



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Análise funcional do gene ERG6 em *Cryptococcus neoformans*

Fabiana Freire Mendes de Oliveira

Brasília, DF

2013

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Análise funcional do gene *ERG6* em *Cryptococcus neoformans*

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa
Mestrado em Patologia Molecular
da Faculdade de Medicina da
Universidade de Brasília e
desenvolvida no Laboratório de
Biologia Molecular da mesma
universidade para a obtenção do
título de mestre.**

Orientada: Fabiana Freire Mendes de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos

Brasília, DF

2013

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Fabiana Freire Mendes de Oliveira

Análise funcional do gene *ERG6 Cryptococcus neoformans*

Brasília, 06 de agosto de 2013.

Banca Examinadora

Orientadora: Maria Sueli Soares Felipe

Examinador externo: Marcio Lourenço Rodrigues

Examinador externo: Lorena da Silveira Derengowski

Suplente: Ana Karina Rodrigues Abadio

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram e me incentivaram em minha caminhada no mundo da ciência, principalmente à minha família que é pequena, mas muito unida. Dedico em especial a meus pais, que me dão força e amparo todos os dias, pois são os meus maiores exemplos de dedicação e conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus que é minha fortaleza e meu refúgio e me guia em todos os passos da minha vida.

Aos meus pais, os quais amo muito, que me educaram sempre com muito amor e paciência indicando os melhores caminhos a serem seguidos e me apoiando em todas as minhas escolhas.

À minha irmã que além de ser uma grande amiga, cuida de mim e me dá conselhos.

À minha orientadora Maria Sueli que é uma grande pesquisadora e me deu a oportunidade de desenvolver esse projeto, me incentivou e auxiliou durante todo o período.

À minha coorientadora Larissa Fernandes que acreditou em mim e pacientemente esteve ao meu lado nesse tempo de trabalho me ensinando e me ajudando a solucionar problemas com os seus conhecimentos e dedicação.

Aos meus colaboradores, Hugo Costa, Patrícia Andrade, André Nicola, Maurício Homem e Luisa Peconick, que tiveram papel fundamental no desenvolvimento do trabalho contribuindo com conhecimentos e experimentos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pela convivência e por todos os momentos que passamos juntos no mundo acadêmico e mesmo fora do laboratório, desde a alegria de resultados positivos à frustração de resultados negativos e a momentos de diversão e alegria.

Aos meus amigos de diferentes lugares que têm rotinas e formações muito diferentes da minha e que, embora não estivessem presentes no meu dia a dia, foram fundamentais demonstrando todo o carinho e amizade.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular pelo apoio e conhecimento que me proporcionou.

Às Agências de Fomento pelo apoio financeiro que possibilitou a realização da pesquisa.

RESUMO

O advento de pacientes portadores do HIV e de pacientes imunocomprometidos provocou um aumento na incidência de micoses fúngicas, como a criptococose. Existem várias classes de antifúngicos disponíveis comercialmente para o tratamento dessas infecções que são utilizadas de acordo com a patologia e o patógeno. No entanto, são relatados casos de resistência a essas drogas e existe uma grande preocupação em relação aos efeitos adversos que elas podem causar nos pacientes. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas poderia ser uma solução para a problemática atual das drogas disponíveis e isso requer o estudo de novos alvos moleculares. O gene ERG6 codifica a enzima esterol C-24 metiltransferase que atua na conversão de zimosterol em fecosterol. Constitui uma etapa que ocorre em fungos para a biossíntese do ergosterol, mas não ocorre nos hospedeiros animais, que possuem enzimas específicas para a conversão do zimosterol até colesterol. No presente trabalho, a função do gene ERG6 foi investigada e caracterizada no fungo *Cryptococcus neoformans* demonstrando que a ausência desse gene gera diversas alterações fenotípicas, tais como sensibilidade ao estresse osmótico, ao estresse oxidativo e maior susceptibilidade a diferentes drogas antifúngicas. Além disso, foi ainda observado que a capacidade de crescer em meios contendo diferentes estressores de parede se mostra alterada. Em relação aos fatores de virulência conhecidos para *C. neoformans*, o fungo foi incapaz de crescer a temperatura de 37°C, porém não teve sua produção de cápsula ou melanina afetadas. No entanto, em testes para observação da sua capacidade de virulência *in vitro* utilizando macrófagos e *in vivo* com lagartas da espécie *Galleria mellonella* mostraram uma redução na virulência em mutantes de ERG6. Por fim a análise dos esteróis de membrana mostrou que ocorre uma alteração em toda a composição de esteróis da membrana celular. Dessa forma, por ser uma enzima encontrada principalmente em fungos, a Erg6 pode ser um alvo molecular potencial para drogas antifúngicas.

Palavras-chave: ergosterol, antifúngicos, *Cryptococcus neoformans*, ERG6, erg6Δ.

ABSTRACT

The advent of HIV patients and immunocompromised patients caused an increase in the incidence of fungal mycoses, such as cryptococcosis. There are several antifungal agents commercially available for the treatment of such infections that are chosen based on the disease and the pathogen. However, cases of resistance are reported to these drugs and there is great concern about the adverse effects that they can cause on patients. In this context, the development of new antifungal drugs could be a solution to the current problem of the available drugs and it requires the study of potential molecular targets. The gene ERG6 encodes the sterol C-24 methyltransferase, an enzyme that acts on the conversion zymosterol in fecosterol. This is a step that occurs in fungi in the ergosterol biosynthesis, but does not occur in the animal hosts which have specific enzymes for the conversion of zymosterol to cholesterol. In this study, gene function of ERG6 was investigated and characterized in the *Cryptococcus neoformans* demonstrating the absence of this gene generates several phenotypic changes, such as sensitivity to osmotic stress, oxidative stress and increased susceptibility to different antifungal drugs. Furthermore, it was also observed that the ability to grow on media with different cell wall stressors was also altered. It was observed that the lack of ERG6 greatly affects the permeability of the membrane resulting in osmotic and oxidative stress sensitivity and changing antifungal drugs susceptibility. Furthermore, it was also observed that the ability to grow in medium with cell wall stressor was altered. About the virulence factor, *C. neoformans* was unable to grow at 37°C, but it had not affected the production of melanin or capsule. However, virulence tests *in vitro* with macrophages and *in vivo* with *Galleria mellonella* caterpillars showed a decrease in the virulence of ERG6 mutants. Finally, the membrane sterols analysis demonstrated a change in the membrane sterol composition. Thus, being an enzyme found especially fungi, the Erg6 may be a potential molecular target for antifungal drugs.

Keywords: ergosterol, antifungals, *Cryptococcus neoformans*, ERG6, erg6Δ.

Lista de Abreviaturas e Siglas

24-SMT – Esterol 24-C-metiltransferase

CMI – Concentração mínima inibitória

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

DC – Diâmetro da colônia

DGP – Diâmetro da colônia mais a zona de precipitação

DIC – Contraste diferencial de interferência

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP – Desoxirribonucleotídeos

EDTA – Ácido etilenoamino tetra-acético

erg6 Δ - Mutante

Erg6 – Enzima

ERG6 – Gene

GalXM – Galactoxilomananas

GFP – Proteína verde fluorescente

GXM - Glucuronoxilomananas

HPH – Higromicina fosfotransferase

Kb – Kilo bases

LPL – Lisofosfolipase

LPTA – Lisofosfolipase transacilase

MOPS- Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PLB – Fosfolipase B

PLC – Fosfolipase C

PZ – Atividade Enzimática

Q.S – Quantidade Suficiente

RPM – Rotações por minuto

SDS – Dodecil Sufato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

UFC - Unidades formadores de colônias

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida do <i>C. neoformans</i>	3
Figura 2. Drogas antifúngicas e seus diversos mecanismos de ação	6
Figura 3. Mecanismo de resistência de azóis em <i>C. neoformans</i>	12
Figura 4. Semelhança entre a via de biossíntese do colesterol e do ergosterol	16
Figura 5. Semelhança estrutural entre lipídeos de membrana de fungos e animais, ergosterol e colesterol respectivamente.	16
Figura 6. Via de biossíntese do ergosterol de fungos	18
Figura 7: Via de biossíntese do ergosterol com a produção de eburicol.	21
Figura 8. Representação geral da técnica de PCR Double joint para construção do cassete de deleção	30
Figura 9. Seleção dos transformantes <i>erg6</i> em meio YPD ágar suplementado	45
Figura 10. PCR confirmatório da deleção do gene <i>ERG6</i> em <i>C. neoformans</i>	46
Figura 11. <i>Southern blot</i> confirmatório da deleção de <i>ERG6</i> de <i>C. neoformans</i> .	47-48
Figura 12. Confirmação da reconstituição do mutante <i>erg6</i> Δ através da amplificação da região 5' e 3' do gene	49
Figura 13. Análise da expressão gênica de <i>ERG6</i> por PCR em Tempo Real no selvagem (wt) e no reconstituído <i>ERG6</i>	49
Figura 14. Análise de sensibilidade térmica dos mutantes <i>erg6</i> Δ realizada em YPD	50
Figura 15. Análise da capacidade de produção de melanina em ágar com sementes de <i>Niger</i> do selvagem (H99) e do mutante <i>erg6</i> Δ	51
Figura 16. Produção de cápsula do mutante <i>erg6</i> Δ , selvagem H99 e reconstituído <i>ERG6</i> em meio DMEM + MOPS a 37°C.	52
Figura 17. Mutante <i>erg6</i> Δ de <i>C. neoformans</i> não é capaz de crescer na presença dos estressores osmóticos NaCl e KCl a 30° C enquanto seu reconstituído demonstra resgatar o fenótipo	53

Figura 18. Mutante <i>erg6Δ</i> de <i>C. neoformans</i> não demonstram sensibilidade a estresse oxidativo em baixas concentrações, porém são incapazes de crescer em altas concentrações de H ₂ O ₂ .	54
Figura 19. Mutante <i>erg6Δ</i> de <i>C. neoformans</i> é suscetível a diferentes estressores de parede celular.	57
Figura 20. Diminuição da produção de fosfolipases pelo mutante <i>erg6Δ</i> de <i>C. neoformans</i>	58
Figura 21. Curvas de crescimento das linhagens mutante <i>erg6Δ</i> , selvagem (H99) e reconstituído ERG6 em diferentes temperaturas (30, 35 e 37° C)	60
Figura 22. Susceptibilidade do mutante <i>erg6Δ</i> , selvagem e reconstituído ERG6 de <i>C. neoformans</i> aos poliênicos anfotericina B e nistatina em YPD.	62
Figura 23. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória das drogas antifúngicas poliênicas anfotericina B e nistatina.	63
Figura 24. Susceptibilidade do mutante <i>erg6Δ</i> , selvagem e reconstituído ERG6 de <i>C. neoformans</i> aos azóis.	64
Figura 25. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória das drogas antifúngicas azólicas: cetoconazol, fluconazol e itraconazol.	65
Figura 26. Sensibilidade do mutante <i>erg6Δ</i> , selvagem e reconstituído ERG6 de <i>C. neoformans</i> à terbinafina que inibe a enzima esqualeno epoxidase do início da via de biossíntese do ergosterol.	66
Figura 27. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória da Terbinafina.	67
Figura 28. Sensibilidade do mutante <i>erg6Δ</i> de <i>C. neoformans</i> à cerulenina que inibe a biossíntese de ácidos graxos.	68
Figura 29. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória da cerulenina	68
Figura 30. Sensibilidade do mutante <i>erg6Δ</i> a drogas que atuam em vias metabólicas não relacionadas à biossíntese do ergosterol, brefeldina A e FK506.	69
Figura 31. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória da brefeldina e FK506	70
Figura 32. Ensaio de sobrevivência em macrófagos peritoniais das linhagens mutante <i>erg6Δ</i> , selvagem e reconstituído ERG6	71

Figura 33. Ensaio virulência em <i>G. mellonella</i> das linhagens mutante <i>erg6Δ</i> , selvagem e reconstituído ERG6.	72
Figura 34. Cromatogramas a 220 nm e 281 nm contendo os resultados dos esteróis de membrana das três cepas estudadas.	74
Figura 35. Curvas de calibração dos padrões lanosterol e ergosterol	75
Figura 36. Citometria de fluxo mostrando que a cepa contendo o ERG6 fusionado a GFP possui duas populações de fluorescência	77
Figura 37. Microscopia de fluorescência para citolocalização de Erg6 em <i>C. neorformans</i>	77

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Informações sobre as drogas antifúngicas utilizadas para o tratamento de micoses	7
Tabela 2	Linhagens de <i>C. neoformans</i> utilizadas	25
Tabela 3.	Oligonucleotídeos utilizados ao longo deste trabalho	28
Tabela 4.	Informações sobre as drogas utilizadas no teste de susceptibilidade em placas contendo YPD ágar	37
Tabela 5.	Análise da atividade enzimática de fosfolipase nas linhagens testadas mutante <i>erg6</i>Δ, selvagem (wt) e reconstituído <i>ERG6</i>	57
Tabela 6.	Concentração de ergosterol e lanosterol em relação à massa de esterol total	74

SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	<i>C. neoformans e a criptococose</i>	1
1.2	Drogas antifúngicas	6
1.3	Resistência aos antifúngicos	10
1.4	Busca por novos alvos terapêuticos	13
1.5	Biossíntese do Ergosterol	15
1.6	Erg6 e seu papel na biossíntese de ergosterol	20
2	Justificativa	23
3	Objetivos	24
4	Materiais e Métodos	25
4.1	Linhagens, meios de cultura e oligonucleotídeos usados no trabalho	25
4.2	Construção do cassete para deleção do gene ERG6 em <i>C. neoformans</i>	29
4.3	Transformação por Biobalística de <i>C. neoformans</i>	31
4.4	Reconstituição do mutante <i>erg6</i> Δ	32
4.5	Extração de DNA genômico pela técnica de <i>Smash and Grab</i>	32
4.6	Extração de DNA genômico de alta qualidade pela técnica de liofilização	33
4.7	Confirmação da deleção e reconstituição de ERG6 por PCR	34
4.8	Confirmação da deleção e reconstituição de ERG6 por <i>Southern Blot</i>	34
4.9	Extração de RNA total e análise de expressão gênica por PCR em tempo real	36
4.10	Testes fenotípicos	37
4.11	Teste de microdiluição para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de drogas antifúngicas	39
4.12	Ensaio de fagocitose em macrófagos	40

4.13	Teste de virulência em <i>Galleria mellonella</i>	41
4.14	Curva de crescimento	41
4.15	Análise dos esteróis de membrana	42
4.16	Citocalização de Erg6 em <i>C. neoformans</i>	43
4.17	Citometria de fluxo	44
5	Resultados e Discussão	45
5.1	Obtenção e confirmação do mutante <i>erg6</i>Δ	45
5.2	Obtenção e confirmação do reconstituído de <i>ERG6</i>	48
5.3	Testes fenotípicos	50
5.3.1	Crescimento a diferentes temperaturas	50
5.3.2	Produção de melanina	51
5.3.3	Capacidade de produzir cápsula	51
5.3.4	Estresse osmótico	52
5.3.5	Estresse oxidativo	54
5.3.6	Avaliação da integridade da parede celular	55
5.3.7	Capacidade de produção de fosfolipase	57
5.4	Curva de crescimento	59
5.5	Susceptibilidade às drogas antifúngicas	61
5.6	Avaliação da sobrevivência do mutante <i>erg6</i>Δ em macrófagos J774 e em <i>Galleria mellonella</i>	70
5.7	Análise dos esteróis de membranas no mutante <i>erg6</i>Δ de <i>C. neoformans</i>	72
5.8	Citocalização	76
6	Considerações Finais	79
	Referências	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 *C. neoformans* e a criptococose

O gênero *Cryptococcus* foi criado em 1833 por Kutzing para inserir a espécie *Cryptococcus mollis*. A primeira descrição de criptococose em pacientes foi realizada em 1894 a partir da observação da infecção pelo fungo em uma mulher de 31 anos na Alemanha. No entanto, apenas em 1901, o fungo isolado foi classificado no gênero *Cryptococcus*, sendo anteriormente classificado como *Saccharomyces*. Atualmente o gênero compreende 70 espécies, entre elas, agentes patogênicos e não patogênicos (Kwon-Chung *et al.*, 2011).

O nome *C. neoformans* foi definido somente no ano de 1952, após estudos de taxonomia dos patógenos em questão. Estudos para a compreensão do ciclo de vida continuaram a ser realizados e, cerca de dez anos após sua classificação taxonômica, foram observadas a formação de hifas com conexões em forma de grampo. Dessa forma, foi demonstrado que o fungo possui tipos sexuais diferentes que podem se conectar e formar basídios e basidiósporos. O fungo, portanto, apresentava ciclo sexual definido e sua forma teleomórfica foi denominada *Filobasidiella neoformans* (Perfect & Casadevall, 2011).

Foram identificados três variedades e cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) diferentes de *Cryptococcus*, baseados nas reações de aglutinação da cápsula. O sorotipo A corresponde ao *C. neoformans* var *grubii*; e D e AD ao *C. neoformans* var. *neoformans*, enquanto que os sorotipos B e C são *C. gatti*. Os sorotipos A e D afetam principalmente pacientes imunocomprometidos, enquanto os sorotipos B e C afetam pacientes imunocompetentes (Idnurm *et al.*, 2005).

O *C. neoformans* é um fungo patogênico causador da criptococose, podendo infectar o sistema nervoso central causando uma meningoencefalite (Hull & Heitman, 2002). É um fungo dimórfico encontrado em todo o mundo em solos contaminados, troncos de eucaliptos e em excretas de pombos (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Possui um ciclo de vida bastante definido podendo variar da forma leveduriforme a filamentosa.

O ciclo assexuado que é caracterizado pela formação de leveduras ocorre nos tecidos durante a infecção, enquanto o ciclo sexual que é caracterizado pela formação de

hifas transitórias que podem ser visualizadas em meios de cultura específicos (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). *C. neoformans* apresenta características fenotípicas e morfológicas únicas por ser um fungo encapsulado. Essa cápsula é constituída por polissacarídeos, principalmente glucuronoxilomananas (GXM) e galactoxilomananas (GalXM) (Bhattacharjee *et al.*, 1984), e é clinicamente importante para a virulência e para a classificação em sorotipos do fungo (Grupta & Fries, 2010).

Essas leveduras possuem dois tipos sexuais diferentes, “ α ” e “ a ”, que em determinadas situações, como resposta a ferormônios ou limitações de nutrientes, se fundem provocando a cariogamia e a consequente formação de basídios. Apesar da existência de dois tipos sexuais, o tipo “ α ” é muito mais encontrado no meio ambiente e acredita-se que o fato ocorra devido a uma vantagem na formação de frutificação haplóide e a basídios do tipo sexual α serem capazes de causar mais infecções clínicas (Hull & Heitman, 2002). No ambiente, o fungo se apresenta no geral como um basidiomiceto que libera basidiósporos, que se convertem para a levedura à temperatura de 37°C no hospedeiro (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Os basidiósporos ou as células leveduriformes podem ser inaladas e se disseminar no organismo provocando infecções pulmonares em indivíduos imunocompetentes (no caso de *C. gattii*) e principalmente de imunocomprometidos (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009), como se visualiza na **Figura 1**. A infecção pode ser assintomática, crônica ou aguda, sendo que infecções pulmonares são os principais casos assintomáticos, mas que podem se disseminar provocando uma infecção sistêmica, que pode atingir o sistema nervoso central (Voelz & May, 2010).

Durante muitos anos, o fungo foi de interesse apenas aos micologistas e médicos por serem pouco vistos na prática clínica, no entanto, com o advento do HIV e de pacientes imunocomprometidos, a criptococose passou a ser encontrada com mais frequência na prática clínica, tornando-se uma importante doença e causando inúmeras mortes nesses pacientes (Idnurm *et al.*, 2005). Segundo o mesmo autor, nos últimos anos, o uso de terapias antifúngicas e anti-retrovirais provocou uma redução na prevalência de criptococose, porém, a doença não deixou de ser uma preocupação. Apesar do tratamento medicamentoso, a doença ainda continua gerando preocupação devido à sua significativa taxa de morbi-mortalidade, cuja incidência varia de 0,04% a 12% por ano entre pacientes com HIV, tendo o número estimado de cerca de um milhão de casos por ano que resultam em cerca de 650 mil mortes no mesmo período (Park *et al.*, 2009).



Figura 1: Ciclo de vida do *C. neoformans*.

O fungo, em geral, é encontrado na sua forma teleomórfica no meio ambiente, em plantas e principalmente em excretas de pombos. Esporos ou leveduras podem ser inalados e se instalarem nos pulmões ou podem ainda se disseminar para o sistema nervoso. As células podem ser isoladas e cultivadas em meios específicos para a produção de cápsula e melanina a fim de confirmar a infecção por *C. neoformans*.

Fonte: Adaptado de Hull & Heitman (2002).

Existem três fatores de virulência de *Cryptococcus* bem estabelecidos, que são a capacidade de produzir cápsula, de produzir melanina e de crescer a 37°C. A cápsula polissacarídica, formada majoritariamente por GXM e GalXM (Bhattacharjee *et al.*, 1984), foi observada desde a descrição do fungo, porém apenas na década de 1930 foi sugerido o seu papel na virulência do fungo (Janbon & Doering, 2011). Posteriormente, estudos demonstraram que a cápsula estava relacionada à atividade antifagocítica e imunomodulatória, sendo importante para a replicação do fungo em macrófagos, podendo afetar a apresentação de antígenos, a produção de citocinas, e ainda inibir a migração de leucócitos nos sítios infectados. Foi, ainda, observado que seu aparecimento e tamanho estão condicionados a fatores ambientais, como a presença de vitaminas, aminoácidos, CO₂, concentração de ferro, presença de íons, bem como fatores que afetam a pressão osmótica (Janbon & Doering, 2011). A cápsula apresenta variações nas concentrações de seus constituintes entre diferentes cepas e parece sofrer modificações em sua estrutura e tamanho de acordo com o meio, possuindo propriedades dinâmicas que variam de acordo com as diferentes situações (Rodrigues *et al.*, 2011).

Essa cápsula pode ser detectada por microscopia óptica utilizando tinta nanquim e, devido a sua capacidade de excluir as partículas de tinta, apresenta-se branca ao redor

da levedura. Pode, ainda, ser detectada por anticorpos monoclonais ou policlonais contra epítomos de carboidratos. Dessa forma, foi observado que todos os isolados clínicos produzem cápsula e que mutantes incapazes de produzi-la são avirulentos (Hull & Heitman, 2002). Experimentos realizados analisando mutantes não capsulados mostraram que todos foram incapazes de provocar a morte de camundongos (Bulmer *et al.*, 1967). Atualmente, alguns genes envolvidos na formação de cápsula vêm sendo estudados, como CAP59 e CAP64. Mutantes *cap59Δ* em *C. neoformans* demonstraram-se avirulentos em modelos animais (Chang & Kwon-Chung, 1994) assim como mutantes de CAP64, apesar dos dois genes não estarem relacionados entre si (Chang *et al.*, 1996).

A melanina foi observada pela primeira vez em 1962 e é caracterizada por ser um pigmento escuro, com carga negativa, alto peso molecular, hidrofóbica, amorfa, insolúvel em água, resistentes a ácido concentrado e susceptível ao branqueamento com agentes oxidantes (Nosanchuk & Casadevall, 2003; Trofa *et al.*, 2011). Apesar dessas características, muitas informações acerca desse pigmento ainda não foram desvendadas devido à dificuldade de estudo de sua estrutura, porém acredita-se que ele seja formado por compostos fenólicos e indólicos. A síntese de melanina é realizada pela enzima lacase, que possui quatro sítios de ligação ao cobre, a partir de substratos fenólicos (Nosanchuk & Casadevall, 2003). Ainda, para esses autores, a ocorrência de infecção no sistema nervoso pode estar associada à capacidade de produção de melanina a partir de catecolaminas, como dopamina, adrenalina e noradrenalina, encontradas em grande quantidade nessa região. No entanto a importância da melanina na virulência está relacionada principalmente à proteção que o pigmento garante contra a resposta imune do hospedeiro e à sua capacidade imunomodulatória (Trofa *et al.*, 2011). Mutantes que têm a capacidade de produção de melanina afetada não são avirulentos, afirmam Hull e Heitman (2002), porém são atenuados em modelos animais (Hull & Heitman, 2002).

A capacidade de crescimento a 37°C está relacionada à sobrevivência no hospedeiro humano; conseqüentemente, apenas fungos capazes de se proliferar à temperatura corporal humana provocam infecções. Alguns estudos, conforme Hull e Heitman (2002), observaram que o crescimento a altas temperaturas está associado a proteínas como a calcineurina e Ras1. Foi demonstrado que a calcineurina é importante para a virulência em *C. neoformans* e alterações na proteína provocam defeitos no crescimento a temperaturas elevadas e em meios com pH alcalino (Odom *et al.*, 1997). A deleção de RAS1 em *C. neoformans* originou cepas incapazes de crescer a 37°C e

avirulentos em modelos animais. Além disso, a utilização de inibidores da via da calcineurina nesses mutantes demonstrou que as vias de sinalização da calcineurina e de Ras1 são distintas (Alspaugh *et al.*, 2000). Outra via que influencia a capacidade de crescimento a temperaturas elevadas foi a das MAP quinases (*Mitogen Activated Protein Kinases*), na qual a deleção de MPK1 provocou defeitos de crescimento no fungo (Kraus *et al.*, 2004).

Apesar de estes serem os principais fatores de virulência do fungo, acredita-se que existam ainda outros mecanismos importantes para o estabelecimento da doença no hospedeiro. Liu *et al.* (2008) construíram uma biblioteca de mutantes a fim de analisar os fatores de virulência em *C. neoformans* e observaram em vários mutantes de melanina defeitos na proliferação pulmonar. A influência da cápsula polissacarídica na virulência também foi observada nos respectivos mutantes, porém foi identificada a existência de mecanismos antifagocíticos independentes de cápsula. Por fim, foram ainda identificados 40 mutantes com redução na infectividade e oito com aumento que afetavam a proliferação no tecido pulmonar, porém não estavam relacionados à melanização, crescimento ou produção de cápsula, sugerindo, dessa forma a existência de novos mecanismos de virulência.

Alguns estudos mostraram ainda que as enzimas fosfolipase e urease contribuem para a virulência. Estudos realizados comparando modelos animais testados com mutantes de urease identificaram que esta enzima não está relacionada aos três fatores de virulência mais comuns, mas que a patogenicidade do fungo varia entre diferentes tipos de infecção e de animais (Cox *et al.*, 2000). Foi observado que a expressão de urease afetou a sobrevivência dos animais infectados via endovenosa ou intranasal, enquanto aqueles que foram infectados com injeção no fluido cerebrospinal não foram afetados pela ausência da enzima, sugerindo seu papel na invasão do sistema nervoso central, o que foi comprovado com a observação de que a urease promove o sequestro do fungo nos microcapilares sanguíneos (Olszewski *et al.*, 2004).

As fosfolipases são divididas em cinco grupos, A1, A2, B, C e D, de acordo com qual ligação éster que é hidrolisada. São enzimas encontradas em fungos patogênicos, mas também em fungos não patogênicos e leveduras industriais. As fosfolipases B (PLB) e a C (PLC) são as mais relacionadas à patogenicidade de fungos e a PLB pode ainda apresentar atividades de lisofosfolipase (LPL) e de lisofosfolipase transacilase (LPTA) (Djordjevic, 2010). Um estudo utilizando mutantes de fosfolipase B em *C. neoformans* demonstrou que a ausência de genes que codificam para essas enzimas

provocou defeito no crescimento no interior de macrófagos e redução na virulência do fungo *in vivo* em dois modelos diferentes de infecção animal (Cox *et al.*, 2001). Posteriormente, foi observado que a incorporação de ácido aracdônico de macrófagos nos lipídeos de *Cryptococcus* depende de PLB1, podendo prejudicar a síntese de outros compostos e a resposta à atividade do sistema imune do hospedeiro (Wright *et al.*, 2007). O papel da enzima fosfolipase C em *C. neoformans* também foi investigado e a deleção de um dos genes que codifica essa proteína resultou em mutantes sem os principais fatores de virulência, ou seja, incapazes de produzir cápsula e melanina e de crescer a 37 °C (Chayakulkeeree *et al.*, 2008).

1.2 Drogas antifúngicas

A era de terapias utilizando antifúngicos sistêmicos iniciou-se nos anos 1950 quando o uso de anfotericina B deoxicolato se tornou acessível e resultou em muitos tratamentos bem sucedidos. No entanto, a droga demonstrou desvantagens como a dificuldade de administração e seus efeitos tóxicos. Posteriormente, surgiram novas drogas como a 5-flucitosina em 1973, fluconazol e itraconazol na década de 1990 e os triazóis nos anos de 2000 (Pappas, 2011).

Atualmente existem diversas drogas antifúngicas utilizadas no tratamento de infecções, como pode ser observado na **Figura 2** e a escolha clínica depende do patógeno, do tipo de infecção e da susceptibilidade do fungo à droga (**Tabela 1**). Os antifúngicos disponíveis para o tratamento de micoses sistêmicas são os polienos (anfotericina B), fluoropiridinas (flucitosina), azóis (cetoconazol, fluconazol, itraconazol), equinocandinas (caspofungina e micafungina), nicomicinas e alilaminas (terbinafina) (Sable *et al.*, 2008).

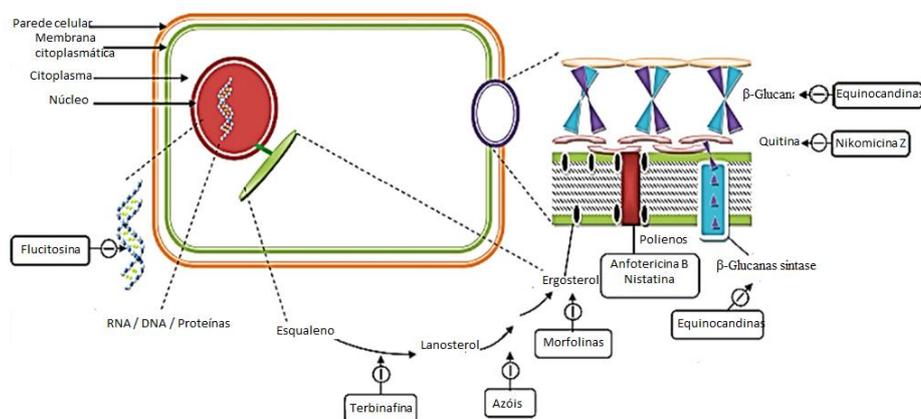


Figura 2: Drogas antifúngicas e seus diversos mecanismos de ação.

As principais drogas utilizadas, azóis e polienos, atuam na membrana celular, porém existem drogas com outros mecanismos de ação atuando na parede celular, como equinocandinas e nicomicina, e até mesmo na síntese de DNA.

Fonte: (Kathiravan *et al.*, 2012).

Tabela 1. Informações sobre as drogas antifúngicas utilizadas para o tratamento de micoses.

Droga	Mecanismo de Ação	Efeito adverso	Uso
Azóis	Inibição da enzima C-14-demetilase (Erg11)	Sintomas gastrointestinais, cefaleia e pruridos. Toxicidade hepática	Candidíase, coccidiomicose, blastomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, aspergilose, esporotricose, criptococcose.
Polienos	Ligação ao ergosterol provocando poros na membrana	Toxicidade renal e hepática	Nistatina: trata Tabmentos tópicos e candidíase orofaríngea. Anfotericina B: criptococcose, candidíase, histoplasmose, paracoccidioidomicose, esporotricose.
Equionacandinas	Inibidores da síntese de glucanas.	Bem toleradas. Sintomas gastrointestinais mínimos e rubor	Candidíase e aspergilose.
Flucitosina	Inibidor da síntese de ácidos nucleicos	Toxicidade da medula óssea: anemia, leucopenia, e trombocitopenia	Cromoblastomicose e adjuvante na terapia de candidíase e criptococcose.
Morfolinas	Inibição da esqualeno epoxidase (Erg1)	Irritação, coceira, vermelhidão ou queimação na pele; ardência na região das unhas.	Na agricultura e infecções de unha e pele.

Droga	Mecanismo de Ação	Efeito adverso	Uso
Alilaminas	Inibição da esqualeno epoxidase (Erg1)	Desconforto gastrointestinal e cefaleia.	Contra dermatófitos. Tratamentos tópicos de micoses superficiais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O ergosterol é um lipídeo componente de membrana celular de fungos, extremamente importante para manter a estabilidade da estrutura e sua ausência prejudica a homeostase celular. Por essa razão, esse esterol é o principal alvo da maioria das drogas atualmente disponíveis (Kathiravan *et al.*, 2012). Atua como um biorregulador garantindo a fluidez da membrana e a integridade celular, o que depende da presença de esteróis sem grupamento metil C-4 (Ghannoum & Rice, 1999). Existem vários mecanismos de ação para drogas que afetam o ergosterol que variam desde a inibição de enzimas da via de biossíntese, como no caso dos azóis, até a atuação direta no ergosterol como no caso dos polienos.

Polienos são efetivos afetando a estrutura do ergosterol (Clarck *et al.*, 1996; Jensen-Pergakes *et al.*, 1998; Karkowska-Kuleta, 2009), sendo a anfotericina B utilizada no tratamento de infecções de *Candida albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (Karkowska-Kuleta, 2009). Esta é uma droga antifúngica muito efetiva para o tratamento contra infecções, porém seu limitante é a gravidade de seus efeitos adversos nos pacientes, como a disfunção renal, que possivelmente acontece devido às semelhanças estruturais entre o ergosterol dos fungos e o colesterol do hospedeiro (Ghannoum & Rice, 1999).

Acredita-se que o mecanismo de ação dessa classe de drogas está relacionado à formação de poros pela forte ligação da droga ao ergosterol o que cria complexos de droga-lípido, desestabilizando a célula em decorrência da alteração no transporte de íons pela membrana (Shapiro *et al.*, 2011). A nistatina foi descoberta em 1950 e é obtida pela fermentação de *Streptomyces noursei* (Kathiravan *et al.*, 2012). A droga não é absorvida por membranas mucosas e dessa forma, não é utilizada via oral. Seu uso se restringe ao tratamento tópico principalmente contra infecções superficiais provocadas por *Candida*, sendo efetiva no tratamento da candidíase orofaríngea (Rang *et al.*, 2007)

Azóis agem inibindo mediadores do citocromo P-450, C14- α -demetilase impedindo a desmetilação do C14 α do lanosterol que é um dos precursores do

ergosterol (Kanafani & Perfect, 2008). A ausência de ergosterol, provocada pela atuação dos azóis na via de biossíntese do ergosterol, altera a fluidez da membrana, afetando outras enzimas relacionadas à membrana e assim, inibindo a replicação das células (Rang *et al.*, 2007). Além desse mecanismo, foi observado que azóis prejudicam o funcionamento da H⁺ ATPase vacuolar que controla o gradiente de pH da célula que ajuda manter a homeostase (Zhang *et al.*, 2010). São divididos em dois grupos, os imidazóis e os triazóis, de acordo com o seu núcleo (Rang *et al.*, 2007). Os imidazóis são mais utilizados em infecções superficiais e os triazóis mais utilizados em infecções sistêmicas (Kanafani & Perfect, 2008).

Existem diversos azóis disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas que são utilizados de acordo com o tipo de infecção e o patógeno, alguns exemplos são cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol (Kathiravan *et al.*, 2012). Para esses autores, o fluconazol é muito utilizado em vários tipos de candidíase e em criptococose, sendo efetivo, nesse último caso, para infecção pulmonar ou disseminada e ainda na meningite criptocócica aguda. A toxicidade hepática em azóis é rara, porém deve ser considerada para a escolha do melhor tratamento, pois ela pode ser fatal. Além disso, embora também raros, foram relatados casos de hepatite com o uso de fluconazol. Entre efeitos adversos mais comuns encontrados para esse grupo de medicamentos estão sintomas gastrointestinais como náuseas e dores abdominais, além de cefaleia e pruridos (Rang *et al.*, 2007).

Alguns antifúngicos ao invés de atuarem na membrana celular, possuem seus alvos moleculares na parede celular do fungo, já que esta é composta por quitina, glucanas e mananas, que são polissacarídeos característicos desse reino (Ghannoum & Rice, 1999). As equinocandinas, por exemplo, são drogas mais novas e afetam a síntese de β -glucanas (Sable *et al.*, 2008). Existem três drogas dessa classe atualmente disponíveis no mercado, caspofungina, micafungina e anidulafungina e atuam como inibidores não competitivos na síntese desse composto (Shapiro *et al.*, 2011). As glucanas estão entre os principais compostos da parede celular e a inibição de sua síntese provoca instabilidade da parede e a lise de células suscetíveis (Kathiravan *et al.*, 2012), além de diminuir os níveis de ergosterol e lanosterol e aumentar a quantidade de quitina da parede celular (Ghannoum & Rice, 1999). Quitina é um polissacarídeo que determina a forma da parede celular e contribui para o fortalecimento da parede, sendo que a droga que inibe sua síntese é a nicomicina (Kathiravan *et al.*, 2012).

Existem, ainda, drogas que atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos, como as fluoropiridinas (Karkowska-Kuleta *et al.* 2009); drogas que são inibidores da síntese de proteínas, como as sordarinas e, ainda, inibidores da síntese de microtúbulos, como a griseofulvina (Kathiravan *et al.*, 2012). Outras enzimas da via de biossíntese do ergosterol podem também ser alvos para drogas, como a enzima esqualeno epoxidase, que é bloqueada pela terbinafina, e impede, portanto a síntese de lanosterol a partir de esqualeno (Kathiravan *et al.*, 2012).

Estudos clínicos que buscam novas opções de tratamentos para criptococose são, no geral, voltados à infecção no sistema nervoso central (SNC) e esses dados são extrapoladas para serem utilizados em pacientes que não apresentam a disseminação ao SNC. Inicialmente, foi utilizada a anfotericina B deoxicolato para o tratamento, porém com o surgimento de novas drogas, ensaios clínicos combinando diferentes drogas à anfotericina B como 5-flucitosina e fluconazol, demonstraram bons resultados. A associação anfotericina B + itraconazol também foi estudada, porém demonstrou menor eficácia em relação às outras. Dessa forma, o uso de fluconazol junto à anfotericina B demonstrou grande atividade contra a infecção e se consolidou no tratamento da criptococose. Atualmente, existem muitos outros anfitúrgicos que apresentam mais vantagens em seu uso, como os novos triazóis: voriconazol, posaconazol e isavuconazol, porém ainda não se tem muitas informações de seu uso na prática clínica. Por fim, inibidores da calcineurina, como tacrolimus e ciclosporina, demonstraram afetar o crescimento celular e seu uso resultou em redução da infecção no SNC, podendo ser utilizados como adjuvantes da terapia (Pappas, 2011).

1.3 Resistência aos antifúngicos

Observa-se que alguns antifúngicos utilizados não apresentam efeito antimicrobiano significativo devido à resistência dos patógenos, o que gera o agravamento da infecção (Sable *et al.*, 2008). A resistência a uma determinada droga pode ser primária, que se refere à capacidade intrínseca do fungo de impedir ação do antifúngico por mecanismos endógenos ou pode ainda ser secundária, que é a resistência adquirida por certas cepas após o contato com a droga. Pode-se ainda observar a resistência clínica, na qual o fungo apresenta susceptibilidade à droga em testes *in vitro*, porém não é capaz de erradicar a infecção quando utilizado por um

paciente e esta pode ocorrer pela própria interação patógeno-hospedeiro (Kanafani & Perfect, 2008).

Na prática clínica, a resistência à droga é observada quando há persistência ou progressão de uma infecção mesmo utilizando o tratamento mais adequado, enquanto na prática laboratorial, a resistência à droga é quantificada usando um ensaio para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) de uma droga na qual o patógeno não é capaz de crescer. A determinação da CMI fornece informações experimentais se os patógenos são capazes de responder ou não à droga. No entanto, os resultados observados *in vivo* podem ser bastante distintos, já que fatores como o ambiente, a farmacocinética da droga e interação entre patógeno e o hospedeiro têm grande influência na resposta ao tratamento como antifúngicos (Shapiro *et al.*, 2011).

Como as principais drogas de escolha para a maioria das infecções fúngicas são os polienos e azóis, existem diversos estudos de resistência a esses grupos de drogas realizados com patógenos, como *C. neoformans*, *C. albicans*, *A. fumigatus* (Sanglard *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003; Archibald *et al.*, 2004; Abdel-Salam, 2005; Pedroso *et al.*, 2006; Mellado *et al.*, 2007). No entanto, estudos de susceptibilidade a droga realizados com isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* em diversas regiões do mundo identificaram pouca resistência do fungo às drogas usuais, como os azóis e polienos (Archibald *et al.*, 2004; Abdel-Salam, 2005; Pedroso *et al.*, 2006).

Estudos de susceptibilidade a azóis com espécies de *Candida* identificaram quatro mecanismos de resistência, que são: diminuição da concentração da droga disponível para ação, alteração do sítio de ação, aumento da expressão da enzima alvo da droga e desenvolvimento de alguma via alternativa (Kanafani & Perfect, 2008). A diminuição da concentração da droga parece estar relacionada a um aumento na expressão de genes transportadores da bomba de efluxo desse grupo de drogas (Sanglard *et al.*, 1995) e esse mecanismo também foi observado em casos de resistência em espécies de *Aspergillus* (Slaven *et al.*, 2002) e *C. neoformans* (Pfaller *et al.*, 2011).

Os azóis atuam se ligando a enzima C14- α -demetilase, codificada pelo gene ERG11, dessa forma, mutações nesse gene, podem provocar alteração na proteína que impeça ou dificulte a sua ligação à droga. Além disso, o aumento na expressão da própria enzima C14- α -demetilase pode impedir que a droga exerça seu efeito, devido a uma necessidade maior de droga que supere as doses terapêuticas utilizadas (Kanafani & Perfect, 2008). Por fim, vias alternativas podem ainda ser ativadas a fim de evitar os efeitos tóxicos que a inibição de Erg11 provoca no fungo, como a expressão ou inibição

de genes da própria via do ergosterol (Kelly *et al.*, 1997a). Em *A. fumigatus* foram identificadas cepas resistentes a triazóis que apresentavam mutações no promotor do gene CYP51A (gene que codifica para a 14 α -esterol desmetilase) aumentando seu nível de expressão (Mellado *et al.*, 2007).

A preocupação existente acerca da resistência de *C. neoformans* a antifúngicos está relacionada ao uso de fluconazol em terapias antifúngicas de manutenção, porém até o momento poucos casos de resistência a essa droga foram relatados para o tratamento de criptococose e aqueles encontrados foram relacionados à resistência secundária em pacientes com AIDS. Os mecanismos de resistência de *C. neoformans* aos azóis são descritos na **Figura 3**. Essa resistência parece estar relacionada a um processo dinâmico e heterogêneo de mutações, estimando-se que cerca de 5% dos isolados clínicos apresentem um fenótipo heteroresistente a fluconazol (Pfaller *et al.*, 2011).

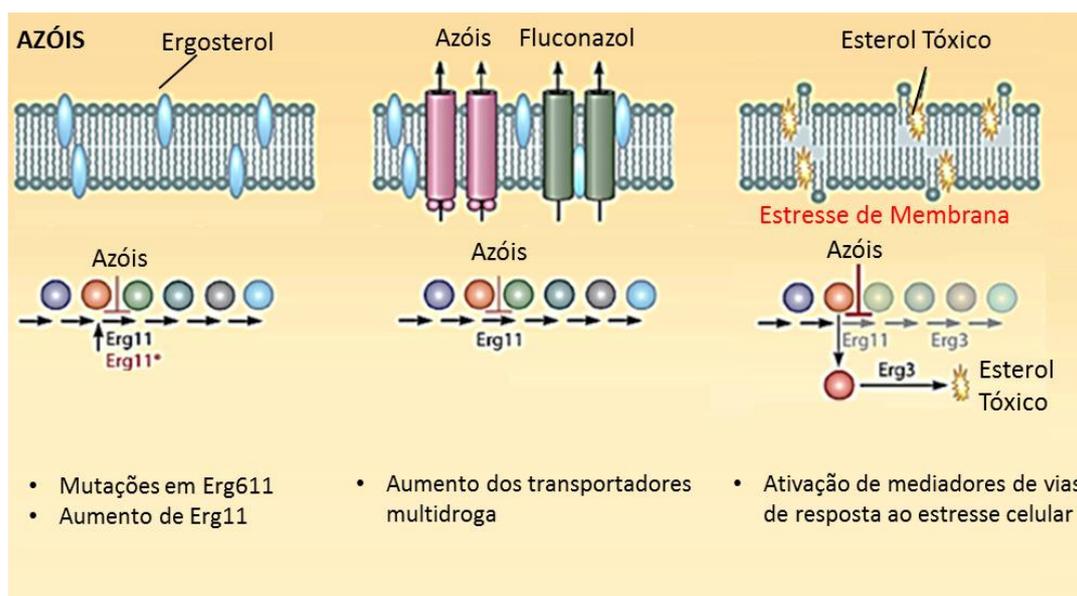


Figura 3: Mecanismo de resistência aos azóis em *C. neoformans*.

O mecanismo de resistência aos azóis em *C. neoformans* pode estar relacionado a mutações ou superexpressão no gene que codifica a Erg11, alteração no transporte de drogas ou mesmo a capacidade do fungo em responder ao estresse celular.

Fonte: Adaptado de Shapiro *et al.* (2011)

A resistência a polienos pode ser encontrada com mais frequência em fungos filamentosos, como espécies de *Aspergillus*, do que em leveduras. No entanto, foram observados casos de diminuição da susceptibilidade dessa classe de drogas em espécies de *Candida* (Kanafani & Perfect, 2008) e resistência em *C. neoformans* (Kim *et*

al.,1975). Foi observado que existe uma relação entre a susceptibilidade a polienos e os níveis de esteróis de membrana e que a adição de esteróis em meios de cultura protege os fungos da ação dos polienos (Ghannoum & Rice, 1999).

Estudos de mecanismos de resistência de *C. neoformans* à anfotericina B foram realizados analisando cepas mutantes e os poucos isolados clínicos resistentes. Foi observado que o mecanismo de resistência a anfotericina B parece estar relacionado a uma alteração nos esteróis das células, o que poderia afetar a ligação da droga a esses esteróis. No entanto, em mutantes com resistência cruzada de anfotericina B e fluconazol foi observado que não havia alteração nos esteróis de membrana, mas havia uma bomba de efluxo de drogas. Resistência a anfotericina B em *C. neoformans* foi pouco encontrada, sendo observada raramente apenas como resistência secundária (Pfaller *et al.*, 2011).

Estudos de susceptibilidade a drogas observaram que poucos pacientes tiveram infecções com cepas que apresentavam CMI de drogas aumentadas. Ao se realizar o estudo de resistência, deve-se levar em consideração a localização geográfica da cepa analisada e se é proveniente de infecção recorrente. Um estudo realizado durante a década de 2000 observou que a resistência a fluconazol é menor na Europa e América do Norte quando comparada àquela da África, Ásia e América Latina. Em relação à anfotericina B, estudos também demonstraram pouca resistência à droga, que demonstra uma alta eficácia no tratamento de 99% dos isolados de *C. neoformans* analisados (Pfaller *et al.*, 2011).

Estudos com mutantes de *C. neoformans* resistentes a polienos observaram que a alteração de susceptibilidade a esse grupo de drogas não está completamente relacionada à composição de esteróis. Linhagem selvagem que apresenta a via biossintética do ergosterol preservada demonstrou-se sensível aos polienos, porém mutantes com redução de ergosterol, embora resistentes a nistatina e piramicina, apresentaram-se sensíveis à anfotericina (Kim *et al.*,1975).

1.4 Busca por novos alvos terapêuticos

A incidência das micoses sistêmicas atualmente é uma grande preocupação para a saúde humana, já que estas prevalecem em grupos de pacientes com imunodeficiências. O tratamento utilizado é baseado no uso de drogas antifúngicas, que nem sempre são eficazes para a erradicação da doença e provocam efeitos adversos em muitos pacientes

(Jensen-Pergakes *et al.*, 1998). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas mais específicas poderia ser uma solução para a problemática atual das drogas comercialmente disponíveis.

A pesquisa e o desenvolvimento de drogas necessitam de muito investimento financeiro, além de demandarem muito tempo até que estas possam ser utilizadas pela população. As drogas desenvolvidas para alvos moleculares identificados por genômica comparativa podem ser promissoras para a terapia antifúngica (Abadio *et al.*, 2011).

A identificação de genes essenciais ou importantes para viabilidade celular de fungos oferece uma estratégia alternativa para a busca de novos alvos para drogas antifúngicas. Roemer *et al.*, (2003) e Hu *et al.*, (2007) demonstraram experimentalmente a essencialidade de genes dos fungos patogênicos *C. albicans* e *A. fumigatus*, respectivamente. A análise de sequências do genoma de *Paracoccidioides brasiliensis* revelou novos alvos moleculares, que após sua identificação podem ser analisados por genômica comparativa a fim de verificar em quais espécies os genes ou seus homólogos são encontrados, possibilitando o conhecimento de possíveis alvos para fármacos (Felipe *et al.*, 2005).

A genômica comparativa realizada a partir de 57 genes, sendo 55 essenciais e 2 importantes para a sobrevivência do fungos, revelou 10 genes conservados em várias espécies de fungos e ausentes no genoma humano. A partir desta lista, foram selecionados quatro potenciais genes alvo: kre2, erg6, rim8 e trr1, baseados em alguns critérios, entre os quais estão: ser, de preferência, uma enzima; ser essencial ou importante para a sobrevivência do fungo no interior do hospedeiro; ter uma localização celular acessível para que a droga tenha sua atividade facilitada; estar presente em todos os patógenos analisados e ausentes em humanos; e não ser auxotrófico. As drogas desenvolvidas para alvos moleculares identificados por genômica comparativa podem ser promissoras para a terapia antifúngica reduzindo os efeitos tóxicos provocados pela inibição de alvos celulares (Abadio *et al.*, 2011).

Muitos estudos têm sido realizados nos últimos anos a fim de encontrar novos tratamentos antifúngicos. A genômica comparativa é apenas uma das técnicas para se buscar novas drogas para o tratamento dessas micoses, porém existem muitas outras estratégias para tal fim, como por exemplo, estudos de compostos a partir de fontes naturais tais como plantas, microrganismos ou mesmo organismos marinhos (Vandeputte *et al.*, 2011). Outra estratégia utilizada é buscar efeitos antifúngicos em drogas já utilizadas atualmente com outras finalidades terapêuticas. Existem drogas

utilizadas para o tratamento de infecções causadas por outros microrganismos que apresentam efeito antifúngico, mas que ainda não foram muito estudadas em espécies de fungos. A milofosina é uma droga usada contra *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* e que foi testada em fungos, inclusive *C. neoformans* e que apresentou atividades antifúngicas (Pappas, 2011).

Pesquisadores buscam, ainda, elucidar a biologia e metabolismo dos microrganismos tanto *in vitro* como *in vivo*, bem como a interação patógeno-hospedeiro (Vandeputte *et al.*, 2011). Fatores que influenciam a função imunológica do hospedeiro também são alvos de terapias para o tratamento de infecções fúngicas e já foram realizados alguns estudos observando efeitos da administração de citocinas e anticorpos monoclonais, porém não foram encontrados resultados confirmatórios (Pappas, 2011). Muitos desses estudos demonstraram resultados promissores para a obtenção de novos antifúngicos, porém, atualmente, nenhum deles resultou em um composto adequado para serem realizados ensaios clínicos (Vandeputte *et al.*, 2011).

1.5 Biossíntese do ergosterol

Os esteróis desempenham diversas funções nos organismos vivos regulando processos biológicos e mantendo a estrutura da membrana celular. Podem ainda afetar a transdução de sinais na célula, a reorganização do citoesqueleto, crescimento e o processo de infecção (Dufoure, 2008).

O ergosterol é um dos principais componente de membrana de fungos, sendo um lipídeo específico para esse reino. A via de biossíntese de esteróis é bastante complexa envolvendo diversas enzimas, que podem ser essenciais ou não para a viabilidade da célula (Kristan & Rizner, 2012). Há muito tempo já se foi observado que em mutantes com a perda total de ergosterol, ocorre acúmulo de precursores da via de biossíntese (Kim *et al.*, 1975). O colesterol, que é um lipídeo presente nas membranas de animais, é produzido pela via de biossíntese de esteróis e apresenta etapas comuns à síntese de ergosterol até a produção da molécula de zimosterol já nos estágios finais da via, como pode ser visualizado na **Figura 4** (Kristan & Rizner, 2012). A estrutura dos dois lipídeos também é semelhante (**Figura 5**); a diferença é que o ergosterol possui uma ligação dupla a mais no anel B e também na cadeia alifática, e, ainda um grupo metil ramificado no C24 (Dufoure, 2008).

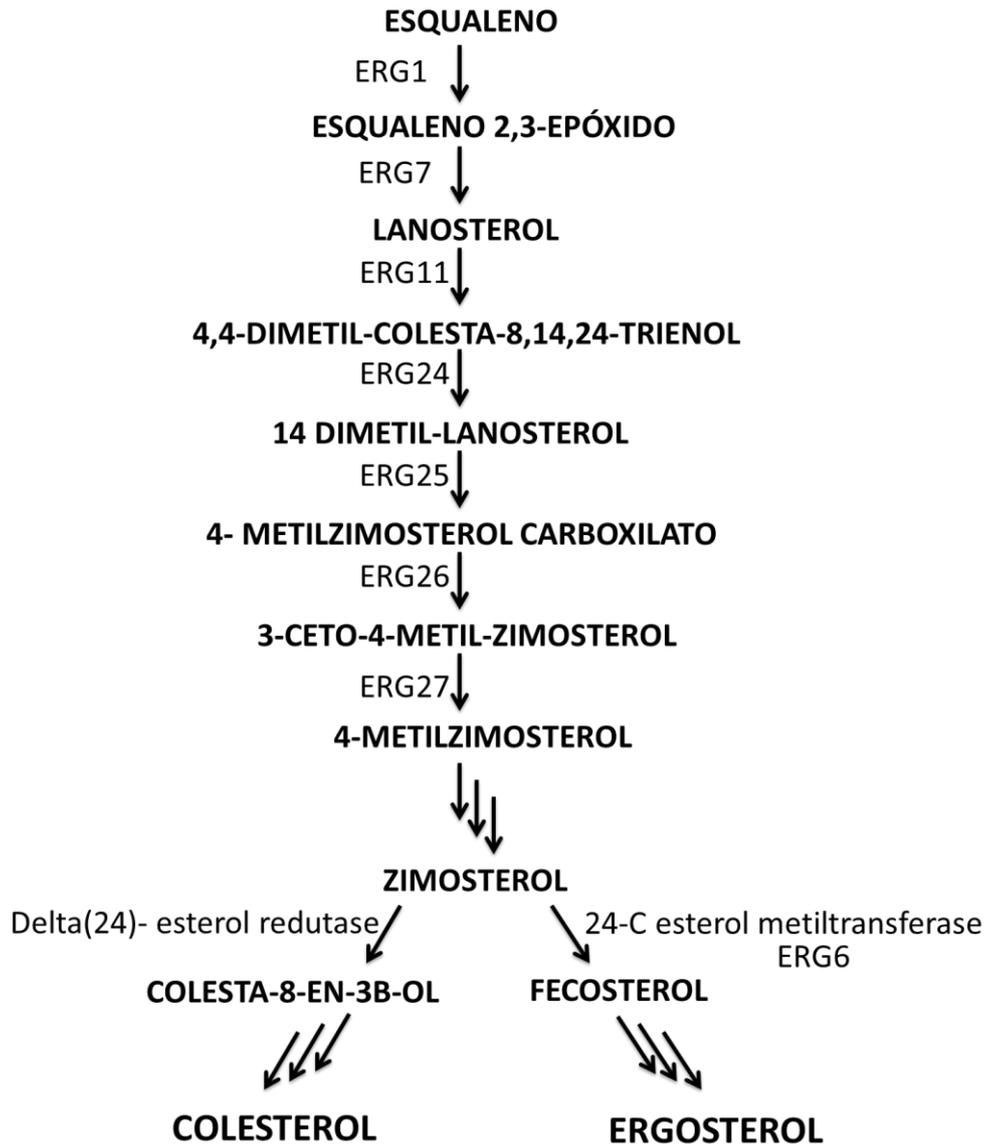


Figura 4: Semelhança entre a via de biossíntese do colesterol e do ergosterol.

A biossíntese do colesterol e do ergosterol é idêntica até a síntese do zimosterol. A partir desse composto, são sintetizados esteróis diferentes em cada uma das vias utilizando enzimas distintas.

Fonte: Elaborada pela autora.

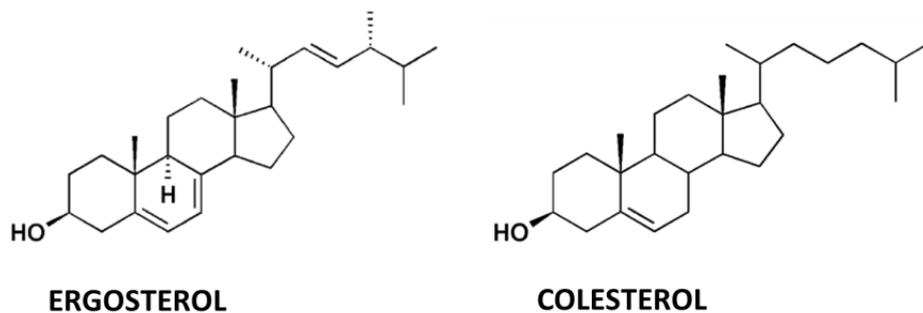


Figura 5: Semelhança estrutural entre os lipídeos de membrana de fungos e animais, ergosterol e colesterol respectivamente.

O ergosterol possui uma ligação dupla a mais no anel B e também na cadeia alifática, e, ainda um grupo metil ramificado no C24.

Fonte: Adaptada de Kristan & Rizner, 2012

A análise comparativa realizada no FUNGIpath v3.0 utilizando banco de dados KEGG entre a via de biossíntese do ergosterol de diversos filos de fungos demonstra que a via não é idêntica entre os fungos, porém é altamente conservada. Entre os *Basidiomycetos*, no qual o *C. neoformans* está agrupado, quase todas as enzimas parecem ser 100% conservadas.

A via se inicia com a produção de lanosterol a partir de uma molécula de esqualeno (**Figura 6**). Esse lanosterol sofre uma desmetilação pela enzima Erg11, que pode ser chamada de CYP51 e representa a primeira enzima da síntese de ergosterol (Kristan & Rizner, 2012). Os azóis atuam inibindo Erg11, dessa forma, mutantes com defeitos na produção de ergosterol são mais sensíveis a essa classe de drogas, segundo Jensen-Pergakes *et al.* (1998) e Sanglard *et al.* (2003), pois afetam a biossíntese de ergosterol, prejudicando ainda mais essa via. As enzimas seguintes da via são a Erg24, Erg25, Erg26 e Erg27 que correspondem respectivamente a uma C-14 esterol redutase, C-4 metil oxidase, C-4 esterol descarboxilase e esterol 3 ceto-redutase (Kristan & Rizner, 2012).

Como já mencionado, o zosterol é o último esterol comum entre a via de biossíntese do ergosterol e do colesterol. Para a síntese de ergosterol, o zosterol é convertido a fecosterol pela enzima Erg6, uma esterol C-24 metiltransferase que atua adicionando um grupo metil ao C-24 (Kristan & Rizner, 2012). As enzimas finais da via são respectivamente a Erg2 (esterol C-8 isomerasas), Erg3 (esterol C-5 desaturases), Erg5 (esterol C-22 desaturases) e por fim Erg4 (esterol C-24 redutase). Mutantes de ERG2, ERG3 e ERG5 foram gerados em *S. cerevisiae* e foram observadas alterações na composição lipídica e na fluidez da membrana celular (Sharma, 2006).

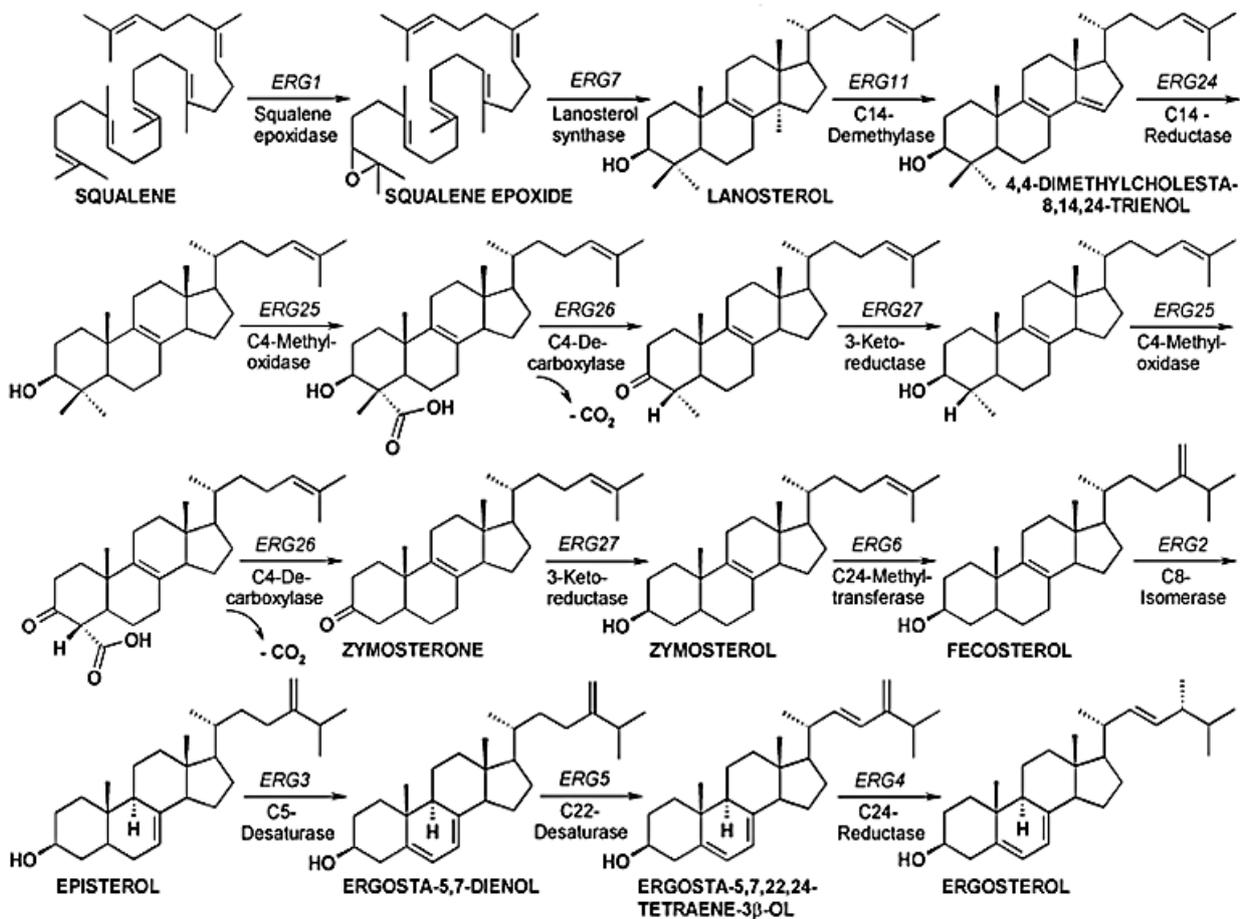


Figura 6: Via de biossíntese do ergosterol de fungos.

A via se inicia com a produção de lanosterol a partir de esqualeno e finaliza com a produção de ergosterol pela enzima pela Erg4. A Erg6 é responsável pela conversão de zimosterol em fecosterol.

Fonte: Kristan & Rizner (2012).

Estudos realizados com a Erg24 em *C. albicans* (Jia *et al.*, 2002) e *S. cerevisiae* (Marcireau *et al.*, 1992) mostraram que a enzima é um potencial alvo de drogas antifúngicas, já que mutantes para esta enzima apresentaram diversos fenótipos alterados em *C. albicans* e em *S. cerevisiae* foram incapazes de crescer em condições aeróbias. A Erg25 foi estudada em *S. cerevisiae*, no qual foi observada a necessidade de suplementação de esteróis para crescimento em meios de cultura, além do acúmulo de 4,4-dimetilzosterol (Bard *et al.*, 1996). Mutantes de ERG26 em *S. cerevisiae* apresentaram acúmulo de esteróis intermediários tóxicos para a célula atrapalhando seu crescimento (Gachotte *et al.*, 1998). A enzima esterol 3 ceto-redutase, Erg27, foi analisada em *C. albicans* demonstrando que sua ausência afetou o crescimento e a viabilidade do fungo, já que os mutantes foram capazes de crescer apenas em meios contendo maltose. (Pierson *et al.*, 2004).

Existe ainda uma enzima Erg28 que, ao ser deletada em *S. cerevisiae*, demonstrou defeitos na desmetilação de C-4 provocando o acúmulo de esteróis intermediários de maneira semelhante a mutantes de ERG26 e mutantes de ERG27, segundo Gachotte *et al.* (2001). Estudos com mutantes de ERG6 demonstraram que o gene não é essencial para a sobrevivência dos fungos, porém, sua ausência afeta diversos fenótipos. Mutantes de *erg6* em *C. albicans* apresentaram susceptibilidade a drogas e a composição de esteróis de membrana alterada (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998), enquanto em *Candida lusitanae*, as células apresentaram-se vacuolares e com defeito de crescimento (Young *et al.*, 2003).

O gene ERG2 não é um gene essencial e foi deletado em *S. cerevisiae* resultando em uma diminuição da enzima triptofano permease, Tat2 provocada pelo aumento de sua degradação vacuolar. Acredita-se que esse efeito ocorre, possivelmente, devido ao acúmulo de esteróis intermediários específicos que afetam os microdomínios de lipídeos nas membranas celulares (Daicho *et al.*, 2009).

Estudos em *Candida glabrata* deletando o gene *erg3* observaram alterações na composição dos esteróis de membrana, aumento no tempo para uma nova geração celular e aumento da susceptibilidade a drogas como azóis e polienos (Geber *et al.*, 1995). No entanto, mutantes de ERG3 foram identificados e caracterizados em *C. albicans* demonstrando resistência a azóis e alterações na composição de lipídeos (Martel *et al.*, 2010).

A enzima esterol C-22 desaturase, Erg5, pode ainda ser chamada de CYP61 e sua inibição afeta a organização da membrana celular mas não é letal para o fungo (Kristan & Rizner, 2012). Sua afinidade a antifúngicos foi avaliada em *S. cerevisiae* a fim de investigar a potencial influência da enzima na susceptibilidade a azóis, já que ela é capaz de se ligar aos inibidores de Erg11 o que demonstra que Erg5 também pode ser um potencial alvo molecular para drogas antifúngicas (Kelly *et al.*, 1997b).

A Erg4 catalisa a etapa final da via de biossíntese do ergosterol produzindo o respectivo produto. Em *S. cerevisiae*, a deleção deste gene provocou a ausência de ergosterol e o acúmulo do precursor ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3L-ol. Além disso, mutantes de ERG4 apresentaram hipersensibilidade a cátions bivalentes e a drogas como cicloheximida, fluconazol e brefeldina A, que poderiam ter sua entrada facilitada na célula pela ausência do ergosterol na membrana ou por problemas nas bombas de efluxo que retiram a droga de dentro da célula (Zweytick *et al.*, 2000).

Enzimas que atuam na biossíntese do ergosterol são potenciais alvos para drogas antifúngicas. Atualmente o principal alvo explorado é a Erg11, na qual os azóis agem provocando sua inibição. No entanto, é importante ressaltar que esta enzima atua no início da via e dessa forma é comum para a biossíntese do colesterol de animais, apresentando apenas diferentes isoformas. Por esta razão, observam-se vários efeitos colaterais em pacientes em tratamento com drogas que atuam neste alvo. Assim, outras enzimas da via poderiam ser alvos moleculares mais apropriados, como a Erg6, Erg4 e Erg5 por serem responsáveis pelo final da via e específicas para a síntese de ergosterol (Kristan & Rizner, 2012).

1.6 Erg6 e seu papel na biossíntese de ergosterol

A Erg6 codificada pelo gene ERG6 é uma enzima esterol 24-C metiltransferase (24-SMT) que atua na via do ergosterol convertendo zimosterol em fecosterol inserindo um grupo metila no C-24. Analisando as vias de biossíntese de esteroides no FUNGIpath v3.0, observa-se que a partir do esqualeno pode-se iniciar a via do ergosterol ou uma via que se inicia com a produção de cicloartenol e resulta na síntese de campesterol. As duas vias compartilham algumas semelhanças, como a produção do intermediário episterol e, principalmente, a utilização da enzima 24-SMT, no entanto, *C. neoformans* sintetiza preferencialmente o lanosterol que resulta na via do ergosterol (Nes *et al.* 2009).

Já foram descritas vias alternativas para a produção de ergosterol para *C. neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Nes *et al.*, 2009; Visbal *et al.*, 2003). Essas vias consistem em produzir ergosterol a partir da conversão de lanosterol em eburicol, que também é uma reação catalisada pela enzima Erg6 (**Figura 7**). Dessa forma a inibição de Erg6 provocaria alteração em duas vias para a conversão do ergosterol.

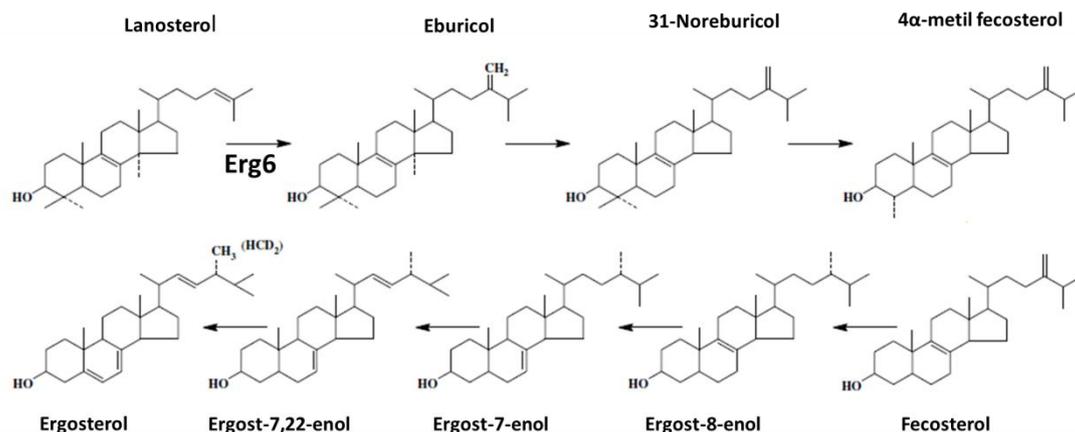


Figura 7: Via de biossíntese do ergosterol com a produção de eburicol.

A produção de ergosterol pode ocorrer por uma via de biossíntese a partir da conversão de lanosterol em eburicol, que é uma reação catalisada pela enzima Erg6.

Fonte: Adaptada de Nes *et al.* (2009).

Mutantes de ERG6 em *S. cerevisiae* apresentaram crescimento vegetativo normal e não tiveram meiose ou esporulação afetada, mostrando que o gene não é essencial para esse fungo. Foi observado que o gene apresenta pleiotropismo, afetando diversas características fenotípicas, principalmente relacionadas à permeabilidade e fluidez da membrana, tais como, hipersensibilidade a cicloheximida, resistência a nistatina, redução na capacidade de transformação genética e defeitos no transporte de triptofano (Gaber *et al.*, 1989). Ainda nessa mesma espécie, foi observado que o gene ERG6 limita a taxa de difusão passiva tornando-a mais lenta e provocando o acúmulo de pequenas drogas lipofílicas pela membrana sem afetar um transportador de drogas, o Pdr5 (Emter *et al.*, 2002).

Em *C. albicans*, a deleção de ERG6 originou cepas com hipersensibilidade a inibidores metabólicos e da síntese de esteróis como terbinafina, cicloheximida, cerulenina e brefeldina A. Os mutantes apresentaram resistência a nistatina enquanto para os azóis, clotrimazol e cetoconazol, não foram observadas diferenças de susceptibilidade a essa classe de drogas. A captação de cátion foi aumentada 3 a 4 vezes no mutante, porém o efluxo parece não ter sido alterado (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998).

A deleção do gene ERG6 em *Candida lusitanae* resultou em cepas viáveis, porém com defeito de crescimento formando uma mistura de células aumentadas e vacuolares com poucas células ovoides. Além disso, foi observada resistência a anfotericina B, hipersensibilidade a outros inibidores de esteróis como terbinafina, azóis e morfolinás e redução do conteúdo de ergosterol. Diante da observação de aumento da

resistência a anfotericina B com mutantes de ERG6 e da semelhança fenotípica que esses apresentaram com isolados clínicos resistentes à droga, a expressão de ERG6 foi analisada nesses isolados com fenótipos de resistência. Curiosamente, ao invés de observar uma redução na transcrição de ERG6, ocorreu um aumento de transcritos mesmo sendo observada a redução de ergosterol. Esse resultado demonstra que, nestes isolados clínicos, ocorre comprometimento da via de biossíntese de ergosterol, provocando uma redução na produção desse esterol. Por fim, concluiu-se que existe uma modulação de enzimas da via, porém o gene ERG6 não está relacionado à resistência observada (Young *et al.*, 2003).

Em isolados de *Candida glabrata* pouco susceptíveis a polienos foi observada uma redução no ergosterol e acúmulo de esteróis intermediários, que estavam relacionadas a mutações no gene ERG6 do fungo. Esses isolados mostraram redução na taxa de crescimento, redução na susceptibilidade a polienos e alterações na parede celular, visualizadas pela sensibilidade ao estressor de parede *Calcofluor White* (Vandeputte *et al.*, 2007).

Em *C. neoformans*, utilizando inibidores de Erg6, Nes *et al.*, 2009 demonstraram que o fungo utiliza a enzima em uma etapa enzimática crítica para o controle da síntese de ergosterol e sua ausência provoca redução no crescimento do fungo e acúmulo de 4,4-dimetil esteróis. Até o presente momento não existem trabalhos que mostrem os efeitos da ausência desta enzima na homeostase do ergosterol e na biologia e patogênese de *C. neoformans*.

2 JUSTIFICATIVA

O ergosterol é um componente da membrana de fungos e protistas. Sua via de biossíntese possui uma série de etapas envolvendo a produção de esteróis intermediários que são convertidos em outros compostos por diversas enzimas. A intervenção em alguma dessas etapas provoca diversas alterações fenotípicas afetando a capacidade de sobrevivência de diferentes fungos em diversas condições ambientais. As drogas antifúngicas que atuam na via do ergosterol, como os azóis, que inibem a Erg11 no início da via, apresentam limitações como os efeitos tóxicos provocados nos pacientes e casos de resistência de algumas cepas fúngicas. Nesse contexto, existe a necessidade pela busca de novos alvos moleculares, que pode ser feita através do estudo funcional de genes. Vários genes da via do ergosterol já foram estudados em fungos como *S. cerevisiae* e *C. albicans* e os resultados mostraram que muitos desses apresentam pleiotropismo. Contudo, em *C. neoformans* a via ainda foi pouco estudada. A escolha do gene ERG6 para a caracterização funcional e molecular em *C. neoformans* se deve ao fato de o gene ser exclusivo de fungos e ausente em humanos. Dessa forma, o estudo funcional de ERG6 em *C. neoformans* irá evidenciar o papel deste gene neste patógeno, além de fornecer subsídios que poderão corroborar os dados da literatura de outros fungos que demonstram que este é um potencial alvo molecular que deve ser explorado para a busca de um novo antifúngico eficaz para o tratamento de diferentes micoses que atingem muitos pacientes.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar a função do gene ERG6 em *C. neoformans*, através de deleção gênica, por análise do fenótipo do mutante obtido quanto às alterações do meio relacionadas a estresse e quanto à virulência: *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos Específicos

- 1) Investigar o papel do gene ERG6 na expressão dos fatores de virulência: cápsula, melanina, capacidade de crescimento a 37°C, em resposta a alterações do meio relacionadas a estresse osmótico, estresse de parede celular e estresse oxidativo.
- 2) Verificar o efeito da deleção de ERG6 na sobrevivência de *C. neoformans in vitro* e na virulência *in vivo*.
- 3) Determinar as CMI's do mutante *erg6Δ* às drogas antifúngicas disponíveis para o tratamento de micoses.
- 4) Identificar as alterações na composição de esteróis de membrana provocadas pela deleção do gene ERG6.
- 5) Citolocalizar Erg6 em *C. neoformans*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens, meios de cultura e oligonucleotídeos utilizados no trabalho

As linhagens trabalhadas estão representadas na **Tabela 2**. Foram realizados estoques de cada uma das cepas em tubos contendo uma mistura de 50% de YPD líquido e glicerol 50%, e armazenados a -80°C. Esses estoques foram utilizados para o repique por esgotamento em placas de YPD sólido (YPD + ágar 1,5%) a cada 15 dias. As placas foram incubadas a 30°C por 48h e armazenadas a temperatura de 2-8°C. As colônias isoladas em cada uma das placas foram utilizadas diretamente em testes ou em inóculos em YPD líquido antes de cada um dos experimentos realizados com as cepas. Os oligonucleotídeos utilizados no trabalho estão representados na **Tabela 3**.

Tabela 2. Linhagens de *C. neoformans* utilizadas

Linhagem	Descrição e genótipo
H99	Selvagem - wt (ERG6)
360.erg6	Mutante <i>erg6</i> Δ
180.360.erg6	Reconstituído Δ <i>erg6</i> + ERG6 (ERG6:: <i>HPH</i> ::ERG6)

Fonte : Elaborada pela autora.

Os meios utilizados durante a pesquisa foram:

- **YPD:**

Extrato de levedura 1,0% (p/v)

Glicose 2,0% (p/v)

Triptona 2,0% (p/v)

pH= 5,6, esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 min.

No caso de meio sólido adição de 1,5% de ágar.

A base do meio YPD foi utilizada para outras condições testadas:

- YPD + Sorbitol 1M
- YPD + *Congo Red* 1 % e 0,5 %
- YPD + SDS 0,05 %
- YPD + *Calcoflúor White* 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL

- YPD + Cafeína 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL
- YPD + NaCl 1,5 M
- YPD + KCl 1,5 M
- YPD + H₂O₂ 1 mM e 5 mM

- **YNB:**

YNB (Difco) 1,7 % (p/v)

Glicose 2,0 % (p/v)

pH = 5,0 e esterilização por filtração em membranas do tipo milipore 0,25 µm.

- **Niger Seed:**

Semente de Niger	7 % (p/v)	Autoclavagem a 120°C por 15 min.
triturada		Filtração do extrato em gaze e ajuste do
Água destilada	35 %	volume com água destilada.
Glicose	0,1 %	Após as etapas acima adiciona-se a glicose e
Ágar	2 %	o ágar e esteriliza-se por autoclavagem a
		120°C por 15 min.

- **Meio DMEM + MOPS para produção de cápsula**

Ágar 5 % (p/v) Autoclavagem a 120°C por 15 min.

Água q.s. Equilibrar a temperatura a 65 °C.

DMEM 13,4 g/L Esterilização por filtração em membranas do

MOPS 25 mM tipo *milipore* 0,25 µm.

NaHCO₃ 22 mM

- **Meio de Gema de Ovo para ensaio de fosfolipase**

Base ágar

Triptona	1,0 % (p/v)
Glicose	1,0 % (p/v)
Cloreto de Sódio	1 M
Cloreto de Cálcio	0,005 M
Ágar	2,0 % (p/v)
Água	q.s.

Ajuste do pH para 5,6 e autoclavagem a 120°C por 15 min.

Preparo da emulsão de gema de ovo 50%:

Gema de Ovo	80 mL
Salina	80 mL

Adição da emulsão a base de ágar, sendo a concentração final de 8% de gema de ovo.

- **RPMI:**

Glicose	2,0 % (p/v)
MOPS	0,165 M
RPMI-1640	1,04 % (p/v)

Ajuste do pH para 7,0 e esterilização por filtração em membranas do tipo milipore 0,25µm.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados ao longo deste trabalho

Iniciador	Alvo	NOME	Sequencia 5'-3'	USO
1	ERG6	LF042	CGGATATGGAATGCAGAGGT	<i>Double Joint</i>
2	ERG6	LF043	ATCATGTCATAGCTGTTTCCTGGCATCCCTGAG AGCAACAAT	<i>Double Joint</i>
3	ERG6	LF046	CAGGAAACAGCTATGACATGAT	<i>Double Joint</i>
4	HPH	LF028	GCGGGAGATGCAATAGGTCAG	<i>Double Joint</i> Confirmatório
5	HPH	LF029	AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT	<i>Double Joint</i> Confirmatório
6	ERG6	LF047	GAGCTCGGATCCACTAGTAACG	<i>Double Joint</i>
7	ERG6	LF044	CGTTACTAGTGGATCCGAGCTCTATACCCTGGG CCTTACTTGC	<i>Double Joint</i>
8	ERG6	LF045	TCGGAGATCAAGACGAGGTAG	<i>Double Joint</i>
9	ERG6	LF036	CCACTCAACATATCCGCAACG	Confirmatório externo ao locus de ERG6
10	ERG6	LF037	CCCCTACACATTTCCGTGTCC	Confirmatório externo ao locus de ERG6
11	ERG6	LF040	CGCTGTGTGGTTCCTTGAGA	PCR em tempo real fora da junção éxon-éxon
12	ERG6	LF041	GTGAACAACCTGGTCTTGCC	PCR em tempo real fora da junção éxon-éxon
13	ACT	LF039	CCACGCTATCCTCCGTATCG	PCR em tempo real fora da junção éxon-éxon
14	ACT	LF038	CGGCAGAAGTGGTGAAGAGG	PCR em tempo real fora da junção éxon-éxon
15	ERG6	LF106	GGAATCGAGGTTGGAGACGGTA	PCR em tempo real na junção éxon-éxon
16	ERG6	LF105	GCATCATCTCGGTCGGCCAGAT	PCR em tempo real na junção éxon-éxon
17	ACT	LF126	GCTGTCTTCCCTTCTATTGTTG	PCR em tempo real na junção éxon-éxon
18	ACT	LF125	CGACGTAAGAGTCCTTCTGG	PCR em tempo real na junção éxon-éxon
19	ERG6	LF100	ATCCTCGGATCCATGCCCGCCGAAACCCGTTC	Fusão com GFP em pGAL7 e pCN50
20	ERG6	LF101	ATCCTCGGATCCCTAGTTAGCGGGCTTTCGAGC	Fusão com GFP em pCN50

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Construção do cassete para deleção do gene *ERG6* em *C. neoformans*

Conduziu-se uma busca *in silico* (função tBLASTn) no banco de dados do genoma da cepa H99 de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), BROAD INSTITUTE (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html), usando como parâmetro a sequência da proteína Erg6 de *S. cerevisiae* (código GenBank CAA89944.1), que permitiu a identificação de uma sequência codante de uma proteína de 343 aminoácidos correspondente à ORF CNAG_03819 - esterol C-24-metiltransferase (Broad Institute). A mesma sequência foi identificada na cepa JEC21 (sorotipo D, var. *neoformans*).

De posse dessa informação, desenhou-se oligonucleotídeos para construção de um cassete de deleção, contendo a marca de resistência à higromicina, segundo o método de *Double joint PCR* (DJ-PCR) (Kim *et al.*, 2009) A técnica consiste em sintetizar dois fragmentos contendo regiões homólogas adjacentes a ORF de *ERG6*, fusionadas ao marcador seletivo (*hph* – Higromicina fosfotransferase) que serão co-transformados no fungo por biobalística. Primeiramente os fragmentos 1+2, 3+4, 5+6 e 7+8 (**Figura 8**) foram amplificados utilizando oligonucleotídeos específicos para de acordo com a respectiva numeração na **Tabela 3** (coluna 1).

Na síntese dos fragmentos iniciais utilizou-se a Enzima Fast DNA Polimerase, a partir da qual foi preparado um mix contendo: 1X da enzima Fast Polimerase (Fermentas); 0,5µM de cada oligonucleotídeo; 10ng do DNA genômico de *C. neoformans* H99 (para amplificação do fragmento 1+2: região 5' flanqueadora de *ERG6* e 7+8: região 3' flanqueadora de *ERG6*) e pZP- HYG2 (plasmídeo que contém o marcador seletivo para Higromicina B, HPH, controlado pelo promotor de actina e terminador *TrpC* ambos de *C. neoformans* (Walton *et al.*, 2006) para amplificação dos fragmentos 3+4 (região 5' do marcador seletivo *hph*) e 5 + 6 (região 3' do marcador seletivo *hph*) e água *milliQ* suficiente para o volume total de 50 µL.

Posteriormente foram gerados por PCR *Overlap* os fragmentos 1+4 e 5+8 (**Figura 8**) utilizando uma reação semelhante a anterior com a Enzima *Fast DNA Polimerase*, que consistiu em um mix contendo 1X da enzima Fast Polimerase (Fermentas); 1µM de cada oligonucleotídeo; 1 µL de cada fragmento gerado na primeira etapa e quantidade de água *milliQ* para completar o volume para 50 µL. Os ciclos da PCR foram: pré-desnaturação de um minuto a 94°C; amplificação em 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 56°C por 30 segundos e extensão final de 68°C por 3

minutos. O primeiro fragmento foi sintetizado pela junção de 1+2 e 3+4, equivalente a região flanqueadora 5' de ERG6 fusionada à região 5' do marcador seletivo HPH, resultando em um fragmento de 2.075 pb. O segundo foi sintetizado utilizando os fragmentos 5+6 e 7+8, equivalente a região flanqueadora 3' de ERG6 fusionada à região 3' do marcador seletivo HPH, resultando em 2.112 pb.

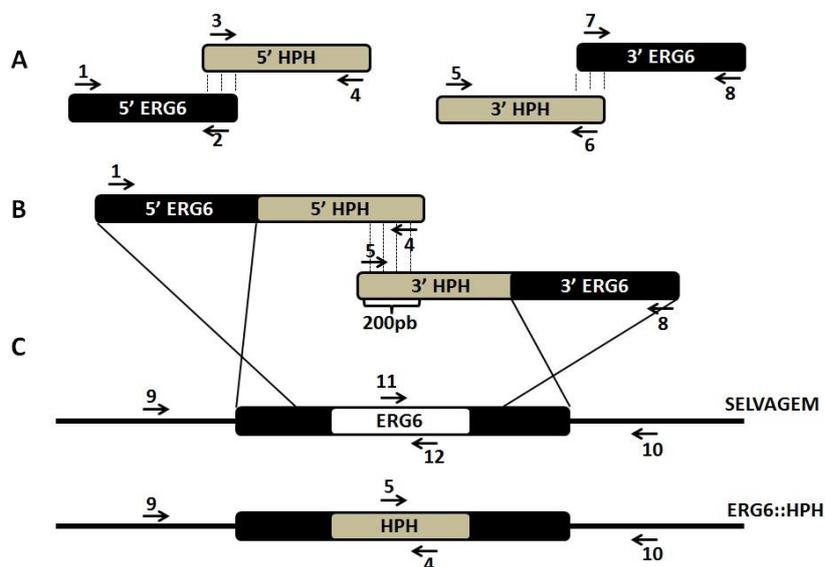


Figura 8. Representação geral da técnica de PCR *Double joint* para construção do cassete de deleção.

A) Primeira etapa: Os oligonucleotídeos 1 e 2 amplificam a região 5' do gene de interesse enquanto o par 7 e 8 é utilizado para região 3'. As regiões 5' e 3' de HPH (higromicina fosfotransferase) são amplificadas usando os pares 3 e 4 e 5 e 6, respectivamente. **B) Segunda etapa:** Amplificação da região 5' do gene de interesse + HPH utilizando os oligonucleotídeos 1 e 4 e da região 3' do gene de interesse + HPH utilizando os oligonucleotídeos 5 e 8. **C)** Em seguida realiza-se uma co-transformação dos fragmentos 1+4 e 5+8 em leveduras de *C.neoformans* para que ocorra *in vivo* a reconstituição homóloga no lócus do gene ERG6, promovendo assim a deleção do mesmo. As setas indicam o oligonucleotídeo e seu sentido.

Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as reações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% e os produtos purificados do gel utilizando *kit GFX purification* da GE (segundo informações do fabricante) antes de serem utilizados nas etapas subsequentes. Os fragmentos 1+4 e 5+8 foram co-transformados por biobalística em células leveduriformes de *C. neoformans*. Os fragmentos, dentro do organismo, sofreram recombinações homólogas para deleção do gene ERG6, de acordo com a **Figura 8C**.

4.3 Transformação por Biobalística de *C. neoformans*

O isolado de *C. neoformans* utilizado para a transformação foi a cepa H99. Foi realizado um inóculo dessa cepa em 50 mL de YPD líquido que cresceu sob agitação de 150 rpm a 30°C durante 48 h. Após esse período, as células foram lavadas em solução salina (NaCl 0,9%) e transferidas para placa contendo meio YPD ágar + 1 M sorbitol. Essas placas, após estarem bem secas, foram utilizadas na transformação por biobalística (Toffaletti *et al.*, 1993; Davidson *et al.*, 2000).

As partículas utilizadas como carreadores do DNA foram de tungstênio M10 (diâmetro 0,7µm, Biorad) e foram preparadas da seguinte forma: 30 mg de partículas foram esterilizadas com 1 mL de etanol 70% por 20 minutos em vórtex a velocidade máxima. As partículas foram então centrifugadas e todo o sobrenadante foi removido. Foi adicionado 1 mL de água *milliQ* estéril às partículas que foram ressuspensas e centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm, sendo esse procedimento realizado mais duas vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as partículas foram ressuspensas em 500 µL de glicerol 50 % estéril.

A precipitação do DNA nas partículas foi realizada da seguinte forma: as partículas estéreis já prontas foram sonicadas por sete minutos para que elas desgrumassem e depois foram agitadas em vórtex a velocidade máxima por dois minutos. Passado o tempo, foram misturados na seguinte ordem: 50 µL de partículas estéreis, 5 µL de DNA (2 µg), 50 µL de cloreto de cálcio estéril (2,5 M) e 20 µL de espermidina (0,1 M). A mistura foi novamente agitada em vórtex por 10 minutos a velocidade três e então centrifugada por dez segundos a velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado e as partículas contendo o DNA foram ressuspensas em 150 µL de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada e o mesmo procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Ao final da última lavagem foi adicionado um volume de etanol proporcional ao número de placas transformadas que corresponde a 4 µL para cada. As partículas foram sonicadas por três segundos e foram distribuídas nas membranas nos discos carreadores e incubadas, por no mínimo trinta minutos em sílica. Por fim, membranas de pressão foram agrupadas em 4 (300 psi cada) a fim de garantir uma pressão final de 1.200 psi e colocadas em isopropanol.

Os parâmetros utilizados nos tiros foram 6 mm de distância do alvo, 1.200 psi de pressão de gás Hélio e 27 mmHg de pressão de vácuo. Após os tiros, as placas foram embaladas em papel alumínio e colocadas em estufa 30°C por 24 h. Passado o período,

as células foram coletadas da placa por raspagem utilizando cerca de 4 mL de YPD líquido em cada placa e foram transferidas para o meio seletivo contendo 200 µg/mL de Higromicina para seleção.

Colônias que cresceram em meio contendo 200 µg/mL de Higromicina (hyg) foram repicadas em placas contendo meios de YPD + ergosterol 0,002 % + triptofano 0,002 % + metionina 0,002 % e YPD + hyg 200 µg/mL + nistatina 20 µg/mL, a fim de contribuir na seleção. A seleção dos transformantes foi realizada baseada na resistência a ambas as drogas adicionadas aos meios e em características visuais das colônias.

4.4 Reconstituição do mutante *erg6*Δ

A co-transformação foi realizada para a obtenção da cepa reconstituída. O cassete contendo o gene *ERG6* foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos 1 e 8 (**Tabela 3**) e foi realizada a biobalística no mutante *erg6*Δ, seguindo o mesmo protocolo descrito na seção anterior, com o plasmídeo de pJAF (contém marca de resistência à geneticina ou neomicina ou G418 – neomicina fosfotransferase, controlado por promotor e terminador de actina de *C. neoformans*, doado pelo Dr. Andrew Alspaugh, Duke University). As células permaneceram por 48h na estufa após a transformação antes de serem transferidas para o meio seletivo contendo 200 µg/mL de G418. Foram obtidas diversas colônias com tamanhos distintos resistentes à droga.

A triagem dos reconstituídos de *ERG6* foi realizado utilizando placas contendo YPD+ G418 200 µg/mL, YPD + Hyg 200 µg/mL e YPD a 30°C e YPD a 37°C. Nesse caso, as colônias de interesse foram aquelas que não eram mais resistentes à higromicina e que eram à G418. Além disso, colônias que eram capazes de crescer a 37°C foram consideradas possíveis reconstituídos, já que a deleção do gene *ERG6* afeta seu crescimento a essa temperatura.

4.5 Extração de DNA genômico pela técnica de *Smash and Grab*

Os DNAs para análise da deleção gênica foram extraídos de acordo com protocolo *Smash and Grab*. As células foram cultivadas em 5 mL de YPD por 24 h ou 48 h e foram lavadas utilizando salina, sendo ressuspendidas, ao final, em 1 mL ou 2 mL de salina. As células foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 13.300 x g. O sobrenadante foi descartado e então foram adicionadas 0,2 mL de pérolas de vidro

(diâmetro: 400-600µm, Sigma), 0,5 mL de fenol:clorofórmio (Bioagency) e 0,5 mL de tampão TENTs (Tris HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM, Triton 2%, SDS 1%). A mistura foi agitada em vórtex durante 10 minutos e então centrifugada sob velocidade máxima durante 5 min. A fase aquosa obtida foi transferida para novo tubo, onde foram adicionados 50 µL de NaOAc 3 M e 1 mL de EtOH 100 % para precipitar o DNA. A mistura foi centrifugada por 15 min a velocidade de 13.300xg e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados, então, 200 µL de EtOH 70 % para lavar o precipitado e após agitação, o sobrenadante foi removido. A fim de tirar o álcool restante, foi realizada uma centrifugação durante 5 min a velocidade de 13.300xg e então o excesso foi removido com a pipeta. Os tubos permaneceram abertos durante o tempo necessário para que os precipitados secassem e por fim foram adicionados 25 µL de água *milliQ* contendo 100 µg/mL de RNase A que foi incubado a 37°C por 1-2 h.

4.6 Extração de DNA genômico de alta qualidade pela técnica de liofilização

Foi ainda utilizada a técnica de extração de DNA genômico por liofilização (Pitkin *et al.*, 1996) para a obtenção de DNAs de alta qualidade utilizados na técnica de *Southern Blot*. As células foram cultivadas em 50 mL de YPD a 30°C por 24 horas e após o período foram lavadas em solução salina. Ao final da lavagem, o sobrenadante foi retirado de forma a deixar apenas o suficiente para que o precipitado se distribuísse no falcon ocupando a maior superfície possível. O precipitado foi congelado a -80 °C por no mínimo 1 h e então foi liofilizado por cerca de 10 h até que fosse observado um pó bem seco. Após a liofilização, foram adicionados três a cinco mL de pérolas de vidro (3mm; VWR #3000) e o tubo foi agitado vigorosamente em vórtex até a formação de um pó bem fino. Foram adicionados 10 mL de tampão CTAB (Tris 100 mM, NaCl 0,7 M, EDTA 10mM, Brometo de hexadecilmetilamônio 1 % (m/v), 2-mercaptoetanol 1 % (v/v), pH= 7,5), e o conteúdo foi misturado até que se formasse uma solução viscosa de aspecto uniforme e então foi incubado em banho a 65 °C por 30 min. Passado o tempo, os tubos foram resfriados em água corrente e foi adicionado clorofórmio em um volume igual ao presente naquele momento. O tubo foi centrifugado por 10 min a velocidade máxima à temperatura ambiente, e ao final, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado igual volume de isopropanol. Foi realizada uma nova centrifugação por 5 minutos à temperatura ambiente a 2.000 rpm e o sobrenadante foi completamente descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70 %, ressuspendido

em 500 µL de RNase A (300 µg/mL) e incubado em banho a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, a integridade do DNA e o tratamento com RNase A foram verificados em eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

4.7 Confirmação da deleção e da reconstituição de ERG6 por PCR

Os DNAs genômicos extraídos e purificados foram quantificados no equipamento *GENEquant* observando sua concentração, a absorbância a 260 nm e a razão entre as leituras das absorbâncias 260/280. Os DNAs foram então diluídos a uma concentração de 10 ng/µL para realizar a confirmação por PCR. A PCR de confirmação da deleção de ERG6 no mutante foi realizada utilizando oligonucleotídeos externos ao locus gênico e internos a sequência de HPH a fim de amplificar a região 5' (oligonucleotídeos 9 e 4) originando um fragmento de 2.355 pb e a região 3' (oligonucleotídeos 5 e 10) originando 2.963 pb. A confirmação da transformação de reconstituição foi realizada de forma semelhante à anterior, utilizando para a região 5' os oligonucleotídeos 9 e 12 resultando em um fragmento de 2.701 pb e para a região 3', 10 e 11, 1.973 pb (**Tabela 3, Figura 8C**).

A PCR foi feita utilizando a enzima FideLiTaq polimerase (Fermentas) para um volume total de 50 µL, sendo 0,25 µL de Enzima FideLiTaq (10x), 0,4 µL de dNTPs (25Mm), 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos (10 µM), 1 µL de DNA genômico molde (10 ng/µL), 5 µL de tampão PCR e 41,35 µL de água *milliQ* para completar o volume. Os ciclos da PCR foram: pré-desnaturação de um minuto a 94 °C amplificação em 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento de 56 °C por 30 segundos e extensão final de 68 °C por 3 minutos.

4.8 Confirmação da deleção e reconstituição de ERG6 por *Southern Blot*

A deleção do gene ERG6 com sua substituição pelo cassete de resistência à higromicina foi confirmada pela técnica de *Southern Blot*. Para isso, foi necessário selecionar enzimas de restrição que teriam sítios que pudessem evidenciar alterações no padrão de restrição ao comparar o mutante com o selvagem.

A escolha das enzimas foi realizada utilizando uma sequência de 25.000 pb obtida do *C. neoformans grubii* H99 cneoH99_Chr2 910000-935000 no banco de dados do *Broad Institute*. As sequências foram analisadas pela ferramenta NEB cutter

disponibilizada pela *New England BioLabs* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). As enzimas escolhidas de acordo com seus perfis de restrição foram BglIII e XhoI para o *Southern Blot* confirmatório dos mutantes.

A digestão utilizando BglIII foi realizada para um volume de 50 μL , sendo 20 μL de DNA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 5 μL de NEB3 (10X), 4 μL de enzima (10 U/ μL) e 21 μL de água *milliQ* para completar o volume, e XhoI foi: 20 μL de DNA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 5 μL de NEB2 (10X), 2 μL de enzima (20 U/ μL), 0,5 μL de BSA (100X) e 22,5 μL de água *milliQ* para completar o volume para 50 μL .

As digestões permaneceram em banho a 37 °C *overnight* e no dia seguinte foram analisadas em gel de agarose 1 % utilizando TAE 1X (TAE 50X para 1L, 242 g Trizma Base, 18,6 g Sal sódico de ácido etilenodiamino tetra-acético, pH 8,0) a uma voltagem baixa (1-5V por cm^2 de gel) por cerca de 8h. Ao final da corrida, o gel foi fotografado com uma régua e todos os excessos de gel foram cortados. Em seguida, foram realizadas três lavagens no gel sob agitação leve com solução de despurinação (250 mM de HCl) por 10 minutos, tampão de desnaturação (NaCl 1,5 M + NaOH 0,5 M) por 30 minutos e tampão de neutralização (NaCl 1,5 M + Trizma Base 0,5 M, pH 7,5) por mais 30 minutos, respectivamente. A etapa seguinte foi a de transferência do DNA genômico digerido para a membrana de Nylon (Hybond N+), que ocorreu *overnight* por capilaridade, utilizando como solução de transferência SSC 2X (Estoque 20X: Na3citrato.2H₂O 0,3 M + NaCl 3 M, pH 7,0) Passado o período de transferência, o aparato foi desmontado e o gel foi visualizado no transiluminador a fim de verificar a transferência. A membrana foi retirada do aparato e submetida a “*cross linking*” em três pulsos de 1200 J/ cm^2 .

As etapas de preparo da sonda, hibridização e detecção foram realizadas utilizando *kit Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* da GE Helthcare. O tampão de hibridização foi preparado de acordo com protocolo estabelecido (NaCl 0,5 M + reagente bloqueador 4 %, para um volume de 0,125 mL por cm^2 de gel), em agitador magnético por 1-2 h e aquecido a 55 °C.

A marcação da sonda foi realizada em gelo logo antes da hibridização e sua quantidade foi proporcional ao volume do tampão de hibridização. A sonda (10 ng/ μL) utilizada na proporção de 10 ng para cada mL do tampão de hibridização foi primeiramente desnaturada em água fervente por 5 minutos e imediatamente colocada em gelo por mais 5 minutos. Foi adicionado igual volume do tampão de reação ao DNA resfriado, seguido pela adição do reagente de marcação em volume equivalente a 20 %

do volume proporcional ao tampão de hibridização e por fim, foi adicionada uma solução de cross-linker 20 %. O tubo contendo todos os componentes para a marcação da sonda foi incubado por 30 min a 37 °C e então foi misturado a 1 mL do tampão de hibridização para aquecimento à 55 °C.

Antes da etapa de hibridização, foi realizada uma pré-hibridização adicionando o tampão da hibridização a um tubo com a membrana que permaneceu no forno giratório por cerca de 10 minutos a 55 °C. Passado o tempo, 1 mL contendo tampão e a sonda marcada foi transferido para o tubo com a membrana a fim de realizar a hibridização, que ocorreu *overnight* em forno giratório a temperatura de 55 °C. A membrana foi então retirada do tubo e lavada duas vezes por 10 minutos com uma solução primária (uréia 2 M, SDS 0,1 %, solução 50 mM de fosfato de sódio pH 7,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ com uma solução secundária (tris base 1 M + NaCl 2 M, pH 10).

A detecção do sinal foi realizada adicionando 30 µL de solução detectora por cm² à membrana por 5 minutos. O excesso foi retirado, a membrana foi envolvida em papel filme e colocada no cassete com filme onde permaneceu por 24 h. A revelação foi realizada em ambiente escuro passando o filme por uma solução reveladora seguida por uma solução fixadora.

4.9 Extração de RNA total e análise de expressão gênica por PCR em tempo real

A extração de RNA foi realizada de acordo com protocolo do fabricante utilizando *TRI- Reagent* (Applied Biosystem, n. cat AM9738). As células foram cultivadas em 5 mL de YPD sob agitação de 150 rpm por 24 h. Passado o tempo, as células foram precipitadas e lavadas com solução salina, sendo adicionados 1 mL de *TRI-Reagent* e pérolas de vidro em quantidade suficiente abaixo da marca de 0,5 de um tubo de 2 mL. A mistura foi agitada em vórtex por 10 minutos e então centrifugada por 5 minutos, a temperatura ambiente e velocidade máxima. O sobrenadante foi coletado e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente seguido por uma adição de 200 µL de clorofórmio. Essa mistura permaneceu incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e então foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol, a mistura foi agitada por 10 segundos em um vórtex e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 8 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1 mL de etanol 75 % ao precipitado e o

tubo foi novamente centrifugado por 5 minutos a 7.500 x g para remover o etanol. Após a secagem do precipitado, o RNA foi dissolvido em 30 µL de água *milliQ* livre de RNase. A verificação da integridade do RNA extraído foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1 % (0,5 g de agarose em 50 mL de TAE 1X + 0,5 µg de brometo de etídio). O RNA extraído foi quantificado em NANOdrop e foram observadas a leitura da absorbância a 260 nm e a razão 260/280. A síntese de cDNA foi realizada a partir de uma diluição de 0,1 µg/µL dos RNAs extraídos utilizando o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). A reação foi preparada para um volume final de 20 µL, composto por 10 µL de RNA (400 ng/µL), 0,8 µL de dNTPs (25X), 2 µL de RT buffer (10X), 2 µL de RT random primers (10X), 1 µL de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 1 µL de inibidor de RNase e 3,2 µL de água *milliQ*.

Os cDNAs foram utilizados para PCR em tempo real para análise da expressão do gene ERG6 no mutante, selvagem e reconstituído. A reação foi montada utilizando o *kit Fast SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems) em placas de 96 poços. Os oligonucleotídeos utilizados foram os de números 11 a 17 (**Tabela 3**), e foram desenhados na junção éxon-éxon. O controle interno foi o gene que codifica actina. O volume final da reação foi de 10 µL contendo com 2 µL de cDNA; 0,4 µL do mix de oligonucleotídeos (10µM) e 5 µL de *Fast SYBR Green PCR Master Mix* (2X) e água para completar o volume. O equipamento utilizado para a PCR em tempo real foi o *7500 Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) e o ciclo foi de 95 °C por 20 segundos para a ativação enzimática, 95 °C por 3 segundos para a desnaturação e 60 °C para o anelamento dos oligonucleotídeos, sendo as duas últimas etapas realizadas em 40 ciclos. Para a quantificação foi utilizado o método comparativo de CT, sendo que a fórmula utilizada para o cálculo do *fold* (número de vezes que o gene foi induzido ou reprimido) foi $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.10 Testes fenotípicos

Os testes fenotípicos para avaliar a integridade da parede celular, a resposta a estresse osmótico e a susceptibilidade a drogas em placas foram realizados através de diluições seriadas de cada uma das cepas. Foi realizado inóculo das leveduras que cresceram a 30°C a 150rpm por 24h. As células foram lavadas em solução salina e contadas em câmara de Neubauer. Os inóculos foram então diluídos de forma a ter

concentrações de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 células /mL e então foram plaqueadas alíquotas de 5 μ L de cada uma. O teste de sensibilidade térmica foi realizado em YPD a temperatura de 25, 30, 35 e 37 °C.

A avaliação da integridade da parede celular foi realizada a 30°C em placas de YPD contendo *Congo Red* 0,5 % ou 1 %, SDS 0,05 %, cafeína 0,5 mg/mL ou 1 mg/mL, *Calcofluor White* 0,5 mg/mL ou 1 mg/mL, enquanto que a avaliação da sensibilidade a estresse osmótico foi realizada em placas de YPD contendo NaCl 1,5M, KCl 1,5M a 30°C. Testes de estresse oxidativo foram realizados a temperatura de 30 °C em YPD sólido contendo H₂O₂ nas concentrações de 1 mM e 5 mM. As placas foram incubadas até que se visualizasse o crescimento das colônias (Hu & Kronstad, 2010).

Os testes de susceptibilidade a drogas foram realizados em YPD contendo a droga de interesse, com as seguintes concentrações: 10 μ g/mL de fluconazol, 8 μ g/mL de anfotericina B, 0,012 μ g/mL de itraconazol, 1 μ g/mL de cetoconazol, 1 μ g/mL de FK506, 50 μ g/mL de nistatina, 10 μ g/mL de cerulenina, 10 μ g/mL de brefeldina A, 50 μ g/mL de cicloheximida e 1 μ g/mL de terbinafina (**Tabela 4**), conforme dados da literatura. As placas foram incubadas a 30 e 35°C até que se visualizasse o crescimento das colônias.

Tabela 4. Informações sobre as drogas utilizadas no teste de susceptibilidade em placas contendo YPD ágar

DROGA	[] ESTOQUE (mg/mL)	[] PLACA (μ g/mL)	SOLVENTE
Anfotericina B	0,25	8	Água
Brefeldina A	5	5	DMSO
Cerulenina	5	1	DMSO
Cetoconazol	0,0016	1	DMSO
FK506	5	1	DMSO
Fluconazol	1,6	10	Água
Itraconazol	1	0.012	DMSO
Nistatina	5	50	DMSO
Terbinafina	10	0.5	DMSO

Fonte: Elaborada pela autora.

A capacidade de produzir melanina foi avaliada a 30 °C e utilizando meio de cultura ágar Semente de Niger (Nandhacumar *et al.*, 2006), enquanto que a capacidade de produzir cápsula foi avaliada em meio com DMEM+ MOPS ágar. As células foram

estricadas e as placas foram incubadas a 37 °C, em estufa com gás carbônico a 5 %. As colônias foram observadas após 48 horas em microscópio de luz invertido utilizando tinta nanquim. (Granger *et al.*, 1985; Gilbert *et al.*, 2010). O teste de fosfolipase foi realizado utilizando meio com emulsão de gema de ovo. Foram pipetadas diluições de 10^7 de cada um dos fungos e as placas foram incubadas a 35 °C por 48 h. (Chen *et al.*, 1997).

4.11 Teste de microdiluição para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de drogas antifúngicas

A determinação da concentração mínima inibitória de cada droga foi realizada de acordo com a norma M-27-A2 estabelecido pelo NCCLS. O meio utilizado foi o RPMI-1640 tamponado a pH 7 em temperatura 25 °C utilizando MOPS pH 7 para uma concentração final de 0,165 mol/L. A partir de uma solução estoque de antifúngicos foram preparadas as diluições para serem utilizadas no teste. Drogas solúveis em água: anfotericina e fluconazol foram diluídas a uma concentração de 10X utilizando o meio RPMI, enquanto drogas não solúveis em água, foram solubilizadas em DMSO e diluídas com RPMI a uma concentração de 100X. As concentrações 100X foram diluídas 1:10 em RPMI resultando em soluções a 10X. Todas as concentrações de 10X foram diluídas 1:5 em RPMI de forma a conter uma concentração 2X.

O preparo das células foi realizado através de um repique de colônias em uma placa de YPD que permaneceu a 30 °C durante 48 h. As colônias isoladas foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril (0,85 %). As células foram contadas utilizando câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 1×10^6 leveduras/mL, que foi diluída 1:50 e 1:20 em meio RPMI, resultando em uma concentração 2X equivalente a 1×10^3 leveduras/mL.

As células e as concentrações das drogas foram diluídas 1:1, atingindo a concentração final de 1X. Os testes foram realizados em placas descartáveis estéreis de 96 poços, fundo chato, sendo o volume final utilizado em cada poço de 200 µL, sendo 100 µL das diluições da droga e 100 µL das diluições com o fungo. A concentração final inoculada foi de 5×10^2 leveduras/mL, enquanto as concentrações das drogas variaram de 32 a 0,00313 µg/mL. Em cada placa, foi feito controle positivo inoculando as leveduras em meio sem droga e meio sem droga contendo DMSO, quando este foi utilizado como solvente e controle negativo contendo apenas o meio RPMI. As placas

foram incubadas a 35 °C por 48 h e então analisadas visualmente e por leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. As médias dos valores obtidos pela leitura das absorbâncias foram calculadas e plotadas em gráficos para avaliação da CMI.

4.12 Ensaio de fagocitose em macrófagos

O teste de virulência em macrófagos foi realizado com uma cultura de macrófagos J774.A1 (linhagem de monócitos de camundongos BALB/c). As células foram mantidas em frasco de cultura de 75 cm² contendo meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino 10%, sendo realizada a troca de meio de cultura de acordo com o procedimento padrão.

Inicialmente, as células de macrófagos aderidas ao frasco de cultura foram soltas e a suspensão foi centrifugada 200 x g por cinco minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio DMEM + SFB 10 %. A contagem foi realizada diluindo-se uma alíquota 1:10 em PBS contendo azul de tripano (estoque: 10X). A concentração dos macrófagos foi ajustada para 2,5 x 10⁵ células/mL com DMEM + SFB 10 % contendo ampicilina a 50 µg/ml (estoque: 50 mg/mL, 1000X) e estreptomicina a 100 µg/mL (estoque: 500 mg/mL, 5000X). Em uma placa estéril de fundo chato, com tampa, tratada para cultura de tecidos de 96 poços (estéril,), foram adicionados 100 µL de macrófagos por poço e a placa foi incubada *overnight* a 37 °C e CO₂ a 5 %.

No segundo dia de experimento, foram feitos inóculos em YPD das cepas de interesse e incubados em shaker a 30 °C a 150 rpm *overnight*. Nesse mesmo dia o meio das placas contendo macrófagos foi trocado por uma solução de meio DMEM + SFB 10 % contendo antibióticos, interferon-gama a 100 U/mL (estoque: 10⁴ U/mL, 100X) e LPS a 300 ng/mL (estoque: 1 mg/mL).

No terceiro dia, as células fúngicas foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 x g à temperatura ambiente, e lavadas 3 vezes com PBS estéril. As células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas para uma concentração de 5 x 10⁵ células/mL em meio DMEM + SFB 10% contendo antibióticos e o anticorpo anti-GXM 18B7 a uma concentração de 10 µg/mL (estoque: 2 mg/mL, 200X). O meio foi novamente trocado, mas dessa vez o novo meio continha os fungos opsonizados pelo anticorpo. A placa foi centrifugada por 5 minutos a temperatura ambiente e incubada na estufa a 37 °C por 2 horas. O meio foi novamente trocado por um novo contendo antibióticos e, o antigo,

que continha os fungos não-fagocitados, foi recolhido num tubo de microcentrífuga estéril. A placa foi novamente incubada na estufa a 37 °C, que é a temperatura ótima para macrófagos, com 5 % CO₂, *overnight*. Os fungos não-fagocitados foram diluídos 1:100 em salina estéril, 100 µL foram plaqueados em YPD sólido em triplicata e estas foram incubadas a 30°C por 48h para serem contadas as UFC.

No dia seguinte, os macrófagos foram lisados através de ressuspensão das células em 100 µL de uma solução de SDS 0,5 % (m/v) estéril. A suspensão foi recolhida em um tubo de microcentrífuga estéril (um tubo para cada replicata) e então foi plaqueada em YPD. As placas foram incubadas a 30 °C e as UFC foram contadas após cerca de 48 h. Os dados obtidos foram analisados pelo programa *GraphPad Prism 5* utilizando o teste estatístico *2 way ANOVA* para a determinação dos valores P.

4.13 Teste de virulência de *Galleria mellonella*

O teste de virulência *in vivo* foi realizado em *Galleria mellonella*. As lagartas, no estágio final de larva foram pesadas e agrupadas de acordo com uma faixa de peso determinada. Para a infecção, leveduras de *C. neoformans* foram inoculadas em YPD líquido e incubadas a 30 °C em shaker, a 150 rpm por 24 h. As células foram lavadas em salina, contadas utilizando câmara de Neubauer e o inóculo foi ajustado para uma concentração de 5×10^6 células/mL. As lagartas foram infectadas na última pata traseira com 10 µL do inóculo utilizando uma seringa estéril e incubadas em estufa a 37 °C. Foram utilizadas 16 lagartas para cada linhagem testada e diariamente todas as lagartas vivas foram contadas até a última sobrevivente morrer (Mylonakis *et al.*, 2005.)

4.14 Curva de crescimento

Foram realizadas curvas de crescimento das linhagens de *C. neoformans* a 30, 35 e 37 °C em meio YPD e uma curva a 30 °C em YNB. Inóculos dos fungos foram feitos em YPD líquido e incubados a 30 °C a 150 rpm. As células foram lavadas com solução salina, foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 1×10^8 células/mL. Foram utilizadas placas de 96 poços estéreis e em cada poço utilizado foi pipetado 198 µL de YPD e 2 µL do inóculo a fim de ter uma concentração final de 1×10^6 . As placas foram incubadas utilizando o equipamento *Eon biotek* com agitação

contínua e a cada 30 minutos as absorvâncias a 600 nm foram medidas ao longo de 96 h.

4.15 Análise dos esteróis de membrana

A extração de esteróis da membrana de *C. neoformans* foi realizada com base no método de Folch (Folch *et al.*, 1957) descrito no *Cyberlipid Center* (<http://www.cyberlipid.org/index.htm>). Foram realizados inóculos de cada uma das cepas em 100 mL de YPD que permaneceram crescendo em *shaker* a 30 °C a 150 rpm por 48 h. Passado o tempo de crescimento, as células foram lavadas três vezes em PBS estéril e foram congeladas em tubos de 50 mL para liofilização. As células foram liofilizadas por cerca de 10 h e o precipitado foi pesado em balança semi-analítica. Em cada tubo foram adicionadas pérolas de vidro (o suficiente para ocupar a ponta do cônica do tubo) e uma mistura de clorofórmio/metanol (2/1) para um volume final 20X maior que o peso da amostra. A mistura foi agitada por 20 minutos em vórtex à velocidade máxima e o solvente foi lavado em 0,2 volumes de solução salina (solução 0,9 % de NaCl). O tubo foi novamente agitado em vortex por alguns segundos e então centrifugado a 2.000 rpm para separar as fases. A fase inferior foi recolhida, aliqüotada em microtubos de 2 mL envoltos por papel alumínio e submetida à completa evaporação do solvente. O esteróis extraídos foram armazenados a -80 °C sob proteção de luz até a quantificação.

A análise dos esteróis foi realizada em um Cromatógrafo Líquido Shimadzu®, composto de injetor automático SIL-20SA com loop de 100 µL, sistema degaseificador DGU-20A, sistemas de bomba quaternária LC-20AT, forno CTO-20SAC, detector SPD-M20A, módulo comunicador CBM-20A e software LC solution® (Kioto, Japão). A eluição foi realizada em modo isocrático, com fase móvel composta somente de Metanol grau HPLC (Tedia), em vazão de 1,0 mL/min. A coluna foi uma RP-C18 da ACE, de 125 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm de tamanho médio. Foram utilizados dois padrões para a análise, o lanosterol e o ergosterol, ambos da marca Sigma. O volume de injeção foi de 10 µL para a maioria das análises, exceto para os testes com o padrão de lanosterol, onde foram injetados 20 µL, pois foi utilizado em uma concentração de aproximadamente 10 mg/mL. Foi utilizado um detector (SPD-M20A) do tipo PDA (*photo diode array*).

4.16 Citolocalização de Erg6 em *C. neoformans*

A citolocalização de Erg6 foi realizada utilizando o plasmídeo pCN50 (gentilmente cedido por Dr. Andrew Alspaugh, Duke University) que contém a marca de seleção de G418 e o marcador fluorescente GFP controlado por um promotor de Histona H3 (O'Meara *et al.*, 2010). Basicamente, o cDNA de ERG6 foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos 19 e 20 mostrados na **Tabela 3** que contém sítios de BamHI nas extremidades para a fusão com GFP, gerando um fragmento de 1.032 pb. A PCR foi feita utilizando a enzima FidelityTaq polimerase (Fermentas) para um volume total de 50 µL, sendo 0,25 µL de Enzima FidelityTaq, 0,4 µL de dNTPs (25Mm), 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos (10µM), 1 µL de cDNA de *C. neoformans*, 5 µL de tampão PCR(10X) e 41,35 µL de água *milliQ* para completar o volume. Os ciclos da PCR foram: pré-desnaturação de dois minutos a 94 °C, amplificação em 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento de 58 °C por 30 segundos e extensão final de 68 °C por 5 minutos. O fragmento correspondente ao cDNAs de ERG6 foi purificado e clonado em pGEMT, para então ser digeridos com BamHI para clonagem no sítio de BamHI do plasmídeo pCN50. A orientação de ERG6 foi confirmada através de digestões com as enzimas de restrição BglII, HindIII e SacI e os tamanhos dos fragmentos foram calculados de acordo com a orientação do gene ERG6.

Após identificar a orientação, 5 µg do plasmídeo contendo o gene ERG6 fusionados corretamente ao GFP foram transformados pela técnica de biobalística no mutante *erg6Δ* de *C. neoformans*, como controle foi utilizado o plasmídeo pCN50, sem a fusão. As colônias obtidas na transformação foram repicadas em placas contendo 200 µg/mL de higromicina ou 200 µg/mL e aquelas capazes de crescer em nas duas placas contendo as drogas foram selecionadas para análise da fluorescência. Além disso, as colônias foram ainda repicadas em fluconazol e nistatina para facilitar a seleção das possíveis colônias contendo o plasmídeo fusionado ao gene ERG6. As colônias selecionadas foram inoculadas em YPD líquido e crescidas *overnight* a 30 °C, sob agitação de 150 rpm. No dia seguinte, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em salina para serem observadas no microscópio invertido *Zeiss Axio Observer Z1*.

4.17 Citometria de fluxo

Para análise da expressão de Gfp-Erg6, as células foram inoculadas em meio YPD líquido e incubadas por 24 h, a 30 °C, sob agitação de 150 rpm. No dia seguinte, as células foram lavadas em PBS 1X e ressuspendidas em 1 mL do mesmo tampão. Para a análise no citômetro de fluxo então foi preparada uma diluição de 1:100 da células em um volume de 500 µL. As suspensões foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com lasers de 488 nm e 633 nm. Os dados coletados foram analisados com o software FlowJo (Treestar Inc.). Para análise, eventos correspondentes às células de *C. neoformans* foram inicialmente selecionados usando os parâmetros FSC x SSC ("forward scatter" e "side scatter") e em seguida a fluorescência de Gfp analisada por histograma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e confirmação do mutante *erg6*Δ

A transformação por biobalística resultou no crescimento de muitas colônias de tamanhos variados capazes de crescer em meio seletivo. Após a primeira seleção em meio com 200 µg/mL de higromicina, as colônias foram repicadas em placas contendo meios de YPD + ergosterol 0,002 % + triptofano 0,002 % + metionina 0,002 % e YPD + hyg 200 µg/mL + nistatina 20 µg/mL, a fim de contribuir na seleção, já que mutantes *erg6* de *S. cerevisiae* (Karst & Lacroute, 1974; Gachotte *et al.*, 1998) relatados em literatura tiveram seus meios suplementados com ergosterol e também apresentaram resistência aos polienos (Garber *et al.*, 1989; Jensen-Pergakes *et al.*, 1998; Vandeputte *et al.*, 2008). Todos os transformantes cresceram em meio contendo a suplementação com ergosterol e aminoácidos, porém já em meio contendo as drogas higromicina e nistatina, apenas alguns transformantes foram capazes de crescer (**Figura 9**). Desta forma, aqueles que cresceram na placa contendo ambas as drogas tiveram seus DNAs genômicos extraídos para confirmação da deleção da ORF de *ERG6* por PCR. A seleção dos transformantes nessa placa foi realizada ainda baseando-se em características visuais das colônias, como possíveis alterações na coloração e no tamanho.

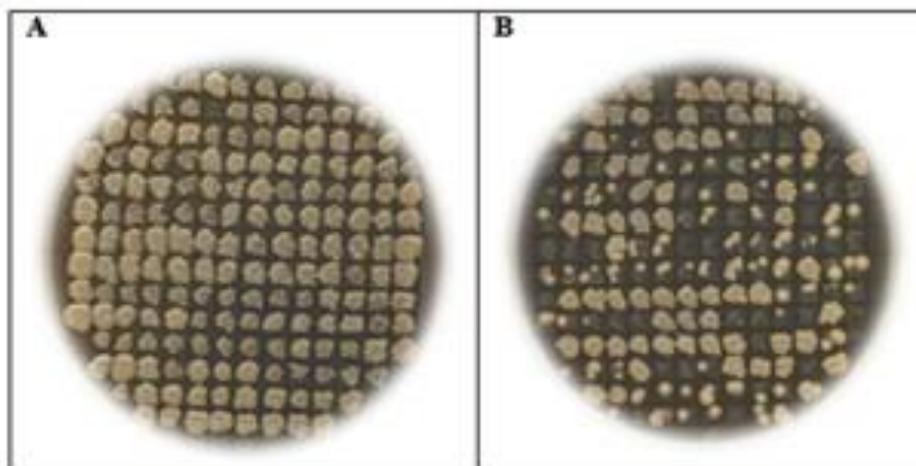


Figura 9. Seleção dos transformantes *erg6* em meio YPD ágar suplementado.

A) ergosterol, triptofano e metionina e contendo B) Higromicina e nistatina. Ergosterol 0,002 %; triptofano 0,002 %; metionina 0,002 %; higromicina 200 µg/mL e nistatina 20 µg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

A confirmação da deleção de ERG6 dos transformantes que cresceram em higromicina e nistatina ocorreu por duas reações diferentes. Foram utilizados oligonucleotídeos externos ao locus gênico e internos a sequência de HPH para amplificar a região 5' que deveria gerar um fragmento de 2.355 pb e a região 3', um fragmento de 2.963 pb a fim de confirmar a correta deleção da ORF de ERG6 (**Figura 8C e Figura 10**). Foram confirmados por PCR sete transformantes que foram então submetidos ao *Southern blot*. Os mutantes inicialmente foram nomeados de acordo com a numeração de repique das colônias, dessa forma os transformantes confirmados por PCR foram os de número: 48, 52, 55, 357, 360, 373, 448.

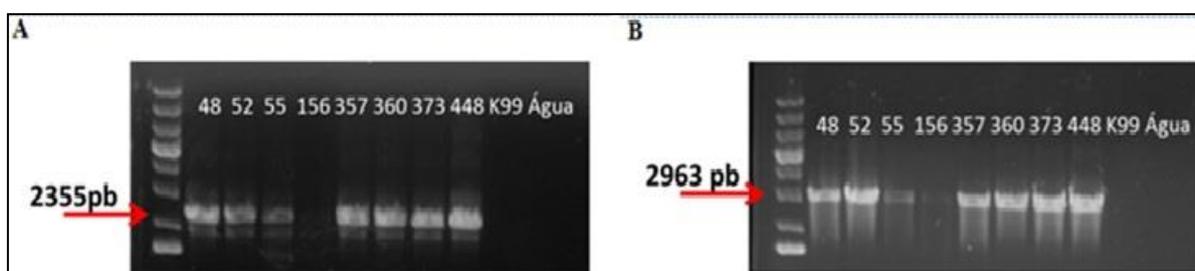


Figura 10. PCR confirmatório da deleção do gene ERG6 em *C. neoformans*.

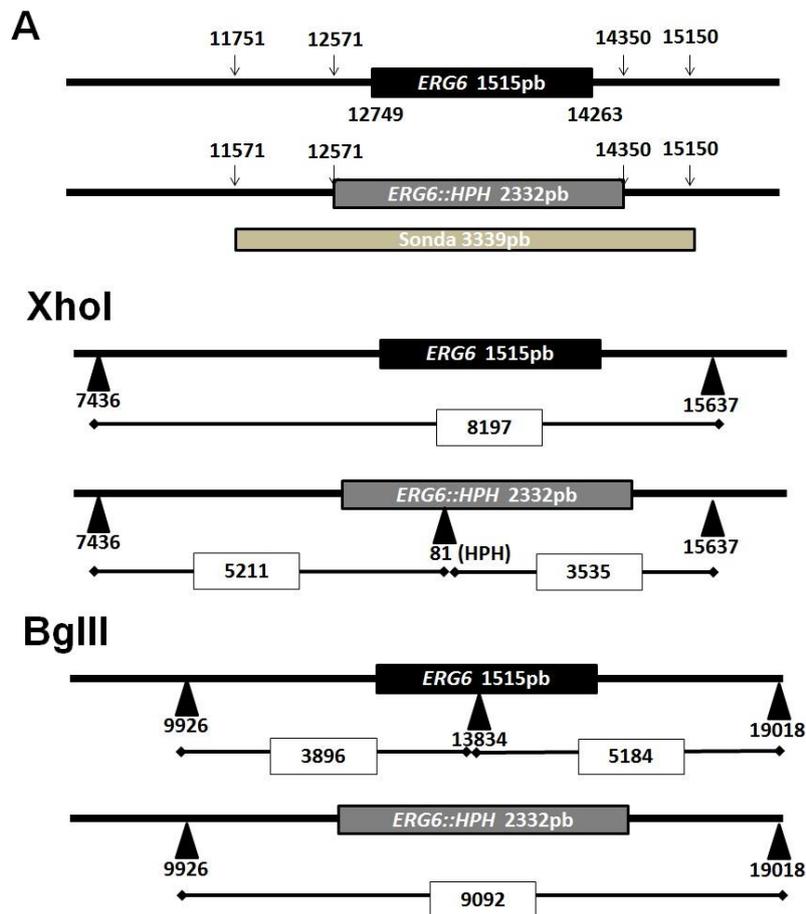
Eletroforese em gel de agarose 0,8 % a fim de confirmar a amplificação das regiões 5'e 3' por PCR dos possíveis transformantes deletados de ERG6. A) Produto da amplificação da região 5', correspondente a 2.355 pb; B) Produto da amplificação da região 3', correspondente a 2.963 pb. Poço 1: marcador molecular DNA Ladder Plus 1Kb (Fermentas). Os transformantes confirmados em ambas as regiões foram: 48, 52, 55, 357, 360, 373, 448.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O *Southern Blot* de confirmação da deleção do gene ERG6 foi realizado utilizando as enzimas BglII e XhoI. A sonda utilizada foi preparada amplificando os fragmentos 1+8 por uma reação de PCR, tendo um tamanho de 3.399 pares de base e abrangendo todo o gene ERG6. A BglII por apresentar sítio de restrição na sequência de ERG6, gerou um fragmento de 3,8 Kb e outro de 5,1 Kb, porém no mutante *erg6Δ*, contendo marcador seletivo para higromicina no locus, gerou apenas um único fragmento de aproximadamente 9,0 Kb. Para XhoI não há nenhum sítio de restrição na sequência ERG6 e um único sítio na sequência de HPH, dessa forma gerou um fragmento único de 8,1 Kb no selvagem e dois fragmentos de aproximadamente 5,2 e 3,5 Kb no mutante *erg6Δ*. A **Figura 11A** representa o perfil de restrição das enzimas

selecionadas e o tamanho de seus respectivos fragmentos hibridizados pela sonda escolhida.

Pelo *Southern Blot*, como se observa na **Figura 11B**, foram confirmados cinco mutantes *erg6* Δ : 42, 52, 357, 360 e 373. Os transformantes 55 e 448 apresentaram fragmentos de tamanhos divergentes daqueles esperados para a enzima *Bgl*II, enquanto que para a *Xho*I, o 55 apresentou ainda outros dois fragmentos além dos esperados, sendo um deles do tamanho do fragmento obtido pelo H99. A capacidade de crescer a 37°C e de produzir melanina foi analisada para os mutantes confirmados e todos apresentaram o mesmo fenótipo, dessa forma foi escolhido o mutante 360 para dar continuidade ao estudo.



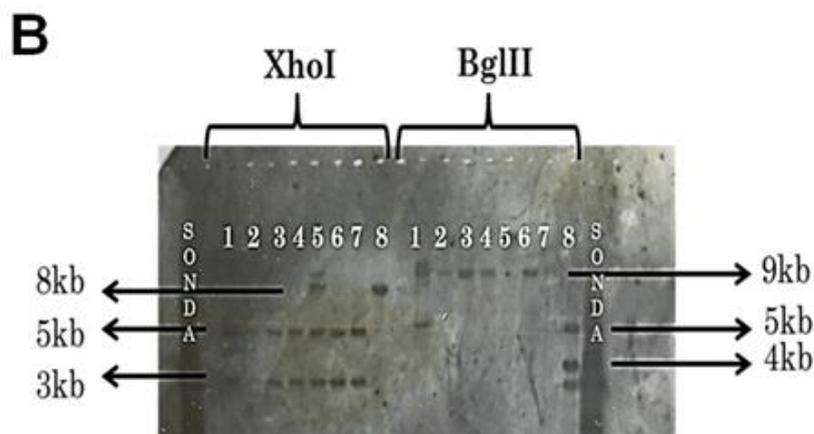


Figura 11. Southern blot confirmatório da deleção de ERG6 de *C. neoformans*.

A. Perfil de restrição gerado pelas enzimas BglII e XhoI escolhidas para confirmação dos mutantes *erg6Δ* por *Southern Blot*. B Resultado confirmatório da deleção de ERG6 de *C. neoformans*.

DNA genômicos dos mutantes e do selvagem H99 foram digeridos com as enzimas de restrição XhoI e BglII. A sonda utilizada corresponde ao locus de ERG6 selvagem. Os padrões obtidos confirmaram os mutantes como sendo os deletados para ERG6. 1) 448; 2) 373; 3) 360; 4) 357; 5) 55; 6) 52; 7) 42; 8) Selvagem (H99)

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Obtenção e confirmação do reconstituído de ERG6

A co-transformação para a obtenção do reconstituído foi realizada através de transformação por biobalística do cassete contendo o locus do gene ERG6 e o plasmídeo de pJAF contendo a marca de seleção de G418. Os transformantes foram selecionados com 200 µg/mL de G418 (neomicina). A maioria das colônias resistentes à G418 eram também à higromicina e dessa forma foram ignoradas, e aquelas que não eram mais resistentes a higromicina (perda do cassete de resistência) e eram à G418 foram selecionadas de acordo com as características de suas colônias. Os reconstituídos também foram confirmados por PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos externos (9 e 10), com internos ao gene ERG6 (11 e 12), conforme **Figura 8C**. No transformante 1 observou-se amplificação apenas da região 5' de ERG6, enquanto nos transformantes 2, 6 e 186 foram amplificadas as duas regiões, sendo possíveis reconstituídos; e no 322 não foram observadas amplificações de nenhuma das regiões (**Figura 12**).

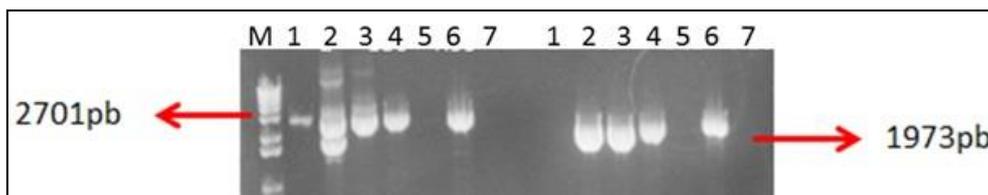


Figura 12. Confirmação da reconstituição do mutante *erg6* Δ através da amplificação da região 5' e 3' do gene. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % dos produtos obtidos na amplificação da região 5' e 3' de ERG6. M= marcador; 1) 1.erg6; 2) 2.erg6; 3) 6.erg6; 4) 186.erg6; 5) 322.erg6; 6) H99; 7) água. Os produtos são: região 5' (2,7 Kb) e 3' (1,9 Kb).

Fonte: Elaborada pela autora.

A expressão do gene ERG6 foi analisada pela técnica de PCR em tempo real (**Figura 13**). O RNA do selvagem e reconstituído foi extraído e a análise da expressão de ERG6 no reconstituído (escolhido 186) demonstrou que o gene foi novamente inserido e teve seu nível de expressão muito similar aquele observado no selvagem.

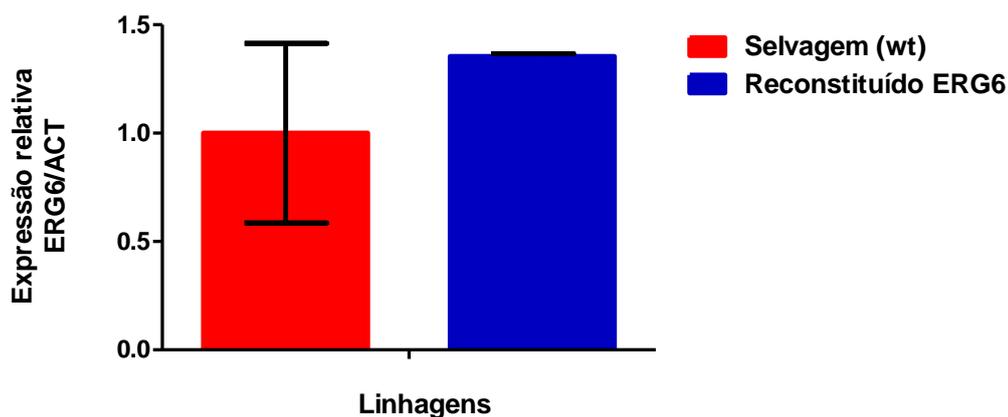


Figura 13. Análise da expressão gênica de ERG6 por PCR em Tempo Real no selvagem (wt) e no reconstituído ERG6.

Observa-se que o selvagem e o reconstituído apresentam padrão de expressão similar. Utilizou-se como controle interno o gene que codifica actina. Expressão avaliada em leveduras de *C. neoformans* crescidas a 30 °C em YPD líquido, sob agitação, 48 h.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Testes fenotípicos

5.3.1 Crescimento a diferentes temperaturas

A fim de verificar se o mutante apresentava crescimento alterado a diferentes temperaturas foi realizado um teste a 25, 30, 35 e 37 °C utilizando diluições seriadas de 10^7 a 10^3 (Figura 14). As placas foram observadas diariamente e entre o terceiro e quarto dia já foi possível observar o crescimento de todas as diluições do selvagem em todas as temperaturas. A 25 °C e 30 °C, mutantes *erg6*Δ apresentam crescimento semelhante ao selvagem H99, porém um pouco mais lento. No entanto, a 35 °C observa-se sensibilidade dos mutantes de ERG6 sendo que a 37 °C, os mutantes não foram mais capazes de crescer em nenhuma diluição. A temperatura de 30 °C demonstrou ser a melhor para o crescimento do mutante de ERG6. Esses resultados divergem aos encontrados em mutantes de ERG6 em *S. cerevisiae*, que foram capazes de crescer a 37 °C apresentando sensibilidade a temperaturas menores, 22 °C ou 30 °C (Gaber *et al.*, 1989), no entanto vale ressaltar que *S. cerevisiae* é uma levedura não patogênica. Assim, pode-se afirmar que o gene ERG6 não é essencial para o crescimento vegetativo de *C. neoformans*, mas é necessário para o seu crescimento a 37 °C, temperatura dos hospedeiros humanos, sendo que esta característica é considerada um fator de virulência deste fungo, e intrínseca de um patógeno humano e (Hull & Heitman, 2002).

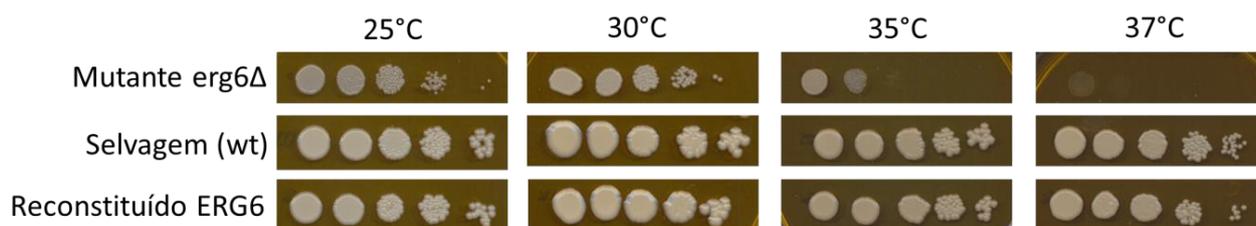


Figura 14. Análise de sensibilidade térmica dos mutantes *erg6*Δ realizada em YPD.

Foi utilizado 5 µL de diluições seriadas de 10^7 a 10^3 em quatro temperaturas diferentes 25°C, 30, 35 e 37°C durante quatro dias. O aumento da temperatura demonstrou afetar o crescimento, sendo observado que a 35 °C o crescimento foi comprometido e a 37 °C não houve crescimento dos mutantes.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Produção de melanina

O teste de melanina foi realizado em meio preparado com sementes de Níger e foi observada a plena capacidade do mutante de ERG6 em produzir melanina, no mesmo período de tempo que o selvagem (**Figura 15**). A capacidade de produção de melanina é um dos principais fatores de virulência do *C. neoformans* que contribui para a sobrevivência no meio ambiente e durante a infecção, sendo inclusive utilizada como forma de identificação do patógeno em infecções humanas (Hull & Heitman, 2002). Além disso, o pigmento protege o fungo da resposta imunológica do hospedeiro (Trofa *et al.*, 2011). Dessa forma, é possível observar que a deleção de ERG6 não interfere com a produção de melanina em *C. neoformans*.

Mutante *erg6* Δ



Selvagem (wt)



Figura 15. Análise da capacidade de produção de melanina em ágar com sementes de Níger do selvagem (H99) e do mutante *erg6* Δ .

A deleção do gene ERG6 não demonstrou afetar a capacidade do fungo em produzir melanina. O crescimento e a pigmentação (castanho-escuro, característico do pigmento) das linhagens foram observados e as imagens documentadas após 48 h de incubação a 30 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.3 Capacidade de produzir cápsula

A capacidade de produção de cápsula do mutante foi avaliada utilizando meio DMEM diluído em bicarbonato e MOPS. A cápsula é um importante fator de virulência do *C. neoformans* sendo protetora ao sistema imune de seu hospedeiro e contribuindo para a replicação do fungo em macrófagos (Janbon & Doering, 2011). O teste foi realizado a 37 °C após 48 h de incubação, temperatura que não permitiu o crescimento do mutante *erg6* Δ utilizando diluições seriadas (**Figura 14**). Os resultados demonstraram crescimento das colônias do selvagem e do reconstituído na placa. Em

relação ao mutante, foram observadas algumas colônias em um ponto da placa, onde provavelmente havia maior número de células inoculadas.

Janbon e Doering, (2011) afirmam ainda que o aparecimento desse fator está relacionado também a condições ambientais, sendo assim, seria esperado que não fosse capaz de visualizar o aparecimento de cápsula ou sequer o crescimento nas cepas mutantes já que a placa foi incubada a uma temperatura em que o mutante não demonstrou crescimento em meio YPD. No entanto, o resultado observado foi a visualização de cápsula nos mutantes e possivelmente a observação dessas poucas colônias esteja relacionada apenas à sobrevivência daquelas que foram inoculadas no meio de cultura. Colônias do mutante, selvagem e reconstituído foram então observadas por microscopia óptica e tinta nanquim, demonstrando a capacidade de produção de cápsula de todas as três linhagens testadas (**Figura 16**). No entanto, a cápsula formada para as três linhagens analisadas foi pequena, impossibilitando a observação de alterações no tamanho e dessa forma não é possível afirmar que a deleção de ERG6 não afeta a produção de capsula em *C. neoformans*.

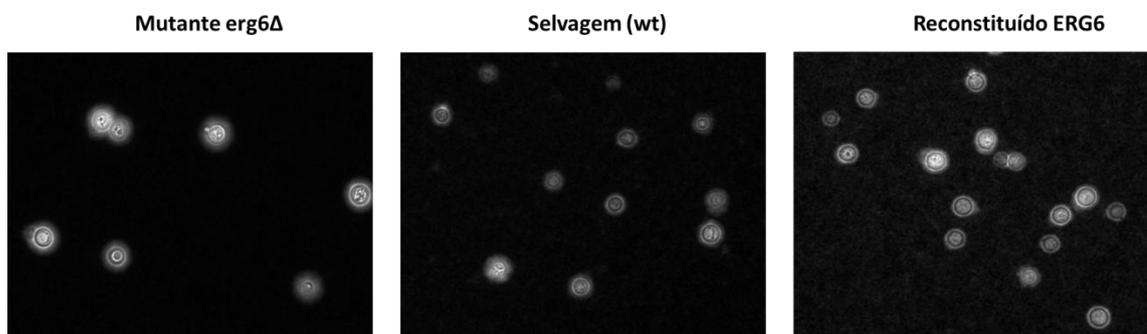


Figura 16. Produção de cápsula do mutante *erg6Δ*, selvagem H99 e reconstituído ERG6 em meio DMEM+MOPS a 37° C.

Não foram observadas alterações na produção de cápsula em meio contendo DMEM, após incubação a 37 °C / 48 h. A presença de cápsula foi avaliada utilizando tinta nanquim. Imagens captadas utilizando objetiva EC Plan Neofluor 40x/ 0,76 Ph2 M27. Escala foto original: 25 μ m/cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.4 Estresse Osmótico

O teste de estresse osmótico foi realizado em meios contendo, NaCl 1,5 M e KCl 1,5 M a 30 °C. As placas a foram observadas diariamente para o acompanhamento do crescimento e após onze dias, apenas as diluições 10^7 e 10^6 apresentavam colônias para

o mutante *erg6Δ* em NaCl 1,5 M e em KCl 1,5 M, havia também um pequeno crescimento na diluição de 10^5 (Figura 17).

O ergosterol atua a fluidez da célula e sua integridade (Ghannoum & Rice, 1999), sendo assim, a ausência do gene ERG6 afetando a biossíntese de ergosterol, provoca a desestabilização da membrana resultando no aumento da sensibilidade aos sais. O resultado encontrado apresentou-se de acordo com o que foi obtido em mutantes de ERG6 em *S. cerevisiae* em que foi observado alteração de características fenotípicas relacionadas à permeabilidade e fluidez da membrana. (Gaber *et al.*, 1989). Dupont *et al.* (2011) ao avaliarem a relação entre a natureza dos esteróis da membrana plasmática e a resistência de células leveduriformes de *S. cerevisiae* em resposta ao tratamento com agentes estressores osmóticos observaram que os mutantes *erg6Δ*, que apresentam acúmulo de precursores de ergosterol são mais sensíveis a alteração osmótica no meio quando comparados às linhagens selvagens. Estes autores sugerem que a natureza dos esteróis de membrana influencia características mecânicas da membrana relacionadas às alterações de volume da célula provocadas pelo tratamento hiperosmótico, como capacidade deformativa e resistência ao alongamento, importantes para adaptação celular à variação hídrica no ambiente. Dessa forma, conclui-se que o mutante *erg6Δ* de *C. neoformans* estudado não é capaz de sobreviver a alterações de sais no meio, possivelmente provocada pela alteração da composição e nas propriedades mecânicas de sua membrana celular.

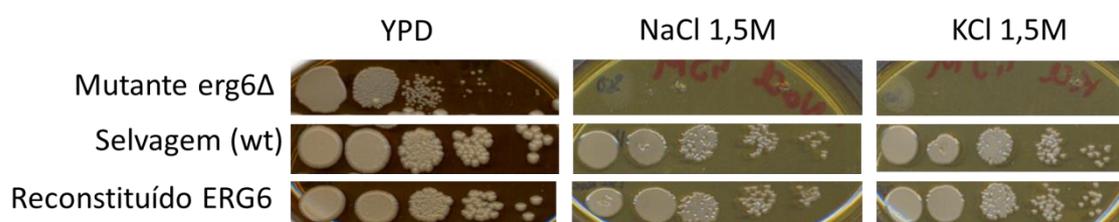


Figura 17: Mutante *erg6Δ* de *C. neoformans* não é capaz de crescer na presença dos estressores osmóticos NaCl e KCl a 30 °C enquanto seu reconstituído demonstra resgatar o fenótipo.

Foram realizadas diluições seriadas das linhagens mutante *erg6Δ*, selvagem H99 e reconstituído ERG6 em placas de YPD contendo NaCl 1,5 M e KCl 1,5 M. Observa-se que o mutante *erg6Δ* apresenta dificuldades de crescimento em meios que provoquem estresse osmótico na célula. Após cinco dias em estufa a 30 °C, os reconstituídos demonstram fenótipo semelhante ao do selvagem pelo retorno à capacidade de tolerar alterações osmóticas do meio extracelular.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.5 Estresse Oxidativo

A capacidade de lidar com estressores oxidativos, foi avaliada no mutante *erg6Δ* utilizando peróxido de hidrogênio em duas concentrações diferentes. Na primeira concentração de 1 mM foi observado o crescimento de todas as diluições das cepas analisadas após três dias de incubação a 30 °C, no entanto, na concentração de 5 mM, o mutante não foi capaz de crescer, indicando uma sensibilidade a concentrações mais altas de H₂O₂ (**Figura 18**). Peróxido de hidrogênio compreendem as espécies reativas de oxigênio mais abundantes em organismos aeróbios e na resposta inflamatória mediada por fagócitos. Em leveduras de *S. cerevisiae*, a entrada de H₂O₂ nas células se dá por gradiente através da membrana plasmática, sendo que suas propriedades biofísicas, dentre elas a permeabilidade está diretamente relacionada à resistência das células ao estresse oxidativo (Branco *et al*, 2004; Folmer *et al.*, 2008).

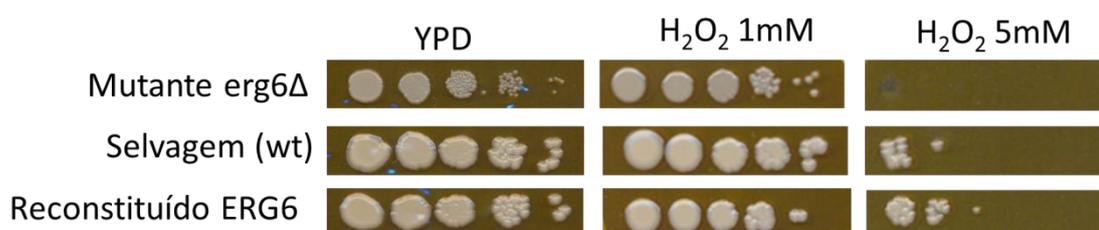


Figura 18. Mutante de ERG6 de *C. neoformans* não demonstra sensibilidade a estresse oxidativo em baixas concentrações, porém são incapazes de crescer em altas concentrações de H₂O₂.

As cepas foram testadas em duas concentrações diferentes de estressor oxidativo, H₂O₂, e demonstraram sensibilidade apenas na concentração mais alta do estressor. Após três dias em estufa a 30 °C foi observado o crescimento de todas as diluições das três cepas em placas contendo H₂O₂ 1 mM. Para a concentração de 5 mM, o crescimento do selvagem e reconstituído foi observado nas duas primeiras diluições após cinco dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com Branco *et al.* (2004), a exposição de leveduras de *S. cerevisiae* a H₂O₂ externo leva à formação de um gradiente de membrana que afeta a resistência a esses compostos e não está relacionada à capacidade intracelular de remover o H₂O₂. Além disso, os mesmos autores observaram que mutantes *erg3Δ* e *erg6Δ*, que possuem alterações na membrana celular, apresentam maior permeabilidade ao H₂O₂ e dessa forma são mais sensíveis ao composto. O mutante *erg6Δ* em *C. neoformans* são incapazes de crescer em altas concentrações (5 mM) de H₂O₂, provavelmente devido as

alterações na composição e propriedades biofísicas da membrana plasmática que impedem o controle do gradiente de H₂O₂.

Estes dados sugerem também que em modelo *in vivo* de infecção, o mutante *erg6Δ* de *C. neoformans* seria mais suscetíveis às células fagocíticas do hospedeiro, de forma que o desenvolvimento de uma droga que bloqueia Erg6, não só alteraria funções celulares importantes para o fungo como favoreceria a ação das defesas do hospedeiro. Esta idéia é corroborada por outros autores, que mostraram que células fúngicas de *C. albicans* tratadas com drogas que afetam a biossíntese do ergosterol, dentre elas os azóis, que promovem a alteração da composição da membrana, são mais suscetíveis à eliminação por fagócitos (Shimokawa & Nakayama, 1992).

5.3.6 Avaliação da integridade da parede celular

Na presença de agentes estressores, como SDS, *Congo Red*, Cafeína, *Calcofluor White* mutantes com defeitos na parede celular apresentam dificuldades de crescimento (Ram e Klis, 2006). O mutante *erg6Δ* de *C. neoformans* foi submetido a crescimento em diferentes estressores de parede, e observou-se que o a ausência do gene *ERG6* promove um aumento da sensibilidade de *C. neoformans* a todos os agentes testados, sendo os efeitos mais pronunciados ocorreram nas placas contendo SDS e nas concentrações mais elevadas de *Congo Red* e Cafeína (**Figura 19**). Os corantes *Congo Red* e *Calcofluor white* interagem com as cadeias de glucanas e quitinas bloqueando as enzimas que conectam estas cadeias no processo de montagem da parede celular de fungos (Ram & Klis *et al.*, 2006), resultando em células com parede celular fragilizada. A susceptibilidade aumentada a estes compostos está diretamente relacionada a defeitos na parede celular, de diferentes fungos, incluindo *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans* entre outros. A hipersensibilidade do mutante *erg6Δ* a SDS (**Figura 19D**) pode ser explicada pelo fato de que a parede celular estando mais frágil facilita a entrada das moléculas deste detergente na célula. O mutante *erg6Δ* também se mostrou sensível à cafeína (**Figura 19B**), que é um composto envolvido com manutenção da integridade da parede celular. Em *S. cerevisiae*, cafeína inibe a via Tor1 e ativa a via PKc1/Mpk1 que controla o remodelamento da parede (Kuranda *et al.*, 2006).

Os dados da literatura, de mutantes de *ERG6* em *C. glabrata* (Vandeputte *et al.*, 2007) relatam os mesmos defeitos observados em *C. neoformans* quanto a susceptibilidade aos estressores de parede, como o *Calcofluor White*, *Congo Red* e

Cafeína e sugerem que estes defeitos são decorrentes de perturbações no tráfego de proteínas que tem como alvo a membrana celular. Estes autores sugerem que enzimas envolvidas na biogênese de parede celular como as quitinases, glucanas sintases e glucanases, não são localizadas corretamente na membrana e conseqüentemente a montagem e a integridade da parede ficariam comprometidas. Esta hipótese pode ser também aplicada ao mutante de ERG6 de *C. neoformans*, visto que as alterações na membrana plasmática acarretariam em defeitos de ancoragem das enzimas envolvidas na biogênese da parede celular, o que explicaria o aumento da sensibilidade deste mutante aos agentes estressores de parede, no entanto, não foi avaliado o tráfego de proteínas e a composição da parede celular no mutante *erg6Δ* de *C. neoformans*. Proszynski *et al.* (2005) realizaram um estudo analisando uma biblioteca de leveduras que revelou a necessidade de diversas enzimas de regulação da síntese de ergosterol para a localização correta e eficiente de outras proteínas na superfície da célula. Nesse mesmo estudo, os autores observaram que mutantes dos genes ERG6 e ERG4 apresentam acúmulo de proteínas marcadas com GFP na rede de transporte do Golgi (TNG). Os resultados dos autores demonstraram que alterações na síntese de ergosterol podem inibir ou provocar defeitos no transporte de proteínas do complexo de Golgi para seus destinos finais.



Figura 19. Mutante *erg6Δ* de *C. neoformans* é suscetível a diferentes estressores de parede celular.

A. *Congo Red* a 0,5 % e 1 %, B. *Cafeína* a 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, C. *Calcofluor White* a 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, e D. *SDS* 0,05 %. As linhagens cresceram a 30° C e foram feitas diluições seriadas de 10^7 a 10^3 que foram plaqueadas em meio YPD contendo os agentes estressores de parede. As placas foram incubadas a 30 °C/ 4 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.7 Capacidade de produção de fosfolipase

A capacidade do mutante *erg6Δ* de produzir fosfolipase foi realizada em meio preparado com uma emulsão de gema de ovo na concentração de 8 %. Estas enzimas ao serem produzidas são direcionadas para a membrana e para a parede celular de onde são secretadas para o meio extracelular (Siafakas *et al.*, 2007). As células foram inoculadas e após três dias observou-se a formação de um halo opaco ao redor das colônias de todas as linhagens testadas, mutante *erg6Δ*, selvagem H99 e o reconstituído ERG6, no entanto o mutante apresentou um menor halo (**Figura 20**). A atividade enzimática da fosfolipase (Pz) é medida através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), se o resultado for $Pz = 1$, a atividade é

considerada negativa; $1 > Pz > 0,64$ a atividade é positiva; e $Pz < 0,64$ a atividade é fortemente positiva (Djordjevic, 2010). Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 5**. (Price *et al.*, 1982). Esse teste não permite identificar se uma ou todas as fosfolipases foram afetadas, no entanto, pode-se observar o mutante *erg6* Δ apresenta uma diminuição na secreção destas enzimas. Não podemos afirmar se esta alteração se dá por diminuição da produção total, ou devido às alterações na composição da membrana e parede celular que estariam dificultando o ancoramento destas enzimas na superfície da célula. Além disto, *C. neoformans* apresenta a isoforma B1 que está diretamente envolvida na biogênese, remodelamento e manutenção da integridade da parede e da membrana celular (Siafakas *et al.*, 2007)., além de ser considerada um fator de virulência, já que sua ausência promove defeitos no crescimento do fungo em macrófagos (Cox *et al.*, 2001).



Figura 20. Diminuição da produção de fosfolipases pelo mutante *erg6* Δ de *C. neoformans*.

Colônias capazes de produzir fosfolipase formaram um halo opaco de precipitação em volta de suas colônias, sendo que o diâmetro foi medido e relacionado à capacidade de produzir fosfolipase.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5. Análise da atividade enzimática de fosfolipase nas linhagens testadas: mutante *erg6* Δ , selvagem H99 e reconstituído ERG6.

Cepa	dc	dcp	Pz	Atividade Enzimática
Mutante <i>erg6</i>Δ	1,1 cm	1,5 cm	0,73	Positiva
Selvagem	1,3 cm	2,5 cm	0,52	Fortemente positiva
Reconstituído ERG6	1,1 cm	2,3 cm	0,47	Fortemente positiva

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Curva de crescimento

Diante da observação em meios sólidos de que mutante de ERG6 de *C. neoformans* apresenta crescimento reduzido quando há aumento da temperatura de 30 para 35 °C, e não crescem na temperatura de 37 °C (**Figura 14**) foram realizadas curvas de crescimento a temperaturas de 30, 35 e 37 °C a fim de melhor visualizar e mensurar esse defeito. A curva de crescimento em YPD líquido realizada a 30 °C mostrou que todas as cepas apresentam um padrão de crescimento semelhante a essa temperatura (**Figura 21A**), no entanto quando comparadas as curvas de crescimento das cepas do mutante, selvagem e reconstituído, observou-se diferenças estatísticas significativas ($P < 0.001$) entre os tempos de 24 h e 48 h, já que o selvagem atingiu a fase estacionária após 36 h de crescimento enquanto o mutante e o reconstituído atingiram em cerca de 72 h. No entanto a partir desse tempo até o tempo final de 106 h todas as cepas apresentaram-se na fase estacionária, sem diferenças estatísticas ($P > 0.05$), demonstrando, assim capacidade de crescimento total semelhantes nesta temperatura. O mesmo teste em meio YNB contendo glicose sem adição de aminoácidos como fonte de nitrogênio foi realizado a 30 °C a fim de verificar se alterações no meio poderiam afetar o crescimento do mutante. Foi observado que a mudança na composição nutricional do meio de cultura, promove uma redução da taxa de crescimento do mutante em relação ao selvagem e o reconstituído, observada após 12 h (**Figura 21B**).

O aumento da temperatura para 35 °C evidenciou que o mutante *erg6Δ* apresenta um atraso para atingir a fase estacionária, quando comparado às linhagens selvagem e reconstituída, que apresentaram padrão de crescimento muito similar. No tempo de 36 h observou-se diferença significativa entre o mutante e o selvagem ($P < 0.001$), sendo possível observar que o mutante ainda encontra-se no início da fase logarítmica enquanto que o selvagem já se apresenta no início da fase estacionária (**Figura 21C**).

À temperatura de 37 °C observa-se a incapacidade do mutante de crescer a essa temperatura (**Figura 21D**), sendo as leituras de turbidimetria semelhantes àsquelas do controle contendo apenas meio YPD. Estes resultados corroboram aqueles observados previamente em meio sólido. A linhagem reconstituída teve seu crescimento restaurado a 37 °C, no entanto evidencia-se um retardo, quando comparada com a linhagem selvagem. O tempo de 90 h não foi suficiente para se observar toda a curva correspondente à fase estacionária de crescimento e os valores obtidos para o selvagem e o reconstituído foram estatisticamente diferentes ($P < 0,001$).

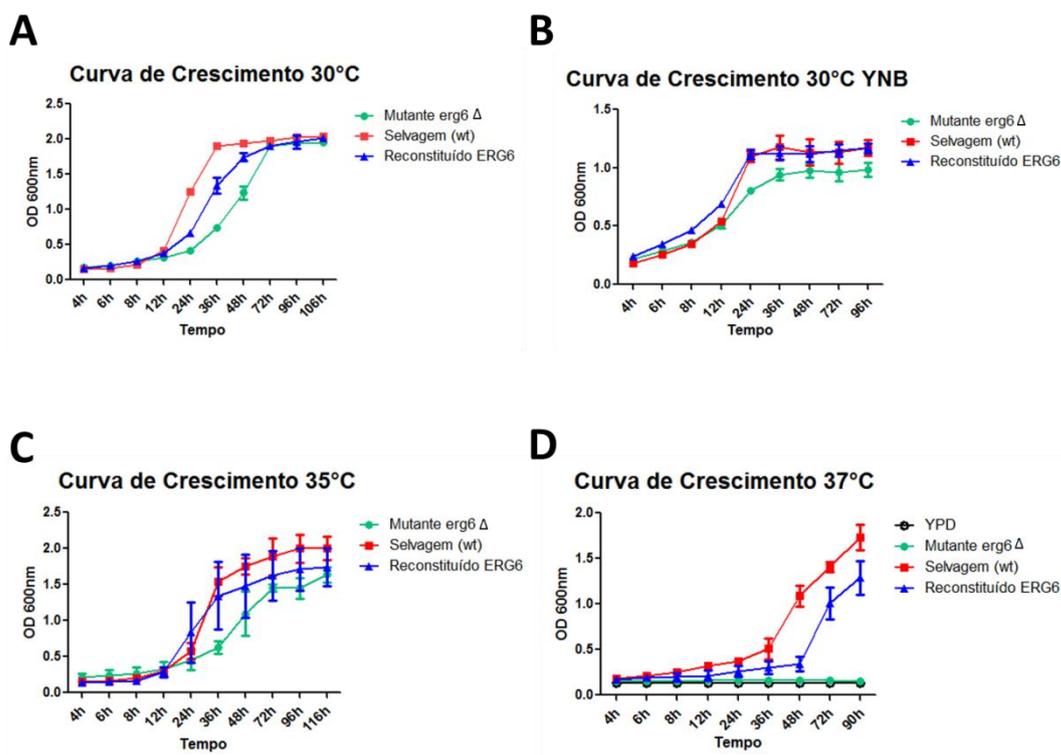


Figura 21. Curvas de crescimento das linhagens mutante *erg6*Δ, selvagem H99 e reconstituído ERG6 em diferentes temperaturas (30, 35 e 37 °C).

A. Curva de crescimento a 30 °C mostra diferenças estatísticas de crescimento ao longo do tempo, porém o mutante é capaz de atingir a fase estacionária assim como as outras cepas. B. Curva de crescimento a 30 °C realizada em YNB mostra que selvagem e o reconstituído são estatisticamente iguais, porém o mutante possui o crescimento alterado. C. Curva de crescimento a 35 °C mostra diferença nos crescimento das cepas com um atraso do mutante para atingir a fase estacionária. D. Curva de crescimento a 37 °C mostra a incapacidade do mutante em crescer a essa temperatura. Todas as curvas foram realizadas em YPD líquido, exceto a curva C, que foi realizada em YNB. A leitura da absorbância foi feita a 600 nm. Teste estatístico 2 way ANOVA.

Fonte: Elaborada pela autora.

Vários mutantes de genes que codificam enzimas que atuam na via do ergosterol também apresentam defeitos no crescimento, como no caso dos mutantes de ERG26 em *S. cerevisiae* (Gachotte *et al.*, 1998), de ERG27 em *C. albicans*, ERG24 em *C. albicans* (Jia *et al.*, 2002). Lees *et al.*, 1980, utilizando meios de cultura contendo diferentes fontes de energia mostraram que mutantes de ERG6 de *S. cerevisiae*, apresentam taxa de crescimento reduzida e limitações no uso de diferentes fontes de energia (fermentável e não fermentável), característica que pode ser atribuída a composição de esteróis da membrana, visto que tais mutantes apresentam um acúmulo

de intermediários da via do ergosterol, como zimosterol e cholesta-5,7,22,24-tetraen-3- β -ol. Os mutantes de ERG6 em *C. lusitaniae*, (Young *et al*, 2003) apresentaram taxa de crescimento reduzida e não atingiram a densidade óptica da linhagem selvagem, sendo que as células apresentaram-se aumentadas e com grande quantidade de vacúolos. Vandeputte *et al.*, 2007 demonstraram que um isolado clínico com mutação em ERG6 em *C. glabrata* apresentou taxa de crescimento reduzido, quando comparada a linhagem selvagem. Em *C. neoformans*, o uso de inibidores de Erg6 também provocou redução no crescimento do fungo (Nes *et al.*, 2009).

5.5 Susceptibilidade às drogas antifúngicas

Mutantes de ERG6 de outros fungos foram descritos na literatura apresentando diversas alterações na sensibilidade às drogas antifúngicas utilizadas atualmente, com diferentes mecanismos de ação, como os azóis (fluconazol, itraconazol e cetoconazol), os polienos (anfotericina B e nistatina), brefeldina A, cerulenina e FK506.

Polienos atuam diretamente na membrana se ligando ao ergosterol e provocando poros na membrana. De acordo com experimentos relatados na literatura, mutantes de ERG6 de diferentes fungos apresentam resistência a esse grupo de drogas (Vandeputte *et al*, 2008; Jensen-Pergakes *et al*, 1998; Young *et al*, 2003). As linhagens: mutante *erg6* Δ , selvagem e reconstituída de ERG6 de *C. neoformans* foram testadas nas concentrações de 4 μ g/mL e 8 μ g/mL de anfotericina B como pode ser visto na **Figura 22A**. Observou-se que mesmo na maior concentração testada foi observado crescimento da linhagem selvagem, bem como das linhagens mutante e reconstituída, impedindo que fosse possível observar a resistência do mutante de ERG6, como relatado em outros fungos (Young *et al*, 2003). O uso de nistatina no processo de seleção de transformantes de *erg6* permitiu identificar que 10 μ g/mL é uma concentração que permite o crescimento da linhagem selvagem H99 de *C. neoformans*, enquanto que em *C. albicans*, 2,5 μ g/mL de nistatina foi suficiente para inibir completamente o selvagem (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998) e em *S. cerevisiae*, foi 2 μ g/mL (Gaber *et al.*, 1989). Dessa forma, o teste de sensibilidade foi então realizado com uma concentração muito maior, 50 μ g/mL, a fim de garantir que se pudesse observar se o mutante *erg6* Δ teria o efeito de resistência, observado em outros fungos. Os resultados na **Figura 22B** demonstram que o mutante *erg6* Δ é capaz de crescer mesmo na concentração de 50 μ g/mL de nistatina.

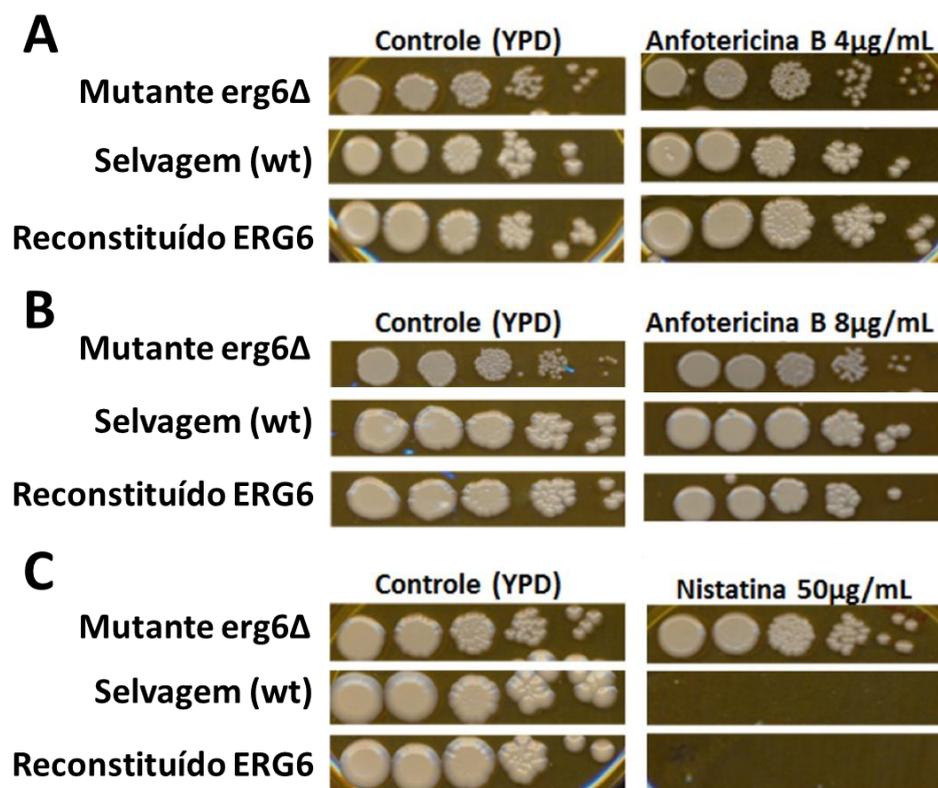


Figura 22. Susceptibilidade do mutante *erg6Δ*, selvagem e reconstituído ERG6 de *C. neoformans* aos poliênicos anfotericina B e nistatina em YPD.

Foram realizadas diluições seriadas em placas de YPD com concentração de A) 4 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B e B) 50 $\mu\text{g/mL}$ de nistatina, a 30° C/ 7 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a observação da susceptibilidade a drogas em placas de YPD, foram realizados testes a fim de determinar a concentração mínima inibitória de cada uma das drogas estudadas. Mutantes de ERG6 de outros fungos apresentaram resistência a polienos (Vandeputte *et al*, 2008; Jensen-Pergakes *et al*, 1998; Young *et al*, 2003). Nos testes de microdiluição para determinação da CMI₉₀, foi possível observar claramente um aumento de 4X na resistência a anfotericina B do mutante *erg6Δ* de *C. neoformans*, 2 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que as CMI do selvagem e do reconstituído foram 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 23A**). Em mutantes de ERG6 em *C. lusitaniae* foi observado um aumento de 80-128X na resistência a anfotericina B (Young *et al.*, 2003). Já para nistatina, o aumento da resistência observado no mutante *erg6Δ* de *C. neoformans* foi de 8X, 16 $\mu\text{g/mL}$ quando comparado com a CMI detectada no reconstituído e selvagem, 2 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 23B**). Como o ergosterol é a molécula alvo principal das drogas

poliênicas, a resistência observada pode ser atribuída à diminuição da quantidade de ergosterol acarretada pela deleção de ERG6, que codifica uma enzima importante na biossíntese destas moléculas.

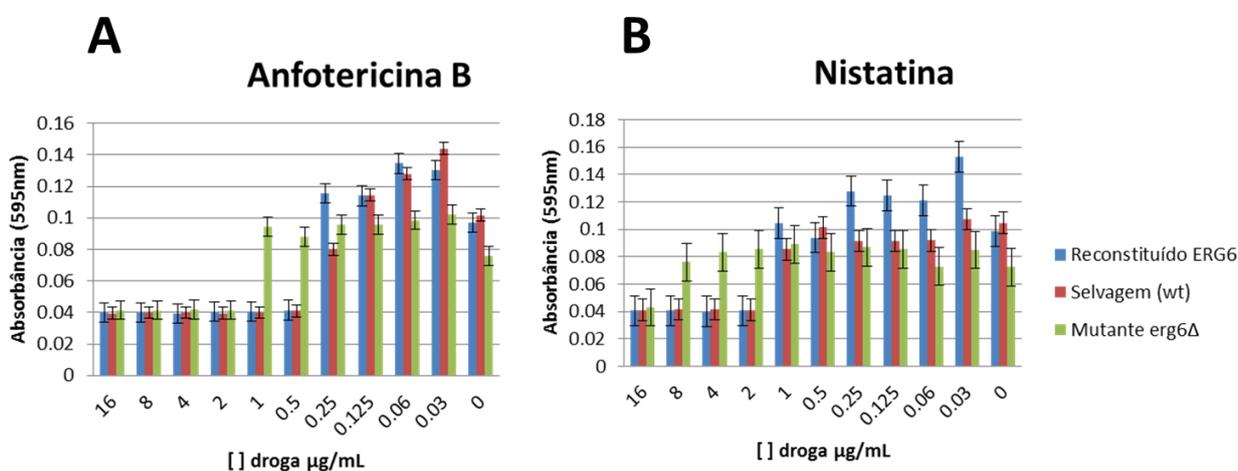


Figura 23. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória das drogas antifúngicas poliênicas anfotericina B e nistatina.

Os testes foram realizados para as linhagens: mutante *erg6Δ*, selvagem H99 e reconstituído ERG6 de *C. neoformans*, de acordo com protocolo padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 595nm e os dados foram plotados em gráficos. Observa-se um aumento de 4X e 8X na resistência do mutante de ERG6 quando comparado ao selvagem e reconstituído para A) Anfotericina B e B) Nistatina, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os azóis atuam inibindo a enzima Erg11, dessa forma, mutantes de enzimas que atuam na via ergosterol são mais sensíveis a essa classe de drogas (Sanglard *et al.*, 2003), pois afetam a biossíntese de ergosterol, prejudicando ainda mais esta via metabólica, o que foi observado em *C. glabrata* (Vandeputte *et al.*, 2007). Neste trabalho, foram avaliadas as susceptibilidades de *C. neoformans* a três drogas da classe dos azóis: itraconazol, cetoconazol e fluconazol em meio YPD sólido sendo que o mutante *erg6Δ* foi incapaz de crescer quando em contato com as três drogas azólicas testadas (**Figura 24**).

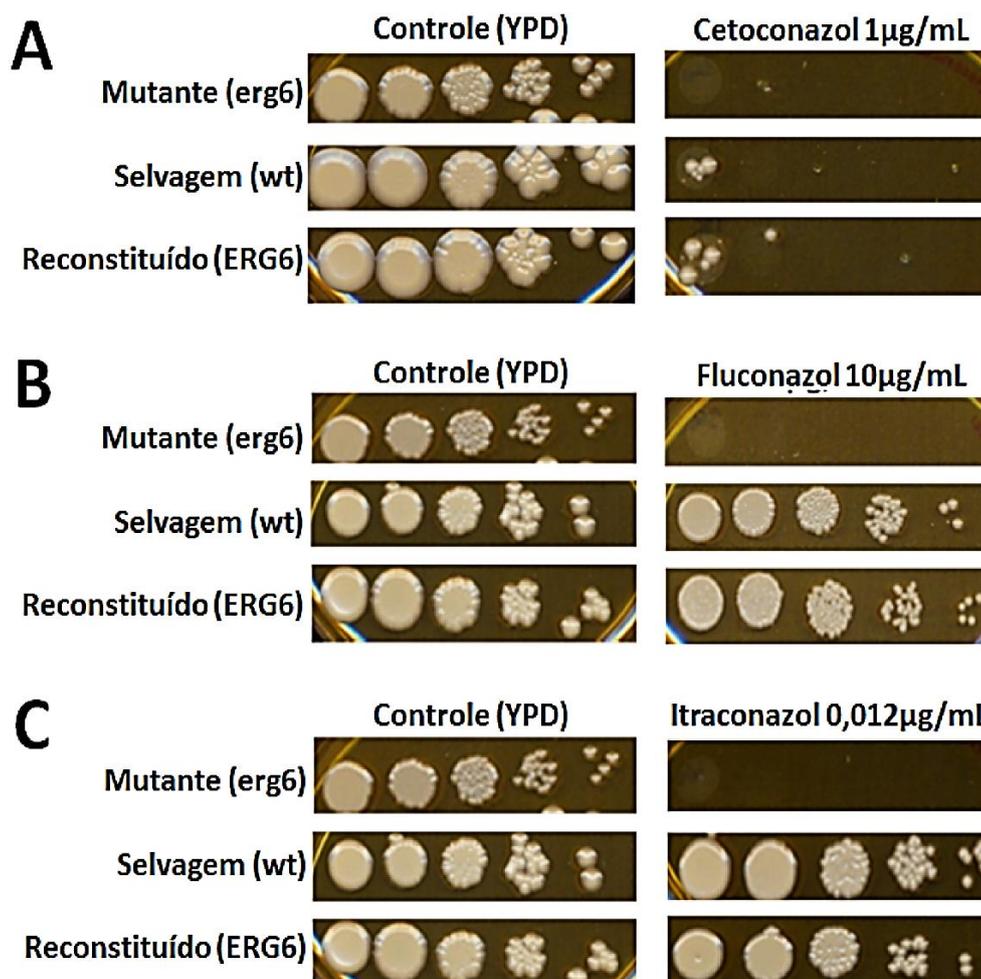


Figura 24. Susceptibilidade do mutante *erg6*Δ, selvagem e reconstituído ERG6 de *C. neoformans* aos azóis.

A. Cetoconazol, B. Fluconazol e C. Itraconazol. Foram realizadas diluições seriadas em placas de YPD com concentração de A. 1 µg/mL de cetoconazol, B. 10 µg/mL de fluconazol, e C. 0,012 µg/mL de itraconazol a 30°C/ 7 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

A CMI de azóis foi determinada para as drogas cetoconazol, fluconazol e itraconazol; as mesmas utilizadas nos testes com YPD. Para as três drogas, não houve crescimento do mutante *erg6*Δ no teste de diluição seriada enquanto o selvagem e o reconstituído foram capazes de crescer (**Figura 24**). O mesmo foi evidenciado no teste para determinação da CMI, no qual, não foi observado crescimento do mutante *erg6*Δ em nenhuma das concentrações testadas, demonstrando sua alta sensibilidade a essa classe de drogas. A CMI₉₀ para o mutante *erg6*Δ de todas as drogas azólicas testadas foi menor que 0,03 µg/mL, enquanto que a CMI para as linhagens selvagem e reconstituída foram: 0,125 µg/mL, 4 µg/mL e 2 µg/mL para Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol,

respectivamente (**Figura 25**). Já em mutantes de ERG6 em *C. lusitaniae*, a alteração na susceptibilidade não foi semelhante para todas as drogas da classe testada, observou-se um aumento de seis vezes na sensibilidade a fluconazol, e CMI semelhante à cepa selvagem para cetoconazol e itraconazol (Young *et al.*, 2003). Diferentemente, o mutante de ERG6 de *C. albicans* não apresentou diferenças na susceptibilidade a drogas azólicas quando comparado ao selvagem (Jensen- Pergakes, *et al.*, 1998).

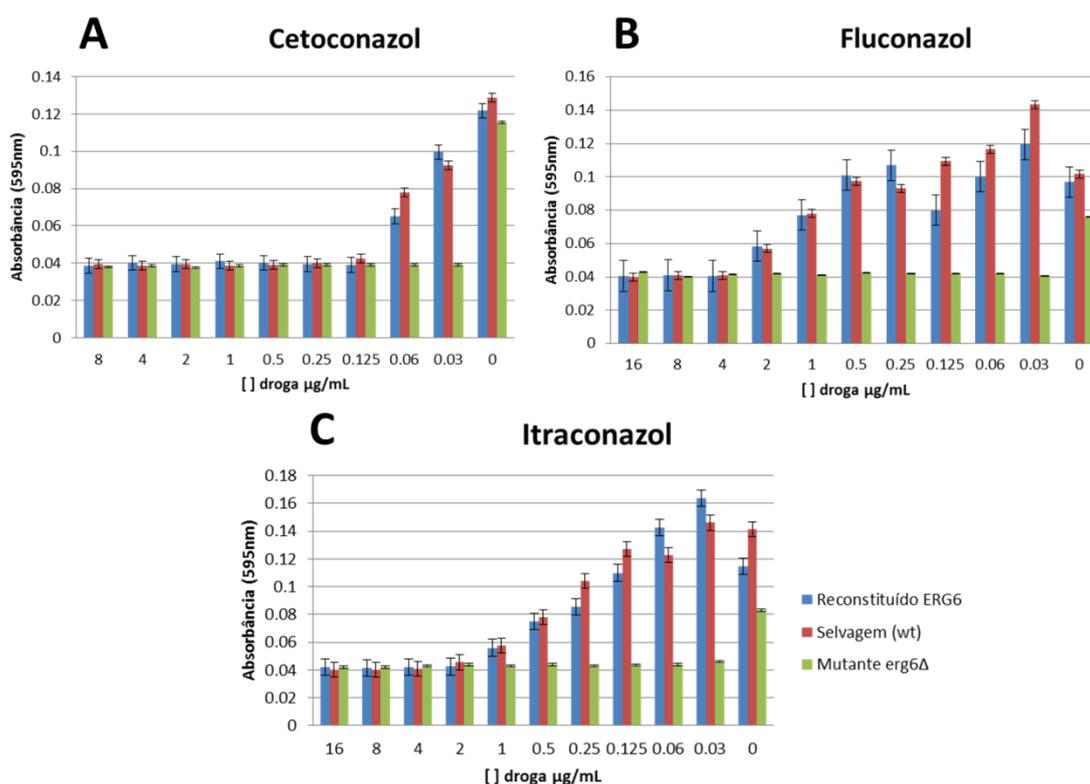


Figura 25. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória das drogas antifúngicas azólicas: cetoconazol, fluconazol e itraconazol.

Os testes foram realizados para as linhagens: mutante *erg6Δ*, selvagem H99 e reconstituído ERG6 de *C. neoformans*, de acordo com protocolo padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm e os dados foram plotados em gráficos. Observa-se redução na susceptibilidade do mutante de ERG6 quando comparado ao selvagem e reconstituído para todas as drogas testadas: A. Cetoconazol e B. Fluconazol e C. Itraconazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho com o mutante *erg6Δ* de *C. neoformans* e aqueles de mutantes de outros fungos, alguns autores sugerem que o aumento da sensibilidade às drogas azólicas pode ser atribuído às alterações de permeabilidade da membrana plasmática que facilitaria a entrada do antifúngico. Além

disto, é sugerido o efeito sinérgico promovido pela inibição concomitante de duas enzimas da via de biossíntese do ergosterol: Erg6 e Erg11 (alvo dos azóis).

Utilizando a Terbinafina, outra droga antifúngica comercialmente disponível que atua na via biossintética do ergosterol, inibindo a enzima esqualeno epoxidase, observou-se que o mutante *erg6* Δ de *C. neoformans* apresenta uma redução de crescimento em YPD contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de terbinafina, quando comparado às linhagens selvagem e reconstituída (**Figura 26**), sendo que a determinação da CMI desta droga para o mutante *erg6* Δ foi ligeiramente diminuída (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ao compará-la com a CMI determinada para as linhagens selvagem e reconstituída que variou de 0,5-1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 27**). Diferente do que observamos para *C. neoformans*, os mutantes de *ERG6* de *C. lusitaniae* mostraram hipersensibilidade à terbinafina (Young *et al.*, 2003). Apesar de que a droga afeta a biossíntese de lanosterol, um intermediário da biossíntese do ergosterol, não foi observado em *C. neoformans* o efeito pronunciado de susceptibilidade a terbinafina e o efeito sinérgico, como visto anteriormente para os azóis.

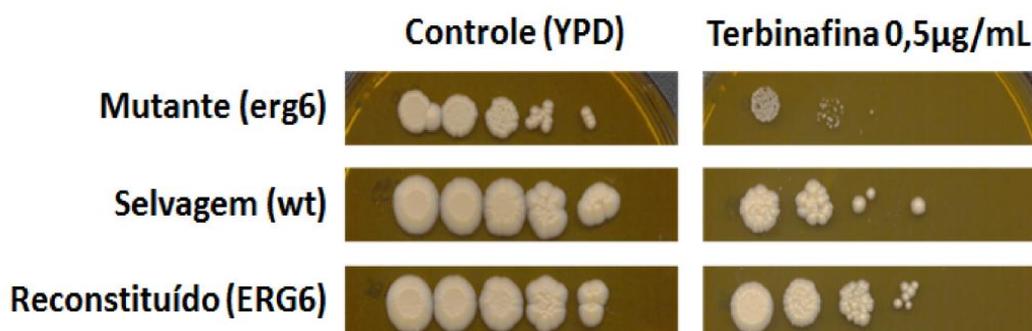


Figura 26. Sensibilidade do mutante *erg6* Δ , selvagem e reconstituído *ERG6* de *C. neoformans* à terbinafina que inibe a enzima esqualeno epoxidase do início da via de biossíntese do ergosterol.

Foram realizadas diluições seriadas em placas de YPD com concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de terbinafina a 30 °C/ 4 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

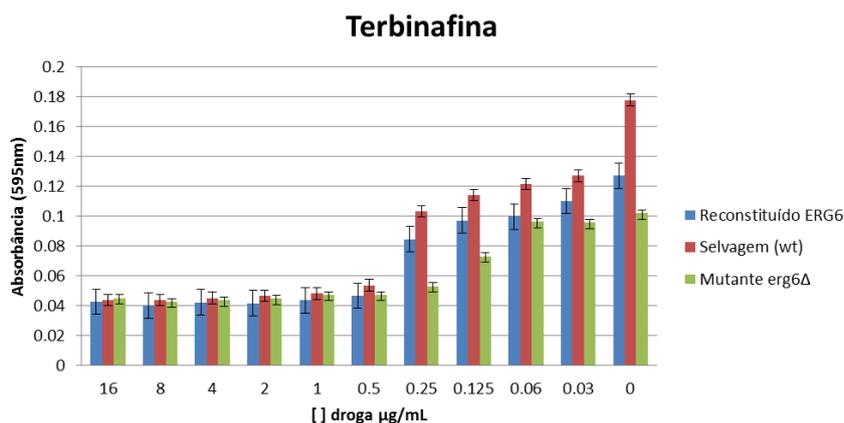


Figura 27. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória da Terbinafina.

Os testes foram realizados para as linhagens: mutante erg6 Δ , selvagem H99 e reconstituído ERG6 de *C. neoformans*, de acordo com protocolo padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm e os dados foram plotados em gráficos. Observa-se pequena redução na susceptibilidade do mutante de ERG6 quando comparado ao selvagem e reconstituído.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi testada também a cerulenina no mutante erg6 Δ de *C. neoformans*. Este antibiótico é produzido por *Cephalosporum caerulens* e inibe as enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos de diferentes microrganismos através da ligação à enzima carreadora beto-cetoacil sintetase (Rouslin, 1979). Além disto, Rouslin (1979) demonstrou que esta droga bloqueia a formação dos complexos enzimáticos presentes na membrana interna mitocondrial. Os testes em meio YPD e a determinação da CMI para o mutante erg6 Δ de *C. neoformans* demonstraram que este mutante não é capaz de crescer em placas contendo 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 28**), enquanto que as linhagens selvagem e reconstituída cresceram. Além disto, a CMI para o mutante foi de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e para as linhagens selvagem e reconstituída foi de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, indicando um pequeno aumento da susceptibilidade (**Figura 29**). Em *C. albicans*, a susceptibilidade de mutante erg6 Δ foi duas vezes aumentada a cerulenina quando comparada ao selvagem (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998). Utilizando esta droga como potencial antifúngico, Nguyen e Nosanchuk (2011) demonstraram um efeito fungicida em *C. albicans* e *C. parapsilosis*, visto que a biossíntese de ácidos graxos é essencial para produção de ácidos graxos saturados e insaturados necessários para produção e manutenção da membrana celular.

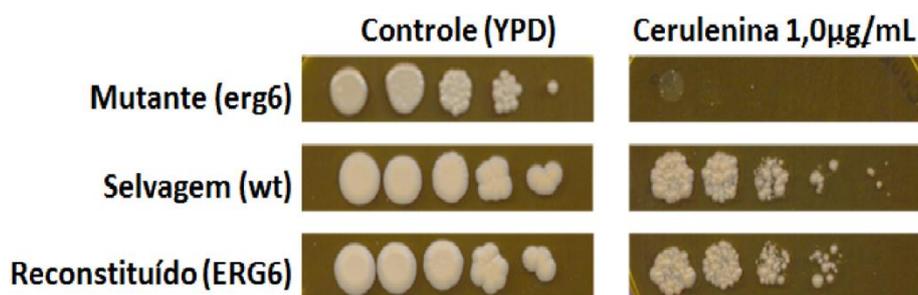


Figura 28. Sensibilidade do mutante *erg6*Δ de *C. neoformans* à cerulenina que inibe a biossíntese de ácidos graxos.

Foram realizadas diluições seriadas em placas de YPD com concentração de 1,0 μg/mL de cerulenina a 30 °C/ 4 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

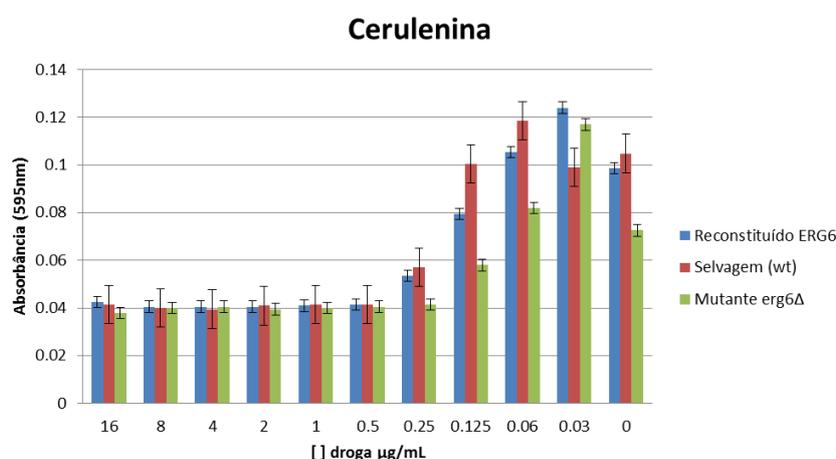


Figura 29. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória da Cerulenina.

Os testes foram realizados para as linhagens: mutante *erg6*Δ, selvagem H99 e reconstituído ERG6 de *C. neoformans*, de acordo com protocolo padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm e os dados foram plotados em gráficos. Observa-se aumento pequeno na susceptibilidade do mutante de ERG6 quando comparado ao selvagem e reconstituído.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, drogas com mecanismos de ação distintos à síntese de esteróis foram testadas e suas CMI foram determinadas. A Brefeldina A demonstrou não ser uma droga eficaz para *C. neoformans* já que a maior concentração testada, de 32 μg/mL não foi capaz de inibir as linhagens selvagem e reconstituído (**Figura 31**). No entanto, para o mutante *erg6*Δ, foi possível identificar uma redução de 4X ou mais para as duas drogas testadas, sendo que para Brefeldina A, a CMI₉₀ para o mutante foi de 8 μg/mL, enquanto para o selvagem foi maior que 32 μg/mL. Já para FK506, observou-se a CMI

para mutante de 0,06 µg/mL e para o selvagem 0,25 µg/mL, o que indica que a ausência do gene *ERG6* provoca um grande aumento na susceptibilidade do fungo a esta droga.

A brefeldina A bloqueia de forma reversível o transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e a FK506 atua na via de sinalização controlada pela calcineurina. A calcineurina é uma proteína fosfatase com resíduos de serina-treonina que é ativada pela calmodulina em resposta ao aumento intracelular de cálcio. Para Brefeldina A, o mutante de *ERG6* de *C. albicans* apresentou CMI 50X menor quando comparada àquela do selvagem (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998) indicando que a alteração na quantidade de ergosterol além de alterar a susceptibilidade a drogas, afetam ainda outros processos celulares, como pode ser visualizado na **Figura 30**. A droga FK506, ao inibir a calcineurina, impede o crescimento de *C. neoformans* a 37 °C, comprometendo a virulência e morfogênese deste fungo (Cruz *et al.*, 2002; Hull e Heitman, 2002). A observação da redução da CMI sugere o efeito sinérgico entre a inibição das duas drogas e a ausência de Erg6 pela deleção gênica. Inibidores da via da calcineurina foram testados com os antifúngicos atualmente usadas em *C. neoformans* e foi observado que existe um efeitos sinérgico entre as drogas. (Del Poeta *et al.*, 2000; Kontoyiannis *et al.*, 2008).

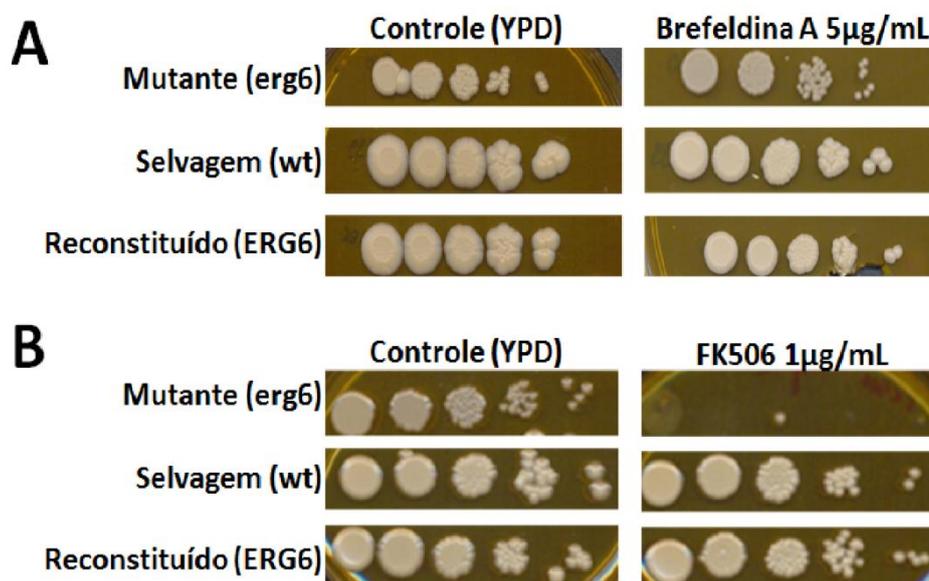


Figura 30. Sensibilidade do mutante *erg6*Δ a drogas que atuam em vias metabólicas não relacionadas a biossíntese do ergosterol, brefeldina A e FK506.

A) Crescimento em placa contendo Brefeldina A 5 µg/mL após quatro dias a 30 °C ou contendo B) FK506, 1 µg/mL observada após sete dias à mesma temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora.

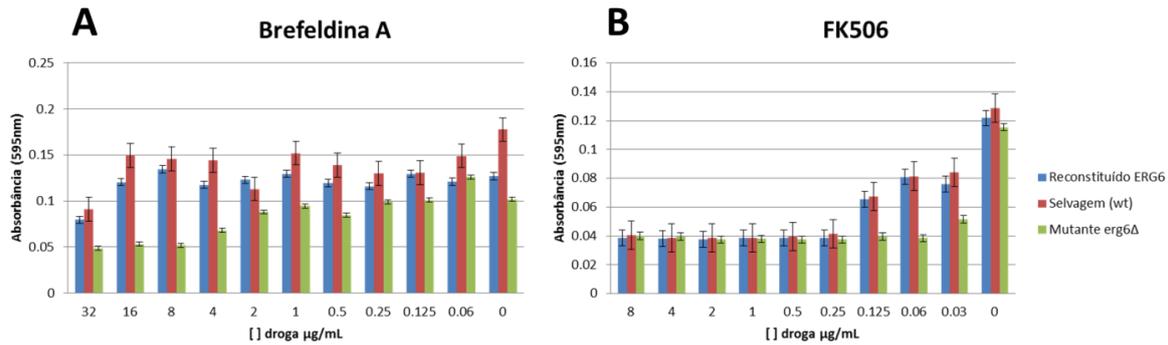


Figura 31. Ensaio para determinação de concentração mínima inibitória da brefeldina A e FK506.

A. Brefeldina A e B. FK506. Os testes foram realizados para as linhagens: mutante *erg6Δ*, selvagem H99 e reconstituído ERG6 de *C. neoformans*, de acordo com protocolo padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm e os dados foram plotados em gráficos. Observa-se pequena redução na susceptibilidade do mutante de ERG6 quando comparado ao selvagem e reconstituído para a Brefeldina A e ausência de crescimento do mutante *erg6Δ* nas concentrações acima de 0,06 µg/mL de FK506 .

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados com mutantes de ERG6 em *C. neoformans* demonstraram assim que a alteração na via de biossíntese do ergosterol afeta a susceptibilidade à diferentes drogas com mecanismos de ação diversos. Dessa forma, a inibição de Erg6 pode contribuir na redução da dosagem de outras drogas quando usado associado, podendo assim diminuir os efeitos adversos que aquelas drogas utilizadas na prática clínica apresentam.

5.6 Avaliação da sobrevivência do mutante *erg6Δ* em macrófagos J774 e em *Galleria mellonella*

A virulência do mutante de ERG6 de *C. neoformans* foi primeiramente analisada *in vitro* a partir de um teste de sobrevivência em macrófagos. As cepas em estudo foram submetidas a fagocitose por macrófagos J774 que, posteriormente, foram lisados. Os fungos que foram internalizados, recuperados da lise celular, foram plaqueados e a contagem de UFC de cada uma das linhagens foi realizada. O resultado observado foi a redução na capacidade de sobrevivência de mutantes de ERG6 em células de macrófagos indicada pelo crescimento de um número reduzido de colônias. Os reconstituídos demonstraram que a re-inserção do gene no fungo possibilitou a sobrevivência de *C. neoformans* em macrófagos de forma semelhante à cepa selvagem (**Figura 32**). É importante lembrar que os mutantes de ERG6 apresentaram vários

fenótipos alterados, dentre eles a capacidade de crescer em altas temperaturas e na produção de fatores de virulência alterada, dessa forma a redução da capacidade de sobrevivência em macrófagos, pode não estar relacionada apenas a alteração da via do ergosterol e sim de sua incapacidade de crescer na temperatura do hospedeiro, além de alteração de outros fatores de virulência, como por exemplo, aqueles observados nos testes de fosfolipase B um dos fatores de virulência mais bem estudados em *C. neoformans*.

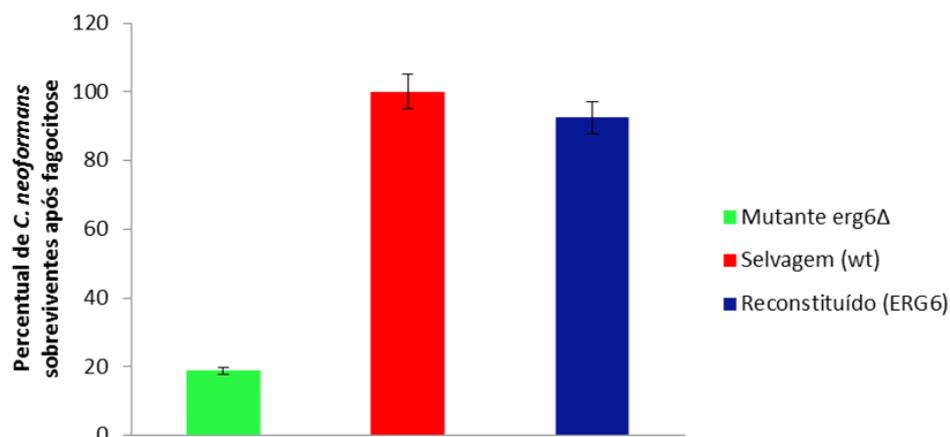


Figura 32. Ensaio de sobrevivência em macrófagos peritonias das linhagens mutante *erg6Δ*, selvagem e reconstituído ERG6.

Mutantes de ERG6 apresentam sobrevivência reduzida após sofrerem fagocitose de macrófagos. Após 24 horas de co-cultivo com macrófagos peritonias J774, semearam-se em YPD 100 microlitros de uma diluição 1:100 de lisado celular contendo leveduras fagocitadas. Após 48 horas, contaram-se as UFC. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados, comparados entre si pelo teste 2 way ANOVA. Constatou-se que a cepa mutante é significativamente ($p < 0,001$) menos apta a sobreviver no interior dos macrófagos do que a selvagem e a reconstituída, que são estatisticamente idênticas.

Fonte: Elaborada pela autora.

A observação de que o mutante de ERG6 em *C. neoformans* apresentou sobrevivência em macrófagos reduzida em relação ao selvagem e o reconstituído, levou ao questionamento se a virulência *in vivo* poderia ser afetada pela deleção do gene. Lagartas da espécie *G.mellonella* foram então utilizadas como o modelo de infecção, previamente descrito por Mylonakis *et al.* (2005), para investigar a virulência da linhagem *erg6* de *C. neoformans*. As lagartas foram infectadas com as linhagens: mutante *erg6Δ*, selvagem H99 e reconstituído, incubadas a 37 °C e observadas diariamente. O mutante *erg6Δ* demonstrou ser hipovirulento, enquanto que o selvagem foi capaz de matar todas as lagartas em apenas quatro dias e o reconstituído em sete, ainda no oitavo dia, quando o experimento se encerrou, havia morrido pouco mais de

50 % das lagartas infectadas com o mutante *erg6*Δ, assim como aquelas que não foram infectadas nas quais foi injetado PBS para controle negativo (**Figura 33**). Esses resultados juntamente aos do teste de macrófagos mostram que a deleção do gene *ERG6* em *C. neoformans* afeta a virulência do fungo.

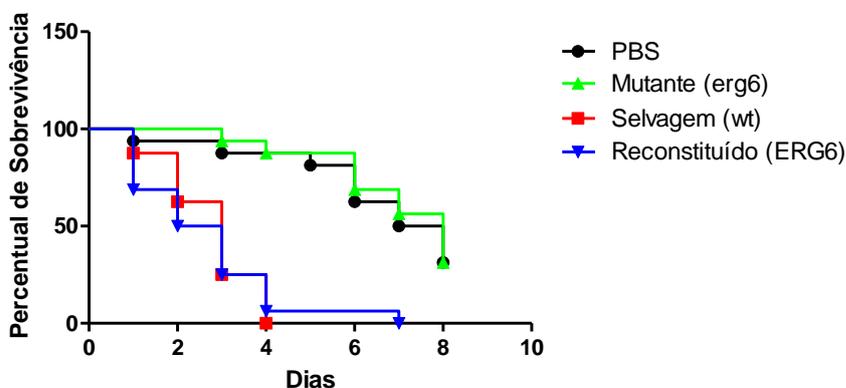


Figura 33. Ensaio virulência em *G. mellonella* das linhagens mutante *erg6*Δ, selvagem e reconstituído *ERG6*.

A deleção do *ERG6* em *C. neoformans* provocou redução na virulência do fungo em *G. mellonella*. As lagartas foram infectadas na última pata traseira com 10 μL de um inóculo de 5×10^6 células e mantidas a 37 °C. Elas foram, diariamente, observadas e contadas. O resultado mostra que o selvagem foi a cepa mais virulenta, enquanto o mutante demonstrou ser estatisticamente ($P < 0.001$) menos virulento que o selvagem e o reconstituído.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.7 Análise dos esteróis de membrana no mutante *erg6*Δ de *C. neoformans*

Para avaliar se os defeitos fenotípicos observados no mutante *erg6*Δ ocorreram devido à alteração da quantidade de ergosterol na membrana plasmática de *C. neoformans*, os esteróis da membrana das linhagens mutante, selvagem e reconstituído foram extraídos e quantificados por HPLC. Foram utilizados o lanosterol e o ergosterol como padrões em diferentes concentrações, com os quais foi realizada uma curva para quantificação. O pico do ergosterol foi observado a 281 nm em um tempo de eluição de cerca de cinco minutos, enquanto o do lanosterol foi a 220 nm próximo de seis minutos. Os picos detectados antes do ergosterol são compostos, provavelmente, mais hidrofílicos, enquanto os compostos mais lipofílicos permanecem mais tempo retidos na coluna cromatográfica.

Em *C. lusitaniae* (Young *et al.*, 2003) foi observada uma redução no conteúdo do ergosterol total no mutante *erg6*Δ. De acordo com Nes *et al.* (2009) já foram

propostas rotas alternativas para a síntese de ergosterol que não utilizam Erg6, porém a via que a enzima faz parte é a principal por ser cineticamente favorável. No presente estudo, a análise do mutante de *C. neoformans* a 281 nm não demonstrou ergosterol quantificável nas concentrações testadas, mas foi possível identificar o pico de lanosterol a 220 nm. Os cromatogramas do selvagem e do reconstituído foram bastante semelhantes, revelando a detecção do ergosterol e ainda, de outros dois picos, não identificados, que poderiam ser característicos de outros esteróis. Dessa forma foi observado que reconstituído e selvagem possuem um perfil de esteróis de membrana bastante similares indicando a reconstituição do fenótipo (**Figura 34**).

Em todas as cepas foram observados picos que, provavelmente, correspondem a outros esteróis de membrana ou seus intermediários (**Figura 34**). Alguns desses esteróis são comuns a todas as cepas, porém, apenas no mutante foi observado um pico bastante concentrado antes do pico do ergosterol. A análise dos cromatogramas revela que esse pico ocorre em consequência da deleção do gene ERG6, podendo se tratar do acúmulo de algum esterol na via devido ao impedimento da síntese do produto final ou algum outro esterol que seja sintetizado a fim de tentar substituir o ergosterol na membrana celular. Em isolados de *C. glabrata*, Vandeputte *et al.* (2007) também identificaram alterações na composição dos esteróis dos mutantes, pois enquanto o selvagem possuía ergosterol como o principal esterol, os mutantes apresentaram diversos intermediários. Nes *et al.* (2009) afirmou que o uso de inibidores de 24-SMT provocaria o acúmulo de 4,4-dimetil esteróis e foi observado que um dos inibidores testados provocou o acúmulo de lanosterol e de colest-5,7,24-trienol.

Em cepas selvagens de *S.cerevisiae*, foram detectados, por cromatografia gasosa, picos de zimosterol, ergosterol e ergostadieno no selvagem, enquanto em mutantes de ERG6, foram observados apenas esteróis não metilados. O zimosterol, que é o substrato da enzima Erg6, foi o principal esterol detectado por Garber *et al.* (1989) nos mutantes, tendo um grande aumento em relação à cepa selvagem.

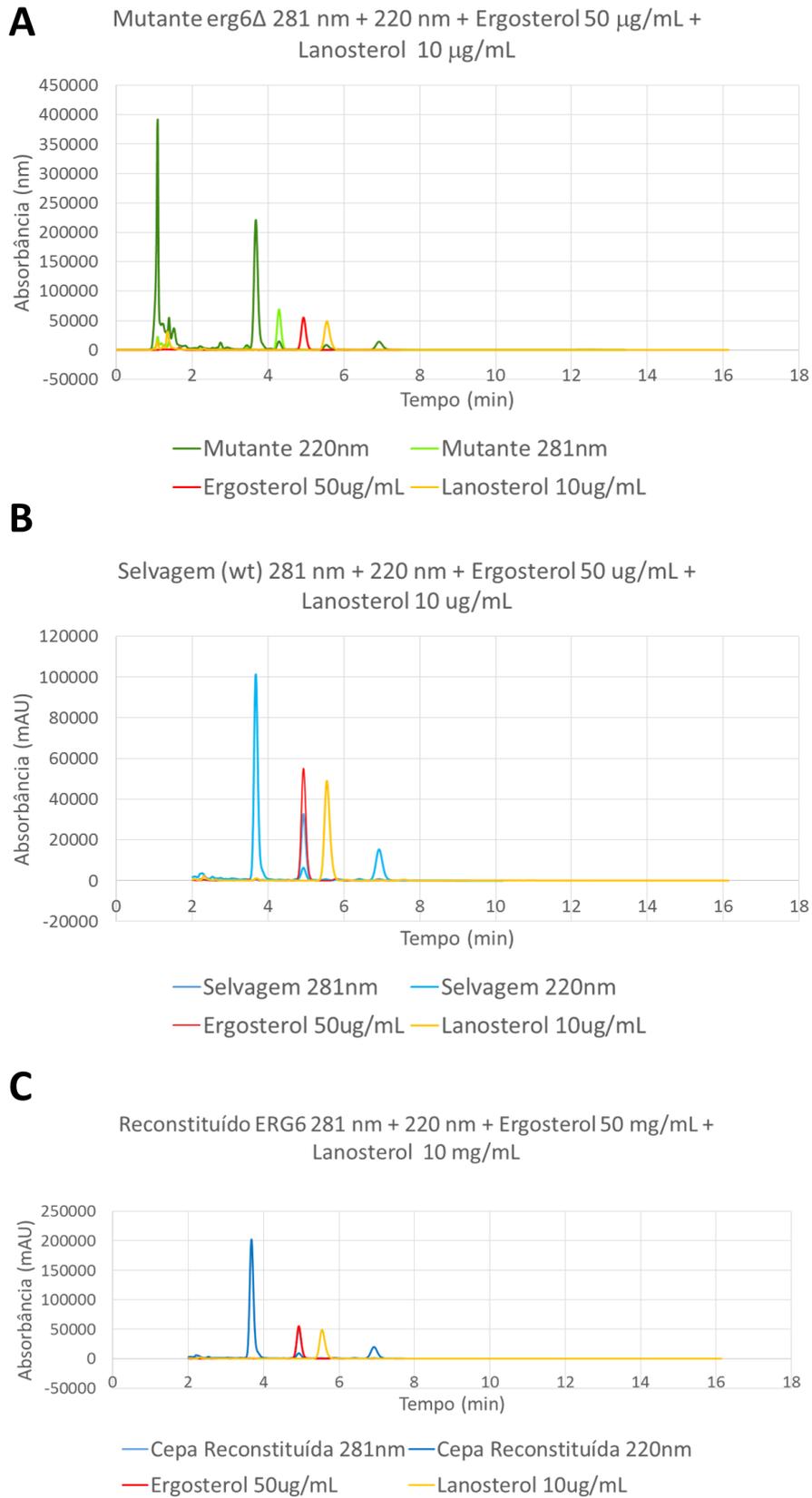


Figura 34. Cromatogramas a 220 nm e 281 nm contendo os resultados dos esteróis de membrana das três cepas estudadas.

Foram observados vários picos que possivelmente correspondem a outros esteróis presentes na membrana de *C. neoformans*. Os perfis de esteróis reconstituído e do selvagem foram bastante semelhantes, porém mutantes apresentam uma composição de esteróis de membrana distinta. A. Cromatogramas do mutante B. cromatogramas do selvagem e C. cromatogramas do reconstituído ERG6

Fonte: Elaborada pela autora.

A curva de calibração dos padrões foi realizada utilizando concentrações variáveis entre 100 µg/mL a 0,1 µg/mL. Ela demonstrou um R^2 bem próximo do linear, permitindo a quantificação dos dois esteróis em cada cepa (**Figura 35**). O ergosterol demonstrou estar mais presente nos extratos do reconstituído do que no selvagem. Já em relação ao lanosterol, que é um lipídeo no início da via de biossíntese do ergosterol, este foi detectado e quantificado em todas as cepas, porém o mutante apresentou quase 10X mais desse lipídeo que o selvagem (**Tabela 6**).

A proporção de ergosterol e lanosterol na membrana pareceram ser inversamente proporcionais. O reconstituído que mostrou ter mais ergosterol foi o que apresentou menos lanosterol, enquanto o mutante não apresentou ergosterol quantificável e demonstrou uma grande quantidade de lanosterol em relação às outras cepas. Nes *et al.* (2009) analisou o perfil característico da membrana de *C. neoformans* em cromatografia gasosa e espectrometria de massa, e observou que 39% do total de esteróis correspondia ao ergosterol, 26 % ao ergost-7,22-eno, 15 % ao ergost-7-enol, 6 % ao eburicol e 3 % ao lanosterol. Dessa forma, o autor demonstrou que o fungo apresenta grande quantidade de ergosterol em sua membrana e pouca de lanosterol, o que pode explicar os resultados obtidos com a quantificação dos dois esteróis.

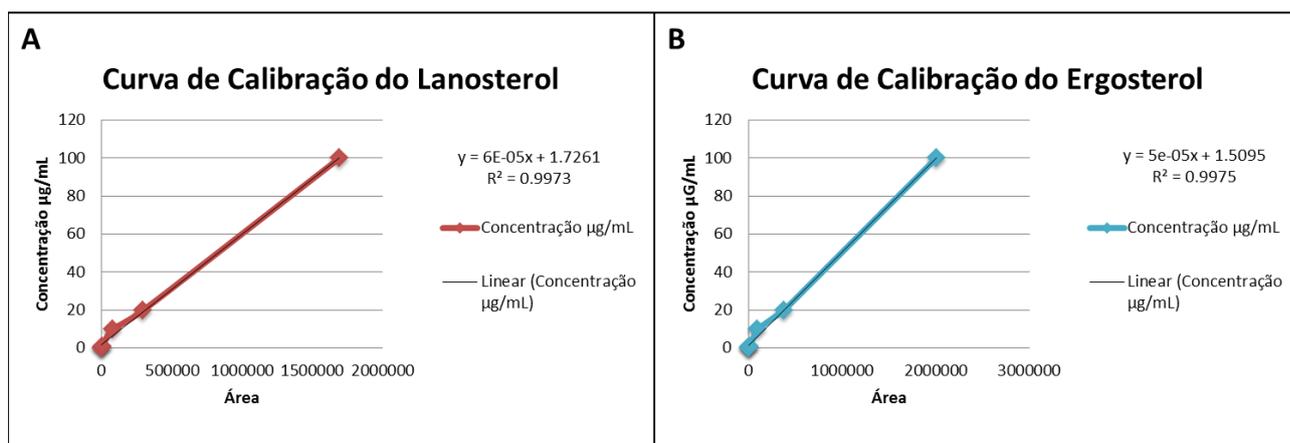


Figura 35. Curvas de calibração dos padrões lanosterol e ergosterol.

As curvas de concentração realizadas para os dois padrões utilizadas demonstraram tendência linear com $R^2 = 0,0073$, possibilitando a quantificação do lanosterol e ergosterol presentes em cada uma das cepas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6. Concentração de ergosterol e lanosterol em relação à massa de esterol total.

	Concentração de ergosterol / mg de esterol total	Concentração de lanosterol / mg de esterol total
Mutante <i>erg6</i>Δ	Inferior ao Limite de Quantificação	11,7 µg
Selvagem (wt)	4,21 µg	1,3 µg
Reconstituído <i>ERG6</i>	7,62 µg	0,7 µg

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante lembrar que o lanosterol é o primeiro esterol sintetizado na via do ergosterol, o que pode justificar uma maior concentração deste composto quando há menos ergosterol. No mutante o acúmulo do lanosterol pode ser justificado pela possível interrupção na via pela ausência de Erg6. A ausência de ergosterol pode ser um sinalizador para a ativação da via, que talvez esteja constantemente ativada produzindo lanosterol na tentativa de possibilitar a síntese do esterol final da via. Em relação à diferença entre reconstituído e selvagem, pode-se, provavelmente, justificar-se devido à alteração no perfil de crescimento das cepas ou até mesmo a alguma alteração na expressão gênica que possa ter ocorrido durante a reconstituição.

5.8 Citolocalização

Após a análise dos efeitos da deleção do gene *ERG6* em *C. neoformans*, a etapa seguinte foi citolocalizar Erg6 no fungo. O gene *ERG6* foi fusionado ao marcador fluorescente GFP (plasmídeo pCN50_{GFP-ERG6}), que foi inserido no mutante *erg6*Δ através de transformação por biobalística. Os controles utilizados foram a própria linhagem selvagem H99 e a linhagem contendo apenas o plasmídeo sem o gene fusionado. A diferença na fluorescência emitida pelos controles e a cepa contendo Erg6 fusionado a GFP foi observada através do ensaio de citometria de fluxo que pode ser visualizada na **Figura 36**. Diante da confirmação que a linhagem que recebeu a fusão *ERG6*-GFP estava emitindo fluorescência prosseguiu-se com a visualização por microscopia de fluorescência.

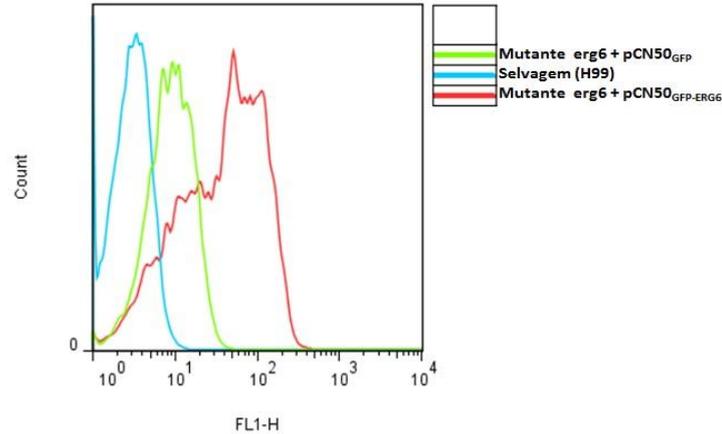


Figura 36. Citometria de fluxo mostrando que a cepa contendo o ERG6 fusionado a GFP possui duas populações de fluorescência.

Células de cada uma das cepas foram diluídas 1:100 em um volume de 500 μ L e suas respectivas fluorescências foram detectadas em citômetro de fluxo FACSCalibur. Os resultados obtidos foram analisados no *software* FlowJo no qual foram observadas as fluorescências de cada uma das cepas. A cepa contendo Erg6-GFP possui duas populações, uma fluorescente semelhante a cepa contendo apenas o plasmídeo sem a fusão, e outra com muito mais fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

As células foram observadas em microscópio de luz invertida utilizando contraste diferencial de interferência (DIC) e a fluorescência emitida pela cepa contendo Erg6 fusionado a GFP foi visualizada na forma de pontos no interior da grande maioria das leveduras observadas, concluindo-se que Erg6 está localizado intracelularmente (**Figura 37**). Já a cepa contendo o plasmídeo vazio não apresentou níveis de fluorescência detectáveis pelo microscópio em quase todas as células.

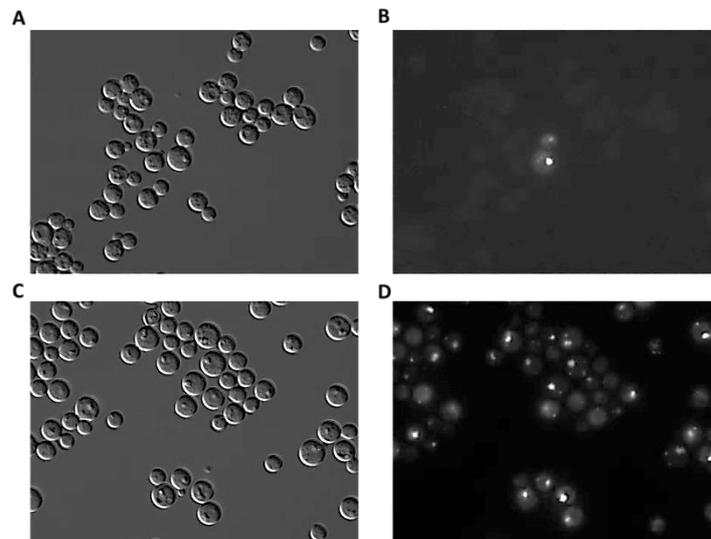


Figura 37. Microscopia de fluorescência para citolocalização de Erg6 em *C. neoformans*.

A linhagem contendo ERG6 fusionado a GFP possui muitas células com fluorescência em seu interior, enquanto a linhagem contendo apenas o plasmídeo com GFP apresenta poucas células com fluorescência. Letras A e B correspondem à linhagem contendo apenas o plasmídeo com GFP. Letras C e D correspondem à linhagem contendo GFP fusionada a ERG6. Letras A e C, fotos usando DIC. B e D, B e C, fotos do campo escuro mostrando a fluorescência das leveduras. Imagens captadas utilizando objetiva Plan-Apochromat 63x/ 1.40 Oil DIC M27. Escala foto original: 15,87 µm/cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

O produto do gene ERG6, foi pela primeira vez localizado em *C. neoformans*, e os resultados indicam que possivelmente a enzima está sub-localizada em uma organela intracelular. Em *S. cerevisiae*, Zweyick *et al.*, (2000) mostraram que a proteína codificada pelo gene ERG4 se localiza no retículo endoplasmático. Os autores ainda observaram que a biossíntese do ergosterol é concluída nessa organela para então o lipídeo ser transportado para a membrana. Essas informações junto às observações microscópicas levam-nos a crer que a Erg6 também pode estar localizada no retículo endoplasmático, já que a proteína também faz parte das etapas finais da biossíntese de ergosterol. No entanto, a Erg6 do mesmo fungo foi também localizada por Zahedi *et al.* (2006) na membrana mitocondrial externa em *S. cerevisiae*. E de acordo com o banco de dados de *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>) a enzima já foi encontrada no retículo endoplasmático, em partículas lipídicas, na membrana mitocondrial externa e mitocôndria. Dessa forma, é possível que além do retículo endoplasmático a enzima também possa ser encontrada em outros locais intracelular, como, na mitocôndria.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A deleção do gene *ERG6* em *C. neoformans* mostrou uma alta capacidade pleiotrópica do gene. Foram observados diversos fenótipos alterados comuns também aos mutantes de *ERG6* de outros fungos ou até mesmo mutantes de outros genes da mesma via de biossíntese do ergosterol. No entanto, os mecanismos pelos quais a ausência da enzima Erg6 afeta outras vias metabólicas são pouco conhecidos e são importantes de serem investigados, pois o entendimento do papel desta enzima em fungos fornecerá conhecimentos que certamente serão utilizados na identificação de novas drogas antifúngicas.

Características que parecem estar relacionadas à permeabilidade e fluidez da membrana foram identificadas, tais como sensibilidade a estresse osmótico e mudança na susceptibilidade de diversas drogas antifúngicas. A ausência do gene foi ainda capaz de afetar a sensibilidade ao estresse oxidativo e a capacidade do fungo em crescer em meios contendo estressores da parede celular. Além disso, mutante *erg6Δ* em *C. neoformans* apresentou sensibilidade térmica com o aumento da temperatura, o que pode ser visto através de curvas de crescimento a três temperaturas diferentes. Esses resultados indicam que a capacidade de sobrevivência do mutante é bastante afetada diante de alterações dos meios extracelulares. A partir dessa informação, acredita-se que se uma droga com esse alvo molecular for utilizada em um indivíduo infectado, o fungo terá sua capacidade de sobrevivência no organismo do hospedeiro reduzida, já que este apresenta defesas imunológicas que também afetam o fungo mais pronunciadamente.

A alteração na susceptibilidade às drogas antifúngicas atualmente disponíveis foi observada em mutante *erg6Δ*. Isso demonstra que mesmo se uma droga que atue na Erg6 não for capaz de erradicar a infecção, o uso combinado com outros antifúngicos permite a redução de dose, diminuindo a possibilidade de efeitos adversos e tóxicos que os atuais medicamentos apresentam.

Em relação aos fatores de virulência, o mutantes de *ERG6* não apresentou problemas na síntese de cápsula ou melanina, mas foram incapazes de crescer a 37°C, além de apresentar uma capacidade de produção de fosfolipase reduzida. As alterações provocadas pela ausência da Erg6 nos fatores de virulência, bem como os ensaios em modelo de infecção em macrófagos e *G. mellonella* evidenciam a capacidade reduzida do *C. neoformans* de provocar a infecção. Todos esses resultados confirmam a possibilidade de o *ERG6* ser um alvo interessante para novas drogas antifúngicas.

Contudo, é importante testar ainda se o mutante *erg6*Δ é capaz de atravessar a barreira hematocefálica em modelos animais. Se a deleção do gene impossibilitar a infecção no Sistema Nervoso Central, a enzima será um alvo ainda mais interessante, já que evitará que os indivíduos infectados desenvolvam meningite.

Alterações na composição dos esteróis da membrana foram observadas em mutantes de genes que atuam na via de biossíntese do ergosterol de outros fungos como: o *erg6* em *C. lusitanae*, (Young *et al.*, 2003), em *S. cerevisiae* (Garber *et al.*, 1989) e em *C. glabrata* (Vandeputte *et al.*, 2007). Neste estudo, alterações na composição dos esteróis da membrana plasmática de *C. neoformans* foram visualizadas pela técnica de HPLC, sendo que os dados confirmam a redução dos níveis de ergosterol no mutante *erg6*Δ. Como a identificação dos picos foi realizada apenas para o ergosterol e para o lanosterol, usando as respectivas moléculas como padrão, seria interessante a identificação e a quantificação de quais esteróis estão alterados na membrana de mutantes *erg6*Δ, a fim de compreender os mecanismos celulares que o fungo utiliza para tentar manter o funcionamento da membrana e sua viabilidade celular. Além disso, alguns dos esteróis intermediários podem ser tóxicos para o fungo e sua identificação pode permitir a síntese de drogas antifúngicas que se assemelhem a esses compostos.

Os resultados preliminares da citolocalização da proteína ERG6 de *C. neoformans* mostraram que a enzima está localizada intracelularmente em alguma organela citoplasmática. A utilização de corantes marcadores organelares poderá possibilitar a identificação de qual organela alberga a enzima. Saber onde se localiza um alvo molecular dentro da célula permite que inibidores contra esse alvo sejam mais específicos e direcionados a atuar nos locais corretos.

O ergosterol é um lipídeo de membrana exclusivo de fungos, dessa forma estudos de enzimas dessa via e identificação do papel de seus respectivos genes são importantes para identificação do envolvimento destas enzimas na biologia do patógeno e para uma melhor compreensão de seus mecanismos metabólicos. O conhecimento sobre o funcionamento de vias de biossíntese de compostos ausentes em humanos possibilita a identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

A deleção do gene ERG6 em *C. neoformans* demonstrou afetar diversos processos celulares do fungo, confirmando o constante na literatura pesquisada em outras espécies. Ao se alterar a via do ergosterol afetando a Erg6, observou-se que a capacidade de sobrevivência do fungo é reduzida, indicando que provavelmente uma

droga que atue nessa proteína tem um grande potencial no tratamento contra a criptococose e outras micoses. Sem dúvida, os dados funcionais gerados por este trabalho, aliados aos estudos genômicos que vem sendo realizados, inclusive em nosso laboratório, lançam as bases para a identificação de alvos moleculares com potencial de tratamento de doenças que afetam o ser humano.

REFERÊNCIAS

- ABADIO, A. K. R; KIOSHIMA, E. S; TEIXEIRA, M. M; MARTINS, N. F; MAIGRET, B; FELIPE, M. S. S. (2011). Comparative genomics allowed the identification of drugs targets against human fungal pathogens. *BMC genomics* 75 (12) 1-10.
- ABDEL-SALAM, H.A. (2005). In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Egypt to seven antifungal drugs. *Mycoses*, 48, 327-332.
- ALSPAUGH, J. A; CAVALLO, L. M; PERFECT, J.R; HEITMAN, J. (2000). RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* 36 (2), 352-365.
- ARCHIBALD, L. K; TUOHY, M.J; WILSON, D.A; NWANYANWU, O; KAZEMBE, P.N; TANSUPHASAWADIKUL, S; EAMPOKALAP, B; CHAOVAVANICH A; RELLER, L.B; JARVIS, W.R; HALL, G.S; PROCOP, G. W. (2004). Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans*. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (1), 143-145.
- BHATTACHARJEE, A.K; BENNETT, J. E; GLAUDEMANS, C.P.J. (1984) Capsular Polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Infectious Diseases* 6 (5), 619-624.
- BARD, M; BRUNER, D. A; PIERSON, C. A; LEES, N. D; BIERMANN, B; FRYE, L; KOEGEL, C; BARBUCH, R. (1996). Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1), 186-90.
- BRANCO, M. R; MARINHO, H. S; CYRNE, L; ANTUNES, F. (2004). Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (8), 6501-6506.
- BULMER, G.S; SANS, M.D; GUNN, C.M. (1967). *Cryptococcus neoformans* I. Nonencapsulated Mutants. *Journal of Bacteriology* 94 (5) 1475-1479.

- CHANG, Y; KWON-CHUNG, K.J. (1994). Complementation of a Capsule-Deficient Mutation of *Cryptococcus neoformans* Restores Its Virulence. *Molecular and Cellular Biology*, 14 (7), 4912-4919.
- CHANG, Y; PENOYER, L.A; KWON-CHUNG, K.J. (1996). The Second Capsule Gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for Virulence. *Infection and Immunity* 64 (6) 1977-1983.
- CHAYAKULKEEREE, M; SORREL, T. C; SIAFAKAS, A. R; WILSON, C. F; PANTARAT, N; GERIK, K.J; BOADLE, R; DJORJEVIC, J. T. (2008). Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 69 (4), 809-826.
- CHEN, S. C. A; MULLER, M; ZHOU, J. Z; WRIGHT, L.C; SORREL, T.C. (1997). Phospholipase Activity in *Cryptococcus neoformans*. A New Virulence Factor? *The Journal of the Infectious Diseases*, 175, 414-420.
- CLARCK, F. S; PARKINSON, T; HITCHCOCK, C. A; GOW, A. R. (1996) Correlation between Rhodamine 123 Accumulation and Azole Sensitivity in *Candida* species: Possible Role for Drug Efflux in Drug Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2 (40), 419 – 425.
- COX, G. M; MUKHERJEE, J; COLE, G. T; CASADEVALL, A; PERFECT, J. R. (2000). Urease as a virulence factor in experimental Cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 68 (2), 443-448.
- COX, G. M; MCDADE, H. C; CHEN, S. C. A; TUCKER, S. C; GOTTFREDSSON, M; WRIGHT, L. C; SORRELL, T; LEIDICH, S. D; CASADEVALL, A; GHANNOUM, M. A; PERFECT, J. R. (2001). Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 39 (1), 166-175.

- CRUZ, M. C; GOLDSTEIN, A. L; BLANKENSHIP, J. R; DEL POETA, M; DAVIS, D; CARDENAS, M. E; PERFECT, J. R; MCCUSKER, J. H; HEITMAN, J. (2002). Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *The EMBO Journal* 21 (4), 546–559.
- DAICHO, K; MAKINO, N; HIRAKI, T; MASARU, U; URITANI, M; ABE, F; USHIMARU, T. (2009). Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an erg2 yeast mutant. *FEMS Microbiology Letters*, 298 (2), 218-227.
- DAVIDSON, R. C; CRUZ, M. C; SAI, R. A. L; ALLEN, B; ALSPAUGH, J. A; HEITMAN, J. (2000). Gene Disruption by Biolistic Transformation in Serotype D Strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 29, 38-48.
- DEL POETA, M; CRUZ, M. C; CARDENAS, M. E; PERFECT, J. R; HEITMAN, J. (2000). Synergistic antifungal activities of bafilomycin A(1), fluconazole, and the pneumocandin MK-0991/caspofungin acetate (L-743,873) with calcineurin inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (3), 739-746.
- DJORDJEVIC, J. T. (2010). Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, 1, 1-13.
- DUFOURE, E. J. Sterols and membrane dynamics. (2008). *Journal of Chemical Biology*, 1, 63-77.
- DUPONT, S; BENEY, L; FERREIRA, T; GERVAIS, O. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808 (6), 1520-1528.
- EMTER, R; HEESE-PECK, A; KRALLI, A. (2002). ERG6 and PDR5 regulate small lipophilic drug accumulation in yeast cells via distinct mechanisms. *FEBS Letters*, 521 (1-3), 57-61.

FELIPE, M. S. S; TORRES, F. A; MARANHÃO, A. Q; SILVA-PEREIRA, I; POÇAS-FONSECA, M. J; CAMPOS, E. G; MORAES, L. M. P; ARRAES, F. B. M; CARVALHO, M. J. A; ANDRADE, R. V; NICOLA, A. M; TEIXEIRA, M. M; JESUÍNO, R. S. A; PEREIRA, M; SOARES, C. M. A; BRÍGIDO, M. M. (2005). Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 45 (3) 369-381.

FOLCH, J, LEES, M; STANLEY, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

FOLMER, V; PEDROSO, N; MATIAS, A. C; LOPES, S. C. D; ANTUNES, F; CYRNE, L; MARINHO, H. S. (2008). H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778 (4), 1141-1147.

GACHOTTE, D; BARBUCH, R; GAYLOR, J. NICKEL, E; BARD, M. (1998). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) involved in sterol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (23), 13794-13799.

GACHOTTE, D; ECKSTEIN, J; BARBUCH, R; HUGHES, T; ROBERTS, C; BARD, M. (2001). A novel gene conserved from yeast to humans is involved in sterol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 42, 150-154.

GABER, RICHARD F; COPPLE, DEBORAH M; KENNEDY, BRIAN K; VIDAL, MARC; BARD, MARTIN. (1989). 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*, 9, 3447-3456.

GEBER, A; HITCHCOCK, C. A; SWARTZ, J. E; PULLEN, F. S; MARSDEN, K. E; KWON-CHUNG, Y. J; BENNETT, J. E. (1995). Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 Genes: Effect on Cell Viability, Cell Growth, Sterol

Composition, and Antifungal Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (12), 270-2717.

GHANNOUM, M. A; RICE, L. B. (1999). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4).

GILBERT, N.M; DONLIN, M. J; GERIK, K. J; SPECHT, C. A; DJORDJEVIC, J. T; WILSON, C. F; SORRELL, T. C; LODGE, J. K. (2010). KRE genes are required for b-1,6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 76 (2), 517-534.

GRANGER, D. L; PERFECT, J. R; DURACK, D.T. (1985). Virulence of *Cryptococcus neoformans* Regulation of Capsule Synthesis by Carbon Dioxide. *The Journal of Clinical Investigation*. 76(2), 508–516.

GRUPTA, G.; FRIES, B.C. (2010). Variability of phenotypic traits in *Cryptococcus* varieties and species and the resulting implications for pathogenesis. *Future Microbiol*, 5 (5), 775-787.

HU, W.; SILLAOTS, S.; LEMIEUX, S.; DAVISON, J.; KAUFFMAN, S.; BRETON, A.; LINTEAU, A.; XIN, C.; BOWMAN, J.; BECKER, J.; JIANG, B.; ROEMER, T. (2007). Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *Plos Pathogens*, 3 (3), 1-15.

HU, G; KRONSTAD, J. W. (2010). A Putative P-Type ATPase, Apt1, Is Involved in Stress Tolerance and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 9 (1), 74-83.

HULL, C; HEITMAN, J. (2002). Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Reviews*, 36, 557-615.

- IDNURM, A; BAHHN, Y; NIELSEN, K; LIN, X. FRASER, J. A; HEITMAN, J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 753-764.
- JANBON, G; DOERING, T. L. (2011). Byosynthesis and Genetics of *Cryptococcus* capsule. In: HEITMAN, J; KOZEL, T.R; KWON-CHUNG, K. J; PERFECT, J.R; CASADEVALL, A. (Org). *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*. (pp. 27-41). Washington: Asm Press.
- JENSEN-PERGAKES, K. L; KENNEDY, M. A.; LEES, N. D.; BARBUCH, R.; KOEGEL, C.; BARD, M. (1998). Sequencing, Disruption, and Characterization of the *Candida albicans* Sterol Methyltransferase (ERG6) Gene: Drug Susceptibility Studies in *erg6* Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5 (42), 1160-1167.
- JIA, N; ARTHINGTON-SKAGGS, B; LEE, W; PIERSON, C. A; LEESM N. D; ECKSTEIN, J; BARBUCH, R; BARD, M. (2002). *Candida albicans* Sterol C-14 Reductase, Encoded by the ERG24 Gene, as a Potential Antifungal Target Site. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (4), 947-957.
- KANAFANI, Z.A; PERFECT, J.R. (2008). Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Antimicrobial Resistance*, 46, 121-128.
- KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of ‘*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*’. *Acta Biochimica Polonica*, 2 (56), 211- 224.
- KARST, F; LACROUTE, F. (1974). Yeast mutant requiring only a sterol as growth supplement. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 59 (1), 370–376.

- KATHIRAVAN, M. K; SALAKE, A.B; CHOTHE, A. S; DUDHE, P. B; WATODE, R. P; MUKTA, M. S; GADHWE. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 20, 5678-5698.
- KELLY, SL; LAMB, D.C; KELLY, D.E; MANING N.J; LOEFFLER J; HEBART H; SHUMACHER, U; EINSELE, H. (1997a). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta^5,6$ -desaturation. *FEBS letters*, 400 (1), 80-82.
- KELLY, S. L; LAMB, D.C; BALDWIN, B. C; CORRAN, A. J; KELLY, D. E. (1997b). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, Sterol Δ^{22} -Desaturase, and Inhibition by Azole Antifungal Agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (15), 9986-9988.
- KIM, MIN SU; KIM, SEO-YOUNG; YOON, JA KYUNG; LEE, YIN-WON; BAHN, YONG-SUN. (2009). An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. *BBRC* 390, 983-988.
- KIM, S.J; KWON-CHUNG.K.J; MILNE, W.A; HILL.W.B; PATTERSON, G. (1975). Relationship between polyene resistance and sterol composition in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7(1), 99-106.
- KONTOYIANNIS, D. P; LEWIS, R. E; ALEXANDER, B. D; LORTHOLARY, O; DROMER, F; GUPTA, K. L; JOHN, G. T; DEL BUSTO, R; KLINTMALM, G. B; SOMANI, J; LYON, G. M; PURSELL, K; STOSOR, V; MUNOZ, P; LIMAYE, A, P; KALIL, A. C; PRUETT, T. L; GARCIA-DIAZ, J; HUMAR, A; HOUSTON, S; HOUSE, A. A; WRAY, D; ORLOFF, S; DOWDY, LA; FISHER, R. A; HEITMAN, J; ALBERT, N. D; WAGENER, M. M; SINGH, N. (2008). Calcineurin inhibitor agents interact synergistically with antifungal agents in vitro against *Cryptococcus neoformans* isolates: correlation with outcome in solid organ transplant recipients with cryptococcosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (2), 735–738.

- KRAUS, P.R; BOILY, M; GILES, S. S; STAJICH, J. E; ALLEN, A; COX, G. M; DIETRICH, F. S; PERFECT, J. R; HEITMAN, J. (2004) Identification of *Cryptococcus neoformans* Temperature-Regulated Genes with a Genomic-DNA Microarray. *Eukaryotic Cell*, 3 (5), 1249-1360.
- KRISTAN, K; RIZNER, T. L. Steroid-transforming enzymes in fungi. (2012). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127 (1-2), 79-91.
- KWON-CHUNG, K. J; BOEKHOUT, T; WICKES, B.L; FELL, J.W. (2011). Systematics of genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. In: HEITMAN, J; KOZEL, T.R; KWON-CHUNG, K. J; PERFECT, J.R; CASADEVALL, A. (Org). *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*. (pp. 3-15). Washington: Asm Press.
- KURANDA, K., LEBERRE, V., SOKOL, S., PALAMARCZYK, G., AND FRANCOIS, J. (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Molecular Microbiology* 61 (5), 1147–1166.
- LEES, N. D; LOFTON, S. L; WOODS, R. AND M. BARD. (1980). The effects of varied energy source and detergent on the growth of sterol mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 118 (1), 209–214.
- LIU, O. W; CHUN, C, D; CHOW, E. D; CHEN, C; MADHANI, H. D; NOBLE, S.M. (2008). Systematic genetic analysis of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell*, 135, 174-188.
- MARCIREAU, C; GUYONNET, D; KARST, F. (1992). Construction and growth properties of a yeast strain defective in sterol 14-reductase. *Current Genetics*, 22, 267-272.
- MARTEL, C. M; PARKER, J. E; BADER, O; WEIG, M; GROSS, U; WARRILOW, A. G. S; ROLLEY, N; KELLY, D. E; KELLY, S. L. (2010). Identification and

Characterization of Four Azole-Resistant *erg3* Mutants of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54 (11), 4527-4533.

MELLADO, E; GARCIA-EFFRON, G; ALCAZAR-FUOLI, L. (2007). A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole involves a combination of *cyp51* alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (6), 1897-1904.

MYLONAKIS, E; MORENO, R; EL KHOURY, J.B; IDNURM, A; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S.B; AUSUBEL, F.M; DIENER, A. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 73 (7), 3842-50.

NANDHAKUMAR, B; KUMAR, C. P; PRABU D; MENON T. (2006). Mustard Seed Agar, a New Medium for Differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (2) 1.

NES, W. D; ZHOU, W; GANAPATHY K; LIU, J; CHAMALA, S; HERNANDEZ, K; MIRANDA, M. (2009). Sterol 24-C-methyltransferase: An enzymatic target for the disruption of ergosterol biosynthesis and homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 481 (2), 210-218.

NGUYEN, L. N; NOSANCHUK, J. D. (2011). The inhibitory effect of cerulenin to yeasts is fungicidal. *Communicative & Integrative Biology* 4 (6), 245.

NOSANCHUK, J. D; CASADEVALL, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5 (4), 203-223.

ODOM, A; MUIR, S; LIM, E; TOFFALETTI, D. L; PERFECT, J; HEITMAN, J. (1997). Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO Journal*, 16 (10), 2576-2589.

OLSZEWSKI, M. A; NOVERR, M. C; CHEN, G; TOEWS, G. B; COX, G. M; HUFFNAGLE, G. B. (2004). Urease Expression by *Cryptococcus neoformans*

Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *American Journal of Pathology*, 164 (5), 1761-1771.

O'MEARA, T.R; HAY, C; PRICE, M.S; GILES S; ALSPAUGH, J. A. (2010) *Cryptococcus neoformans* histone acetyltransferase Gen5 regulates adaptation to the host. *Eukaryotic Cell* 9 (8), 1193-1202.

PAPPAS, P.G. (2011). Antifungal Trials: Progress, Approaches, New Targets, and Perspectives in Cryptococcosis. In: HEITMAN, J; KOZEL, T.R; KWON-CHUNG, K. J; PERFECT, J.R; CASADEVALL, A. (Org). *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*. (pp. 27-41). Washington: Asm Press.

PARK, B. J; WANNEMUEHLERB, K. A; MARSTONC, B. J; GOVENDERD, N; PAPPASE, P. G; CHILLER, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Concise Communication*, 23 (4), 525-530.

PFALLER, M. A; LODGE, J. K; CHANNOUM, M. A. (2011). Drug Resistance in *Cryptococcus*: Epidemiology and Molecular Mechanisms. In: HEITMAN, J; KOZEL, T.R; KWON-CHUNG, K. J; PERFECT, J.R; CASADEVALL, A. (Org). *Cryptococcus from human pathogen to model yeast* (pp. 203-216). Washington: Asm Press.

PEDROSO, R.S; FERREIRA, J.C; CANDIDO, R.C. (2006). In vitro susceptibility to antifungal agentes of enviromental *Cryptococcus* spp. Isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 10 (3), 239-243.

PERFECT, J. R; CASADEVALL, A. (2011). The history of *Cryptococcus* and *Cryptococcosis*. In: HEITMAN, J; KOZEL, T.R; KWON-CHUNG, K. J; PERFECT, J.R; CASADEVALL, A. (Org). *Cryptococcus from human pathogen to model yeast* (pp. 17-26). Washington: Asm Press.

PIERSON, C. A; JIA, N; MO, C; LEES, N. D; STURM, A. M; ECKSTEIN, J; BARBUCT R; BARD, M. (2004). Isolation, characterization, and regulation of the

Candida albicans ERG27 gene encoding the sterol 3-keto reductase. *Medical Mycology*, 42 (5), 461-473.

PITKIN, J. W; PANACCIONET, D. G; WALTON, J.D. (1996). A putative cyclic peptide efflux pump encoded by the TOXA gene of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Microbiology*, 142 (6), 1557-1565.

PRICE, M. F; WILKINSON, I. D; GENTRY, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20 (1) 7-14.

PROSZYNSKI, T. J; KLEMM, R. W; GRAVERT, M; HSU, P. P; GLOOR, Y; WAGNER, J; KOZAK, K; GRABNER, H; WALZER, K; BAGNAT, M; SIMONS, K; WALCH-SOLIMENA C. (2005). A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (50), 17981-17986.

RAM, A. F. J; KLIS, F. M. (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols* 1, 2253-2256.

RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M; FLOWER, R. J. (2007). *Farmacologia*. [tradução de Raimundo Santos e outros] Rio de Janeiro:Elsevier.

RODRIGUES, M. L; CASADEVALL, A; ZARAGOZA, O. (2011). The Architecture and Antigenic Composition of Polysaccharide Capsule. In: HEITMAN, J; KOZEL, T.R; KWON-CHUNG, K. J; PERFECT, J.R; CASADEVALL, A. (Org). *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*. (pp. 27-41). Washington: Asm Press.

ROEMER, T.; JIANG, B.; DAVISON, J.; KETELA, T.; VEILLETTE, K.; BRETON, A.; TANDIA, F.; LINTEAU, A.; SILLAOTS, S.; MARTA, C.; MARTEL, N.; VERONNEAU, S.; LEMIEUX, S.; KAUFFMAN, S.; BECKER, J.; STORMS, R.; BOONE, C.; BUSSEY, H. (2003) Large-scale essential gene identification in

Candida albicans and applications to antifungal drug discovery. *Molecular Microbiology*, 1 (50), 167-81.

ROUSLIN, W. (1979). Effects of cerulenin upon the syntheses of lipid and protein and upon the formation of respiratory enzymes in adapting, lipid-limited *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 139 (2), 502-506.

SABLE, C. A.; STROHMAIER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A. (2008). Advances in antifungal therapy. *Annu Rev Med*, 59, 361-379.

SANGLARD, D; KUCHLER, K; ISCHER, F; PAGANI, J.L; MONOD M; BILLE, J. B. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, .2378-2386.

SANGLARD, D; ISCHER, F; PARKINSON, T; FALCONER, D; BILLE, J. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 47, 2404-2412.

SHAPIRO, R. S; ROBBINS, N; COWEN, L. E. (2011). Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75 (2), 213-267.

SHARMA, S. C. (2006). Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 6 (7), 1047-1051.

SHIMOKAWA, O; NAKAYAMA, H. Increased Sensitivity of *Candida albicans* Cells Accumulating 14 α -Methylated Sterols to Active Oxygen: Possible Relevance to In Vivo Efficacies of Azole Antifungal Agent. (1992). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (8), 1626-1629.

- SIAPAKAS, A. R; SORREL, T. C; WRIGHT, L. C; WILSON, C; LARSEN, M; BOADLE, R; WILLIAMSON, P. R; DJORJEVIC, J. T. (2007). Cell Wall-linked Cryptococcal Phospholipase B1 Is a Source of Secreted Enzyme and a Determinant of Cell Wall Integrity. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (52), 37508-37514.
- SLAVEN, J; ANDERSON, M. J; SANGLARD, D; DIXON, G; BILLE, J; ROBERTS, I; DENNING, D. W. (2002). Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genetics and Biology*, 36 (3), 199-206.
- TOFFALETTI, D. L; RUDE, T. H; JOHNSTON, S. A; DURACK, D. T; PERFECT, J. R. (1993). Gene Transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *Journal of Bacteriology*, 175 (5), 1405-1411.
- TROFA, D; CASADEVALL, A; NOSANCHUCK, J. (2011). Melanin: Structure, Function and Biosynthesis in *Cryptococcus*. In: HEITMAN, J; KOZEL, T.R; KWON-CHUNG, K. J; PERFECT, J.R; CASADEVALL, A. (Org). *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*. (pp. 55-65). Washington: Asm Press.
- VANDEPUTTE, P; TRONCHIN, G; BERGÈS, T; HENNEQUIN, C; CHABASSE, D; BOUCHARA, J-P. (2007). Reduced Susceptibility to Polyenes Associated with a Missense Mutation in *ERG6* Gene in Clinical Isolate of *Candida glabrata* with Pseudohyphal Growth. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 51 (3), 982-990.
- VANDEPUTTE, P; TRONCHIN, G; LARCHER, G; ERNOULT, E; BERGÈS, T; CHABASSE, D; BOUCHARA, J-P. (2008). A nonsense mutation in the *erg6* gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52, 3701-3709.
- VANDEPUTTE, P; FERRARI, S; COSTE, A. T. (2011). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology* 2012 (2012), 1-26.

- VISBAL, G; ALVAREZ, A; MORENO, B; SAN-BLAS, G. (2003). S-Adenosyl-L-Methionine Inhibitors Δ^{24} -Sterol Methyltransferase and $\Delta^{24(28)}$ -Sterol Methylreductase as Possible Agents against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 47 (9), 2966-2970.
- VOELZ, K.; MAY, R.C. (2010). Minireviews: Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. *Eukaryotic Cell*, 9 (6), 835-846.
- WALTON, F.J; HEITMAN, J; IDNURM, A. (2006) Conserved elements of the RAM signaling pathway establish cell polarity in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* in a divergent fashion from other fungi. *Molecular Biology of the Cell*, 17 (9), 3768-3780.
- WRIGHT, L. C; SANTANGELO, R. M; GANENDREN, R; PAYNE, J; DJORDJEVIC, J. T; SORREL, T. C. (2007). Cryptococcal Lipid Metabolism: Phospholipase B1 Is Implicated in Transcellular Metabolism of Macrophage-Derived Lipids. *Eukaryotic Cell*, 6 (1), 37-47.
- YOUNG, L. Y; HULL, C. M; HEITMAN, J. (2003). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 2717-2724.
- ZAHEDI, R. P; SICKMANN, A; BOEHM, A. M; WINKLER, C; ZUFALL, N; SCHÖNFISCH, B; GUIARD, B; PFANNER, N; MEISINGER, C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Molecular Biology of the Cell* 17 (3), 1436–1450.
- ZHANG, Y; GAMARRA, S; GARCIA-EFFRON, G; PARK, S; PERLIN, D. S; RAO, R. (2010). Requirement for Ergosterol in V-ATPase Function Underlies Antifungal Activity of Azole Drugs. *Plos Pathogens*, 6 (6), 1-13.

ZWEYTICK, D; HRASTNIK, C; KOHLWEIN, S. D; DAUM, G. (2000). Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, Erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 470 (1), 83-87.