não com correções de Dunnett. Foram realizadas duas replicatas técnicas e biológicas.

4.5.6 Ensaio de secreção de fosfolipase

Para investigar a capacidade dos mutantes de secretar fosfolipases, foram preparadas placas de ágar gema de ovo (Chen et al., 1997). Inicialmente, o meio base (Peptona 1%, glicose 2%, NaCl 5,7%, cloreto de cálcio 0,055%, ágar 2%) foi autoclavado e resfriado até aproximadamente 55°C e adicionou-se solução de gema de ovo (50% gema de ovo e 50% salina) em proporção 1:5. As placas prontas foram então inoculadas com 1×10^7 células de cada cepa em 5µL de inóculo. Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C por 48 h e fotografadas para medição das colônias e dos halos de precipitação no programa ImageJ v.1.53r < <u>https://imagej.net/ij/</u>>. As colônias de cepas que secretam fosfolipases formam um halo de precipitação, Pz, obtido pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total com precipitado. Valores de Pz = 1 indicam fenótipo negativo para secreção de fosfolipase enquanto Pz < 1 indicam fenótipo positivo, e Pz < 0,5, muito positivo. Foram realizados dois testes com

duplicata técnica para cada cepa, e a análise estatística feita por *One Way* ANOVA com correção de Tukey para múltiplas comparações.

4.5.7. Análise de secreção de urease

Para averiguar a secreção extracelular da enzima urease, foram utilizados 10 mL de meio de *Christiansen* sólido (peptona 0,01%, NaCl 0,05%, KH2PO4 0,02%, vermelho de fenol 0,0016%, dextrose 0,1%, ureia 2%, ágar 2%, pH 5,5), em placas de Petri pequenas (Canteros et al., 1996). O vermelho de fenol presente no meio muda sua coloração amarelada em pH ácido para tons mais rosados conforme o pH alcaliniza, consequência da hidrólise da ureia em amônia (NH₃), uma base fraca, pelas enzimas secretadas.

Foram inoculadas 10⁷ células em cada placa com ágar *Christiansen*. Em seguida, os tubos foram incubados a 30°C por 24 h a 72 h. As placas foram fotografadas nas mesmas condições de local e luminosidade a cada 24 horas. Foram feitas duplicatas técnicas de cada cepa em dois experimentos repetidos.

4.6. Ensaio de suscetibilidade a antifúngicos

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos, anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cerulenina, foi avaliada nas cepas de linhagem KN99 α , de acordo com o protocolo adaptado de microdiluição em placa, EUCAST (v. E def. 7.4, 2023). As placas foram preparadas utilizando meio líquido RPMI 1640 (com L-glutamina e indicador de pH sem bicarbonato) suplementado com glicose para uma concentração final de 2%, tamponado com 0,165 mol/L de MOPS, e pH ajustado para 7.0. Fez-se uma diluição em série dos antifúngicos 1:2 para atingir concentrações finais de 8 μ g/mL a 0,032 μ g/mL de anfotericina B e itraconazol, e 64 μ g/mL a 0,125 μ g/mL de fluconazol. Cada poço tinha 100 μ L de RPMI 1640 com antifúngico.

Os fungos foram previamente cultivados em YPD líquido por 24h a 30°C, e após lavagem e ressuspensão das células, estas foram contadas em Câmara de Neubauer para ajustar concentração celular em RPMI 1640 com uma densidade celular de 5×10^5 células/mL. Foram inoculados 100 µL por poço com os inóculos de cada cepa em duplicatas, e seguidamente, as

placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As análises das placas foram realizadas visualmente e por leitura de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), que, para a anfotericina B, é a concentração que inibe ao menos 90% do crescimento fúngico, enquanto para o itraconazol e fluconazol é aquela que inibe ao menos 50% do crescimento.

4.7. Ensaio de interação com macrófagos murinos derivados de medula óssea

4.7.1 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos

Os camundongos (*Mus musculus*) utilizados neste estudo – linhagem C57BL/6 selvagem (WT), foram mantidos no biotério da Universidade de Brasília com água e comida *ad libitum* e utilizados para experimentação quando atingiram entre 8 e 12 semanas de idade. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o projeto aprovado pelo Conselho de Ética da Universidade de Brasília (Processo SEI n° 23106.113772/2020-80).

Os ensaios de fagocitose foram realizados conforme protocolo adaptado de Nicola e Casadevall (2012). Para obtenção dos macrófagos, foi realizada lavagem, com tampão PBS, da medula óssea do fêmur de camundongos, e as células foram ressuspendidas em RPMI 1640 (com L-glutamina e indicador de pH, sem bicarbonato de sódio) suplementado com 100μ g/mL de gentamicina. Foi adicionado tampão de lise para eliminar as hemácias presentes, e as células foram então contadas em Câmara de Neubauer para transferir 2×10^6 células/mL em placas de Petri com 10mL de meio RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), além de 20 ng/mL do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF, ImmunoTools), e 50 μ M de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

As placas foram armazenadas em incubadora a 37°C, sob atmosfera de 5% CO₂ por 8 dias, adicionando 10mL de meio estimulador no 3° dia e renovando com 10 mL de meio no 6° dia. No 8° dia, as placas tiveram o sobrenadante descartado, e os macrófagos, agora aderidos na superfície do fundo, foram incubados por 30 minutos em solução TrypLETM para desaderi-los. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS e os macrófagos recuperados foram contados em Câmara de Neubauer, ressuspendidos em RPMI 1640 + 10% SFB, e 5 × 10⁴ células por poço foram transferidas em 100µL para placas de 96 poços, posteriormente incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂, por 6 horas. Após esse tempo, cada experimento teve um grupo estimulado, ou não, com IFN- γ 500 UI, e após 24 horas, no dia da interação com *C. neoformans*, o grupo tratado foi reestimulado com IFN- γ 500 UI.

4.7.2 Avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos

Para infecção dos macrófagos, as cepas mutantes e selvagem foram previamente crescidas por 24 horas em YPD líquido, as células foram lavadas três vezes com PBS, contadas em Câmara de Neubauer, e ressuspendidas em RPMI 1640. As células fúngicas foram opsonizadas em RPMI com anticorpo monoclonal anti-GXM 18B7 em uma concentração de 10 μ g/mL, e inoculadas nas placas com os macrófagos, em multiplicidade de infecção (MOI) de 5. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂, por 2 horas e 24 horas.

Após 2 horas, as placas foram lavadas com PBS para remoção de fungos em suspensão, e seguidamente, foi utilizado o Kit Panótico Rápido (LB Laborclin) para fixação e coloração hemoxilina-eosina dos macrófagos de cada poço. Os poços foram fotografados em microscópio invertido (EVOS), e foi posteriormente avaliado a cada 100 macrófagos por poço, a quantidade de macrófagos fagocíticos e o número de leveduras internalizadas. O índice fagocítico (IF) foi estipulado a partir da seguinte fórmula:

 $IF_{(\%)} = (macrófagos fagocíticos/total de macrófagos) \times n^{\circ} de leveduras fagocitadas \times 100$

4.7.3 Avaliação da atividade fungicida dos macrófagos

Para determinar a atividade fungicida dos macrófagos com os mutantes e selvagem, os macrófagos foram plaqueados em duas placas de 96 poços, com ou sem estímulo por 24 h, conforme descrito anteriormente. No dia da cocultura, após 2 h de interação, as placas foram lavadas com PBS, e em uma delas, os macrófagos foram lisados utilizando 100 μ L de uma solução de água destilada com SDS 0,05%. Esse lisado foi diluído e plaqueado em YPD ágar a 30°C por 48 horas para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Foi adicionado à outra placa, 100 μ L de RPMI + 10% SFB (IFN- γ 50 ng/mL no grupo com estímulo), e incubada por aproximadamente 24 horas, quando foi realizada novamente a lise dos macrófagos e contagem das UFCs. A atividade fungicida (AF) foi calculada com a fórmula:

 $AF_{(\%)} = \{ [média UFC (2h) - UFC (24h)] / UFC (24h) \} \times 100.$

Os dados foram analisados aplicando o teste de ANOVA de duas vias com correção de Tukey, utilizando o selvagem KN99α como controle. Foram realizadas três replicatas técnicas em duas replicatas biológicas.

4.8 Teste de infecção em modelo Galleria mellonella

Foi realizado teste de virulência *in vivo* com lagartas da espécie *Galleria mellonella* conforme Mylonakis e colaboradores (2005). As lagartas no último estágio larval foram pesadas, separando as que tinham peso acima de 200 mg para o experimento. No dia da infecção, as células de cada cepa de *C. neoformans* foram ressuspendidas em PBS e o inóculo foi ajustado para concentração de 5×10^6 célula/mL. As lagartas foram infectadas na última perna abdominal esquerda, inoculando-se 10 µL com uma seringa Hamilton estéril, e em seguida, foram incubadas a 37°C. Para cada linhagem testada foram utilizadas 12 lagartas e um grupo como controle negativo foi inoculado com apenas PBS. Diariamente, foram contadas as lagartas vivas até o 10° dia. Para a análise dos dados foram feitos teste de Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

4.9 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos

5. RESULTADOS

5.1 Sequências dos genes que codificam as enzimas da biossíntese de PC

5.1.2 CNAG_00424 codifica Pct1 em linhagem H99

CNAG_00424 (H99), é a sequência codificadora da provável fosfocolina citidiltransferase (Pct1) em *C.neoformans. PCT1* tem cinco éxons, gerando apenas um transcrito com 1362 nucleotídeos, traduzidos em uma proteína de 453 aminoácidos. Análises dos domínios conservados indicam a presença do motivo de CTP:fosfocolina citidiltransferase (*e-value* = 1.1e-23) com maior porcentagem de identidade (50,0 %) à *PCT1* de *C. albicans*, dentre as sequências de citidiltransferase escolhidas (**Figura 10**). A sequência nucleotídica foi utilizada no desenho dos oligonucleotídeos para a construção do mutante *pct*1 Δ (CNAG_00424), e o duplo mutante *opi3\Delta pct*1 Δ em *background* KN99 α

CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	1 MSA I PPAQKRHNRNRLGERRVNRDPSSSRDASEEDNDNVENSFSDVGSMNSYHAEALSTTST I DSPTRMPPPALP	75
CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	76 PHSSS6SPGTTQAGRRSYQQRRVEELSGEGSQSEGLDSPTYDGDVESSSTIGGAPAHHQHT 1MARLTRKRTIEKELNGSSRVTRTLSMESISSLFKRNKKRKH. 1MSSPSTAAKRKRSASQHLTADIAKSSTVDLLQPSSRDASGEEGDDSTDPITPTASKNRKHT 1MANPTTGKSSIRAKLSNSSLSNLFKKNKNKRQ.	136 41 61 32
CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	137 HF RRP SF SAP VP TSD TP HPAAH TVQRQ PT PKASQ I GF SAAD YP AVP TPKATYVRP SD VP VAP SVAL DE CAR SPP T 42 NINIT DD E E Q 62 SI EVT ST GAP NPP SKRARKS SO E APAAAP NG TT EHSS AI HQE DP OE P SET TVA 33 RETE E E Q D NE OK DE SKNQ 1 MDAQCSAKVN A. RKRRKEAP OP NGATE E DG VP SK	211 65 115 51 33
CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	212 T S S I Q SPN SAGG PP KMYT RAVERTEE - D I KGF VERA I HGRGQE DG VERWWKT NP PP EG KVVR VYADOVYDLFH FG 60 - D H I D T KP NH KKR - K I KT K - A EEEFEANE KKL D EELP I D L - R KY RP RG F R F NL PP ED RP I R I YADOVF D L FH G 116 SSD I EHGATG - RP - GL H I KTAGADAET - KERL MKP PERA - GL DH PVG YHT NP PT TG RP VR YADO VF D L FH G 52 ENKD TQL T P. RKR R - L T KEFEEKEARYT NELP KEL - R KY RP KG F RF NL PP TD RP I R I YADO VF D L FH G 34 VQR CAVGL RQ PAPFSDE I EVD F SKPYVR V	285 135 184 118 91
CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	286 HALOL ROAKLSF POVHLMVGVCSDVLCAOHKSAPAMTHAERCEAVRHCRWADEVIFDAPWVVDQAFLDKHQIDYI 138 HMKQLEQAKKSF PNVELVCGIPSDIETHKRKGLTVLTDEORCETLMHCKWVDEVIPNAPWCVTPEFLOEHKIDYV 185 HMRQLEQAKKAF PNVTLIVGVTGDEETHKRKGLTVLSGRERAESVRHCKWVDEVIPNDVDVIVTPEFLEHKIDYV 194 HMRQLEQCKKAF PNVTLIVGVSDELTHKRKGLTVLTDKORCETLTHCRWVDEVVPNAPWCVTPEFLEHKIDYV 92 HARALMQAKNLFPNTYLIVGVCSDELTHNFKGFTVMNENERYDAVGHCRYVDEVVPNAPWTLTPEFLAEHRIDFV	360 210 259 193 166
CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	381 AHDEEVYPSKDHEDVYAFAKKKORFVPTRRTPAISTSDLLERIVROYRDGFFDSKLEKNGHPELLAADVDWDSSA 211 AHDDLPYASDSDDIYKPIKEOOKFLTTORTEGISTSDIITKIIRDYDDKYLMRN-FSRGATRKELNVSWLKMN 280 AHDDLPYGAAEGDDIYAPIKAOOKFLVTORTEGVSTTGIITRIIRDYDDYLARQ-FKRGASRQELNVSWIKKN 194 AHDDIPYVSAGSDDIYKPIKEMOKFLVTORTNOVSTSDIITKIIRDYDVYLMRN-FARGATRQELNVSWLKKN 187 AHDDIPYSSAGSDDIYKHIKEACMFAPTORTEGISTSDIITRIVRDYDVYARRN-LORGYTAKELNVSFINEK	435 282 331 265 238
CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	436 SVEKREKRAA <mark>H</mark> HHKVKK. 283 ELEFKKHINDFRTYWMKKKTNINNVSRDLYFEIREFMRGKKFDFQKFIEDGNS 332 ELEIKRHVMELRDSIRNNWTATGQELGRELRQLWQNSRDGSPAPSARNSMDL-GSVROGNG 266 ELEFKKHINEFRSYFKNQTNNNASRDLYFEVREILLKKTLGKKLYS.KLIGNELK 239 KYHLQERVDKVKKKVKDVEEKSKEFVQKVEEKSIDLIQKWEEKSREFIGSFLEMFGPEGALKHMLKECKG	453 335 391 321 308
CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	336 QNSSNHOSDEESTNS SKVSSP LSDFASKYIGNRNKDLNRKGILNNFKO-WINRDDHSEQET 392 GL SPTGGQKSHVSRLEALGRPDSP VGTNGRNEDFATGY SLGLIGGVRA-WMMRSRSLMES 322 KQNQRQRKQNFLDDPFTRKL IREASP ATEFANEFTGENSTAKSPDDNGNLFSQ EDDE 300 RMLQA-ISPKQ SPSSSPTRERSPSPSFRWPFSGKTSPPCSPANLSRHKAAAYDISEDE	395 452 378 365
CNAG_00424 Candida_albicans Aspergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	396 EEEIKPIVIKPIRRSRRLSGGSSTSSVPSTPVKRTASSASTTPKRKSPLKKSSSVKNTPKTK 453 RPHSPTSEDDPEPELET-TNGHGGSDRSLHASS 378 - DTNSNNTNTNSD <u>S</u> DSNTNSTPPSEDDDDNDRLTLENLTQKKKQSAN 366 - ED	457 484 424 367

Figura 10: CNAG_00424 codifica gene da enzima Pct1 na linhagem H99 de *C. neoformans.* Alinhamento de aminoácidos a partir da sequência CNAG_00424, com as fosfocolina citidiltransferases (Pct1) de *C. albicans* (GenBank: C4_00570C_A), *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank: YGR202C), *Aspergillus fumigatus* (GenBank: Afu1g09290), e *Homo sapiens* (Acesso UniProt: P49585). Os aminoácidos estão destacados conforme a conservação entre as sequências, quanto mais escuro, mais conservado. O retângulo preto representa a sequência de aminoácidos correlata ao motivo de citidiltransferase. Imagem gerada por ClustalO e Jalview v.2.11.3.2.

5.1.3 CNAG_06543 codifica Ept1 bifuncional em linhagem H99

Foi encontrada no banco de dados do FungiDB e do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), uma única sequência que codifica uma fosfolipídio fosfotransferase hipotética em *C. neoformans* (H99). A sequência encontrada, CNAG_06543, possui 6 éxons, gerando apenas um transcrito de 1.687 nucleotídeos, traduzido a uma proteína de 430 aminoácidos. As análises dos domínios conservados predizem que essa proteína possui motivo de etanolamina fosfotransferase (*e-value* = 2.3e-15), com maior porcentagem de identidade (53,6 %) à *EPT1* de *C. albicans*, dentre as sequências de etanolamina fosfotransferase escolhidas (**Figura 11**). Esse resultado condiz com o que foi demonstrado na literatura, que algumas formas dessa enzima possuem dupla afinidade, tanto para CDP-etanolamina quanto para CDP-colina (Gibellini e Smith, 2010; McMaster, 2017).

Assim, aparentemente *C. neoformans* não possui uma fosfotransferase com afinidade única à CDP-colina, e por essa razão foi realizada apenas a caracterização do mutante com deleção em *EPT1*, preferindo-se focar nos mutantes que não possuem alteração na síntese de PE para a reconstituição gênica, análise de suscetibilidade a antifúngicos e ensaios de interação patógeno-hospedeiro, *in vitro* e *in vivo*. Por fim, o mutante *ept1* Δ utilizado neste estudo possui a sequência CNAG_06543 deletada com marca de seleção de resistência a nourseotricina Nacetil transferase (NAT) e foi obtido do banco de mutantes do laboratório de Madhani (Brown et al., 2014).

CNAG_06543 Candida_albicans ASperyillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	1MRITKAQFTGLDAYKYSGIDKSVV3KYILGPF 1MGLFIPTNKLQNLKLYKYSEDHSIISKVILKKW 1MNAIFRRIKATQDTLTDEILMPLKSYKYQSVDKSYISNHILKHY 1MGFFIPQSSLGNLKLYKYQSDDRSFLSNHVLRPF 1.MSGHRSTRKRCGDSHPESPVGFGHMSTTGCVLNKLFQLPTPPLSRHQLKRLEEHRYQSAGRSLLEP.LMQGY	W 33 W 35 W 45 W 35 W 35 W 72
CNAG_06543 Candida_albicans ASpergillus_fumigatus Saccharomyces_cerevisiae Homo_sapiens	34 AWLVTLFPKILAPNTITFIGLCFVFTNVGTLLFFDPLYEGEALPSWAYFSFAFGLFAYQSMDAIDGKQARRTGMA 36 NFFVQIFPLSMAPNVVTLLGLFFIIGNLMTVFYYDPYLNE - TQPTWCYFFYAFGLFMYQTFDGCDGCHARRTGOS 48 NAFYEVLPLWIAPNMVTLLGFLFIVGNVMLIEVLMPDLIG - PGPSWLYYSFALGMWMYSTLDNVDGKQARRTGTS 38 RKFATIFPLWMAPNLVTLLGFCFIIFNVLTTLYYDPYFOG - ESPRWTYFSYAIGLFLYQTFDACDGMHARRTGQQ 73 EWLVRRVPSWIAPNLITIIGLSINICTTILLVFYCPTATE - QAPLWAYIACACGLFIYQSLDAIDGKQARRTNSS	S 109 G 110 S 120 G 110 G 110 S 147
CNAG_06543	110 ALGEMEDHGCDAINTTLEVILASHALGLNQ-SWWTVASQVASLCNFYVSTWEEYHTGTLYLSAFSGPVEGILLIV	G 184
Candida_albicans	111 PLGELFDHSIDAINTTLGTFVFASVLKMGY-GGLLLLSQFASVQNFYTSTWEEYHTHTLFLSKFSGPVEGILMIC	I 185
ASperyillus_fumigatus	121 GLGELFDHGIDSLNCTLASLLETAAMGFGS-SQLGAYTALVPCLAMYFSTWETYHTHTLYLGYINGPTEGLLVAI	G 195
Saccharomyces_cerevisiae	111 PLGELFDHCIDSINTTLSMIPVCSMTGMGY-TYWTIFSGFALLCSFYLSTWEEYHTHKLYLAFFGGPVEGILVLC	I 185
Homo_sapiens	148 PLGELFDHGCDSLSTVFVVLGTCIAVQLGTNPDWMFFCCFAGTFMFYCAHWQTYVSGTLRFGIIDVTEVQIFIII	M 223
CNAG_06543	185 IYIITAI HPLGSAFWSQPLLKPVLYLVPQLFPYVQKVDGLLESVGVWKYVRLESIPANVAFMSFGAVGTLANIVT	S 260
Candida_albicans	188 VYIITOIFGP.D.IWTIDLFELNLTSLGYGYYKVDTSIIYTIIGLTSLYFNIASAMFNVSK	(H 245
ASperyillus_fumigatus	198 IMTASGYYGP.Q.IWSRPIVEFLNFPQIFGNYSVKDVWVPFLLLSFFVGHLPGCVFNVIE	A 254
Saccharomyces_cerevisiae	188 SFIAVGIYGP.QTIWHTKVAQFSWQDFVFDETVHLMYAFCTGALIFNIVTAHTNVVR	(Y 243
Homo_sapiens	224 H.LLAVIGGPPFWQSMIPVLNIQMKIFPALCTVAG	(Y 265
CNAG_06543	281 YHNVITSRRKAGKPIFPPLFGLLPFFTHTTIL.LAWLHAESKGGVCIVHDSRMLPFLGYWGMAFSY	7 - 325
Candida_albicans	249 YKKSSTNNSTNGDKDESTKDQISQAYRGLYPFFIYYGFVFL.LLWIYPQILYDYGFPLVISIGCTIAFSY	7 - 314
ASpergillus_fumigatus	255 RKKQGLPVSTIFKEWVPMIVFTICN.IAWLFSPYSTLLAQNRLVLYCWTISFVF	6 308
Saccharomyces_cerevisiae	244 YESQSTKSATPSKTAENISKAVNGLPFFAYFSSIFT.LVLIQPSFISLALISIGFSVAFVV	7 - 305
Homo_sapiens	266 FRVIFTGG.VGKNGSTIAGTSVLSPFL.HIGSVITLAAMIYKKSAVQLFEKHPCLYILTFGFVS	8 A 328
CNAG_06543	328 - QVSQLILAHVTKSSFPYWNGMMIFSLFGAADANMGWLFGREPLVQSSPVAANVFIWMSFVVALFNYV	(R 393
Candida_albicans	315 GRIILAHLILQEFPFIQYPMFVPIGQLILSKILIDIYGYGTAKVLHAISWLGCGITLGIHG) 376
ASperyillus_fumigatus	309 RMTTKIILAHLIRQPFPYWTVQLTPLIGGAILANLPHLGLPAVSAWVELLYLRAYLLFAFVAYW	H 373
Saccharomyces_cerevisiae	306 GRMIIAHLTMQPFEWVNFPFLIPTIQLVLYAFMVYVLDYQKGSIVSALVWMGLGLTLAIHG) M 367
Homo_sapiens	329 KITNKLVVAHMTKSEMHLHDTAFIGPALLFLDQYFNSFIDEYIVLWIALVFSFFDLI	R 386
CNAG_06543	394 FAREVIWQICEYTGLACFTVRHKDENGKWVQNGKKMQ	430
Candida_albicans	377 FVAEVITEITTYLDIYALSIKHKKIN.	402
ASpergillus_fumigatus	374 WAFLVINRITTFLGINCLTIKKORSMAREQAYRNFGESLLEVPDATDPLKGGLKHH	429
Saccharomyces_cerevisiae	368 FINDIIYDITTFLDIYALSIKHPKEI.	393
Homo sapiens	387 YCVSVCNQIASHLHIHVFIKVSTAHSNHH	416

Figura 11: CNAG_06543 codifica gene da enzima Ept1 na linhagem H99 de *C. neoformans.* Alinhamento de aminoácidos a partir da sequência CNAG_06543, com as CDP-etanolamina/colina fosfotransferases (Ept1) de *C. albicans* (GenBank: C7_02690C_A), *Aspergillus fumigatus* (GenBank: Afu8g04940), *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank: YHR123W), e Cept1 de *Homo sapiens* (Acesso UniProt: Q9Y6K0). Os aminoácidos estão destacados conforme a conservação entre as sequências, quanto mais escuro, mais conservado. O retângulo preto representa a sequência de aminoácidos correlata ao motivo de etanolamina fosfotransferase. Imagem gerada por ClustalO e Jalview v.2.11.3.2.

5.1.4 CNAG_06839 codifica Opi3 em linhagem H99

CNAG_06839 é uma sequência anotada, codificadora da fosfatidiletanolamina Nmetiltransferase (Opi3) hipotética em *C. neoformans*. Possui quatro éxons com um único transcrito de 1.342 nucleotídeos, traduzido em uma proteína de 315 aminoácidos. As análises dos domínios conservados detectaram motivo de fosfolipídio-metiltransferase (*e-value* = 3.9e-33), com maior porcentagem de identidade (56.8%) à *PEM2* de *C. albicans*, dentre as sequências de fosfatidiletanolamina-metiltransferase escolhidas (**Figura 12**), indicando a presença de sítio catalítico para conversão de PE em PC. O mutante *opi3* Δ , obtido da biblioteca de mutantes de *C. neoformans*, do laboratório de Madhani (Brown et al., 2014), foi utilizado para construção do duplo mutante *opi3* Δ *pct*1 Δ , e possui deleção na sequência CNAG_06839, com marca de seleção NAT e já foi parcialmente caracterizado em estudo anterior (Muniz, 2015).



Figura 12: CNAG_06839 codifica gene da enzima Opi3 na linhagem H99 de *C. neoformans*. Alinhamento de aminoácidos a partir da sequência CNAG_06839, com as fosfatidiletanolamina metiltransferases de *C. albicans* (Código GenBank: C3_06570C_A), *Saccharomyces cerevisiae* (Código GenBank: YJR073C), *Aspergillus fumigatus* (Código GenBank: Afu1g09050) e *Homo sapiens* (Acesso UniProt: Q9UBM1). Os aminoácidos estão destacados conforme a conservação entre as sequências, quanto mais escuro, mais conservado. O retângulo preto representa a sequência de aminoácidos correlata ao motivo de fosfolipídio metiltransferase. Imagem gerada pelo programa Jalview v.2.11.3.2.

5.2 Construção das cepas mutantes e reconstituídos

Os fragmentos do cassete de deleção foram amplificados (**Figura 13**), para transformação genética por biobalística das diferentes linhagens. Foi avaliada a estabilidade mitótica da marca de seleção através da passagem dos transformantes em ágar YPD e, depois, novamente em ágar YPD seletivo contendo Higromicina B. Em seguida, constatou-se por PCR e análise eletroforética a deleção dos genes: *PCT1* (CNAG_00424), nos transformantes A2, A9, A48, A87, A93 e B16 (**Figura 14**); e *PCT1/OP13* (CNAG_00424 /CNAG_06839), nos transformantes A16, A29, A36, A48, A66, B28, B31, C3, C6, C22 e C27 (**Figura 15**).



Figura 13: Etapas da construção do cassete de deleção do gene *PCT1* **na linhagem KN99***α*. Fragmentos de DNA amplificados por PCR e analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) com brometo de etídeo. Utilizado marcador de referência DNA *Ladder* RTU 1 kb (Kasvi). (a) Fragmentos prévios para construção do cassete de deleção: 1 + 2 (5'*PCT1*, 954 pb), 3 + 4 (5'*HPH*, 985 pb), 5 + 6 (3'*HPH*, 1451 pb) e 7 + 8 (3'*PCT1*, 1117 pb). (b) Cassetes de deleção 1 + 4 (5'*PCT1* + 5'*HPH*, 2405 pb) e 5 + 8 (3'*HYG* + 3'*PCT1*, 2102 pb), obtidos através da técnica, DJ-PCR. Fragmentos desejados estão representados pelo retângulo vermelho. (c) Cassetes de deleção purificados por extração de gel de agarose.



Figura 14: Deleção do gene PCT1 confirmada nos transformantes da linhagem KN99α. Fragmentos de DNA amplificados por PCR e analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) com brometo de etídeo. Utilizado marcador de referência *HighRanger* 1 kb (NORGEN). A cepa selvagem KN99α (S) foi utilizada como controle positivo da amplificação do fragmento interno do gene alvo por PCR, e negativo da amplificação das extremidades da marca de seleção HYG. (a) Fragmentos internos do gene *PCT1* (210 pb). (b) Fragmentos 5' do cassete de deleção HYG (2621 pb). (c) Fragmentos 3' do cassete de deleção HYG (2292 pb). Retângulo vermelho indica as

bandas que confirmam inserção do cassete de deleção no genoma. Os transformantes que não amplificaram o fragmento interno do gene (a), foram escolhidos para confirmação da inserção do cassete de deleção (b e c).



Figura 15: Deleção do gene PCT1 confirmada nos transformantes de linhagem mutante $opi3\Delta$. Fragmentos de DNA amplificados por PCR e analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) com brometo de etídeo. Utilizado marcador de referência *HighRanger* 1 kb (NORGEN). A cepa mutante parental $opi3\Delta$ (Δ) foi utilizada como controle positivo da amplificação do fragmento interno do gene alvo, e negativo da amplificação das extremidades da marca de seleção HYG. (a) Fragmentos internos do gene *PCT1* (210 pb). (b) Fragmentos 5' do cassete de deleção HYG (2621 pb). (c) Fragmentos 3' do cassete de deleção HYG (2292 pb). Retângulos vermelhos indicam bandas que confirmam inserção do cassete de deleção no genoma. Os transformantes que não amplificaram o fragmento interno do gene (a), foram escolhidos para confirmação da inserção do cassete de deleção (b e c).

As sequências dos genes *PCT1* e *OPI3*, foram amplificadas (**Figura 16a**) para reconstituição gênica por biobalística das cepas $opi3\Delta$, $pct1\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$, e os transformantes obtidos foram selecionados em placas contendo Neomicina. Uma nova triagem foi realizada com os transformantes $opi3\Delta$::OPI3 e $opi3\Delta pct1\Delta$::OPI3 utilizando ágar MM sem suplementação, e os transformantes que cresceram nesse meio foram escolhidos para extração

de DNA genômico, e amplificação do fragmento interno do gene, confirmando reconstituição nos transformantes A62 e A95 ($opi3\Delta$::OPI3), e A6, A31 e A38 ($opi3\Delta pct1\Delta$::OPI3) (**Figura 16b** e **16d**). A triagem do transformante $opi3\Delta pct1\Delta$::PCT1 foi feita com ágar MM suplementado com colina, e a confirmação da reconstituição dos transformantes foi efetuada conforme descrito anteriormente, obtendo-se os reconstituídos, A34 e A71 (**Figura 16e**). Por fim, foi utilizado apenas ágar seletivo com neomicina para triagem dos transformantes $pct1\Delta$::PCT1, escolhendo-se 10 transformantes dos quais apenas um, A1, teria confirmação de reconstituição (**Figura 16c**).



Figura 16: Reconstituição dos genes *PCT1* e *OPI3* confirmada nos mutantes $pct1\Delta$, $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$. Fragmentos de DNA amplificados por PCR e analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) com brometo de etídeo. Utilizado marcador de referência *HighRanger* 1 kb (NORGEN). Foram utilizados os DNAs do selvagem KN99 α como controle positivo (S) e dos mutantes parentais respectivos como controle negativo da confirmação de reconstituição (Δ). (a) Genes *PCT1* (3555 pb) e *OPI3* (3881 pb) amplificados para reconstituição dos mutantes. (b) Fragmentos internos do gene *OPI3* (499 pb) dos reconstituídos $opi3\Delta$::OPI3. (c) Fragmentos internos do gene *PCT1* dos reconstituídos ($pct1\Delta$::PCT1). (d) Fragmentos internos do gene *OPI3* (499 pb) dos reconstituídos $opi3\Delta pct1\Delta$::*OPI3*. (e) Fragmentos internos do gene *PCT1* dos reconstituídos $opi3\Delta pct1\Delta$::*PCT1*. Os transformantes que amplificaram os fragmentos do gene interno confirmaram reconstituição.

5.3 Caracterização fenotípica dos mutantes

5.3.1 Biossíntese de fosfatidilcolina é importante para crescimento celular em diferentes condições

As vias de biossíntese de PC são essenciais para proliferação celular em leveduras, inibição da principal via, CDP-DAG, é compensada pela assimilação de colina exógena para síntese de PC pela via alternativa Kennedy (McGraw e Henry, 1989; McMaster, 2018). Dessa forma, foi avaliada a velocidade de crescimento dos mutantes sob diferentes temperaturas e disponibilidade de nutrientes. Foi realizada curva de crescimento em meio YPD a 30°C e 37°C, e em meio MM a 30°C e 37°C. Os mutantes *opi3* Δ e *opi3* Δ *pct1* Δ mantiveram crescimento normal a 30°C e 37°C em YPD (**Figura 17**), mas este foi reduzido ou inibido significativamente (*p* < 0,0001) em MM sem a presença de colina (**Figura 18**), evidenciando um déficit metabólico da síntese de PC. A suplementação com colina recuperou o crescimento de *opi3* Δ a 30°C em MM, mas não completamente a 37°C (**Figura 18a**), indicando termossensibilidade em condições restritas de nutrientes.

Vale ressaltar que o duplo mutante não cresceu em MM mesmo com a suplementação de colina (**Figura 18**), confirmando que a via Kennedy em *C. neoformans* é responsável pela assimilação exógena de colina para produção de PC, entretanto, os mutantes $pct1\Delta$ e $ept1\Delta$, mantiveram fenótipo semelhante ao selvagem em todas as condições (**Figura 17 e 18**), indicando que essa não é a principal via de biossíntese do fosfolipídio no fungo.



Figura 17: Os mutantes da via de síntese de PC têm crescimento normal em YPD a 30°C e 37°C. 10^4 células de cada cepa foram inoculadas em diferentes meios para medição das curvas por leitura de densidade ótica (600 nm) em intervalos de 30 minutos, por 96 horas. Cepa selvagem parental KN99 α foi utilizada como controle. (a) Crescimento a 30°C e 37°C em YPD. (b) Os mutantes foram inoculados em diluição seriada (10^6 - 10^2 células) em placas de ágar YPD a 30°C ou 37°C, por 72 horas.



Figura 18: O duplo mutante *opi3* Δ *pct1* Δ tem crescimento celular inibido em MM, enquanto *opi3* Δ cresce somente na presença de colina. 10⁴ células de cada cepa foram inoculadas em diferentes meios para medição das curvas por leitura de densidade ótica (600nm) em intervalos de 30 minutos, por 96 horas. Cepa selvagem parental KN99 α foi utilizada como controle. (a) Crescimento em MM a 30°C e 37°C suplementado ou não com cloreto de colina 1mM. (b) Os mutantes foram inoculados em diluição seriada (10⁶ - 10² células) em placas de MM a 30°C (e) ou 37°C (f), com ou sem suplementação de 1mM de cloreto de colina, e incubadas por 72 horas.

5.3.2 O mutante opi $3 \Delta \text{pct} 1 \Delta$ é mais sensível a estresse de membrana

Para averiguar se a deleção dos genes envolvidos com a síntese de PC causa defeitos na parede celular e manutenção da membrana plasmática, os mutantes e a cepa selvagem foram inoculadas em meios suplementados com SDS, um detergente desestabilizante de membrana, ou *Calcofluor White* e Vermelho do Congo, pigmentos que desestruturam a parede celular pela associação com os polímeros de quitina (Ram e Klis, 2006). Foi observada diferença no crescimento do duplo mutante *opi3\Delta pct1\Delta* em meio suplementado com SDS a 30°C (**Figura 19a**), podendo-se inferir alterações na homeostase de membrana nessa cepa. As outras cepas mutantes não tiveram alterações.

a

Foi também avaliada a osmoregulação e permeabilidade de membrana, crescendo os mutantes em placa de YPD suplementado com NaCl 1M. Não houve diferença entre os mutantes e o selvagem (**Figura 19b**), apontando para uma osmorregulação e integridade de membrana semelhante ao selvagem. Por fim, foi investigada a capacidade dos mutantes de crescer em meios suplementados com substâncias oxidantes como o nitrito de sódio (NaNO₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Não houve diferença aparente entre os mutantes e o selvagem (**Figura 19c**) o que indica permeabilidade de membrana inalterada (Branco et al., 2004).



Figura 19: O duplo mutante *opi3* Δ /*pct1* Δ é mais sensível a estresse de membrana plasmática. Os mutantes foram inoculados em diluição seriada (10⁶ - 10² células) em placas de YPD com diferentes agentes estressores e incubadas a 30°C. A cepa selvagem KN99 α foi utilizada como controle. (a) Crescimento em condições de estresse de parede celular e membrana plasmática. (b) Crescimento em condição de estresse osmótico. (c) Crescimento em condições de estresse osmótico.

5.3.3 Mutante opi 3Δ tem a capacidade de melanização restaurada com a presença de colina

A capacidade de sintetizar melanina auxilia o fungo *C. neoformans* a sobreviver no interior dos macrófagos, protegendo do ataque de espécies reativas de oxigênio, permitindo, dessa forma, a sua disseminação no hospedeiro (Wang e Casadevall, 1994). Este fenótipo foi

analisado após 72 horas de indução em MM suplementado com L-DOPA, e os resultados demonstram que os mutantes da via Kennedy tiveram fenótipo de melanização comparável ao da cepa selvagem (**Figura 20**). Porém, o mutante *opi3* Δ teve redução da capacidade de melanização em MM sem suplementação de colina, enquanto todas as outras cepas apresentavam escurecimento intenso aparente após 96 horas (**Figura 20**). Já na presença de colina, foi observado aumento do crescimento e de melanização do mutante, enquanto o duplo mutante não cresceu nas condições do teste.



Figura 20: O mutante *opi3* Δ recupera completamente a capacidade de melanização em meio suplementado com colina. Os mutantes de cepa parental KN99 α foram crescidos em ágar MM suplementado com L-DOPA 1mM, incubadas a 37°C, para indução de melanização. O meio também foi suplementado ou não com 1mM de cloreto de colina. As placas foram fotografadas em mesmas condições de iluminação por intervalos de tempo determinados, 72, 96 e 120 horas.

5.3.4 Deleção do gene OPI3 aumenta expansão da cápsula polissacarídica

C. neoformans é um dos únicos fungos conhecidos que possuem cápsula polissacarídica (Zaragoza et al., 2009), e a capacidade de expandir essa estrutura é um fenótipo essencial para a sobrevivência no interior do hospedeiro (Bojarczuk et al., 2016). Para avaliar essa característica nos mutantes das vias de PC, foi efetuada a indução de cápsula com crescimento das células a 37°C em meio indutor (Constituído de Sabouraud DifcoTM, diluído dez vezes em

tampão MOPS). Não houve alterações na espessura capsular dos mutantes $pct1\Delta$ e $cept1\Delta$, em relação ao selvagem KN99 (**Figura 21**). Entretanto, $opi3\Delta$ e o duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$ tiveram cápsula significativamente mais espessa (p < 0,0001), com cápsulas 35% e 45% mais espessas, respectivamente (**Figura 21b**). Os resultados indicam que a via CDP-DAG de síntese de PC está envolvida na capacidade do fungo de acumular polissacarídios em sua cápsula.



Figura 21: O mutante *opi3* Δ e duplo mutante *opi3* Δ *pct1* Δ produzem cápsula mais espessa em condição indutora. Foram utilizados os mutantes da linhagem parental KN99 α para crescimento em meio indutor (Sabouraud ácido, pH 5,6, diluído 10X em tampão MOPS) a 37°C por 48 horas. A cepa parental foi utilizada como controle positivo em meio indutor e negativo sem indução em meio Sabouraud. (a) A microfotografia das células das cepas KN99 α , *opi3* Δ , *pct1* Δ , *ept1* Δ , e *opi3* Δ *pct1* Δ , foi realizada em suspensão de 20% tinta nanquim. Foi utilizada a cepa KN99 α em meio Sabouraud como controle negativo. Barra de escala representa 20µm. (b) Foi

realizada medição de 50 células por cepa em duas replicatas técnicas, utilizando a ferramenta ImageJ, sendo a espessura capsular obtida pela diferença entre o diâmetro total das células e o corpo celular. Os mutantes, $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$, apresentaram, respectivamente, cápsula 35% e 45% significativamente mais espessa que o selvagem. Análise estatística dos dados efetuada com teste ANOVA de uma via, com correção de Dunnett para múltiplas comparações.

5.3.5 Mutantes das vias de PC secretam fosfolipases

Os mutantes das vias de PC tiveram o fenótipo de secreção de fosfolipase avaliado com o crescimento das cepas em ágar gema de ovo 10%, onde a ação catalítica das enzimas gera um halo de precipitação ao redor das colônias dos fungos. Todas as cepas secretaram fosfolipases, indicado pela formação de um halo de precipitado ao redor das colônias (**Figura 22**). Também foi medida a zona de precipitação (Pz), valor obtido da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total com precipitado. Valores de Pz < 1 indicam cepas positivas para secreção de fosfolipase (Chen et al., 1997). Não houve diferença significativa entre os valores de Pz das colônias, sendo a média de 0,71.

O ágar utilizado neste experimento não possui extrato de levedura em sua composição base (Chen et al., 1997), o que aponta a importância das fosfolipases extracelulares na assimilação dos lipídios presentes na gema de ovo necessários para o crescimento do duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$, considerando a incapacidade de assimilação de colina pela via alternativa Kennedy com a deleção de *PCT1*, e a inibição da síntese de novo pela via CDP-DAG com a deleção de *OPI3*.



Figura 22: O mutante *opi3* Δ e duplo mutante *opi3* Δ *pct1* Δ são capazes de crescer em ágar gema de ovo através da secreção de fosfolipases. Os mutantes e cepa parental KN99 α foram inoculados em placas com ágar gema de ovo (10%), e incubados a 30°C por 48h a 72h. Após o período de incubação, as placas foram fotografadas e analisadas no programa ImageJ para medição das colônias. Pz é a razão entre o diâmetro da colônia (DC) sobre o diâmetro total com precipitado (DT). As cepas positivas para secreção de fosfolipases têm o valor de Pz < 1,

enquanto aquelas que não secretam tem valor de Pz = 1. Foram realizadas duas replicatas biológicas e utilizado teste de *One Way* ANOVA para análise estatística dos dados.

5.3.6 Mutantes da via de PC secretam urease

Outro atributo de virulência importante na patobiologia do *C. neoformans* é a secreção de urease, enzima que hidrolisa ureia, auxiliando na sobrevivência no interior de macrófagos, pela redução da acidificação do fagolisossomo, além do papel dessas enzimas na disseminação do fungo para o sistema nervoso central, permitindo a passagem pela barreira hematoencefálica (Fu et al., 2018; Olszewski et al., 2004). Todos os mutantes avaliados para este fenótipo, em meio *Christiansen* a 30°C e 37°C, secretaram urease (**Figura 23**).



Figura 23: Os mutantes das vias de fosfatidilcolina secretam urease. Os mutantes de cepa parental KN99 α foram crescidos por 72 horas, a 30°C, em meio Christiansen, que modifica cor conforme ocorre a hidrólise da ureia em amônia e consequente aumento do pH. As placas foram fotografadas após 72 horas de crescimento. O sinal (+) indica cepas que secretam urease, enquanto (-) é o controle negativo, neste caso *C. parapsilosis*.

5.4 Diminuição da CIM de antifúngicos convencionais na cepa mutante pct1A

Foi determinada a CIM de diferentes antifúngicos para os mutantes das vias de PC conforme protocolo de microdiluição do EUCAST. A CIM de Anfotericina B (AmB) foi a mesma para todos os mutantes (**Tabela 5**). Considerando os resultados obtidos em outras pesquisas com a deleção do gene ERG6 da via de ergosterol (Gaber et al., 1989; Jensen-Pergakes et al., 1998; Oliveira et al., 2020) que demonstraram que os níveis do esterol na composição da membrana afetam a sensibilidade do fungo à AmB, pode-se concluir que provavelmente nenhum dos mutantes deste estudo tem alterações nos níveis de ergosterol na membrana plasmática. A diferença de CIM entre $pct1\Delta$, $pct1\Delta$::PCT1 e KN99 α , está dentro da faixa de erro de uma diluição para mais e para menos comparado à cepa controle.

Também foi avaliada a CIM dos triazóis fluconazol e itraconazol, antifúngicos inibidores da síntese do ergosterol (Nozawa e Morita, 1986). A maioria dos mutantes apresentou CIM, de ambos azóis, semelhante à CIM para a cepa selvagem KN99 α , enquanto o mutante *pct1* Δ apresentou CIM quatro vezes menor para fluconazol e itraconazol, assinalando uma maior sensibilidade a esses antifúngicos (**Tabela 5**). O reconstituído *pct1* Δ ::*PCT1* recuperou os valores de CIM dos antifúngicos semelhante ao selvagem, e a diferença de CIM do fluconazol, entre a cepa parental e o reconstituído, está dentro da faixa de uma diluição (**Tabela 5**).

O duplo mutante, $opi3\Delta pct1\Delta$, não cresceu nas condições do experimento, pela incapacidade de assimilar a colina presente no meio RPMI 1640 para síntese de PC, entretanto, seus reconstituídos, $opi3\Delta pct1\Delta::PCT1$ e $opi3\Delta pct1\Delta::OPI3$, cresceram. O reconstituído $opi3\Delta pct1\Delta::PCT1$ teve CIM semelhante à cepa $opi3\Delta$ (**Tabela 5**), porém a reconstituição apenas de *OPI3* em $opi3\Delta pct1\Delta::OPI3$ não recuperou os níveis de sensibilidade aos azóis semelhante à cepa parental, com CIM de ambos antifúngicos 16 vezes menor. Esse resultado indica um possível papel da via Kennedy na suscetibilidade de *C. neoformans* a esses antifúngicos.

	CIM(µg/mL)		
Сера	Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol
KN99α	0,06	2	0,12
$pct1\Delta$	0,12	0,5	0,03
$pct1\Delta$::PCT1	0,12	1	0,12
$opi3\Delta$	0,06	2	0,12
opi3∆::OPI3	0,06	2	0,12
$opi3\Delta pct1\Delta$::PCT1	0,06	2	0,12
$opi3\Delta pct1\Delta$:: $OPI3$	0,06	0,12	0,008

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diferentes antifúngicos nos mutantes dos genes das vias de PC e seus reconstituídos

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 A via CDP-DAG é importante para a sobrevivência no interior de macrófagos

Para investigar a capacidade dos mutantes de sobreviverem no interior de macrófagos, foi realizada a interação *in vitro* de macrófagos derivados de medula óssea (*Bone Marrow-Derived Macrophages*, BMDM) de camundongos com as leveduras das cepas $pct1\Delta$, $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$, para avaliar a capacidade fagocítica e resposta fungicida dos macrófagos às diferentes cepas. Na infecção causada por *C. neoformans*, a eliminação efetiva do fungo ocorre com a polarização dos macrófagos para um perfil inflamatório M1, envolvendo a maturação do fagolisossomo, secreção de citocinas pró-inflamatórias, e diminuição da proliferação do patógeno fagocitado, possibilitando assim sua eliminação (Hardison et al., 2010). Dessa forma, para obtenção de macrófagos com perfil inflamatório, foi utilizado GM-CSF para diferenciação, e estímulo com IFN- γ . GM-CSF é capaz de induzir aumento da expressão de citocinas próinflamatórias e ativação de resposta imunológica adaptativa T_h1 (Krausgruber et al., 2011; Lawrence e Natoli, 2011), porém também se optou por ter um grupo estimulado com IFN- γ para ativação clássica M1, sabendo-se que essa citocina tem papel positivo na eliminação do *C. neoformans* (Hardison et al., 2010).

Para determinação do índice fagocítico (IF), as placas contendo os BMDMs foram infectadas com as leveduras dos mutantes em MOI de 5:1 por 2 horas. Após esse intervalo, as placas foram lavadas e coradas com kit Panótico para visualização em microscópio. A contagem de macrófagos e leveduras internalizadas não revelou diferença do índice fagocítico dos macrófagos para as diferentes cepas mutantes (**Figura 24 a**).

Já para avaliar a atividade fungicida (AF) dos macrófagos, as placas foram inoculadas com as cepas mutantes e incubadas por 2 e 24 h. Em cada intervalo pós-infecção, os macrófagos foram lisados para contagem de UFC, e foi calculado a AF pela diferença das UFCs. As análises estatísticas dos dados de AF, revelaram uma atividade fungicida significativamente maior (p < 0,05) para mutantes $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$ (**Figura 24 b**), obtendo-se zero colônias na maioria das placas de UFC das duas cepas em 24 h de interação.



Figura 24: BMDMs estimulados com GM-CSF e ou IFN-γ são mais eficientes em eliminar as leveduras dos mutantes *opi3*Δ, e duplo mutante *opi3*Δ*pct1*Δ. Os BMDMs (MΦ) diferenciados com GM-CSF e estimulados ou não com 50nM de IFN- γ 24 horas antes do experimento, foram infectados em um MOI de 5, e incubados por 2 e ou 24 horas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. (a) Após duas horas, as placas foram lavadas e coradas com o kit Panótico rápido para marcar as células e visualizá-las no microscópio. O índice fagocítico (IF) foi obtido pela razão dos macrófagos contendo células fúngicas × número de células fúngicas em relação ao número total de macrófagos x 100 (%). Não houve diferença significativa entre os grupos (ns). (b) Análise da taxa de eliminação do fungo pelos macrófagos obtida a partir da seguinte fórmula: 100 - (UFC obtida em 24 horas / média de UFC obtida em 2 horas × 100) (%). Esses dados são representativos de uma duplicata biológica, realizando-se triplicatas técnicas em ambas. Foi utilizada a cepa KN99α como controle positivo, e apenas macrófago no controle negativo. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de ANOVA de duas vias com correção de Dunnet para múltiplas comparações.

5.6 O duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$ é hipovirulento em G. mellonella

Para investigar a virulência *in vivo* dos mutantes $pct1\Delta$, $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$, foi efetuado um ensaio de infecção em modelo larval de *G. mellonella*. Essa lagarta é um ótimo modelo para estudo da virulência de *C. neoformans*, devido à facilidade de cuidado e manuseio, os fatores de virulência que impactam na infecção em mamíferos também possuem papel no inseto, e a possibilidade de se utilizar tratamentos com antifúngicos (Mylonakis et al., 2005). A curva de sobrevivência teve duração de 10 dias, e as lagartas infectadas foram incubadas a 37°C e observadas diariamente. Apenas o duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$ e um de seus reconstituídos, $opi3\Delta pct1\Delta$::*PCT1*, foi hipovirulento (**Figura 25**). Enquanto o selvagem matou todas as lagartas no sexto dia, apenas no nono dia que uma lagarta morreu pela infecção com $opi3\Delta pct1\Delta$ (**Figura 25 c**). Esses resultados indicam que o duplo mutante não consegue obter os nutrientes necessários para síntese de PC e proliferação no interior do inseto ou sua termossensibilidade em condições de baixa disponibilidade nutricional (**Figura 18**), pode afetar sua eficiência na capacidade de causar infecções a 37°C.



Figura 25: O mutante *opi3* Δ *pct1* Δ possui virulência reduzida em modelo de infecção de *G. mellonella*. Leveduras das cepas mutantes foram cultivadas por 16h, lavadas e ressuspendidas com PBS. Em seguida 10µL de PBS com 5 × 10⁴ células de cada cepa foram inoculadas com microseringa na última properna esquerda de 12 larvas por grupo. O controle positivo foi inoculado com a cepa parental KN99 α , enquanto o controle negativo foi

inoculado apenas com PBS. As curvas (a), (b), e (c), possuem os mesmos grupos de controle (KN99 α e PBS) advindos de um único experimento. (a) Curva de sobrevida com o mutante deletado para *PCT1* e seu reconstituído. (b) Curva de sobrevida com o mutante deletado para *OPI3* e seu reconstituído. (c) Curva de sobrevida com o duplo mutante *opi3* Δ *pct1* Δ e os reconstituídos de cada gene. O duplo mutante demonstrou ser significativamente menos virulento (p < 0,0001) em relação ao selvagem (KN99 α). Para as análises estatísticas foram realizados os testes de Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

6. DISCUSSÃO

A partir da investigação *in silico* dos genes relacionados às vias de biossíntese de PC foi observado que *C. neoformans* possui apenas um gene codificador de fosfotransferase da última etapa da via Kennedy com domínio conservado de etanolamina-fosfotransferase, ept1 (**Figura 12**). Vale ressaltar que já foi demonstrado que a levedura *S. cerevisiae* possui dois genes de fosfotransferases, *CPT1* e *EPT1*, o primeiro codifica, Cpt1, uma enzima com afinidade específica à CDP-colina, e o segundo codifica, Ept1, uma enzima bifuncional com afinidade tanto para CDP-colina, quanto para CDP-etanolamina (McMaster e Bells, 1994). Esse modelo referencial de leveduras não reflete a realidade encontrada em *C. albicans*, que aparentemente apresenta apenas a fosfotransferase Ept1 com função dupla de síntese de PE e PC (Tams et al., 2019), e, ao que tudo indica, em *C. neoformans* também (**Figura 26**).



Figura 26: Vias de biossíntese de fosfatidilcolina em *C. neoformans*. A principal via de biossíntese em fungos, CDP-DAG (setas amarelas), sintetiza fosfatidilcolina (PC) em três reações de metilação da fosfatidiletanolamina (PE). A via alternativa Kennedy (setas azuis) sintetiza PC pela assimilação de colina. A última reação da via é catalisada por uma fosfotransferase bifuncional (Ept1), que converte tanto CDP-etanolamina quanto CDP-colina em PC. A via acessória de reacilação (setas vermelhas) sintetiza PC a partir da acilação de glicerofosfocolina (GPC) pela enzima Gpc1. MME, monometil fosfatidiletanolamina. DME, dimetil-fosfatidiletanolamina. Etn, etanolamina. P-Etn, fosfoetanolamina. CDP-Etn, citidina difosfoetanolamina. Cho, colina. P-Cho, fosfocolina. CDP-Cho, citidinadifosfocolina. LPC, lisofosfatidilcolina. Em vermelho, estão representadas as enzimas envolvidas na biossíntese de PC. Em parênteses estão os códigos CNAG utilizados neste estudo, que se referem

às sequências genômicas presentes no banco de dados do Projeto Genoma H99 do Broad Insitute. Figura elaborada pelo autor no biorender.com.

Observou-se que a ausência da enzima Opi3 gerou um mutante com crescimento debilitado na ausência de colina (**Figura 18**), e, aliado ao fato de que a deleção de *PCT1* nesse mutante impede a recuperação do crescimento pela incorporação de colina exógena (**Figura 18**), pode-se inferir que essas enzimas estão envolvidas na síntese de PC, com *Cn* Opi3 realizando a síntese de novo do fosfolipídio e *Cn* Pct1 participando da assimilação de colina exógena (Cole; Vance, 2012).

Insta ressaltar que os estudos presentes na literatura investigam essas vias de síntese de PC em fungos ascomicetos, como a levedura *S. cerevisiae* e o patógeno *C. albicans*. Porém não há pesquisas que investiguem essas vias em *C. neoformans*, um importante patógeno basidiomiceto. Estudos relacionados como o de Konarzewska e colaboradores (2019), revelaram que a via alternativa Kennedy, não é capaz de recuperar a viabilidade dos mutantes com deleção de *CHO1*, envolvido na síntese de PS no início da via CDP-DAG. Apesar disso, foi elucidado que a via Kennedy está ativa em *C. neoformans*, o que foi confirmado neste estudo com o crescimento do mutante *opi3* Δ recuperado com a incorporação de colina pela via Kennedy (**Figura 18**)

Quanto às características fenotípicas dos mutantes obtidos, é interessante observar que nenhum teve crescimento reduzido a 37°C em YPD (**Figura 17 a**). Já alterações no níveis de outros lipídios de membrana como o ergosterol afeta o crescimento de *C. neoformans* a 37°C, como foi demonstrado no mutante deletado para *ERG6* (Oliveira et al., 2020). Ao que tudo indica, diferentemente da via metabólica do ergosterol, as vias biossintéticas de PC conseguem atuar de forma a compensar uma das vias inibidas, pela utilização de substratos presentes no meio rico em nutrientes, YPD.

Esses dados são corroborados com a caracterização parcial do mutante, realizada por Muniz (2015), que demonstrou que o crescimento de $opi3\Delta$ em YPD a 37°C se assemelha à linhagem selvagem, mas em meios mais pobres em nutrientes como Sabouraud e MM, as altas temperaturas afetam a velocidade de crescimento do mutante, afinal, a via Kennedy consegue suprir a síntese do fosfolipídio em condições nas quais existem altas concentrações de colina extracelular disponível (Tams et al., 2019; McGraw e Henry, 1989; Muniz, 2015; Wang et al., 2019). Muniz (2015) também observou atraso no processo de melanização de *opi3* Δ que pode ser explicado pela reduzida densidade celular em MM (Einsenman et al., 2011), e confirmado

neste estudo pela recuperação completa do fenótipo e melanização tão rápida quanto o selvagem na presença de colina (**Figura 20**).

Além disso, a PC é um fosfolipídio associado à regulação da integridade da membrana plasmática, incluindo fluidez e permeabilidade (McMaster, 2017). Thibault e colaboradores (2012) demonstraram que a razão entre PC e PE em *S. cerevisiae* é essencial para manutenção das membranas celulares e dobramento de proteínas de membrana, e quando há ausência das metiltransferases Cho2/Opi3, o desequilíbrio dos níveis de PE e PC geram uma drástica mudança na regulação proteômica consequência da resposta às proteínas desenoveladas (UPR *- Unfolded Protein Response*), iniciada pela ativação do receptor Ire1 presente na membrana do retículo endoplasmático (RE). Essa resposta aumenta os níveis de proteínas das membranas celulares envolvidas na homeostase proteica como a chaperona Hsp12 (Balogh, 2013; Thibault et al., 2012). Esse desequilíbrio entre os níveis de fosfolipídios poderia explicar a termossensibilidade do mutante *opi3* Δ em condições mais restritivas de nutrientes nas quais haveria uma redução significativa da síntese de PC (**Figura 17 a**).

Quanto ao duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$, o seu crescimento só foi observado em meios que continham extrato de levedura (YPD) ou altas concentrações de lipídios (gema de ovo). Existem alguns substratos candidatos que tornam isso possível, entre eles a própria CDP-colina, o precursor utilizado pelas fosfotransferases Ept1/Cpt1 para a última etapa de biossíntese de PC (McMaster e Bells, 1994; McMaster, 2017), considerando que neste mutante foi deletado o gene PCT1 responsável pela conversão de fosfocolina em CDP-colina. Entretanto, não é conhecido nenhum transportador para interiorização dessa molécula nas células de leveduras, assim o provável responsável por esse crescimento seria o lipídio glicerofosfocolina (GPC), precursor utilizado na via de reacilação de GPC para síntese de PC (**Figura 7**) (Głąb et al., 2016). Esta hipótese será avaliada com a caracterização desta via em *C. neoformans*.

Um dos principais fenótipos associados à virulência de *C. neoformans*, a cápsula polissacarídica (Casadevall e Perfect, 1998), foi afetada positivamente pela deleção de OPI3 na cepa $opi3\Delta$ e $opi3\Delta pct1\Delta$ (**Figura 21**). A cápsula de GXM é regulada por diferentes vias de sinalização, incluindo as vias das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Jung e Bahn, 2009). Dentre elas, a via da MAPK Hog1, é ativada por sinais relacionados a diferentes tipos de estresse, incluindo estresse osmótico, oxidativo, de parede celular, e altas temperaturas (Chen e Thorner, 2007). Hog1 está presente no fim da via de sinalização e sua fosforilação permite a translocação para o núcleo e ativação de diversos genes relacionados à resposta a estresse, incluindo formação de cápsula polissacarídica (Jung e Bahn, 2009). Insta ressaltar que

Husain et al. (2022) elucidaram o envolvimento do receptor da UPR, Ire1, na ativação de Hog1, dessa forma, não é improvável que Hog1 esteja sendo ativado por sinais de estresse de RE nos mutantes, aumentando a expressão dos genes relacionados à síntese de cápsula polissacarídica.

Ademais, o ciclo celular também está envolvido com a regulação da cápsula polissacarídica, demonstrado no estudo de García-Rodas e colaboradores (2014) no qual mutantes de *C. neoformans* com genes de ciclinas G1/S interrompidos exibiram cápsulas maiores, confirmando a coordenação entre o crescimento da cápsula e o ciclo celular. Essa explicação pode ser corroborada pela microfotografia do duplo mutante em meio indutor de cápsula (**Figura 21**), cujas células possuem morfologia semelhante a um "cometa" com múltiplas células filhas em sequência, indicando uma possível alteração no ciclo celular.

Outro aspecto afetado pela deleção de OPI3 foi a reduzida sobrevivência no interior dos macrófagos *in* vitro (**Figura 24 b**), possivelmente devido à redução da disponibilidade de nutrientes no interior dos fagolisossomos de macrófagos (Appelberg, 2006) aliada à acidificação e ataque por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Tjelle; Lovdal, Berg, 2000). Porém esse resultado está divergente daqueles obtidos dos ensaios em *G. mellonella*, nos quais a virulência apresentou-se inalterada no mutante $opi3\Delta$ (**Figura 25 b**). Na literatura, deleção de OPI3 afeta diferenciadamente a virulência, resultante das diferenças fisiológicas do patógeno. Em *C. albicans*, a deleção do gene das metiltransferases Pem1 e Pem2, resulta na hipervirulência do fungo causada pela produção aumentada de PE pela via Kennedy, enquanto a deleção do gene da fosfotransferase Ept1 diminui a carga fúngica nos rins de camundongos (Tams et al., 2019). Já em *Aspergillus fumigatus*, deleção do gene ChoC, análogo ao *OPI3*, reduziu significativamente a virulência do fungo também em modelo murino, devido à inibição da expressão da enzima colina quinase, *Af* Ck1, reduzindo a capacidade de assimilar colina do hospedeiro pela via Kennedy (Pan et al., 2024).

Portanto, os resultados encontrados em *C. neoformans* parecem se assemelhar mais com o que já foi observado em *C. albicans* do que em *A. fumigatus*, pois mesmo com a deleção de *OPI3*, o fungo consegue incorporar colina dos tecidos do hospedeiro pela via Kennedy, possibilitando sua proliferação, além de manter a capacidade de melanizar (**Figura 20**), secretar fosfolipases e ureases (**Figura 22 e 23**), e expandir a cápsula polissacarídica (**Figura 21**). Entretanto, a deleção em conjunto de *OPI3* e *PCT1* afetou drasticamente a virulência do fungo (**Figura 25 c**), possivelmente devido a uma incapacidade de assimilar os nutrientes necessários para biossíntese de PC ou devido a algum defeito na manutenção da membrana plasmática frente aos estresses enfrentados no interior do hospedeiro, considerando a sensibilidade desse
mutante ao detergente SDS (**Figura 19**) e termossensibilidade em baixa disponibilidade nutricional (**Figura 18**). É importante frisar que os resultados obtidos com *G. mellonella* não refletem necessariamente em um modelo murino, sendo necessário realizar essa investigação.

Enquanto os mutantes com deleção em *OPI3* apresentaram diferentes características fenotípicas em relação ao à cepa selvagem, os mutantes da via Kennedy de PC, $ept1\Delta e pct1\Delta$, demonstraram serem mais semelhantes, apesar de *Cn* Ept1 aparentemente ser uma enzima bifuncional e também participar da síntese de PE. Estudos com mutantes dessa via apresentam resultados diversos, como citado anteriormente, Chen et al. (2018) demonstrou em experimentos com o fungo *M. robertsii*, que o gene Pct (PCT1) não é importante para o crescimento e morfologia das colônias, para a formação de apressório, porém o fungo teve virulência atenuada em modelo de infecção larval. Já em estudos com *F. graminearum*, mutantes da via Kennedy apresentaram alterações na morfologia de colônias e produção de conídios, entretanto foram tão virulentos quanto o selvagem em infecção de trigo (Wang et al., 2019). Esses resultados refletem uma heterogeneidade interespecífica, e possivelmente intraespecífica, do papel dessas vias na fisiologia celular dos fungos.

Apesar de sua semelhança com o selvagem KN99 α , o mutante *pct1* Δ é mais sensível aos antifúngicos da classe dos azóis, diferente do mutante *opi3* Δ (**Tabela 5**). Esse resultado pode ser fruto de diferentes fatores. Um deles, consiste no fato de que a via Kennedy é responsável pela síntese de espécies diferentes de PC, com cadeias de ácidos graxos mais saturadas menores (DeLong et al., 1999; Gibellini et al., 2010). Boumann e colaboradores (2005) demonstraram, em *S. cerevisiae*, os efeitos da deleção de *CHO2/OP13* nos tamanhos e insaturações das moléculas de PC, PE e triacilgliceróis. Essa alteração do perfil lipídico ocorre com a reciclagem de PC de cadeias longas e insaturadas pela via Kennedy. Esse processo tem o propósito de manter a curvatura ótima de membrana, tendo em vista que PC com cadeias curtas e saturadas consegue manter a bicamada de fase lamelar (**Figura 5**), mesmo com a assimetria de PE devido às deleções de CHO2/OPI3. Seguindo essa linha de raciocínio, é possível que a deleção de PCT1 altere a capacidade do fungo de regular a integridade e permeabilidade da membrana plasmática, gerando um efeito sinérgico com azóis como o fluconazol, que também afeta a permeabilidade pela alteração da biossíntese de ergosterol (Pais et al., 2020).

Outra explicação possível para a sensibilidade aumentada de $pct1\Delta$ aos azóis, está na biogênese de vesículas intracelulares. As enzimas Pct1 e Cpt1, estão associadas à proteína de transporte Sec14p na formação de vesículas intracelulares no complexo golgiense (Henneberry et al., 2001). Demuyser et al. (2019) comprovou em *S. cerevisiae*, *C. albican se C. glabrata*,

que a inibição do transporte vesicular diminui os níveis de ergosterol na membrana plasmática, aumentando a sensibilidade ao antifúngico fluconazol. Porém, como não foi observada alteração no CIM de AmB (**Tabela 5**), é improvável que deleção de *PCT1* tenha afetado o transporte de ergosterol para a membrana plasmática. Por fim, o papel regulatório dessas vias na homeostase de membrana aparentam ser um importante alvo de estudos nos fungos.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Ao longo deste trabalho, foi observado os efeitos da deleção de duas vias diferentes de biossíntese de PC na patobiologia de *C. neoformans*. Os resultados indicam que apesar de cada via compensar a inibição da outra pela síntese de PC, elas possuem papéis importantes na fisiologia do fungo, como a expansão de cápsula polissacarídica e resistência aos antifúngicos azóis. Além disso, a hipovirulência do duplo mutante $opi3\Delta pct1\Delta$ em modelo larval é uma característica emergente da deleção das duas vias, indicando a importância de cada uma para a capacidade de *C. neoformans* infectar o hospedeiro. Aliás, faz-se necessário identificar e caracterizar uma possível terceira via de síntese de PC por reacilação de GPC, e confirmar se o crescimento do duplo mutante em YPD pode ser atribuído à esta via.

É necessário ressaltar que não foi possível realizar a quantificação dos fosfolipídios totais e da PC presentes nas membranas dos mutantes. Esses dados serão importantes para averiguar a contribuição de cada via na síntese de PC, além de observar se a célula do fungo aumenta a síntese de outros fosfolipídios de forma compensatória, e confirmar se as alterações fenotípicas observadas são consequências da redução dos níveis de PC na célula ou se essas vias contribuem para outros processos fisiológicos.

Outra perspectiva para este trabalho remete ao que Tams e colaboradores (2019) observaram com o duplo mutante de *C. albicans*, $cho2\Delta/\Delta pem2\Delta/\Delta$. Esse mutante não é virulento em camundongos devido à síntese compensatória de PE pela via Kennedy, assim, considerando as semelhanças fenotípicas discutidas desse mutante com $opi3\Delta$ de *C. neoformans*, faz-se necessário averiguar a capacidade dos mutantes deste estudo de infectar camundongos e elucidar o papel de cada via para o fungo em um modelo mamífero de infecção. Além disso, é importante avaliar o impacto da inibição da síntese de PC na biogênese das vesículas extracelulares e seu conteúdo, considerando sua importância na patogenicidade de *C. neoformans*.

Também precisa-se realizar análises microscópicas para investigar os possíveis efeitos da redução de PC nas estruturas de organelas membranosas e suas funções, como a mitocôndria, além da biogênese de vesículas intracelulares, vacúolos e corpos lipídicos. Por fim, apesar de confirmado o papel dessas vias na patogênese de *C. neoformans*, as enzimas associadas também estão presentes em mamíferos, dessa forma, precisa-se conhecer melhor a regulação dessas vias e o envolvimento delas em diferentes aspectos fisiológicos do fungo e sua adaptabilidade ao

hospedeiro, para assim encontrar o alvo antifúngico mais efetivo no tratamento de doenças fúngicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPELBERG, Rui. Macrophage nutriprive antimicrobial mechanisms. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. 6, p. 1117-1128, 2006.

AKINS, Robert A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. Medical mycology v. 43,4, p. 285-318, 20005.

ALSPAUGH, J. Andrew. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Fungal Genetics and Biology, v. 78, p. 55-58, 2015.

BASU BALL, Writoban; NEFF, John K.; GOHIL, Vishal M. The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. **FEBS letters**, v. 592, n. 8, p. 1273-1290, 2018.

BALOGH, Gábor et al. Key role of lipids in heat stress management. **FEBS letters**, v. 587, n. 13, p. 1970-1980, 2013.

BENNETT, John E.; KWON-CHUNG, K. J.; HOWARD, Dexter H. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. American journal of epidemiology, v. 105, n. 6, p. 582-586, 1977.

BICANIC, Tihana; HARRISON, Thomas S. Cryptococcal meningitis. **British medical bulletin**, v. 72, n. 1, p. 99-118, 2004.

BOJARCZUK, Aleksandra et al. *Cryptococcus neoformans* intracellular proliferation and capsule size determines early macrophage control of infection. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 21489, 2016.

BONGOMIN, Felix et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus species*. **Mycoses**, v. 61, n. 5, p. 290-297, 2018.

BRANCO, Miguel R. et al. Decrease of H2O2 plasma membrane permeability during adaptation to H2O2 in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 8, p. 6501-6506, 2004.

BROWN, Sarah M.; CAMPBELL, Leona T.; LODGE, Jennifer K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 4, p. 320-325, 2007.

BROWN, Jessica CS et al. Unraveling the biology of a fungal meningitis pathogen using chemical genetics. **Cell**, v. 159, n. 5, p. 1168-1187, 2014.

CANTEROS, Cristina Elena et al. A rapid urease test for presumptive identification of Cryptococcus neoformans. Mycopathologia, v. 136, n. 1, p. 21-23, 1996.

CARRILLO-MUNOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.

CARMAN, George M.; HENRY, Susan A. Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes. **Progress in lipid research**, v. 38, n. 5, p. 361-400, 1999.

CARMAN, George M.; HAN, Gil-Soo. Regulation of phospholipid synthesis in yeast. **Journal of lipid research**, v. 50, p. S69-S73, 2009.

CASSILLY, Chelsi D.; REYNOLDS, Todd B. PS, it's complicated: the roles of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the pathogenesis of *Candida albicans* and other microbial pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 28, 2018.

CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John R. Cryptococcus neoformans. Washington, DC: ASM press, 1998.

CHEN, Raymond E.; THORNER, Jeremy. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1311-1340, 2007.

CHEN, Sharon CA et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor?. Journal of Infectious Diseases, v. 175, n. 2, p. 414-420, 1997.

CHEN, Yanli et al. *Cryptococcus neoformans* infection in the central nervous system: the battle between host and pathogen. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 1069, 2022

CHEN, Yixiong et al. Diverse effect of phosphatidylcholine biosynthetic genes on phospholipid homeostasis, cell autophagy and fungal developments in *Metarhizium robertsii*. Environmental microbiology, v. 20, n. 1, p. 293-304, 2018.

COLE, Laura K.; VANCE, Jean E.; VANCE, Dennis E. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 754-761, 2012.

COX, Gary M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166-175, 2001.

DAVIS, Sarah E. et al. *Candida albicans* cannot acquire sufficient ethanolamine from the host to support virulence in the absence of de novo phosphatidylethanolamine synthesis. **Infection and immunity**, v. 86, n. 8, p. e00815-17, 2018.

DECOTE-RICARDO, Debora et al. Immunomodulatory role of capsular polysaccharides constituents of *Cryptococcus neoformans*. Frontiers in medicine, v. 6, p. 129, 2019.

DELONG, Cynthia J. et al. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 42, p. 29683-29688, 1999.

DEMUYSER, Liesbeth et al. Inhibition of vesicular transport influences fungal susceptibility to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. 10.1128/aac. 01998-18, 2019.

DRESCHER, Simon; VAN HOOGEVEST, Peter. The phospholipid research center: current research in phospholipids and their use in drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 12, p. 1235, 2020.

DROMER, Françoise et al. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. **Clinical infectious diseases**, v. 23, n. 1, p. 91-96, 1996.

EISENMAN, Helene C. et al. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. **Virulence**, v. 2, n. 4, p. 329-336, 2011.

EUCAST. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agentes for yeasts, v. E. Def 7.4, 2023.

FARRUGIA, Gianluca; BALZAN, Rena. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in oncology**, v. 2, p. 26912, 2012.

FISHER, Matthew C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018.

FRANZOT, Sarah P.; SALKIN, Ira F.; CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans* var. grubii: separate varietal status for Cryptococcus neoformans serotype A isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838-840, 1999.

FRASER, James A. et al. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. gattii: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 1036-1045, 2003.

FRIEDMAN, Daniel ZP; SCHWARTZ, Ilan S. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. Journal of Fungi, v. 5, n. 3, p. 67, 2019.

FU, Man Shun et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018.

GABER, Richard F. et al. The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 8, p. 3447-3456, 1989.

GARCÍA-RODAS, Rocío et al. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. **MBio**, v. 5, n. 3, p. 10.1128/mbio. 00945-14, 2014

GEDDES, Jennifer MH et al. Analysis of the protein kinase A-regulated proteome of *Cryptococcus neoformans* identifies a role for the ubiquitin-proteasome pathway in capsule formation. **MBio**, v. 7, n. 1, p. 10.1128/mbio. 01862-15, 2016.

GEORGOPOULOS, Aoostolos et al. In vitro activity of naftifine, a new antifungal agent. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 19, n. 3, p. 386-389, 1981.

GIAEVER, Guri; NISLOW, Corey. The yeast deletion collection: a decade of functional genomics. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 451-465, 2014.

GIBELLINI, Federica; SMITH, Terry K. The Kennedy pathway—de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **IUBMB life**, v. 62, n. 6, p. 414-428, 2010.

GREENBERG, MIRIAM L. et al. Yeast mutant defective in phosphatidylcholine synthesis. Journal of Bacteriology, v. 153, n. 2, p. 791-799, 1983.

HARDISON, Sarah E. et al. Pulmonary infection with an interferon-γ-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 2, p. 774-785, 2010.

HAMMOUDI HALAT, Dalal et al. Allylamines, benzylamines, and fungal cell permeability: a review of mechanistic effects and usefulness against fungal pathogens. **Membranes**, v. 12, n. 12, p. 1171, 2022.

HENNEBERRY, Annette L. et al. Phosphatidylcholine synthesis influences the diacylglycerol homeostasis required for SEC14p-dependent Golgi function and cell growth. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 3, p. 511-520, 2001.

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

HOLZ, Ronald W. The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 235, n. 1, p. 469-479, 1974.

HOWE, Alicia G.; MCMASTER, Christopher R. Regulation of phosphatidylcholine homeostasis by Sec14. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 29-38, 2006.

HU, Guanggan; KRONSTAD, James W. A putative P-type ATPase, Apt1, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 1, p. 74-83, 2010.

HUSAIN, Farha et al. Adaptation to endoplasmic reticulum stress in *Candida albicans* relies on the activity of the Hog1 mitogen-activated protein kinase. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 794855, 2022.

JENSEN-PERGAKES, K. L. et al. Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in erg6 mutants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1160-1167, 1998.

KENT, Claudia. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. **Annual review of biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 315-343, 1995.

KENT, Claudia. Regulatory enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis: a personal perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1733, n. 1, p. 53-66, 2005.

KIEWIETDEJONGE, Annette et al. Hypersaline stress induces the turnover of phosphatidylcholine and results in the synthesis of the renal osmoprotectant glycerophosphocholine in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 2, p. 205-217, 2006.

KILLIAN, J. Antoinette et al. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1666, n. 1-2, p. 275-288, 2004.

KIM, Min Su et al. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 390, n. 3, p. 983-988, 2009.

KONARZEWSKA, Paulina et al. Phosphatidylserine synthesis is essential for viability of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Journal of Biological Chemistry, v. 294, n. 7, p. 2329-2339, 2019.

KRAUSGRUBER, Thomas et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. **Nature immunology**, v. 12, n. 3, p. 231-238, 2011.

KWON-CHUNG, Kyung J.; BENNETT, John E.; THEODORE, Theodore S. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov. serotype BC of *Cryptococcus neoformans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 28, n. 4, p. 616-620, 1978.

KWON-CHUNG, Kyung J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

LENGELER, Klaus B. et al. Identification of the MATa mating-type locus of Cryptococcus neoformans reveals a serotype A MATa strain thought to have been extinct. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14455-14460, 2000.

LANIADO-LABORÍN, Rafael; CABRALES-VARGAS, Maria Noemí. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

LAWRENCE, Toby; NATOLI, Gioacchino. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 750-761, 2011.

LÖSEL, D. M. Lipids in the structure and function of fungal membranes. In: **Biochemistry of cell walls and Membranes in Fungi**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990. p. 119-133.

LUNA-TAPIA, Arturo et al. Trafficking through the late endosome significantly impacts *Candida albicans* tolerance of the azole antifungals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2410-2420, 2015.

LUTZ, M. B.; KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L.; RÖSSNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of immunological methods**. v. 223, n.1, p. 77-169, 1999.

MCGRAW, Patricia; HENRY, Susan A. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* opi3 gene: effects on phospholipid methylation, growth and cross-pathway regulation of inositol synthesis. **Genetics**, v. 122, n. 2, p. 317-330, 1989.

MCMASTER, C. R.; BELL, R. M. Phosphatidylcholine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Regulatory insights from studies employing null and chimeric sn-1,2-diacylglycerol choline- and ethanolaminephosphotransferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 45, p. 28010-28016, nov. 1994.

MCMASTER, Christopher R. From yeast to humans–roles of the Kennedy pathway for phosphatidylcholine synthesis. **FEBS letters**, v. 592, n. 8, p. 1256-1272, 2018.

MESA-ARANGO, Ana C.; SCORZONI, Liliana; ZARAGOZA, Oscar. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 286, 2012.

MUNIZ, Anna Catarina Ferreira. Caracterização do mutante do gene OPI3 de *Cryptococcus neoformans*. 2015. 104 f. il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) —Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MYLONAKIS, Eleftherios et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

NICOLA, André Moraes; CASADEVALL, Arturo. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. Leucocytes: Methods and Protocols, p. 189-197, 2012.

NIELSEN, Kirsten et al. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans var. grubii* and virulence of congenic a and α isolates. **Infection and immunity**, v. 71, n. 9, p. 4831-4841, 2003.

NIELSEN, Kirsten et al. *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. **Infection and immunity**, v. 73, n. 8, p. 4922-4933, 2005.

NOZAWA, Yoshinori; MORITA, Tatsuya. Molecular mechanisms of antifungal agents associated with membrane ergosterol. Dysfunction of membrane ergosterol and inhibition of ergosterol biosynthesis. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. Elsevier Science Publishers, BV, Amsterdam, The Netherlands, p. 111, 1986.

OLIVEIRA, Débora L. et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1601-1609, 2010.

OLIVEIRA, Fabiana Freire M. et al. Erg6 affects membrane composition and virulence of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genetics and Biology, v. 140, p. 103368, 2020.

OLSZEWSKI, Michal A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva. 2022. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241. Acesso em: 10 mai. 2023.

PAIS, Pedro et al. *Candida glabrata* transcription factor Rpn4 mediates fluconazole resistance through regulation of ergosterol biosynthesis and plasma membrane permeability. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 9, p. 10.1128/aac. 00554-20, 2020.

PAN, Jiao; HU, Cuiting; YU, Jae-Hyuk. Lipid biosynthesis as an antifungal target. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 50, 2018.

PAN, Jiao et al. Functional, transcriptomic, and lipidomic studies of the choC gene encoding a phospholipid methyltransferase in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 1, p. e02168-23, 2024.

PERFECT, John R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.

PICHOT, Roman; WATSON, Richard L.; NORTON, Ian T. Phospholipids at the interface: current trends and challenges. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 6, p. 11767-11794, 2013.

POKHAREL, Mona et al. The anticancer drug bleomycin shows potent antifungal activity by altering phospholipid biosynthesis. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. e00862-22, 2022.

PRICE, Margaret F.; WILKINSON, Ian D.; GENTRY, Layne O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

PYRGOS, Vasilios et al. Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997–2009. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56269, 2013.

RAM, Arthur FJ; KLIS, Frans M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2253-2256, 2006.

RODRIGUES, Marcio L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

ROHDE, J. R.; CARDENAS, M. E. Nutrient signaling through TOR kinases controls gene expression and cellular differentiation in fungi. **TOR: Target of Rapamycin**, p. 53-72, 2004.

RUIZ-BACA, Estela et al. Molecular mechanisms of resistance to antifungals in *Candida albicans*. Adv. Candida Albicans, v. 39, p. 5772, 2021.

RYDER, N. S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **British Journal** of **Dermatology**, v. 126, n. s39, p. 2-7, 1992.

SANT, D. G. et al. Fungal cell membrane—promising drug target for antifungal therapy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1498-1510, 2016.

SCHULER, Max-Hinderk et al. Phosphatidylcholine affects inner membrane protein translocases of mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 36, p. 18718-18729, 2016.

SPADARI, Cristina de Castro et al. New approaches for cryptococcosis treatment. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 613, 2020.

TAMS, Robert N. et al. Overproduction of phospholipids by the Kennedy pathway leads to hypervirulence in *Candida albicans*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 86, 2019.

THIBAULT, Guillaume et al. The membrane stress response buffers lethal effects of lipid disequilibrium by reprogramming the protein homeostasis network. **Molecular cell**, v. 48, n. 1, p. 16-27, 2012.

TOFFALETTI, Dena L. et al. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 5, p. 1405-1411, 1993.

VANDEPUTTE, Patrick et al. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

WALTON, Felicia J.; IDNURM, Alexander; HEITMAN, Joseph. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1381-1396, 2005.

WANG, Bo; TONTONOZ, Peter. Phospholipid remodeling in physiology and disease. Annual review of physiology, v. 81, p. 165-188, 2019.

WANG, Jing et al. Phospholipid homeostasis plays an important role in fungal development, fungicide resistance and virulence in *Fusarium graminearum*. **Phytopathology Research**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2019.

WANG, Yulin; CASADEVALL, Arturo. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen-and oxygen-derived oxidants. **Infection and immunity**, v. 62, n. 7, p. 3004-3007, 1994.

WATERHOUSE, Andrew M. et al. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.

WIRTH, Fernanda et al. Relationship between intracranial pressure and antifungal agents levels in the CSF of patients with cryptococcal meningitis. **Medical Mycology**, v. 56, n. 3, p. 257-262, 2018.

YANG, Zhonghui et al. Molecular and genetic analysis of the *Cryptococcus neoformans* MET3 gene and a met3 mutant. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2617-2625, 2002.

ZARAGOZA, Oscar; CASADEVALL, Arturo. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biological procedures online**, v. 6, p. 10-15, 2004.

ZARAGOZA, Oscar et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Advances in applied microbiology, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHANG, Xiaoling; MAJERUS, Philip W. Phosphatidylinositol signalling reactions. In: Seminars in cell & developmental biology. Academic Press, 1998. p. 153-160.

ZHAO, Youbao et al. Life cycle of *Cryptococcus neoformans*. Annual review of microbiology, v. 73, p. 17-42, 2019.

ZHAO, Youbao et al. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 12, n. 02, p. 1-18, 2023.