

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB  
CURSO DE FARMÁCIA**

NARLA VERORRAYNE GONÇALO PIMENTEL

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE *RAD53* DE *CRYPTOCOCCUS*  
*NEOFORMANS***

**BRASÍLIA, DF**

**2017**

NARLA VERORRAYNE GONÇALO PIMENTEL

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE *RAD53* DE *CRYPTOCOCCUS*  
*NEOFORMANS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientadora: Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos**

BRASÍLIA, DF

2017

NARLA VERORRAYNE GONÇALO PIMENTEL

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE *RAD53* DE *CRYPTOCOCCUS*  
*NEOFORMANS***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Dr. Alex Leite Pereira  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vc Verorrayne, Narla  
Caracterização funcional de RAD53 de *Cryptococcus*  
*neoformans* / Narla Verorrayne; orientador Larissa  
Fernandes. -- Brasília, 2017.  
77 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade  
de Brasília, 2017.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. RAD53. 3. resposta  
à agentes genotóxicos. 4. ciclo celular.. I.  
Fernandes, Larissa, orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por tornar todas essas conquistas possíveis, sem a presença Dele nada disso seria possível de ser iniciado e completado.

Aos meus pais, Adriana Gonçalo e Flávio Henrique Pimentel por todo o amor, apoio, cuidado, paciência e incentivo para que eu não desistisse e os meus sonhos sejam concretizados.

A toda a minha família, sendo a base em minha vida.

A todos os meus amigos de longa data em especial a Lully Alcântara e Luísa Ribon e aqueles que participam a pouco tempo, por estarem sempre presentes e fortalecendo o caminho que escolhi seguir.

À minha professora e orientadora Larissa Fernandes Matos por propiciar todo suporte necessário para que esse trabalho fosse realizado, além disso agradeço pela paciência e generosidade.

Aos meus amigos do laboratório LIA, especialmente ao Raffael Castro, Fabiana Brandão, Cláudia Bravo e Camille Florencio, que me apoiaram e ajudaram em cada experimento realizado.

À Universidade de Brasília, principalmente o Campus Ceilândia pela oportunidade e ao Instituto de Biologia pelo suporte.

## RESUMO

Rad53 é uma proteína quinase presente em eucariontes que é fosforilada e ativada em resposta ao dano do DNA. Quando os eventos do ciclo celular são interrompidos, as proteínas do ponto de controle bloqueiam a progressão do ciclo celular até o processo de reparo do DNA ser concluído. Em *Saccharomyces cerevisiae*, Rad53 desempenha papéis importantes nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, medeia a maioria das respostas após o dano ao DNA e está envolvido na tolerância à exposição a UV. Este trabalho, apresenta os dados relacionados à caracterização funcional de Rad53 em *Cryptococcus neoformans*. Não é um gene essencial, pois o mutante *rad53Δ* foi obtido por recombinação homóloga do marcador de resistência a Hygromicina B (HPH). A integração do marcador HPH no locus *RAD53* foi confirmada por PCR e Southern Blot. O mutante não apresentou defeito de crescimento em relação à alta temperatura, estresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), estresse osmótico (KCl, NaCl) e estresse da parede celular (Congo Red e Calcofluor white). Também foi avaliada a produção de fatores de virulência em *rad53Δ* como urease, fosfolipase, melanina e cápsula. A cápsula foi observada diminuída em comparação com a cepa do tipo selvagem. A resposta do mutante *rad53Δ* a estressores genotóxicos, incluindo hidroxauréia (HU) que inibe a síntese de DNA, sulfato de metilmetano (MMS) que interrompe o ciclo celular devido à alquilação de DNA e radiação UV, também foram avaliadas. O mutante *rad53Δ* mostrou um defeito de crescimento em 0,04% de MMS, a 150 e 200 mM de HU e após exposição à radiação UV (60-360 J / m<sup>2</sup>) em comparação com o tipo selvagem. Quando as células não sincronizadas foram tratadas com MMS 0,04% por 1 h, a citometria de fluxo não detectou diferença na distribuição das células em relação às fases do ciclo celular ao comparar as linhagens H99 e *rad53Δ*. Entretanto, ao avaliar células sincronizadas e não tratadas com MMS, o mutante *rad53Δ* parece apresentar um atraso para retomada do ciclo celular, apresentando uma maior população de células em G2. Além disso, foi avaliada a susceptibilidade às drogas antifúngicas de *rad53Δ*, entretanto este não difere do seu selvagem H99, assim como no ensaio de sobrevivência após fagocitose por macrófagos M1. Assim, estes dados demonstram que Rad53 desempenha papel importante na resposta de *C. neoformans* aos agentes genotóxicos e sua ausência afeta a expressão de um dos fatores de virulência mais bem estudados neste fungo, a cápsula polissacarídica,

indicando que a expressão de fatores de virulência e regulação do ciclo celular estão intimamente relacionadas.

**Palavras chave:** *Cryptococcus neoformans*, *RAD53*, resposta à agentes genotóxicos, ciclo celular.

## ABSTRACT

Rad53 is a protein kinase present in eukaryotes that is phosphorylated and activated in response to DNA damage. When cell cycle events are disrupted, the check point proteins block cell cycle progression until the DNA repair process is completed. In *Saccharomyces cerevisiae*, Rad53 plays important roles in the G1, S and G2 phases of the cell cycle, mediates most responses after DNA damage and is involved in tolerance to UV exposure. This work presents the data related to the functional characterization of Rad53 in *Cryptococcus neoformans*. It is not an essential gene since the mutant *rad53Δ* was obtained by homologous recombination of the resistance marker to Hygromycin B (HPH). Integration of the HPH marker on the *RAD53* locus was confirmed by PCR and Southern Blot. The mutant showed no growth defect conditions of to high temperature, oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), osmotic stress (KCl, NaCl) and cell wall stress (Congo Red and Calcofluor white). The production of virulence factors such as urease, phospholipase, melanin and capsule were also evaluated. Only the capsule was decreased compared to the wild-type strain. The *rad53Δ* response to genotoxic stressors, including hydroxyurea (HU) which inhibits DNA synthesis, methyl methane sulfate (MMS) that disrupts the cell cycle due to DNA alkylation and UV radiation, has also been evaluated. The *rad53Δ* mutant showed a growth defect in 0.04% MMS, at 150 and 200 mM HU and after exposure to UV radiation (60-360 J / m<sup>2</sup>) as compared to the wild type. When the non-synchronized cells were treated with 0.04 % MMS for 1 h, flow cytometry did not detect difference in cell distribution relative to the cell cycle phases when comparing the H99 and *rad53Δ*. However, when evaluating cells synchronized and not treated with MMS, the *rad53Δ* mutant appears to present a delay to the recovery of the cell cycle, with a larger population of cells in G2. In addition, the susceptibility to the antifungal drugs of *rad53Δ* was evaluated, however this did not differ from wild type H99, as well as in the survival assay after phagocytosis by M1 macrophages. Thus, these data demonstrate that Rad53 plays an important role in the response of *C. neoformans* to genotoxic agents and its absence affects the expression of one of the best-studied virulence factors of this fungus, the polysaccharide capsule, indicating that the expression of virulence factors and cell cycle regulation are closely related.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, *RAD53*, response to genotoxic agents, cell cycle.



## LISTA DE ABREVIATURAS

**BMDMs** - Diferenciação de Células Precursoras da Medula Óssea em Células de Macrófago

**CdSO<sub>4</sub>** – Sulfato de Cádmio

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**DMSO** – Sulfoxido de dimetil.

**dNTPs** - Desoxirribonucleotídeos trifosfatos

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana

**HU** – Hidrouréia

**L-Dopa** – L-3,4-di-hidroxifenilalanina

**MMS** - metilmetanosulfonato

**MOI** – Multiplicidade de infecção

**mRNA** – RNA mensageiro

**NaOAc** – Acetato de sódio

**PBS** – Solução salina tamponada com fosfato

**RPM** – Rotação por minuto

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

**SNC**- Sistema Nervoso Central

**SUS** – Sistema Único de Saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Ciclo de vida do <i>C. neoformans</i> .....	<b>16</b>
<b>Figura 2</b> Internações por micose sistêmicas. Brasil, 2000-2007.....	<b>17</b>
<b>Figura 3</b> Ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i> e os pontos de parada para checagem do DNA.....	<b>21</b>
<b>Figura 4</b> Vias envolvidas no controle de danos ao DNA em <i>S. cerevisiae</i> .....	<b>23</b>
<b>Figura 5</b> Procedimento para o PCR de dupla junta usando marcadores de deleção de <i>HPH</i> .....	<b>31</b>
<b>Figura 6</b> Fluxograma dos experimentos de citometria de fluxo para avaliação do ciclo celular.....	<b>38</b>
<b>Figura 7</b> Construção do cassete de deleção de <i>RAD53</i> pelo método de Double Joint.....	<b>44</b>
<b>Figura 8</b> Confirmação da deleção do gene <i>RAD53</i> em <i>C. neoformans</i> por <i>PCR</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 9</b> Confirmação por <i>Southern Blot</i> da deleção de <i>RAD53</i> nos mutantes.....	<b>46</b>
<b>Figura 10</b> Curvas de crescimento a 30°C e 37°C de <i>rad53Δ</i> em diferentes meios de cultura.....	<b>48</b>
<b>Figura 11</b> Avaliação dos fatores de virulência de <i>rad53Δ</i> de <i>C. neoformans</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 12</b> Avaliação da síntese de cápsula polissacarídica pelo mutante <i>rad53Δ</i> de <i>C. neoformans</i> .....	<b>50</b>
<b>Figura 13</b> Avaliação do fenótipo do mutante <i>rad53Δ</i> a estressores osmóticos e da parede celular.....	<b>53</b>
<b>Figura 14</b> Avaliação da sensibilidade do mutante <i>rad53Δ</i> ao estressor oxidativo ( $H_2O_2$ ).....	<b>54</b>
<b>Figura 15</b> Análise da sensibilidade do mutante <i>rad53Δ</i> a agentes estressores genotóxicos.....	<b>55</b>
<b>Figura 16</b> Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade do mutante <i>rad53Δ</i> as drogas antifúngicas comercialmente disponíveis para tratamento de micoses.....	<b>57</b>
<b>Figura 17</b> Avaliação de crescimento do mutante <i>rad53Δ</i> em meio YPD contendo MMS.....	<b>58</b>
<b>Figura 18</b> Avaliação do ciclo celular do mutante <i>rad53Δ</i> após exposição ao agente genotóxico MMS 0,04%.....	<b>60</b>

<b>Figura 19</b> Sincronização celular das células do mutante <i>rad53Δ</i> .....	<b>62</b>
<b>Figura 20</b> Construção do cassete de reconstituição de <i>RAD53</i> .....	<b>64</b>
<b>Figura 21</b> Clonagem de <i>RAD53</i> no plasmídeo pSDMAD57 para transformar em <i>C. neoformans</i> .....	<b>65</b>
<b>Figura 22</b> Confirmação da reconstituição do gene <i>RAD53</i> por <i>PCR</i> .....	<b>66</b>
<b>Figura 23</b> Avaliação da sobrevivência do mutante <i>rad53Δ</i> em macrófagos M1.....	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Linhagens de <i>C. neoformans</i> utilizadas neste trabalho.....	<b>29</b>
<b>Tabela 2</b> Oligonucleotídeos usados para construção do cassete de deleção <i>RAD53::HPH</i> .....	<b>32</b>
<b>Tabela 3</b> Oligonucleotídeos usados para confirmação da deleção do gene <i>RAD53</i> por PCR.....	<b>34</b>
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos usados para amplificação do locus <i>RAD53</i> para reconstituição do mutante <i>rad53Δ</i> .....	<b>39</b>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1	Gênero <i>Cryptococcus</i> e a criptococose.....	14
1.2	Fatores de virulências do <i>C. neoformans</i> .....	17
1.3	Ciclo celular em fungos e <i>RAD53</i> .....	19
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1	Linhagens e meios de cultura utilizada no trabalho.....	29
4.2	Construção do cassete de deleção do gene <i>RAD53</i> .....	31
4.3	Transformação por biobalística de <i>C. neoformans</i> para a obtenção dos mutantes <i>rad53Δ</i> .....	33
4.4	Extração do gDNA pela técnica de <i>Smash and Grab</i> .....	33
4.5	Confirmação da deleção do gene <i>RAD53</i> por PCR.....	34
4.6	Confirmação da deleção do gene <i>RAD53</i> por Southern Blot.....	34
4.7	Caracterização fenotípica do <i>rad53Δ</i> .....	35
4.8	Determinação da concentração mínima inibitória das drogas antifúngicas para <i>rad53Δ</i> .....	36
4.9	Sincronização celular e citometria de fluxo.....	36
4.10	Reconstituição do gene <i>RAD53</i> no mutante <i>rad53Δ</i> .....	39
4.11	Confirmação da reconstituição do gene <i>RAD53</i> .....	41
4.12	Avaliação da sobrevivência do mutante <i>rad53Δ</i> em macrófagos M1.....	42
<b>5.</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
5.1	Obtenção e confirmação do mutante <i>rad53Δ</i> .....	43
5.2	Caracterização fenotípica do <i>rad53Δ</i> .....	46
5.3	Ensaio de atividade antifúngica <i>in vitro</i> do <i>rad53Δ</i> .....	55
5.4	Sincronização celular e citometria de fluxo.....	58
5.5	Reconstituição do gene <i>RAD53</i> no mutante.....	62
5.6	Confirmação da reconstituição do gene <i>RAD53</i> .....	65
5.7	Avaliação da sobrevivência do <i>rad53Δ</i> em macrófagos M1.....	67
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>PESRPECTIVAS</b> .....	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Gênero *Cryptococcus* e a criptococose

Os patógenos são organismos que possuem a capacidade de causar doença em um hospedeiro. Os fungos responsáveis por causar infecções sistêmicas merecem atenção, pois como seres eucariotos dificultam o tratamento da doença, uma vez que muitos dos seus mecanismos que poderiam ser considerados como alvos para os agentes quimioterápicos são partilhados com as células do hospedeiro, além disso, os antifúngicos possuem efeitos colaterais significantes no hospedeiro além de alguns apresentarem ação restrita em algumas espécies.

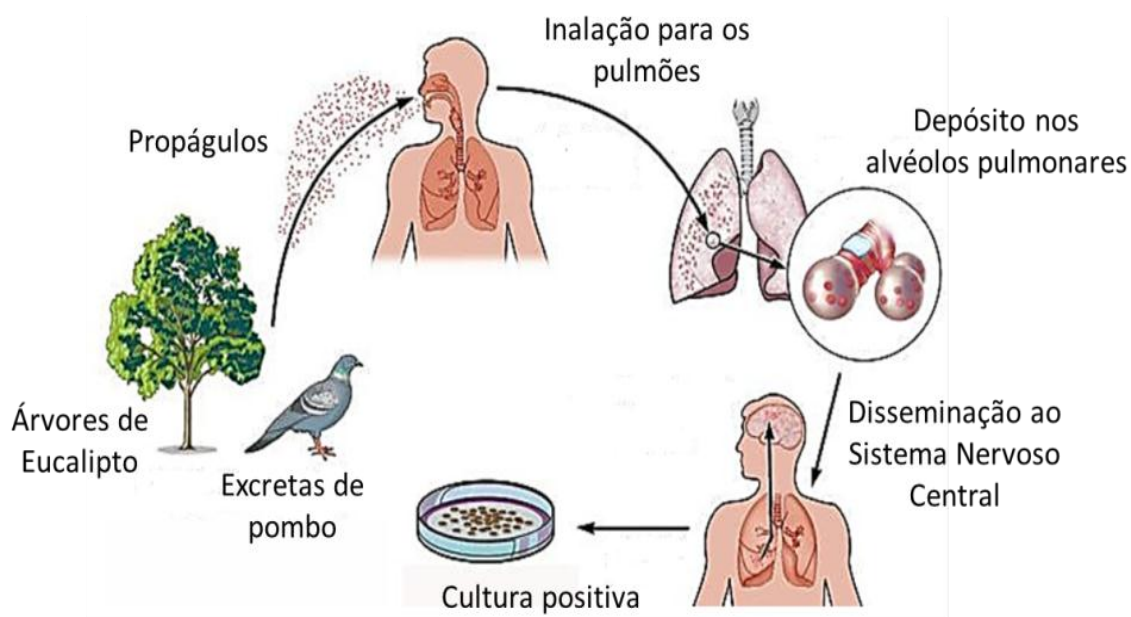
De acordo com Vigilância em Saúde as micoses sistêmicas são provocadas por fungos patogênicos primários ou oportunistas, estas possuem como porta de entrada o trato respiratório, portanto adquiridas através da inalação de esporos, leveduras ressecadas ou fragmentos de hifas, sendo o estabelecimento da infecção e a disseminação no hospedeiro, dependente muitas vezes, do estado imunológico do ser humano. As micoses sistêmicas têm tido grande importância devido ao aumento de pacientes imunocomprometidos seja por uso de imunossupressores por terapêutica, transplantados ou acometidos por doenças, por exemplo AIDS.

Existem três patógenos responsáveis por provocarem a maioria das infecções oportunistas: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, sendo este último de importância para o trabalho realizado. O gênero *Cryptococcus* foi identificado por Kutzing no ano de 1833, para inserir a espécie *Cryptococcus molli*. Acredita-se que o primeiro caso relatado de criptococose foi na Alemanha no ano de 1894, onde o patologista Otto Busse observou um corpúsculo oval dentro e fora das células de uma amostra cirúrgica de uma paciente do sexo feminino de 31 anos, que foi denominado de *Saccharomyces neoformans*. Entretanto, foi somente em 1901 que o fungo foi isolado e classificado no gênero *Cryptococcus*, que até o momento inclui 70 espécies entre patogênicas e não patogênicas. (KWON-CHUNG *et al.*,2011).

Baseado nas reações de aglutinação da cápsula o gênero *Cryptococcus* foi diferenciado em três variedades e cinco sorotipos sendo: A, B, C, D e AD. O sorotipo A refere-se ao *C. neoformans var grubii*; sorotipos D e AD correspondem ao *C. neoformans var. neoformans*, e por fim os sorotipos B e C são *C.gatti*. Existe uma

diferença quanto ao tipo de paciente acometido pelos sorotipos, geralmente os sorotipos B e C afetam pacientes imunocompetentes, diferente dos sorotipos A e D que afetam principalmente pacientes imunocomprometidos. (IDNURM *et al.*,2005). Meyer e colaboradores (2009) publicaram um trabalho a respeito de uma nova classificação dos sorotipos do *Cryptococcus* baseada em métodos de genotipagem através de grupos moleculares. Os tipos moleculares de *C. neoformans* estão correlacionados com os sorotipos: *C. neoformans var. grubii*, sorotipo A, é composto pelos tipos moleculares VNI e VNII. O sorotipo híbrido AD compreende VNIII; e *C. neoformans var. neoformans*, o sorotipo D corresponde a VNIV. *C. gattii* consiste em VGI, VGII, VGIII e VGIV, que correspondem ambos aos sorotipos B ou C (MEYER *et al.*, 2009). Recentemente, KWON-CHUNG *et al.*,2017 propuseram que *C. neoformans* seja dividido em 2 espécies e *C. gattii* em 5 espécies, sendo recomendado o uso das expressões "complexo de espécies de *C. neoformans* " e "complexo de espécies de *C. gattii*" por refletirem melhor a diversidade genética destes microrganismos.

O *C. neoformans* é um fungo dimórfico podendo se apresentar na forma leveduriforme e filamentosa (após acasalamento), pertence ao filo Basidiomycota e pode ser encontrado em troncos de eucaliptos, solos contaminados e excretas de pombo (KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009). O *C. neoformans* é um fungo patogênico oportunista responsável pela doença conhecida como criptococose. A criptococose é uma micose sistêmica que acomete principalmente pacientes imunossuprimidos (PARK *et al.*, 2011). A infecção ocorre através da inalação de leveduras ou esporos do fungo, que podem causar uma doença pulmonar, em que o fungo pode permanecer de forma latente ou oligossintomática por um longo período. Os casos podem evoluir com disseminação pelo sangue, com tropismo para o sistema nervoso central (SNC), onde poderá se instalar e gerar a neucryptococose ou meningite criptococócica (**Figura 1**). De modo geral, o arsenal terapêutico para o tratamento de doenças fúngicas é limitado por problemas de seletividade, toxicidade e perfis de resistência dos fungos aos antifúngicos disponíveis (CLARK *et al.*, 2009). O tratamento em humanos é realizado principalmente com o uso de antifúngicos poliênicos como anfotericina B, 5-fluocitosina e os azóis: fluconazol, cetoconazol e itraconazol (CALVO *et al.*, 2001)



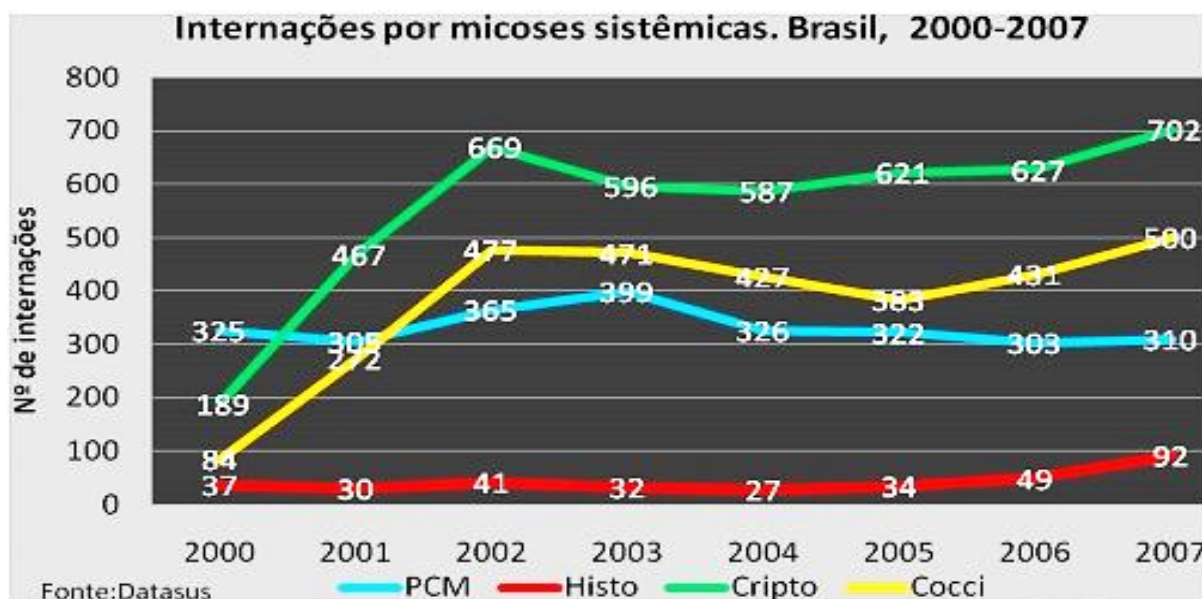
**Figura 1: Ciclo de vida do *Cryptococcus* spp.** O *Cryptococcus* pode ser encontrado em árvores e principalmente em excretas de pombos. Esporos ou leveduras chamadas de propágulos podem ser inalados e se instalarem nos pulmões na região alveolar ou na sua forma mais agressiva migrar para o Sistema Nervoso Central. As células podem ser cultivadas e isoladas em meios específicos para a análise dos seus fatores de virulência como produção de cápsula e melanina a fim de confirmar a infecção por *C. neoformans*. Fonte: Adaptado de Hull & Heitman (2002).

Segundo Pirofsky e Casadevall a maioria da população humana entra regularmente em contato com o *Cryptococcus* seja na forma de esporos ou leveduras dessecadas e é possível encontrar anticorpos em 100% da população adulta. (PIROFSKY & CASADEVALL, 2011). Ao longo dos anos os fungos foram despertando não só o interesse de micologistas e médicos como de outras áreas, devido a alta prevalência de doenças fúngicas sistêmicas na população imunocomprometida, particularmente aqueles indivíduos acometidos pelo HIV, sendo a criptococose responsável por grande número de mortes nesses pacientes.

Nas últimas décadas foi possível observar que o uso do coquetel e de antifúngicos, reduziu o número de mortes por criptococose, entretanto a prevalência da doença ainda é preocupante. No ano de 2014 foram 223.100 casos incidentes de meningite criptococócica, sendo estimado 181.100 mortes anuais por meningite



criptocócica (RAJASINGHAM, 2017). A África subsaariana foi onde ocorreram 73% dos casos de criptococose. Na América Latina como um todo estima-se 5.300 casos e 2.400 mortes por ano (RAJASINGHAM, 2017). No Brasil, dados do Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde –SIH-SUS, demonstram que a criptococose entre os anos de 2000 a 2007 apresentou o maior número de internações entre as doenças fúngicas analisadas (PbMicose, Coccidioidomicose, histoplasmose e criptococose) (Figura 2).



**Figura 2: Internações por micose sistêmicas. Brasil, 2000-2007.** Este gráfico demonstra o número de internações entre os anos de 2000 a 2007 das micoses sistêmicas no Brasil, sendo possível observar que a criptococose é a responsável por acometer mais pacientes que são internados por infecções fúngicas. Legenda: PCM (PbMicose), Histo (histoplasmose), Cripto (criptococose) e Cocci (Coccidioidomicose). Imagem retirada de: [http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/proposta\\_ve-criptococose1.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/proposta_ve-criptococose1.pdf)

## 1.2 Fatores de virulências de *C. neoformans*

O *C. neoformans* apresenta fatores de virulência bem definidos, sendo responsável por realizar funções importantes na sua patogenicidade, burlando a defesa do hospedeiro (HOGAN *et al.*, 1996; CASADEVALL *et al.*, 2003; STEENBERGEN & CASADEVALL 2003). Atualmente outros fatores de virulência estão sendo estudados através de métodos bioquímicos e moleculares.

Os três principais fatores de virulência do *C. neoformans* considerados fundamentais para a sobrevivência do fungo no hospedeiro e sucesso na infecção são: a capacidade de crescer a temperatura de 37°C, a produção de cápsula e de melanina (CASADEVALL & PERFECT 1998; IDNURM *et al.*, 2005). O fato do *C. neoformans* possuir a capacidade de crescer e sobreviver à temperatura de 37°C, permite a ele causar infecção no hospedeiro ao invadir o tecido (BUCHANAN & MURPHY 1998).

A cápsula polissacarídica é responsável pela classificação da espécie nas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii*. Ela é composta principalmente por glicuronoxilomanana (GXM) e glicuronoxilomanogalactana (GXMgal) (HEISS *et al.*, 2009) e algumas manoproteínas. A função da cápsula está relacionada à proteção da levedura contra a fagocitose quando não há anticorpos opsonizantes, além de permitir sua reprodução no interior dos macrófagos e gerar efeitos imunomodulatórios para o fungo (JANBON & DOERING, 2011). A cápsula pode variar de tamanho dependendo do genótipo do fungo e das condições de crescimento em que o fungo se encontra, a inibição de sua síntese se dá em meios com pH inferior a 7.0, entretanto observa-se um aumento da mesma em altas concentrações de CO<sub>2</sub> e baixas taxas de ferro. No hospedeiro quando há infecção observa-se a cápsula aumentada, isto pode estar associado a baixa concentração de ferro nos tecidos e altas concentrações de CO<sub>2</sub> nos pulmões (CASADEVALL & PERFECT 1998; ZARAGOZA; CASADEVALL 2004; FRASES *et al.*, 2009).

Outro importante fator de virulência é a capacidade do fungo de produzir melanina. A melanina é um pigmento escuro com cargas negativas, que possui características como alto peso molecular, estrutura amorfa, insolubilidade em água e resistência a degradação por ácidos (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003; TROFA *et al.*, 2011). As espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* se diferem das demais por produzirem em grande quantidade a melanina, exercendo funções antioxidante, antifagocíticas e imunomodulatória. (TROFA; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2011). Linhagens mutantes com deficiência na produção de melanina são considerados hipovirulentas (HULL & HEITMAN, 2002).

Apesar dos três fatores de virulência citados a cima serem os mais estudados, existem outros fatores que contribuem para a virulência de *C.*

*neoformans* como as enzimas que possuem papéis mais específicos na patogênese deste fungo. A fosfolipase B1(PBL) também é considerada um fator de virulência por auxiliar a invasão do tecido pulmonar, além de favorecer a sobrevivência do fungo dentro do macrófago. Esta enzima desestabiliza as células através de hidrólise das ligações éster dos glicerofosfolipídeos permitindo a lise celular e conseqüentemente a entrada do patógeno nos tecidos do hospedeiro (FOX; DJORDJEVIC; SORRELL, 2011; GHANNOUM, 2000). Outra enzima importante é a urease que permite o fungo atravessar a barreira hemato-encefálica, de forma a colonizar o SNC (DROMER & LEVITZ, 2011).

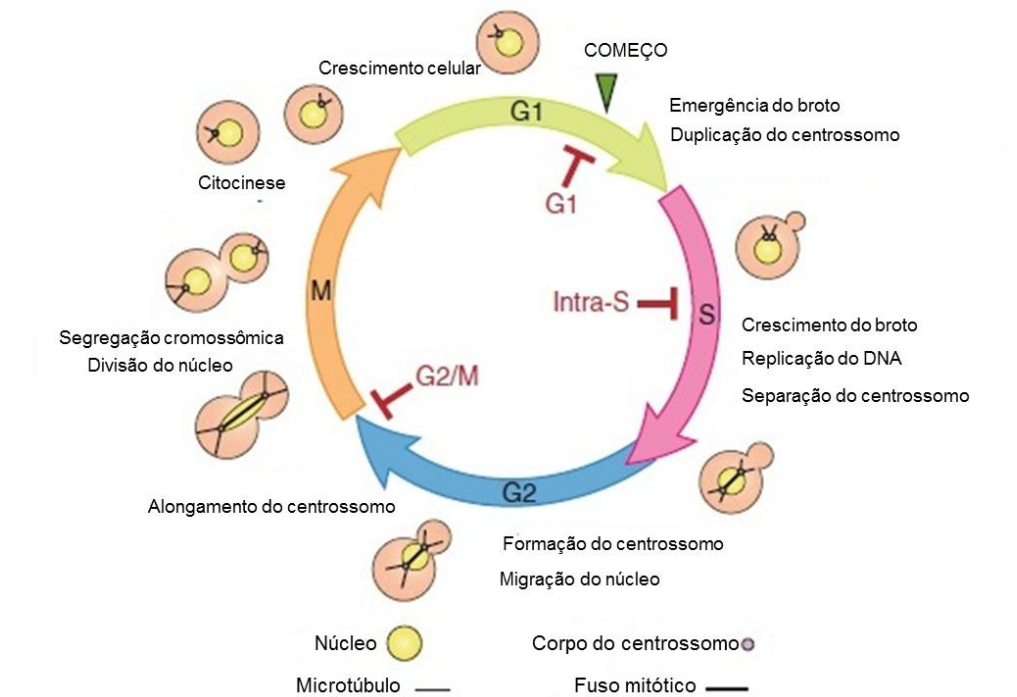
### **1.3 Ciclo celular em fungos e *RAD53***

A célula possui a propriedade fundamental de reproduzir-se. O ciclo celular nas células eucariontes é dividido na fase interfase, onde basicamente ocorre o crescimento da célula para divisão. Esta etapa engloba a fase G0 conhecida como fase de repouso, e como diz o nome nesta fase a célula apenas exerce sua atividade basal, pois não há estímulos para a divisão; fase G1 onde ocorre o crescimento da célula, havendo síntese de RNA e de proteínas; a fase S é conhecida como fase de síntese, onde a célula inicia o processo de duplicação do seu material genético e por fim fase G2 que antecede a fase mitótica. Na fase G2 existe a produção de substâncias para que haja a síntese de RNA e proteínas essenciais para o início da mitose e duplicação de organelas que irão contribuir para a formação das novas células. A fase M é responsável pela separação dos cromossomos da célula mãe, e por último a fase de citocinese, onde ocorre a liberação da célula filha e assim o processo de divisão celular é finalizado, gerando assim duas células com mesmo conteúdo celular (FINN; LOWNDES; GRENON, 2012)

Organismos eucariontes possuem um sistema de vigilância conhecido como ponto de checagem de dano ao DNA, este é responsável por detectar alterações no DNA decorrentes de radiações (ionizante ou UV), ou de estresses endógenos (radicais livres de oxigênio) para evitar a instabilidade genômica que conseqüentemente pode comprometer a sobrevivência celular. Atualmente, este mecanismo, em fungos é melhor compreendido nas espécies *Saccharomyces*

*cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida albicans* (PELLICIOLI; FOIANI, 2005).

Em *S. cerevisiae* a regulação do ciclo celular é bem mais entendida. A estabilidade genômica é primordial para a informação genética e viabilidade celular. Assim, as células desenvolveram uma rede de regulação denominada sistema de controle do ciclo celular, sendo esta responsável por coordenar tempo e ordem dos eventos do ciclo (MORGAN, 2007). O ciclo celular de *S. cerevisiae* (**Figura 3**) é compreendido em quatro fases. A primeira fase é conhecida como fase G1, esta é a principal fase de crescimento e ativação de vias de transcrição necessárias para seguir para a fase seguinte chamada de fase S (BAHLER, 2005). No final da fase G1 quando as células atingem o tamanho crítico e há nutrientes suficientes disponíveis, elas passam pelo ponto de restrição em vertebrados (START) e seguem para a fase subsequente S onde ocorrem os principais processos do ciclo celular, pois os cromossomos são duplicados. Após a fase S as células entram na fase G2 e preparam-se para seguir para a fase de mitose (M), onde os cromossomos duplicados na fase S são segregados e a célula divide-se em duas. É fundamental que as células só deixem a mitose e prossigam para a citocinese apenas após a completa segregação cromossômica. Para isso existem dois principais pontos de transição presente no ciclo celular: o primeiro na transição G1/S e o outro no final da fase G2/ M (SILVA, 2016). A família conhecida como CDKs (quinases dependentes de ciclina) são os principais reguladores do ciclo celular e correspondem a proteínas serina/ treonina quinases que fosforilam substratos que desempenham papéis fundamentais em eventos do ciclo celular, como a replicação do DNA e mitose (ENSERINK & KOLODNER, 2010). Em *S. cerevisiae*, todos os eventos do ciclo celular são controlados por uma única CDK conhecida como Cdk1 / Cdc28 (FINN; LOWNDES; GRENON, 2012)



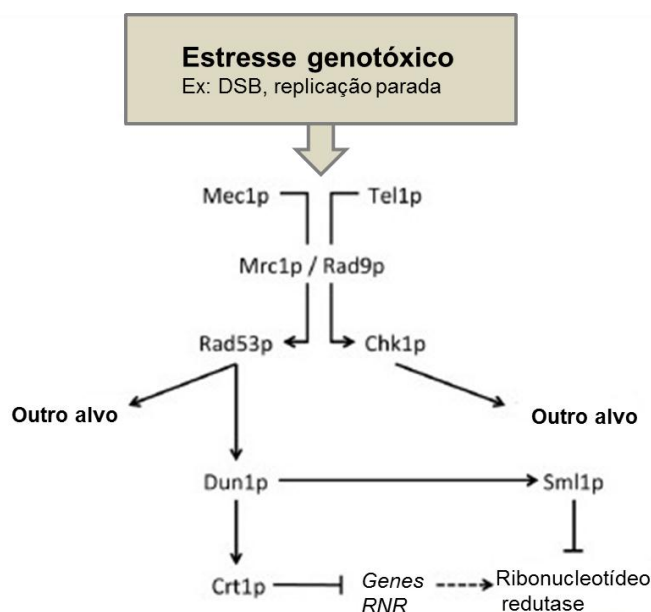
**Figura 3. Ciclo celular de *S. cerevisiae* e os pontos de parada para checagem do DNA.** Imagem representativa das morfologias celulares específicas em cada fase do ciclo celular, sendo descritos os três pontos de verificação do dano ao DNA. O ponto de verificação G1 onde as células ficam retidas antes do START, o ponto de verificação da fase S que retarda a taxa de replicação do DNA e o ponto de controle G2/M que retém as células na transição metáfase/anáfase. Uma vez reparado o dano, às células retomam o ciclo. (Retirado de FINN; LOWNDES; GRENON, 2012)

Em *S. cerevisiae*, os pontos de verificação de dano ao DNA atuam em três fases distintas do ciclo celular. O ponto de verificação G1 retém as células na transição G1/S antes do START, evitando que as células se comprometam irreversivelmente com o próximo ciclo celular. Esta parada transitória, conseqüentemente, atrasa a emergência do broto, a duplicação do centrôssomo e a entrada na fase S, assim há tempo para reparar as lesões do DNA antes da sua replicação. No entanto, pode haver lesões no DNA, como DNA alquilado ou quando não há a ativação do ponto de controle em G1, que podem ativar o ponto de verificação durante a fase S. Neste caso, observa-se diminuição da taxa de replicação em resposta ao dano no DNA, coordenando os mecanismos de reparo e

a progressão do ciclo celular para garantir a fidelidade e a conclusão da replicação antes que as células entrem na mitose (FINN; LOWNDES; GRENON, 2012). O último ponto de verificação do DNA acontece em G2/M, em que as células ficam paradas na transição metáfase e anáfase, impedindo a progressão para a mitose na presença de dano no DNA. Quando o dano não pode ser reparado rapidamente havendo a parada do ciclo celular, as proteínas quinases PI3Ks (fosfoinositol-3-quinases: os ortólogos de ATR e ATM em células humanas - *S. cerevisiae* Mec1 e Tel1, *S. pombe* Rad3 e Tel1) atuam na cascata de transdução de sinal para resposta ao dano no DNA, incluindo ativação das proteínas de reparo (FINN; LOWNDES; GRENON, 2012). As proteínas PI3Ks são os importantes reguladores dos pontos de verificação de danos no DNA e têm papéis funcionais distintos. Tel1 responde principalmente à DSB (quebras de duplas fitas de DNA) enquanto Mec1 tem um papel geral, na reparação dos danos de replicação e do DNA (FINN; LOWNDES; GRENON, 2012). O sensoriamento de lesões no DNA ou de problemas de replicação via Mec1 ou Tel1 leva ao recrutamento e fosforilação das quinases efetoras Rad9 (no caso de danos no DNA) e Mrc1 (no caso de problemas de replicação) que, por sua vez, recrutam a serina/treonina quinase Rad53 (Chk2 em células humanas, Cds1 em *S. pombe*) através dos seus domínios FHA (domínios de associação a forquilha de replicação). Rad53 é então fosforilada pela Mec1 ou Tel1 em locais constituídos pelos pares específicos de aminoácidos serina/glutamina ou treonina/ glutamina. Rad53 ativado permite a propagação do sinal de ponto de checagem do DNA para alvos subsequentes, como Dun1, que regula a disponibilidade de dNTP no interior das células durante a fase S (LOLL-KRIPPLEBER et al, 2014). A síntese de dNTP é realizada pela enzima ribonucleotídeo-redutase, que é codificada pelo gene *RNR*. A fosforilação de Dun1p, desencadeia a liberação de Crt1, sendo este um repressor das regiões promotoras dos genes *RNR*, promovendo sua transcrição. Em seguida, enzima ribonucleotídeo-redutase é inibida por Sml1p, após a fosforilação por Dun1p (**Figura 4**) (LOLL-KRIPPLEBER et al, 2014)

Rad53, objeto deste estudo é uma proteína quinase que exerce um papel importante na via de transdução de sinal, ativada quando há lesão no DNA para evitar rearranjos do genoma. Em 1991, Rad53 foi identificada como uma proteína quinase (PELLICOLI; FOIANI, 2005) envolvida na regulação dos pontos de

verificação por fosforilar várias enzimas necessárias para a progressão do ciclo celular e/ou reparo de danos do DNA (WANG *et al*, 2012). Rad53 desempenha papéis importantes nas fases do ciclo celular G1, S, G2, medeia a maior parte da resposta de brotamento da levedura e está envolvido na tolerância à exposição aos raios UV. (SHI *et al*, 2007). Além da regulação do ciclo celular, Rad53 desempenha papel relevante na morfogênese de *S. cerevisiae*, sendo que os mutantes deletados para RAD53, têm morfologia e parede celular alteradas, bem como defeitos no brotamento após tratamento com agentes que promovem dano ao DNA (ENSERINK *et al*, 2006). Em *C. albicans*, na presença de agentes genotóxicos, Rad53 desempenha um papel crucial na transição dimórfica de levedura para filamentos, que é essencial para a virulência e estabelecimento da infecção deste patógeno (SUN *et al*, 2011). Estudos revelam que a hiperfosforilação de Rad53 é suficiente para a parada do ciclo celular e sua defosforilação leva à recuperação das células após estresse genotóxico (WANG, *et al*, 2012). Assim, Rad53 desempenha um papel importante na coordenação de eventos morfogenéticos e da replicação do DNA em resposta aos danos causados pelos agentes genotóxicos.



**Figura 4. Vias envolvidas no controle de danos ao DNA em *S.cerevisiae*.** Após o dano ao DNA, o sinal de ponto de verificação é propagado através de uma cascata de quinases, resultando na ativação de genes efetores envolvidos na reparação do DNA e regulação do ciclo celular. Retirado de Loll-Krippelber *et al.*, 2014.

O ciclo celular, bem como a sua regulação em *C. neoformans* ainda é pouco estudado, quando comparado a *S. cerevisiae*. Atualmente, um estudo relatou que uma grande fração de genes de *S. cerevisiae* é expressa periodicamente durante o ciclo celular e que a adequada regulação deste programa transcricional é importante para a divisão celular (KELLIHER & HAASE, 2017, KELLIHER *et al.*, 2016). Apesar da divergência evolutiva entre as leveduras *S. cerevisiae* e *C. neoformans*, verificou-se que há uma percentagem semelhante de todos os genes (~ 20% do genoma) periodicamente expressos durante o ciclo celular. Entretanto, a ordenação temporal da expressão periódica divergiu para alguns genes do ciclo celular, especialmente aqueles relacionados à emergência e crescimento do broto. Os genes que regulam a replicação do DNA e a mitose exibiram uma expressão temporal conservada em ambas as leveduras, sugerindo que os processos essenciais do ciclo celular são conservados na periodicidade e no momento da expressão (isto é, duplicação do material genético antes da divisão). Durante o ciclo celular de *C. neoformans*, observou-se a expressão temporal de genes relacionados à replicação de DNA, mitose e 40 genes envolvidos na virulência. Diante desta análise, os autores puderam correlacionar a regulação dos genes de ciclo celular com a expressão dos genes envolvidos na virulência de *C. neoformans* (KELLIHER & HAASE, 2017; KELLIHER *et al.*, 2016).

A relação entre ciclo celular e expressão de fatores de virulência, já havia sido avaliada anteriormente por VIRTUDAZO *et al.*, 2010; GARCIA-RODAS *et al.*, 2014 e GARCIA-RODAS *et al.*, 2015, que demonstram que o atraso no brotamento a síntese de DNA, a expressão de cápsula polissacarídica e melanina são afetadas por alterações no ciclo celular de *C. neoformans*. Em 2010, Virtudazo e colaboradores publicaram um trabalho avaliando o papel da única ciclina Cdk1-G1 de *C. neoformans*. Este gene foi deletado e observou-se que o mutante de *ccln1Δ* apresentou brotamento alterado, problema na divisão celular, além de atraso na iniciação da síntese de DNA. Enquanto GARCIA-RODAS *et al.* (2014) e GARCIA-RODAS *et al.* (2015) relataram a relação da síntese de cápsula e da produção de melanina com o ciclo celular. O trabalho cita que a síntese da cápsula ocorre principalmente na fase G1, antes do aparecimento do broto. Ao utilizar a droga Benomil que provoca parada em G2/M observa-se inibição da cápsula



polissacarídica, enquanto ao tratar as células com a droga rapamicina que provoca parada em G1 a cápsula aumentou de tamanho. Ainda o mutante *cln1Δ* apresentou-se avirulento a 37°C e com defeito na produção de melanina, o que pode estar relacionado com a expressão do gene da lacase (LAC1), tornando-o susceptível a danos oxidativos. Esses dados mostram que há uma relação direta entre a regulação do ciclo celular e a expressão dos principais fatores de virulência de *C. neoformans*.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, LEE *et al.*, (2016) reportaram um grande estudo com análise funcional das quinases em *C. neoformans* através de deleção gênica, avaliação das características fenotípicas em condições variadas e ensaios de virulência dos mutantes nos modelos animais. As 183 quinases analisadas foram categorizadas em 18 famílias baseadas na sequência e estrutura, e dentre estas famílias foram identificados membros do grupo das CDKs (ciclina quinases) e PI3K (fosfatidilinositol quinases) envolvidas na regulação do ciclo celular, destacando-se: Cdc7, Mps1, Cdc28, Mec1 e Rad53. A deleção parcial do gene CDC7 acarretou em severo defeito de crescimento e alta susceptibilidade a agentes genotóxicos e estressores de membranas além de apresentar defeito na produção de urease. Mps1 é uma proteína do ciclo celular necessária para a duplicação do centrôssomo, seu mutante em *C. neoformans* apresentou defeito de crescimento a 37°C, aumento da susceptibilidade a agentes que promovem danos na parede celular e defeito na produção de melanina, e Pik1 é uma quinase conhecida por controlar a citocinese em *S. cerevisiae*, seu mutante apresentou maior susceptibilidade à estresse osmótico e oxidativo, além de defeito na produção de melanina. A proteína Cdc28 pertence à família CDK1 e a deleção deste gene em *C. neoformans* torna o mutante sensível a flucitosina, dificultando a síntese de RNA e DNA. A deleção de MEC1 não causou qualquer defeito de crescimento ou letalidade no fungo, mas aumentou sua sensibilidade a agentes genotóxicos. O mutante *rad53* também foi gerado e seus fenótipos analisados por LEE *et al.*, (2016). Recentemente, JUNG *et al.*, (2017) ao avaliar o transcriptoma de *C. neoformans* após a exposição à radiação gama identificou genes regulados em resposta a este tratamento, entre eles aqueles envolvidos no sistema de reparo do DNA. Tais autores identificaram um fator transcricional Bdr1, regulador da resistência à radiação gama em *C. neoformans*, que por sua vez é transcricionalmente controlado

por Rad53. Neste trabalho, o mutante de *RAD53* foi avaliado em condições de estresse como radiação gama, UV, MMS e HU, e apresentou defeito de crescimento quando comparado com a linhagem selvagem H99. Apesar destes dados terem sido publicados durante o desenvolvimento deste TCC, decidiu-se continuar com a caracterização funcional de *RAD53* na patobiologia de *C. neoformans*

## 2. OBJETIVO GERAL

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é caracterizar o papel do gene RAD53 em *C. neoformans*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- I. Construir uma cepa nocaute para o gene *RAD53*: construir o cassete de deleção, transformar por biobalística, selecionar os transformantes, extrair DNA genômico e confirmar por PCR e Southern Blot.
- II. Caracterizar o fenótipo do mutante *in vitro*: avaliar os **atributos de virulência** (cápsula, melanina, fosfolipase, urease e capacidade de crescimento a 37°C), **resposta a agentes estressores (parede celular** – Congo Red, SDS, Calcofluor White, **osmóticos** – NaCl, KCl, **genotóxicos** – MMS, Hidrouréia, UV, sulfato de cádmio, **oxidativos** – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadiona , e **susceptibilidade às drogas antifúngicas** (Itraconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Anfotericina B, Nistatina, FK506, 5-Fluocitosina e Terbinafina).
- III. Avaliar o ciclo celular do mutante *rad53Δ* por citometria de fluxo.
- IV. Reconstituir o gene RAD53 no mutante *rad53Δ*
- V. Avaliar a capacidade de sobrevivência do mutante após fagocitose por macrófagos M1 *in vitro*.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista a escassez de dados disponíveis na literatura a respeito do ciclo celular de *C. neoformans* e que *RAD53* está envolvido não só na regulação do ciclo celular, bem como na morfogênese e virulência em resposta a danos genotóxicos em outros fungos já estudados, este trabalho avaliou o envolvimento de Rad53 na regulação do ciclo celular, na expressão dos atributos de virulência e na morfogênese de *C. neoformans*. Devido ao crescente aumento do número de indivíduos acometidos por infecções causadas por este fungo patogênico oportunista, este trabalho de biologia molecular básica se mostra relevante para obter maior conhecimento da patobiologia de *C. neoformans* e uma possível aplicação deste conhecimento para o desenvolvimento de estratégias para tratamento desta doença.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Linhagens e meios de cultura utilizada no trabalho

As linhagens utilizadas neste estudo estão listadas na **Tabela 1**. Foram realizados estoques de cada uma das linhagens em tubos criogênicos, contendo glicerol 25%, e armazenados a -80°C. Esses estoques foram utilizados para o repique por esgotamento em placas de YPD sólido previamente a todos os experimentos realizados.

**Tabela 1. Linhagens de *C. neoformans* utilizadas neste trabalho**

Linhagem	Descrição e genótipo	Origem
<b>H99</b>	Selvagem - WT ( <i>RAD53</i> )	Duke University
<b><i>rad53Δ</i></b>	Mutante <i>rad53Δ</i> ( <i>RAD53::HPH</i> )	Este trabalho
<b><i>rad53Δ+RAD53</i></b>	Reconstituído <i>rad53Δ</i> + <i>RAD53</i> ( <i>RAD53::HPH::RAD53</i> )	Este trabalho

Os meios utilizados neste trabalho foram:

**YPD:** Extrato de levedura 1,0% (p/v); Glicose 2,0% (p/v); Peptona 2,0% (p/v) pH= 5,6, esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 min. No caso de meio sólido adição de 2,0% de ágar.

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

- Estresse de parede celular: YPD + Congo Red 1% e 0,5 %; YPD + Calcofluor White 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL
- Estresse osmótico: YPD + NaCl 1,5 M; YPD + KCl 1,5 M
- Estresse oxidativo: YPD + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5, 1 e 2 mM; YPD + Menadiona 0,01 mM, 0,02 mM e 0,04 mM
- Estresse genotóxico: YPD + CdSO<sub>4</sub>; YPD + Hidroxuréia; YPD + MMS 0,04%

**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 ágar:** Semente de Niger triturada 7 % (p/v) e autoclavada a 120°C por 15 min. Filtração do extrato em gaze e ajuste do volume para 350 mL com água destilada. Adição de 0,1% glicose e 4% ágar e esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 min.

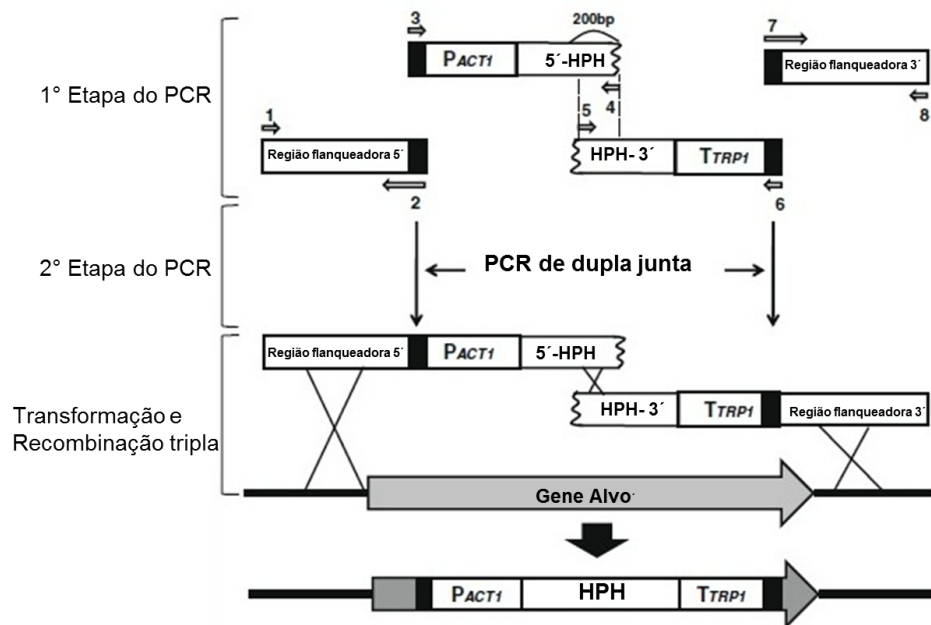
**Meio mínimo para indução de cápsula:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (29,4 mM);  $\text{MgSO}_4$  (10 mM); Glicina (13mM); Dextrose (15mM). Autoclavar a 120°C por 20 min. Adicionar após a autoclavagem a tiamina (3 $\mu\text{M}$ ) e L-Dopa 1mM na hora do experimento.

**Meio de Gema de Ovo para ensaio de fosfolipase: Base ágar:** Triptona 1,0% (p/v); Glicose 1,0% (p/v); Cloreto de Sódio 1M; Cloreto de Cálcio 0,005M; Ágar 2,0% (p/v), pH para 5,6 e esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 min. **Preparo da emulsão de gema de ovo 50%:** Gema de Ovo 80 mL; Solução Salina 0,9% 80 mL. Adição da emulsão a base de ágar, sendo a concentração final de 8% de gema de ovo. Adição de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de Azul de metileno para facilitar a mensuração do halo de degradação dos fosfolipídeos.

**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 0,25 $\mu\text{m}$ .

**LB:** Triptona 1,0%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 1,0%. Ajuste do pH para 7,0. Esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 min. No caso de meio sólido adição de 1,5% de ágar.

## 4.2 Construção do cassete de deleção do gene *RAD53*



**Figura 5. Etapas do PCR de dupla junta usando marcador de seleção *HPH*.** Na primeira etapa do PCR, as regiões de flanqueamento 5' e 3' de um gene a ser excluído são amplificadas usando os oligonucleotídeos 1 + 2 e 7 + 8, respectivamente. As regiões do marcador seletivo 5' e 3'-*HPH* são amplificadas usando oligonucleotídeos 3 + 4 e 5 + 6, respectivamente. Na segunda etapa do PCR, os produtos do PCR referentes à região de flanqueamento 5' do gene alvo e o do gene marcador 5'-*HPH* são combinados e amplificados usando oligonucleotídeos 1 + 4 (PCR de dupla junta). Da mesma forma, os fragmentos correspondentes à região flanqueadora 3' do gene alvo e o do marcador 3'-*HPH* são combinados e amplificados usando os oligonucleotídeos 5 + 8. Os dois fragmentos de DJ-PCR são combinados e introduzidos usando transformação biológica na célula, onde a recombinação tripla ocorre entre o locus nativo do gene alvo e o cassete de deleção. *PACT1*, o promotor *ACT1*; *TTRP1*, o terminador *TRP1*; *HPH* Higromicina fosfotransferase. (Fonte: Retirada e adaptada de KIM *et al.*,2009).

Para obtenção do mutante, foi construído através de PCR de dupla junta (**Figura 5**) um cassete de deleção contendo as regiões flanqueadoras de *RAD53* e o cassete de resistência ao antibiótico Higromicina B (gene *HPH* – Higromicina fosfotransferase controlado por Promotor de actina e terminador *TrpC* de *C. neoformans*) (KIM *et al.*,2009). Primeiramente foi realizado o PCR das regiões

flanqueadoras de *C. neoformans* utilizando DNA genômico de H99 e os oligonucleotídeos 1 e 2 (1+2: 0,4 Kb) para a região 5' de *RAD53* e 7 e 8 (7+8: 0,4 Kb) para a região 3' de *RAD53*, posteriormente foi realizado o PCR para amplificação da marca de resistência utilizando o plasmídeo pPZPHYG como DNA alvo e os oligonucleotídeos 3 e 4 (3+4: 1,2 Kb) para região 5' do marcador seletivo *HPH*, controlado pelo promotor de actina de *C. neoformans* e 5 e 6 (5+6: 1,2 Kb) para a região 3' do marcador, o qual possui o terminador de *TrpC* de *C. neoformans*. Os fragmentos amplificados foram purificados com o Kit GFX PCR DNA and Gel band purification Kit (GE Healthcare) e quantificados por espectrofotometria a 260 nm. Em seguida foi realizado o PCR de sobreposição dos fragmentos 1+2 e 3+4 (PCR de dupla junta 1+4) resultando no fragmento 5' *RAD53/HPH* de 1,7 Kb. O segundo fragmento foi gerado através da sobreposição dos fragmentos 5+6 e 7+8 (PCR de dupla junta 5+8), equivalente a região, resultando no fragmento 3' *HPH/RAD53* de 1,6 Kb. Os tamanhos citados acima foram confirmados em gel de agarose 1%. Os fragmentos 1+4 e 5+8 foram usados para co-transformação genética da cepa H99. (Tabela 2)

**Tabela 2. Oligonucleotídeos usados para construção do cassete de deleção *RAD53::HPH*.**

Oligonucleotídeo	Alvo	Nome	Sequência 5' - 3'	Tamanho esperado do fragmento
1	5' <i>RAD53</i>	LF 391	CTTTTGAAGAAGAAGTCGACACAGC	0,480 Kb
2		LF392	ATGTCATAGCTGTTTCCTGTGCAGGAGTGGC	
3	5' <i>HPH</i>	LF020	CAGGAAACAGCTATGACATGAT	1.235 Kb
4		LF028	GCGGGAGATGCAATAGGTCAG	
5	3' <i>HPH</i>	LF029	AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT	1.295 Kb
6		LF021	GTAAAACGACGGCCAGTGC	
7	3' <i>RAD53</i>	LF393	GCACTGGCCGTCGTTTTACAGGCGTTTTATCATT	0,425 Kb
8		LF394	GCCGCCTCTATCTCGTCGCAATACA	

#### 4.3 Transformação por biobalística de *C. neoformans* para a obtenção dos mutantes *rad53Δ*.



A obtenção do mutante de *RAD53* foi aprovada pela Comissão Interna de Biossegurança do Departamento de Biologia Celular (CiBio – ano 2016). A transformação no fungo foi realizada através de biobalística. Primeiramente semeou-se uma colônia isolada da cepa a ser transformada (H99) em meio YPD líquido e incubou-se a 30 °C por 48 horas sob agitação. Centrifugou-se as células a 4000 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com solução salina 0,9%. Centrifugou-se a suspensão novamente e o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em solução salina e distribuídas no número de placas que seriam transformadas. Espalhou-se a suspensão de leveduras nas placas de YPD ágar com sorbitol 1M e estas foram secadas por 2 horas no fluxo laminar (TOFFALETTI *et al.*,1993; DAVIDSON *et al.*,2000). Para a precipitação do DNA nas partículas de tungstênio, a suspensão de partículas foi incubada em banho sonicator por 7 minutos e depois homogeneizada em vórtex mecânico por 2 minutos a velocidade máxima. Preparou-se uma suspensão com partículas estéreis, DNA, CaCl<sub>2</sub> e espermidina que foi homogeneizada em vórtex por 10 minutos, seguidos de lavagens em etanol absoluto alternadas com centrifugações a 13000 rpm por 30 segundos. Ao fim as partículas revestidas de DNA foram ressuspensas em etanol absoluto, brevemente vortexadas e distribuídas nas membranas macrocarreadoras, em seguida as placas com a cepa selvagem H99 foram alvejadas para introduzir o DNA nas células. Após 24 horas foi feita a passagem das células bombardeadas para o meio seletivo (YPD ágar contendo Higromicina B a 200 µg/ml). As placas foram incubadas a 30 °C. Após o período de 72 horas, as colônias foram repicadas em meio seletivo para checar a estabilidade mitótica da marca de seleção.

#### **4.4 Extração do gDNA pela técnica de *Smash and Grab***

Para confirmar a deleção do gene *RAD53* nos mutantes obtidos, primeiramente foi realizada a extração do DNA genômico de *C. neoformans*, segundo o protocolo “Smash & Grab”: As células foram cultivadas em YPD líquido por 48 horas a 30°C, sob agitação. Centrifugou-se a suspensão a 4000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em água estéril, centrifugou-se a suspensão novamente por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de fenol clorofórmio e 500 µL tampão TENTS (

Triton, TrisHCl, EDTA, NaCl e SDS) e 200 µL de pérolas de vidro 0,6 µm, esta foi homogeneizada por 10 minutos em vórtex. Centrifugou-se por cinco minutos a 13.000 rpm e transferiu-se a fase aquosa para novo tubo. Adicionou-se NaOAc 3M e etanol absoluto para precipitar o DNA. Centrifugou-se novamente por 5 minutos a 13.000 rpm, e deixou-se secar por 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se água *MilliQ* contendo 100 µg/mL de RNase para ressuspender o DNA. Incubou-se a 37°C por 1 hora. As quantidades de DNA foram avaliadas por espectrofotometria a 260nm. Os DNAs genômicos foram então diluídos a uma concentração de 10 ng/µL para realizar a confirmação da deleção por PCR.

#### 4.5 Confirmação da deleção do gene *RAD53* por PCR

Para confirmar a deleção do gene *RAD53*, pela integração do cassete de deleção *RAD53::HPH* no locus de *RAD53*, foram utilizados os oligonucleotídeos desenhados fora da região de recombinação do cassete de deleção, juntamente com oligonucleotídeos específicos para o gene *HPH* (**Tabela 3**). A confirmação foi realizada pela amplificação da região 3' dos transformantes obtidos utilizando os oligonucleotídeos 5 e 12 para a amplificação dos fragmentos. O tamanho esperado para essa região foi de 1.741pb.

**Tabela 3. Oligonucleotídeos usados para confirmação da deleção do gene *RAD53* por PCR.**

Oligonucleotídeo	Alvo	Nome	Sequência 5' - 3'	Tamanho esperado do fragmento
5	3' <i>RAD53</i>	LF 029	AGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT	1.741pb
12		LF390	GCTTCCGGTCAGGCAT	

#### 4.6 Confirmação da deleção do gene *RAD53* por Southern Blot

Além de usar a PCR para confirmação de deleção do gene foi realizado o método de *Southern blot*, para demonstrar que a inserção do cassete de deleção ocorreu somente no locus do gene-alvo. Primeiramente foi realizado um estudo de restrição para escolher a enzima a ser utilizada através do programa <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> onde sítios das enzimas de restrição foram verificados na sequência do gene *RAD53* da linhagem H99. A região 5' de *RAD53*

que compreende os oligonucleotídeos 1 e 2 foi utilizada para amplificação da sonda. O kit utilizado para a preparação da sonda foi o PCR DIG PROBE SYNTHESIS KIT (ROCHE, CAT#11636090910). A enzima de restrição escolhida para a digestão do gDNA foi a XhoI, sendo esta usada para digerir o DNA genômico a 37 °C/ overnight.

Após a digestão do gDNA com a enzima de restrição, foi realizada a transferência do gDNA para a membrana de Nylon (Hybond N+, GE) por meio de um sistema de transferência por capilaridade. No dia seguinte foi realizado o “*crosslinking*” para fixação do DNA à membrana, em seguida a hibridização ocorreu a 50°C overnight. Após hibridização, a membrana foi lavada segundo instruções do fabricante do kit DIG WASH AND BLOCK BUFFER SET (CAT #11585762001, ROCHE), bem como a revelação da membrana. Os tamanhos previstos dos fragmentos detectados foram: mutante *rad53Δ*– 1,100Kb e o selvagem H99 – 1,700 Kb.

#### **4.7 Caracterização fenotípica do *rad53Δ***

Para a avaliação fenotípica da cepa *rad53Δ* observou-se a capacidade de crescimento a 37° C e 30° C do mutante, que foi submetido a crescimento *in vitro* em YPD líquido overnight a 30°C no dia seguinte as células foram lavadas com solução salina, contadas e a densidade celular ajustada para  $1 \times 10^7$  leveduras/mL. As diluições seriadas foram feitas em tubos e semeadas em meio de cultivo YPD sólido. Avaliaram-se também outros fatores de virulência de *C. neoformans*, tais como: a capacidade da de produzir melanina em meio Niger Seed ágar; a secreção de fosfolipase B em ágar gema de ovo, avaliado pela formação de um halo de hidrólise de fosfolipídios; a secreção de urease em meio ágar de Christiansen em que se observa a formação de um halo púrpura de degradação da uréia. A indução de cápsula foi avaliada após o crescimento das leveduras em meio mínimo a 30°C por 48h utilizando  $1 \times 10^7$  células/mL. Após o crescimento, as células foram visualizadas microscopicamente com tinta nanquim, fotografadas e o tamanho da cápsula foi medido. As linhagens também foram submetidas a diferentes condições de estresse em meio YPD ágar, tais como: estressores osmóticos (NaCl 1,5M, KCl 1,5M), estressores da membrana e parede celular (Congo Red 0,5 e 1%, Calcofluor White 0,5 e 1,5mg/mL), agentes genotóxicos (Hidroxiuréia 10, 20, 30, 50, 100, 150 e 200 mM, MMS 0,04%, CdSO<sub>4</sub> 20, 30, 35 e 50 µM e UV) e oxidativos em YPD e meio

mínimo SD ( $H_2O_2$  0,5, 1 e 2 mM e Menadiona 0,01 Mm, 0,02 mM e 0,04 mM). Além disso, foi avaliada a curva de crescimento do *rad53Δ* nos meios de cultura YPD e YNB. Foram inoculadas  $5 \times 10^4$  células/mL nos respectivos meios, utilizando placa de 96 poços pelo período de 144h a 30°C e 37°C, tendo como controle o selvagem H99 e a densidade óptica medida a cada 30 minutos em 600 nm.

#### **4.8 Determinação da concentração mínima inibitória das drogas antifúngicas para *rad53Δ***

Os testes *in vitro* para determinação da concentração inibitória mínima (CMI) foi baseada na metodologia preconizada por NCCLS, 2008, protocolo M-27A4. Os inóculos das leveduras foram preparados em tampão salina estéril (0.85%) na concentração final de 2X, proporcional a  $1-2 \times 10^3$  células/mL. A suspensão inicial de células foi preparada em salina e a concentração foi ajustada a  $1 \times 10^6$ / mL que foi diluída 1:50 em RPMI 1640 e a seguir, 1:20 para se obter a concentração final desejada. As células e as concentrações das moléculas foram diluídas 1:1, em uma concentração final de 1X. Os testes foram realizados em microplacas estéreis contendo 96 poços. Como controles foram utilizados RPMI sem inóculo (negativo) e RPMI sem droga e RPMI acrescido de DMSO (controles positivos). A cepa de *C. neoformans* H99 foi utilizada como referência para todos os testes. O tempo de incubação foi de 48 h a 37°C. Os dados apresentados foram obtidos após leitura da absorbância dos poços a 600nm e plotados em gráficos. As drogas utilizadas para o teste *in vitro* foram: Itraconazol (16 – 0,03 µg/mL), Cetoconazol (16 – 0,03 µg/mL), Fluconazol (16 – 0,03 µg/mL), Anfotericina B (16 – 0,03 µg/mL), Nistatina (16 – 0,03 µg/mL), FK506 (8 – 0,015 µg/mL), 5-Fluocitosina (8 – 0,015 µg/mL) e Terbinafina (16 – 0,03 µg/mL).

#### **4.9 Sincronização Celular e Citometria de fluxo**

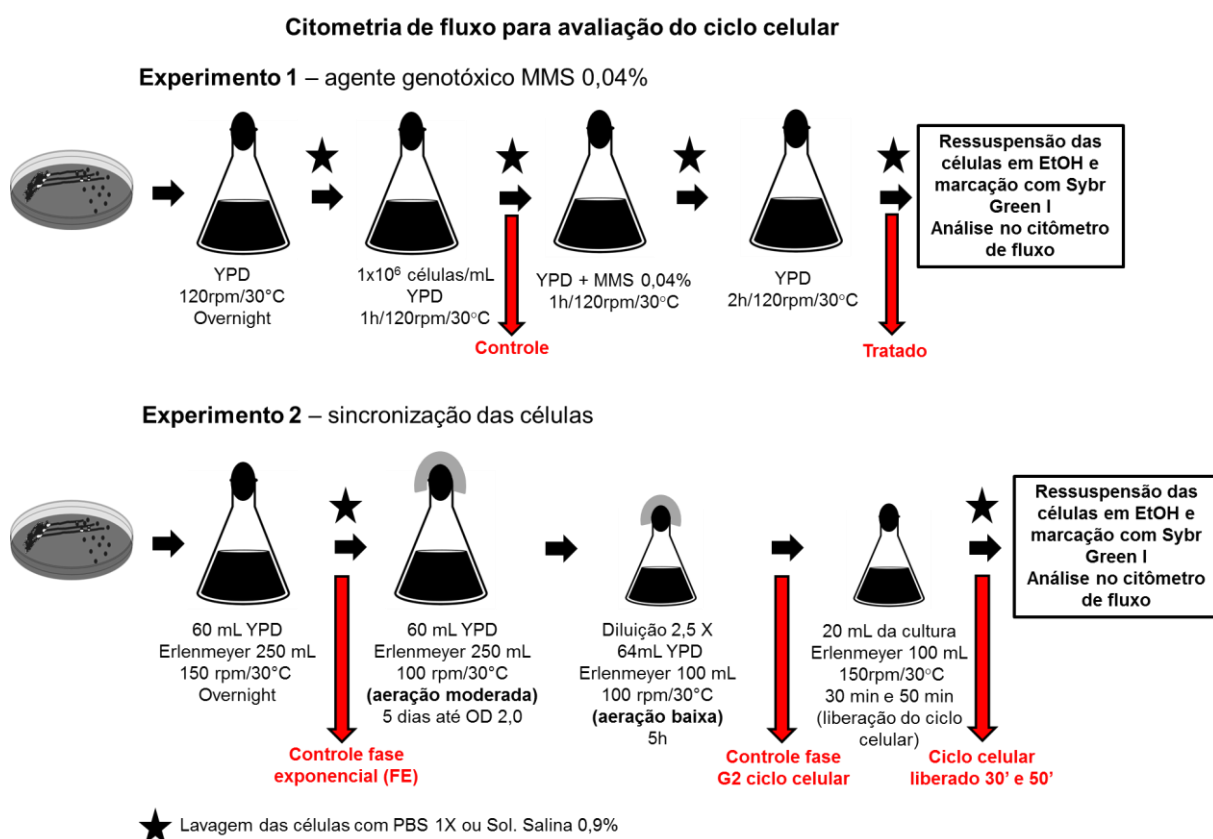
Para avaliar o ciclo celular de *rad53Δ* na presença de agente genotóxico MMS, primeiramente foi realizada uma curva de crescimento com meio YPD líquido contendo MMS nas concentrações de 0,01%, 0,03% e 0,04%. Foram inoculadas  $5 \times 10^4$  células/ mL utilizando placa de 96 poços pelo período de 120h a 30°C, tendo como controle o selvagem H99 e a densidade óptica medida a cada 30 minutos em

600nm. A concentração em que se observou uma maior diminuição do crescimento das linhagens foi selecionada para a realização da citometria de fluxo.

Foi realizada a citometria de fluxo da linhagem selvagem H99 e do mutante *rad53Δ*, tratadas com MMS 0,04% (**Figura 6**). As células foram crescidas em YPD líquido durante a noite a 120rpm/30°C, no dia seguinte as células foram ajustadas para  $1 \times 10^6$  células/mL em 5 mL de meio YPD e incubadas por 1 hora a 120rpm/30°C para coleta em fase exponencial. Em seguida as células foram lavadas com PBS 1X e ressuspensas em 5mL de YPD contendo MMS 0,04% sendo incubadas por 1 hora a 120rpm/30°C. Após este período as células foram lavadas novamente com PBS 1X e ressuspensas em meio YPD, sendo incubadas novamente por 2 horas a 120rpm/30°C. Por fim as células foram lavadas novamente com PBS 1X, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensado em 5 mL de álcool 70% gelado, em seguida as amostras foram armazenadas a 4°C durante a noite para permeabilização. No dia seguinte as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X, sendo centrifugadas a 4.000rpm/5min em cada lavagem. O sedimento celular foi ressuspensado em 5 mL de PBS 1X. As células foram contadas na câmara de Neubauer e ajustadas para  $1 \times 10^6$  células em 500µL de PBS 1X em um tubo envolvido com alumínio para receberem 0,5uL do corante Sybr Green I (Invitrogen, estoque 10.000X). Este corante intercala nas bases nitrogenadas do DNA e serve para quantificar o conteúdo de DNA intracelular e dessa forma estimar em qual fase do ciclo celular a população se encontra. Após 30 minutos de incubação a por 37°C por 30 minutos sob agitação, as células foram utilizadas analisadas no aparelho de citometria BD FACSVers. Os dados adquiridos no equipamento foram analisados com o auxílio do programa FlowJo.

Um segundo experimento de citometria de fluxo foi realizado com protocolo de sincronização celular para *C. neoformans* descrito por Ohkusu e colaboradores (2002) (**Figura 6**). A sincronização celular é um método ainda pouco utilizado e definido em *C. neoformans*. Primeiramente as linhagens, selvagem H99 e mutante *rad53Δ* foram inoculadas em erlenmeyer de 250 mL com 60 mL do meio YPD a 150 rpm/30°C e mantidas em sob agitação durante a noite, para que houvesse uma boa aeração das células. No dia seguinte, com a população na fase estacionária, 10 mL da suspensão foram coletados e guardados para citometria de fluxo, o restante do volume dos cultivos foram centrifugados a 4.000rpm por 5 minutos, o sobrenadante

foi descartado e as células lavadas uma vez com salina 0,9%, em seguida as células foram ressuspensas em 60 mL de meio YPD em erlenmeyer de 250 mL, foi passado papel alumínio na bucha para diminuir a aeração (moderada), estas foram incubadas a 30°C/100rpm por 4 a 5 dias, segundo o protocolo esperava-se a OD próxima a 4.0, pois neste momento as células em aeração moderada, no entanto após o período as células atingiram OD 2.0. Foi realizado o mesmo procedimento acima citado, coletando as amostras na fase G2, para realização da citometria de fluxo. Em seguida as amostras foram diluídas 2,5 X com YPD novo em erlenmeyer de 100 mL, foi passado papel alumínio na bucha para diminuir a aeração e incubado a 30°C/ 100rpm por 5 horas. Ao término das 5 horas observou-se no microscópio se as células não apresentavam brotamento ou com tamanho aumentado (indicativo de bloqueio em G2), para assim continuar o experimento. Posteriormente foram coletados 40 mL de cada amostra em erlenmeyer de 100 mL, sendo 20 mL para liberação do ciclo celular em 30 minutos e em 50 minutos, realizando a cada tempo o procedimento para citometria de fluxo.



**Figura 6 – Fluxograma dos experimentos de citometria de fluxo para avaliação do ciclo celular.**

#### 4.10 Reconstituição do gene *RAD53* no mutante *rad53Δ*

Para realizar a reconstituição do gene *RAD53*, primeiramente foi amplificado por PCR um fragmento correspondente ao locus de *RAD53* com os oligonucleotídeos 9 e 12 (**Tabela 4**), utilizando o DNA genômico da linhagem selvagem H99 para reconstituição do gene. O tamanho esperado foi de 3,9 Kb. O plasmídeo pBluescript KS+ foi usado para clonagem deste fragmento por recombinação (kit InFusion, Clontech), nos sítios BamHI e HindIII e posteriormente a reação de recombinação foi clonada em *E.coli* para seleção dos clones.

**Tabela 4. Oligonucleotídeos usados no PCR para amplificação do locus *RAD53* para reconstituição do mutante *rad53Δ***

Oligonucleotídeo	Alvo	Nome	Sequência 5' - 3'	Tamanho esperado do fragmento
9	Locus <i>RAD53</i>	LF 506	<b>CGGTATCGATA</b> AAGCTTTGCCCATCACCTGTCCTA CTT	WT: 3,9 Kb Ou Δ: 3,5Kb
12		LF507	<b>TAGAACTAGTGGATCC</b> TAATCCGCCATACGTCCC TAC	
10	ORF <i>RAD53</i>	LF509	TTATGCCGACAGACCAGGAGT	0.2 Kb
11		LF510	TTATGCCGACAGACCAGGAGT	

\* Sítios de restrição HindIII e BamHI estão destacados em cinza claro e cinza escuro, respectivamente. As bases em negrito representam a região do plasmídeo pBluescript KS + usadas para recombinação.

A clonagem em *E.coli* (HD5α) foi realizada por choque térmico. Primeiramente foram preparadas placas com meio LB contendo IPTG, X-gal e ampicilina 100 µg/mL. Posteriormente foi adicionado 4 µL da reação de recombinação em 50 µL de células competentes de *E. coli* (HD5α), estas foram incubadas no gelo por 30 minutos. Em seguida a amostra foi incubada em banho Maria a 42°C por 45 segundos e por mais 1 minuto no gelo. Foi adicionado 1 mL de meio SOC (5µL de Mg<sup>2+</sup> (10mM) e 20 µL de glicose (20mM) para 1 mL de meio SOC (Tryptona 2%, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,058 %, KCl 0,02 % pH 7,5) para recuperação das células. Logo após, as células foram transferidas para tubo de 15mL e incubadas a 37°C a 150 rpm por 1 hora. Por fim, 50µL e 100µL e o restante foi centrifugado e inoculado nas placas contendo meio LB + AMP. As placas foram incubadas na

estufa a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, foram escolhidas colônias isoladas brancas para realizar a extração do DNA plasmidial (MINIPREP).

Para a realização da MINIPREP inicialmente as colônias escolhidas foram inoculadas em 5 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) a 37°C sob agitação de 250 rpm, durante a noite. Posteriormente 1mL das células foi guardado a 4°C para estoque e o restante foi centrifugado a velocidade máxima 13.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e ressuspensionado em 200 µL da solução I (EDTA 1mM e Tris-HCl 10 mM, pH 8), logo após, foi adicionado 360 µL da solução II (NaOH 200 mM e SDS 1%), a solução foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida foi adicionado 300 µL da solução III gelada (acetato de potássio 60% e ácido acético glacial 11.5%), as amostras foram homogeneizadas novamente e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a velocidade máxima por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Em seguida foi adicionado 750 µL de isopropanol às amostras, estas foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, logo após as amostras foram centrifugadas a velocidade máxima por 5 minutos e ressuspensionadas em 200 µL da solução I, sendo adicionado 110 µL de acetato de amônio 7,5M. As amostras foram agitadas vigorosamente e posteriormente centrifugadas a velocidade máxima por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e acrescentou-se 750 µL de etanol 100 % (absoluto). Centrifugou-se novamente as amostras a velocidade máxima por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70 %. Centrifugaram-se novamente as amostras a velocidade máxima por 5 minutos, descartando o sobrenadante e retirando o excesso de álcool com a pipeta. As amostras foram secadas a temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida foi adicionado 50 µL de água milliQ contendo RNase A na concentração final de 100 µg/mL. As amostras foram incubadas a 37 °C por no mínimo 1 h. Por fim, foi aplicado 2 µL das amostras em gel de agarose 1% para checar a eficiência da purificação.

As amostras plasmidiais foram digeridas com as enzimas HindIII e SpeI para confirmação da clonagem do fragmento de 3,9Kb referente ao locus de *RAD53*. Sendo esperado o aparecimento de duas bandas sendo uma de 3,9 Kb correspondente ao tamanho do fragmento de *RAD53* e outra de 3,0 Kb



correspondente ao tamanho do plasmídeo pBluescript KS+. Foi realizada a purificação do gel do fragmento de 3,9Kb relativa ao fragmento de *RAD53* que por sua vez foi clonado no plasmídeo pSDMA57 (ARRAS *et al.*, 2015) previamente digerido com as enzimas HindIII e SpeI. Para a reação de ligação entre o fragmento purificado de *RAD53* e o plasmídeo pSMAD57, foi utilizada a enzima T4 ligase (Promega), incubada a 4°C durante a noite. Posteriormente, esta ligação foi transformada em *E.coli* e a extração do DNA plasmideal foi feita como citado acima. Os plasmídeos obtidos foram digeridos com as enzimas HindIII e SpeI, esperava-se o aparecimento de dois fragmentos um de 3,9 Kb correspondente ao fragmento de *RAD53* e outro de 6,0 Kb correspondente ao tamanho do plasmídeo pSDMA57. Por fim, este plasmídeo foi linearizado com a enzima AsclI, sendo esperado um tamanho de 10 Kb, para a transformação por biobalística do mutante *rad53Δ*, seguindo o protocolo já citado acima.

#### **4.11 Confirmação da reconstituição do gene *RAD53***

Após a transformação e extração do DNA genômico dos possíveis reconstituídos, foi realizada uma PCR com os oligonucleotídeos 10 e 11 que amplifica um fragmento de 0,2 Kb relativo a ORF de *RAD53*. Os transformantes confirmados foram selecionados para a realização de um segundo PCR de confirmação de reconstituição do gene utilizando os oligonucleotídeos 9 e 12 externos ao locus de *RAD53* (**Tabela 4**). O fragmento correspondente ao gene *RAD53* tem o tamanho esperado de 3,9 Kb, enquanto que o mutante *rad53Δ* deveria apresentar um fragmento de 3,5 Kb relativo a substituição de *RAD53* por *HPH*. Assim como a reconstituição não foi feita no locus original de *RAD53*, mas no “*safe haven*”, previamente padronizado por ARRAS *et al.*, 2015, as possíveis linhagens reconstituídas deveriam apresentar os dois fragmentos: 3,5 Kb (deleção de *RAD53* no locus) e 3,9 Kb relativo a integração de *RAD53* no locus “*safe haven*”. Os transformantes que apresentaram os dois fragmentos foram selecionados para confirmar a reconstituição do gene *RAD53* por análise de fenótipo com MMS 0,04%, uma vez que o mutante *rad53Δ* apresenta-se sensível nesta condição.

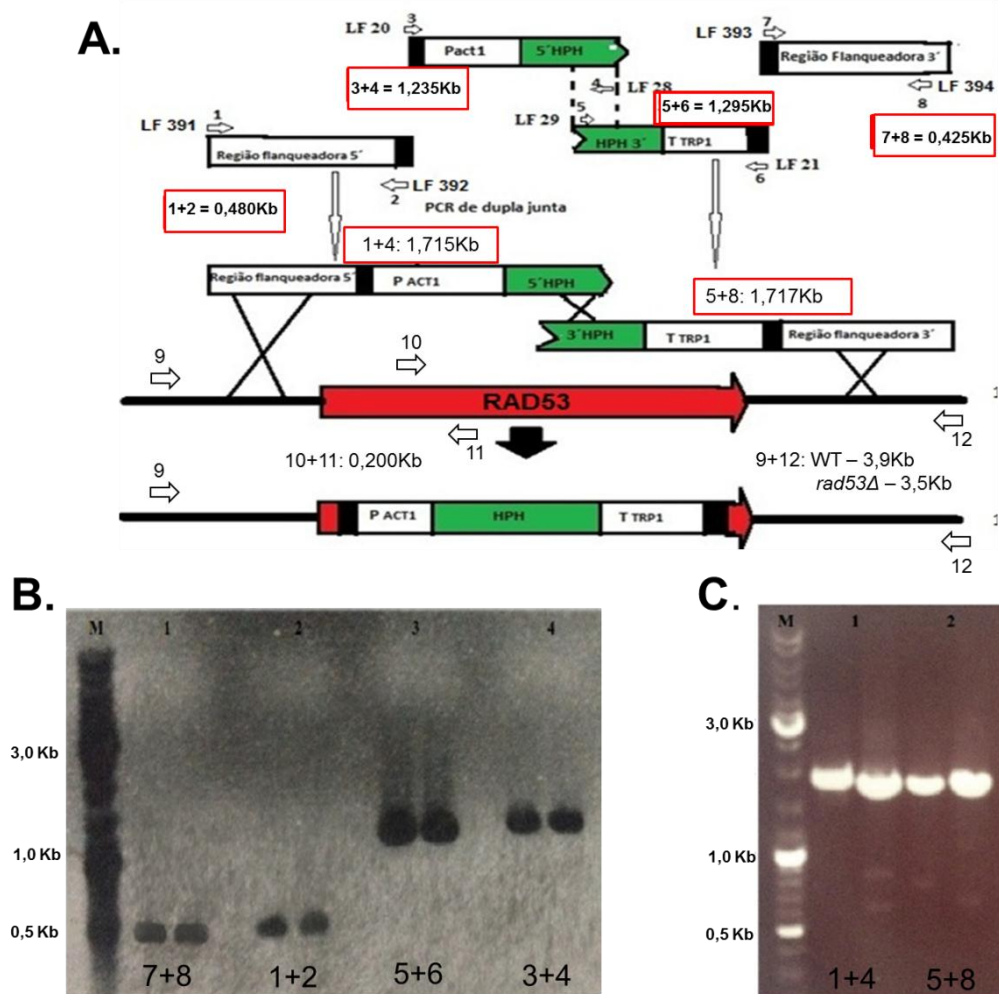
#### 4.12 Avaliação da sobrevivência do mutante *rad53*Δ em macrófagos M1.

Para avaliar a capacidade de sobrevivência do  $\Delta rad53$  em macrófagos após a fagocitose, foi utilizado o protocolo descrito em Nicola & Casadevall (2012). Foi utilizado neste estudo cultura de células primárias de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs). A geração das células foi elaborada a partir da diferenciação das células tronco hematopoiéticas murinas da linhagem C6 Black segundo protocolo indicado por Lutz e colaboradores (1999). A utilização dessas células (BMDMs) está prevista em projeto previamente aprovado pelo CEUA (UnBDoC nº 66729/2016) do nosso laboratório. As cepas em estudo foram submetidas à fagocitose por macrófagos M1 que, posteriormente, foram lisados. Primeiramente foi realizado um inóculo inicial das linhagens mutante *rad53*Δ e selvagem H99 em YPD, além disso, em placa de 96 poços, foi realizado um inóculo inicial das células M1 na concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço em meio RPMI, volume final de 200  $\mu$ L por poço. As células foram incubadas na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C overnight. No dia seguinte os macrófagos foram infectados na proporção de 2:1 com o mutante *rad53*Δ e selvagem H99 na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço, sendo estes opsonizados com o anticorpo anti-GXM 18B7 por 30 minutos a 37°C/ 120 rpm. Em seguida foi aplicado 100  $\mu$ L por poço e a placa foi incubada na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 2 h. Posteriormente as células foram lavadas uma vez com o próprio meio RPMI e lisadas com água destilada estéril, para a recuperação dos fungos internalizados, em seguida foi realizada as diluições 1:100 e 1:1.000 que foram semeadas em YPD ágar para a realização da contagem de UFC (unidades formadoras de colônias) após 24h de interação com macrófagos para cada linhagem. A fagocitose foi realizada nas mesmas condições, entretanto não houve a lise das células, após a lavagem com meio RPMI as células foram coradas com o Kit de coloração celular panótico rápido e contadas por microscopia óptica. O índice de fagocitose foi calculado através do número de leveduras fagocitadas dividido pelo número de macrófagos que fagocitaram, em uma contagem de cem células.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e confirmação do mutante *rad53Δ*

Com os métodos estabelecidos para deleção do gene *RAD53* em *C. neoformans*, foi possível construir o cassete de deleção, contendo as regiões flanqueadoras de *RAD53*, tendo como marca de resistência ao antibiótico Higromicina B. O método utilizado para construção do cassete foi baseado na PCR de sobreposição, denominado Dupla Junta (KIM *et al.*,2009). A **Figura 7A** apresenta as etapas de amplificação que culminaram na construção do cassete de deleção, como descrito em materiais e métodos. Foi confirmada a correta amplificação das regiões externas do cassete, sendo observada uma banda de 0,480 Kb para a região 5' de *RAD53*, resultado da amplificação de 1+2 e uma banda de 0,425 Kb para a região 3' de *RAD53*, resultado da amplificação de 7+8, ainda foi confirmada a amplificação para a região interna do cassete, foi observada uma banda de 1,235 Kb correspondente a região 3' *HPH*, resultado da amplificação de 5+6 e uma banda de 1,295 Kb correspondente a região 5' *HPH*, resultado da amplificação 3+4 (**Figura 7B**). A amplificação dos produtos finais 1+4 e 5+8 resultou no aparecimento de uma banda de 1,715 Kb corresponde a fusão 5' *RAD53-HPH* e uma banda de 1,717 Kb correspondente a fusão 3' *RAD53-HPH*, respectivamente. Ressalta-se que os produtos finais, os fragmentos 1+4 e 5+8 (**Figura 7C**) foram utilizados para transformação biobalística da cepa selvagem H99.

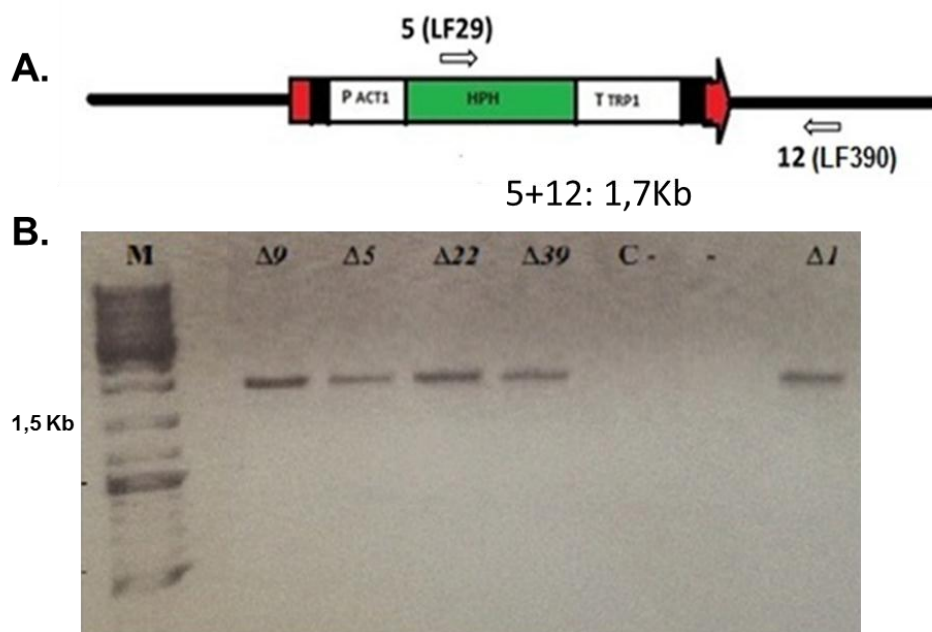


**Figura 7. Construção do cassete de deleção de *RAD53* pelo método de Dupla Junta (KIM *et al.*,2009). A) Representação esquemática da construção do cassete de deleção do gene *RAD53* por PCR dupla-junta. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação dos fragmentos 1. 7+8 = 0,425 Kb corresponde a região adjacente 3' de *RAD53*; 2. 1+2 = 0,480 Kb região adjacente 5' de *RAD53*; 3. 5+6 = 1,235 Kb corresponde a região 3' *HPH*; 4. 3+4 = 1,295 Kb correspondente a região 5' *HPH*. C) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da fusão dos fragmentos adjacentes ao gene alvo com os fragmentos da marca de seleção. 1. Fragmento 1+4 = 1,715 Kb correspondente a fusão 5' *RAD53-HPH*; 2. Fragmento 5+8 = 1,717 Kb correspondente a fusão 3' *RAD53-HPH*; M, marcador de peso molecular 1Kb.**

Fonte: Adaptado de Bravo-Chaucanés, C. (dados não publicados)

A transformação do fungo através de biobalística proporcionou o crescimento de colônias mutantes em placas com meio de cultura YPD contendo o antibiótico Higromicina B, que foram coletadas e repicadas em meio YPD com antibiótico para

extração de gDNA para confirmação da deleção gênica. Os mutantes *rad53Δ* foram submetidos a PCR (**Figura 8**) e Southern Blot (**Figura 9**) para confirmação da deleção. Foram selecionados 5 mutantes para checar a inserção do gene *HPH* no locus de *RAD53*, em seguida foi realizada a PCR com os oligonucleotídeos 5 e 12 que amplificou um fragmento de 1,741 Kb na região 3' do mutante, conforme mostrado na **Figura 7A**. Os mutantes positivos para a região 3' foram: 1, 9, 5, 22, e 39 (**Figura 7B**).



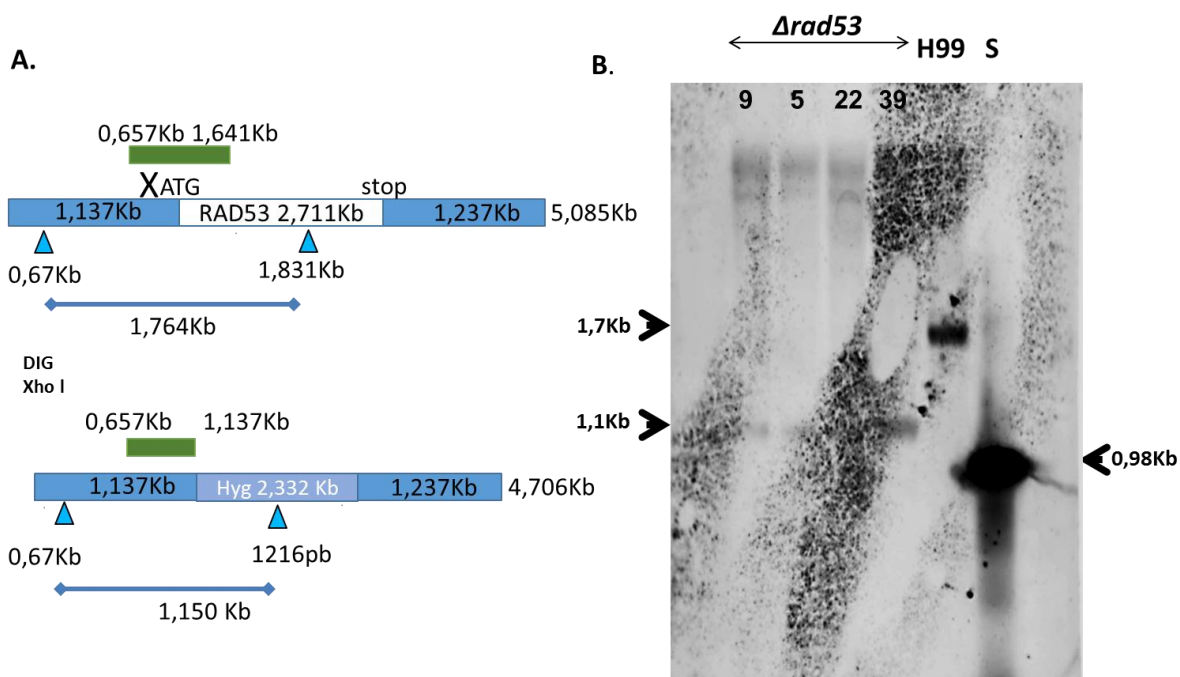
**Figura 8. Confirmação da deleção do gene *RAD53* em *C. neoformans* por PCR.**

**A)** Representação esquemática das posições dos oligonucleotídeos utilizados na confirmação de deleção do gene *RAD53*. **B)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% da confirmação dos possíveis mutantes de *RAD53* (1,9,5,22 e 39), C-: controle negativo - cepa H99. O fragmento amplificado apresentou um tamanho aproximado de 1,7 Kb, confirmando assim a correta deleção do gene *RAD53*. M, marcador de peso molecular 1 Kb.

Fonte: Adaptado de Bravo-Chaucanés, C. (dados não publicados)

Após a confirmação da deleção do gene *RAD53* por PCR, os transformantes foram submetidos ao *Southern Blot* para confirmar que a inserção do cassete de resistência a Higromicina B ocorreu somente no locus do gene-alvo. Na **Figura 9A** observa-se uma representação dos sítios da enzima de restrição *XhoI* no locus de *RAD53*, com representação da sonda de 0,984Kb e o tamanho esperado após hibridização para a linhagem selvagem H99 de 1,7 Kb e para o mutante *rad53Δ* de

1,1 Kb. A **Figura 9B** apresenta o perfil após a hibridização e revelação do *Southern blot*, sendo possível notar os fragmentos de tamanho esperado para todos os possíveis transformantes *rad53Δ* (9, 15, 22 e 39), de 1,1 Kb, confirmando a deleção do gene *RAD53*, enquanto o controle H99 apresentou um fragmento de 1,7 Kb. Dos mutantes confirmados foi escolhido o **39** para a realização dos demais testes fenotípicos.



**Figura 9. Confirmação por *Southern Blot* da deleção de *RAD53* nos mutantes.** O DNA genômico digerido com Xho I foi transferido para membrana de nylon positivamente carregada e hibridizada com a sonda de 0,984 Kb correspondente à região 5' de *RAD53*. **A)** Perfil de restrição para a enzima Xho I. É possível observar um padrão diferente entre os mutantes com um fragmento de 1,150 Kb, e o selvagem H99 de 1,764 Kb. **B)** Confirmação dos transformantes obtidos por *Southern Blot*. Após a hibridização com a sonda foi possível confirmar a deleção do gene *RAD53* nas amostras: 9, 5, 22 e 39. H99: linhagem selvagem, S: sonda (controle positivo)

Fonte: Adaptado de Bravo-Chaucanés, C. (dados não publicados)

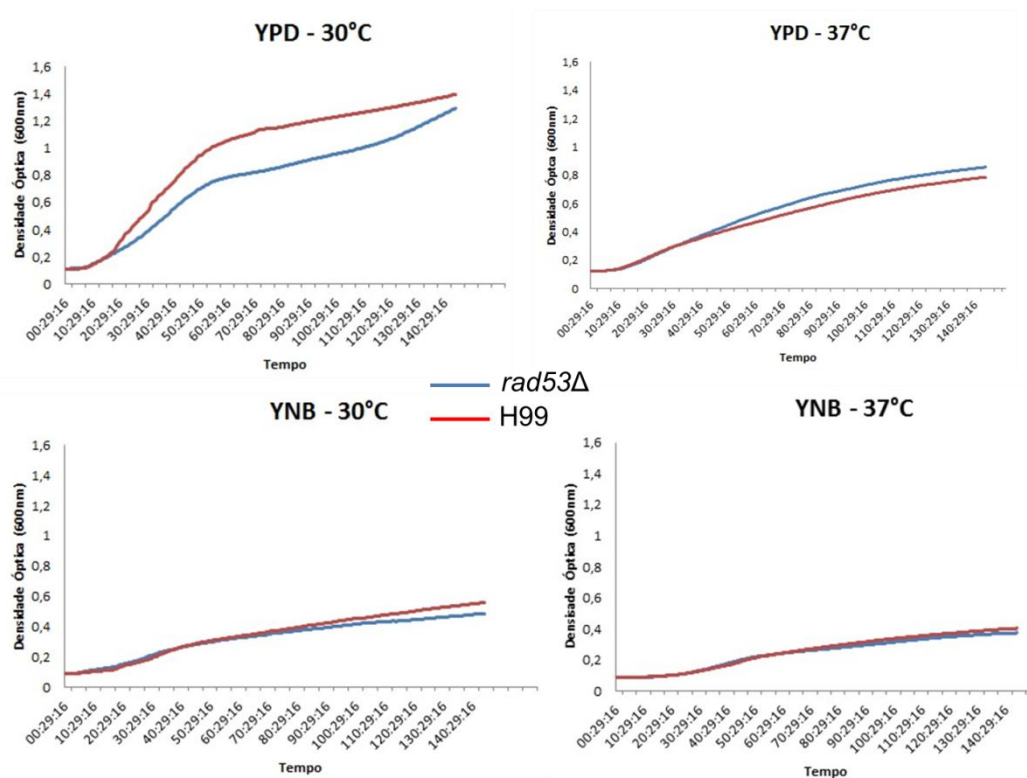
## 5.2 Caracterização fenotípica do *rad53Δ*

Para avaliar o papel de *RAD53* na patobiologia de *C. neoformans*, foram conduzidos diversos testes fenotípicos com o mutante obtido, primeiramente o

mutante *rad53Δ* foi analisado quanto à produção dos fatores de virulência clássicos de *C. neoformans*. Como já descrito na literatura Rad53 é proteína quinase com similaridade à proteína Chk2 em células humanas, que exerce um papel importante na via de transdução de sinal, ativada quando há lesão do DNA para evitar rearranjos do genoma (PELLICOLI & FOIANI, 2005). Para que um patógeno possa desenvolver-se dentro de um hospedeiro mamífero é importante que este microrganismo consiga crescer a 37°C (PERFECT. 2006; LIU *et al.*,2008). A fim de testar se a deleção de *RAD53* altera a capacidade de crescimento a 37°C, foi realizada uma curva de crescimento em 2 meios de cultivo diferentes: YPD (meio completo e rico) e meio YNB (meio definido e mínimo). Como controle as cepas H99 (selvagem) e mutante *rad53Δ* também foram crescidas a 30°C para comparação das curvas de crescimento. **(Figura 10)**. Observou-se que não houve diferença de crescimento entre o mutante *rad53Δ* e o selvagem H99 nos meios líquidos YPD e YNB até 144h, na temperatura de 37° C, no entanto o mutante apresentou um atraso no crescimento, quando comparado com a linhagem H99 a 30° C em YPD, o que não foi detectado em YNB. Em meio YPD sólido também não foi evidenciada sensibilidade a temperatura do mutante *rad53Δ*, em relação ao H99 **(Figura 11 A)**.

Os fenótipos seguintes avaliados neste estudo foram a atividade de fosfolipase e urease. As fosfolipases formam um grupo de enzimas que hidrolisam ligações éster de glicerofosfolipídios, assim as membranas desestabilizam-se, provocando a lise celular e a liberação de lipídios como segundo mensageiro. (GHANNOUM, 2000). A fosfolipase B é importante para a replicação e sobrevivência das leveduras no interior dos fagócitos e disseminação fúngica. (NOVERR *et al.*,2003). Para a análise de atividade de fosfolipase foi utilizado o meio ágar preparado com emulsão de gema de ovo, esta atividade foi detectada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia após 72h de incubação **(Figura 11B)**. A urease é uma enzima hidrolítica secretada também por *C. neoformans*, sua produção possibilita evasão das células do hospedeiro e consequentemente difusão para o sistema nervoso central (SINGH *et al.*,2013). Para a análise de atividade de urease foi utilizado o meio ágar Chirstiansen's, este meio contém uréia e vermelho de fenol que funciona como indicador de pH, à medida que a urease é liberada pelas células o meio foi se tornando rosa pela degradação da uréia. Foi observado que o mutante *rad53Δ* não apresentou comportamento diferente do seu selvagem H99 em

nenhuma das condições testadas, tendo o aparecimento do halo translúcido no meio ágar gema de ovo (**Figura 11B**) e no meio Christianses´s o surgimento de um halo rosa em torno da colônia. (**Dados não mostrados**). A melanina é um pigmento de coloração marrom ou preta que protege as células fúngicas contra fagocitose, estresse oxidativo (WANG & CASADEVALL, 1996), ação de antifúngicos, além de modificar a resposta imune do hospedeiro (GOMES & NOSANCHUK, 2003), assim foi testada a capacidade de melanização do mutante *rad53Δ* no meio ágar *Niger seed* e observou-se que após 120 h no meio *Niger Seed* não houve diferença de melanização entre o mutante *rad53Δ* e o selvagem H99 (**Figura 11C**). Diferente dos resultados obtidos, GARCIA-RODAS e colaboradores (2014) ressaltam correlação dentre ciclo celular e expressão de melanina em *C. neoformans*, uma vez que na ausência da ciclina Cln1 (Cdk1) de G1/S, *C. neoformans* apresentou defeito no processo de melanização devido a alteração da expressão de LAC1 (GARCÍA-RODAS *et al.*,2014).

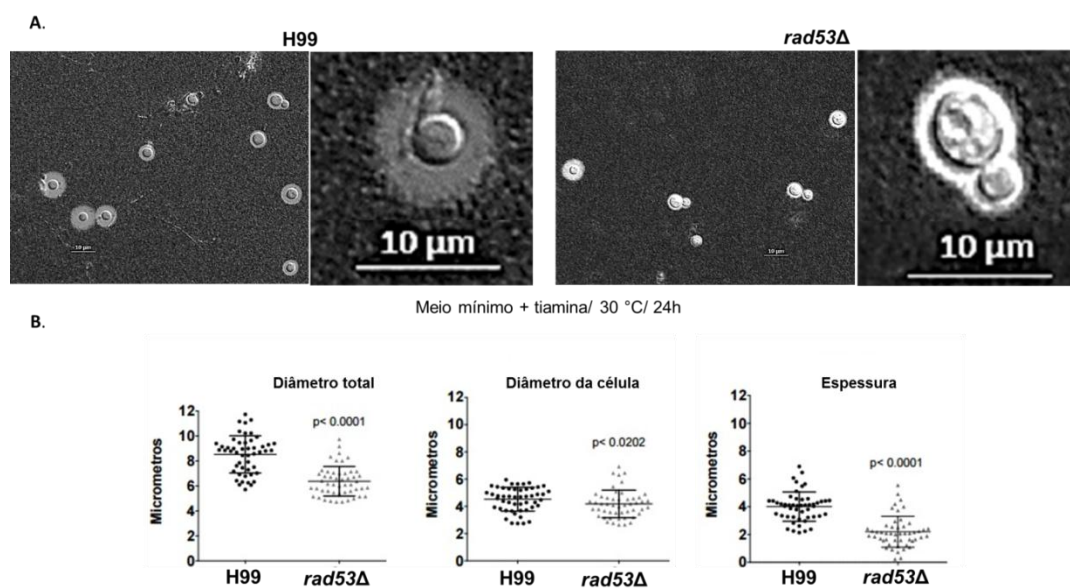


**Figura 10. Curvas de crescimento a 30°C e 37°C de *rad53Δ* em diferentes meios de cultura.** Curva de crescimento a 30°C e 37°C, utilizando  $5 \times 10^4$  células/mL de inóculo inicial por 144 h. A densidade óptica foi medida a 600 nm a cada 30 min, sendo que as medidas foram plotadas nos gráficos. Os meios de cultura utilizados foram YPD e YNB.





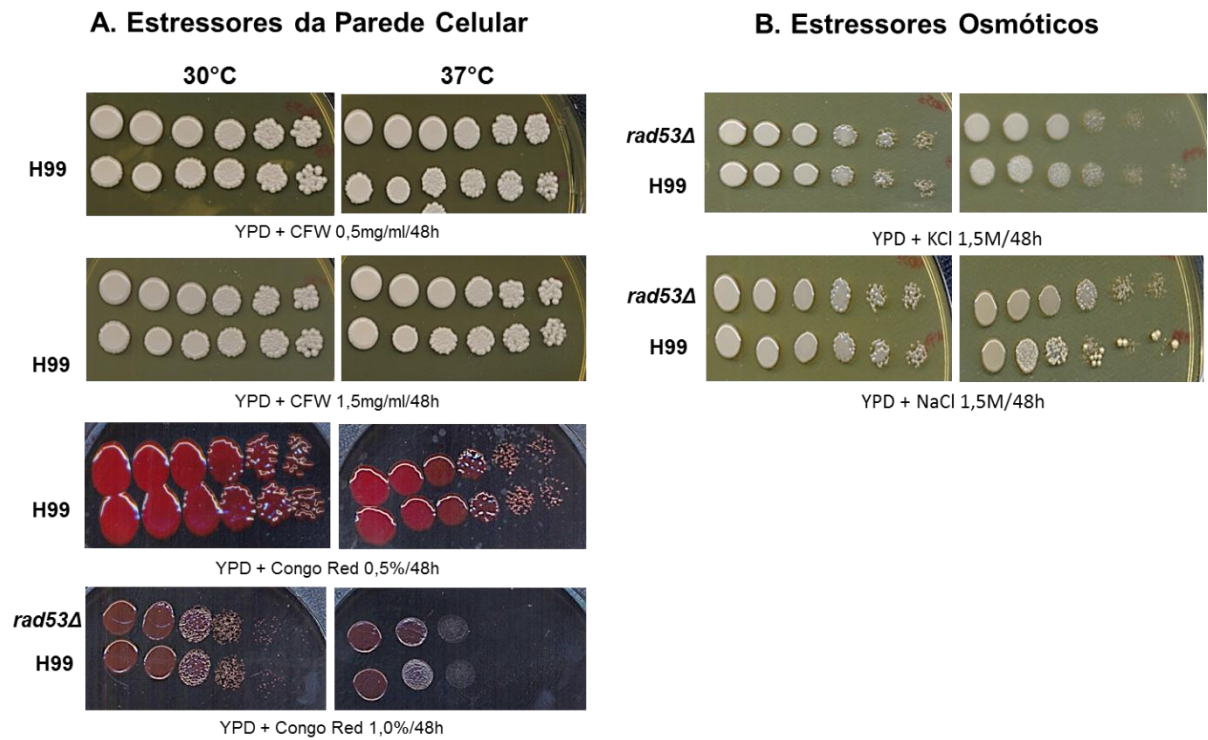
fase G1 (RODAS-GARCIA *et al.*,2014). O tratamento de *C. neoformans* com o inibidor de microtúbulos, Benomil, resultou na inibição da síntese de cápsula, devido a parada do ciclo celular em G2/M, enquanto que a indução da cápsula foi observada tanto quando as células foram tratadas com rapamicina, que induz parada do ciclo celular em G1, como na ausência da ciclina Cln1, uma Cdk1 de G1/S (RODAS-GARCIA *et al.*,2014). Os resultados para o mutante *rad53Δ* demonstram uma diminuição do tamanho da cápsula quando comparado com a linhagem selvagem H99 (**Figura 12A/B**). Estas alterações podem estar relacionadas com possíveis alterações no ciclo celular na ausência de *RAD53*, possivelmente em G2/M, uma vez que esta é uma proteína quinase de checagem do DNA no ciclo celular e sua ausência parece afetar a expressão deste fator de virulência indicando mais uma vez, assim como outros autores relataram, a correlação entre regulação do ciclo celular e expressão de fatores de virulência em *C. neoformans*.



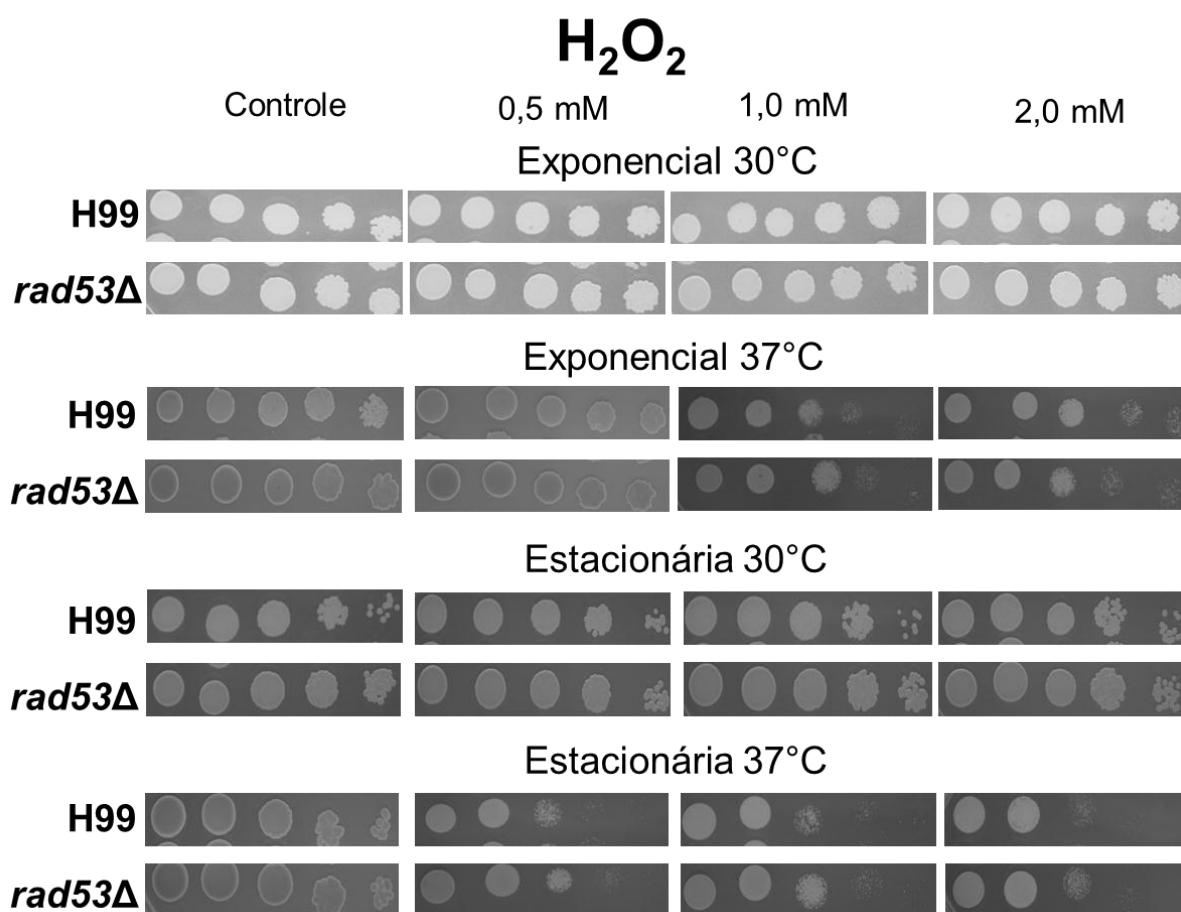
**Figura 12. Avaliação da síntese de cápsula polissacarídica pelo mutante *rad53Δ* de *C. neoformans*.** **A)** A indução de cápsula foi realizada em meio mínimo contendo tiamina após incubação a 30°C/28 h, e visualização com tinta nanquim. **B)** Gráficos representativos dos valores plotados do diâmetro total (cápsula + corpo celular), do diâmetro da célula (corpo celular) e da espessura da cápsula polissacarídica após contagem de 50 células. Teste não paramétrico aplicado para análise estatística Mann Whitney test.  $P < 0,0001$ . Imagens captadas utilizando o microscópio de luz (Axiovert 100, Carl Zeiss), objetiva Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, Escala de 10μm.

Dentre os testes realizados para caracterização do papel de *RAD53*, estão aqueles em que as cepas são submetidas a diferentes agentes estressores para avaliação da capacidade de crescimento. Inicialmente o mutante *rad53Δ* foi submetido a crescimento na presença de Congo red nas concentrações de 0,5 % e 1 %, este é um corante capaz de se ligar a constituintes da parede e afetar a sua montagem e Calcofluor White (0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL) que se liga aos filamentos de quitina também desestabilizando a parede celular. Estes agentes são considerados estressores por interferirem na biogênese de parede, sendo que mutantes defectivos nestas estruturas apresentam defeitos de crescimento na presença dos mesmos. Os resultados mostram que o mutante *rad53Δ* não apresentou nenhum defeito de crescimento nas condições avaliadas, indicando que o gene *RAD53* não apresenta relação com a biogênese da parede de *C. neoformans* (**Figura 13A**), nossos resultados divergem do estudo de Enserink e colaboradores que relatam que o mutante *rad53Δ* em *S. cerevisiae* apresenta alteração de crescimento tanto em SDS 0,01 % quanto em Calcofluor White sugerindo um possível defeito na arquitetura da parede celular (ENSERINK & KOLODNER, 2010). Além disso, GARCIA-RODAS relata que o mutante da ciclina *Cln1* apresentou defeitos de crescimento, especialmente a 37° C, o que pode ser explicado pelo fato de que alguns genes expressos no limite da fase G1 / S estão envolvidos na biossíntese da parede celular. Sendo esta ideia sustentada pelo fato do mutante de *cln1* apresentar defeito de crescimento após a adição de agentes que alteram a estabilidade da parede celular como o Cong Red. (GARCÍA-RODAS *et al.*, 2015). Além disto, as cepas foram avaliadas na presença dos agentes estressores osmóticos NaCl 1,5M, KCl 1,5M (**Figura 13B**) e Sorbitol 2,5M (**dados não mostrados**) que indicam defeitos na permeabilidade da membrana plasmática, no entanto o mutante *rad53Δ* apresentou o mesmo padrão de crescimento observado na cepa selvagem H99 (**Figura 13B**). No presente estudo para avaliar a sensibilidade do mutante a estressor oxidativo foi utilizado meio YPD acrescido de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**Figura 14**) e menadiona (**dados não mostrados**), e não foram detectadas diferenças em nenhuma das condições avaliadas (temperatura 30 e 37° C, células coletadas na fase exponencial e estacionária), ao comparar as linhagens mutante e selvagem. Apesar disto, em *C. albicans*, Dantas e

colaboradores (2010) demonstraram que o crescimento de células polarizadas induzidas por  $H_2O_2$  foi significativamente abolido nas células do mutante *rad53Δ*, que permaneceram exclusivamente na forma de levedura. A função *Rad53* em *C. albicans* é claramente importante para a resposta celular ao ROS, como demonstrado pelo aumento da sensibilidade do *rad53Δ* para  $H_2O_2$ , no entanto em *C. neoformans* *Rad53* parece não estar envolvido na resposta ao estresse oxidativo. Por último, as linhagens foram avaliadas na presença dos agentes genotóxicos: Hidroxiuréia (HU), que causa danos ao DNA através de bloqueio da replicação, Sulfato de cádmio ( $CdSO_4$ ) que promove alquilação do DNA assim como o metilmetanosulfonato (MMS) e a luz UV bloqueando a maquinaria de replicação e transcrição do DNA por induzir a formação de dímeros de Timina. Foi observado que na presença do estressor genotóxico Sulfato de cádmio ( $CdSO_4$ ) nas concentrações testadas de 20  $\mu M$  a 50  $\mu M$ , o mutante não apresentou diferença de crescimento quando comparado com a cepa selvagem H99, entretanto na presença do agente estressor MMS a 0,04%, HU 150 mM e 200 mM e radiação UV o mutante *rad53Δ* apresentou defeito de crescimento quando comparado com a cepa selvagem H99 (**Figura 15**). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Jung e colaboradores (2016), que também detectaram um defeito de crescimento no mutante *rad53Δ* de *C. neoformans* na presença de agentes genotóxicos como MMS (0,02 %), HU (100 mM) e radiação UV (12,5  $\mu J/cm^2$ ). Como se sabe *Rad53* é uma quinase com papel crucial na detecção de danos no DNA no ponto de verificação do ciclo celular, assim, na ausência de *Rad53*, leveduras de *C. neoformans* não são capazes de crescer quando submetidas aos agentes que causam danos no DNA, uma vez que a ativação das vias de reparo e parada do ciclo celular podem estar comprometidas.

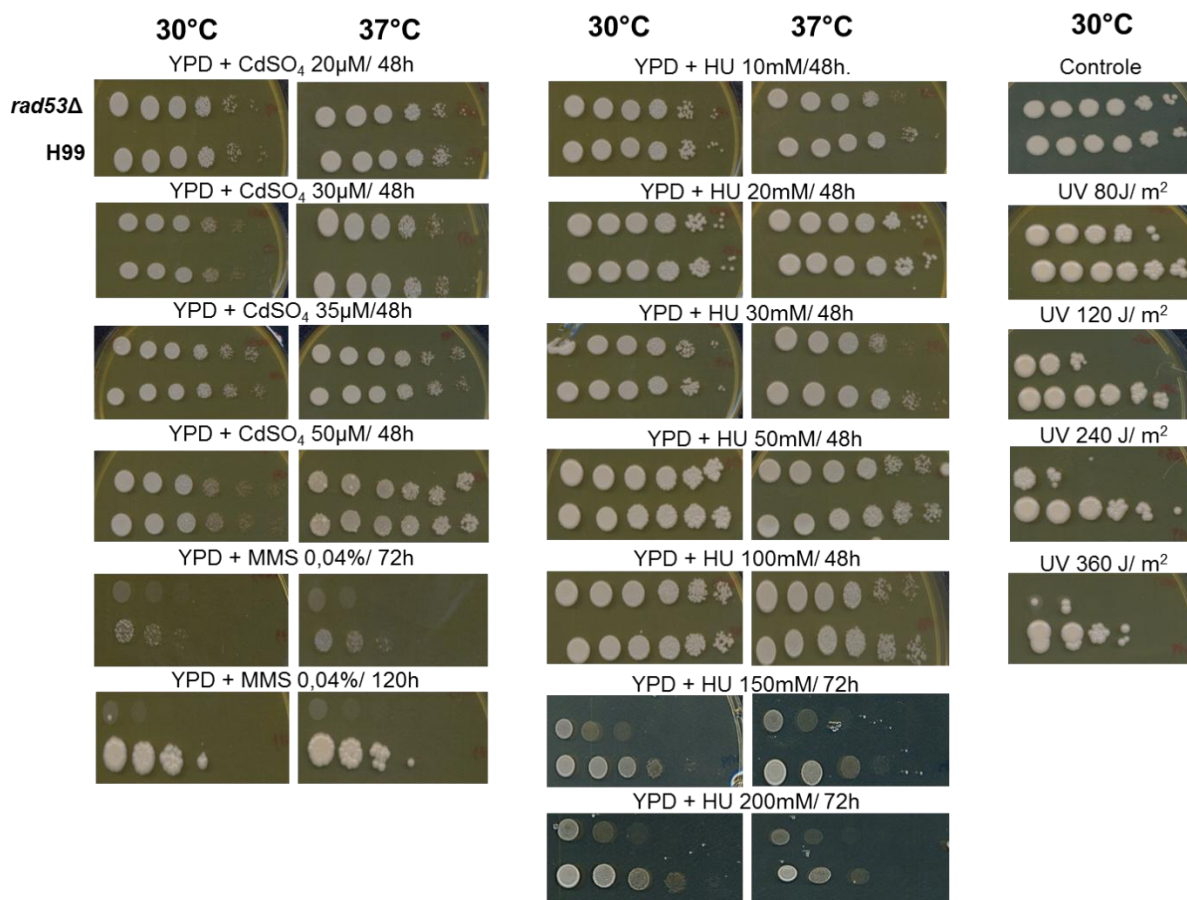


**Figura 13. Avaliação do fenótipo do mutante *rad53Δ* a estressores osmóticos e da parede celular.** Teste realizado em YPD ágar nas temperaturas de 30°C e 37°C. A diluição seriada partiu de  $1 \times 10^8$  levedura por mL, sendo plaqueados 5  $\mu$ L. As concentrações testadas em cada agente e o tempo de incubação estão indicadas na figura. O mutante *rad53Δ* não apresentou diferença de crescimento quando comparado com o selvagem H99.



**Figura 14. Avaliação da sensibilidade do mutante *rad53Δ* ao estressor oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** Teste realizado em meio YPD nas temperaturas de 30°C e 37°C. e crescimento na fase exponencial e estacionária. O mutante *rad53Δ* não apresentou diferença de crescimento quando comparado com o selvagem H99, nas condições testadas. Fonte: Adaptado de Bravo-Chaucanés, C. (dados não publicados)

## Estressores Genotóxicos



**Figura 15. Análise da sensibilidade do mutante *rad53Δ* a agentes estressores genotóxicos.** Teste realizado em YPD ágar nas temperaturas de 30°C e 37°C. A diluição seriada partiu de  $1 \times 10^8$  levedura por mL, sendo plaqueados 5  $\mu$ L. As concentrações testadas em cada agente e o tempo de incubação estão indicadas na figura. O mutante *rad53Δ* não apresentou defeito de crescimento ao estressor CdSO<sub>4</sub> nas condições testadas, entretanto apresentou defeito quanto ao agente MMS na concentração de 0,04 %, HU nas concentrações de 150 mM e 200 mM e quando exposto a radiação UV a 80 J/m<sup>2</sup>, 120 J/m<sup>2</sup>, 240 J/m<sup>2</sup> e 360 J/m<sup>2</sup>.

### 5.3 Ensaio de atividade antifúngica *in vitro* do *rad53Δ*

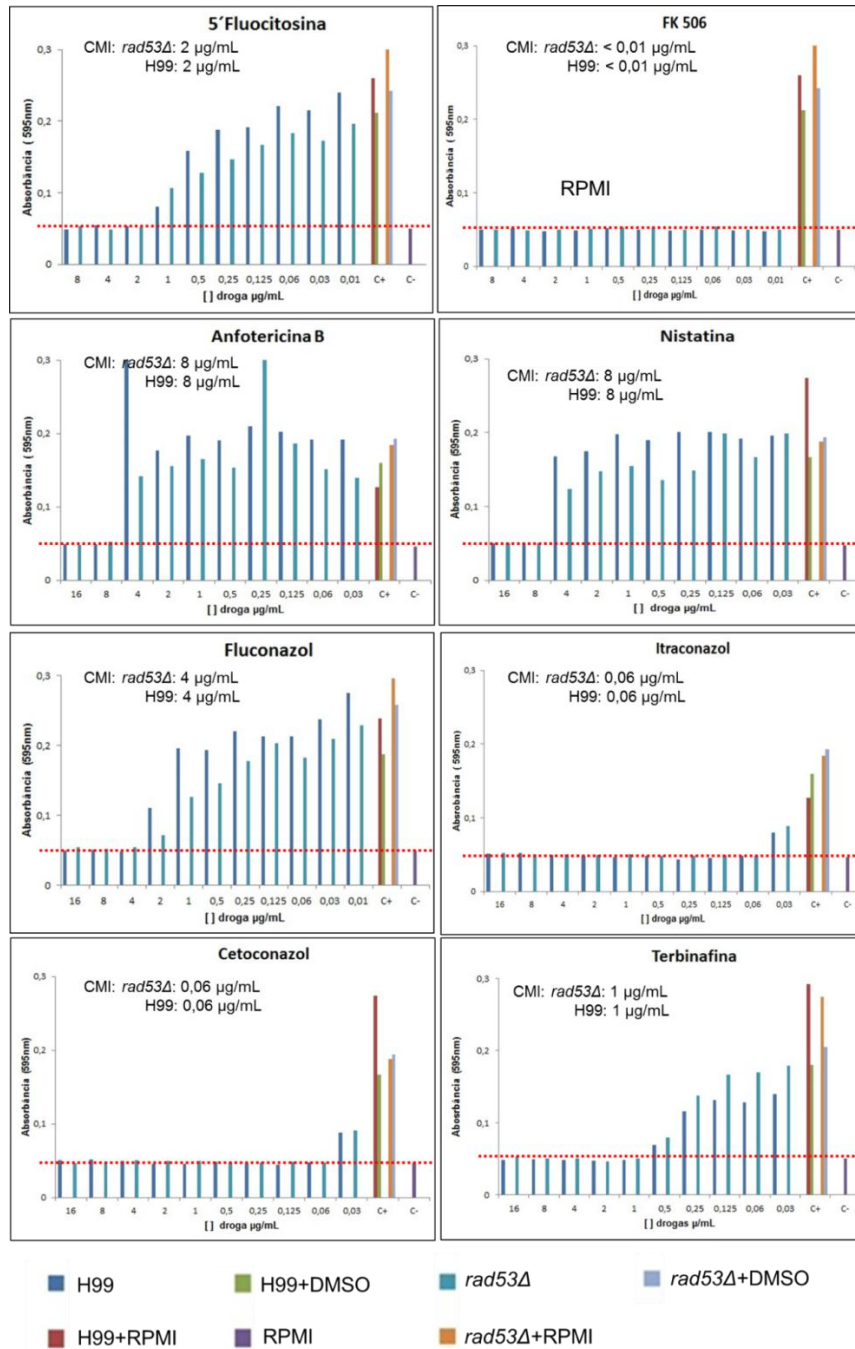
Ainda não há descrito na literatura o perfil de sensibilidade do mutante *rad53Δ* de *C. neoformans*, para a atividade antifúngica às drogas atualmente utilizadas, com diferentes mecanismos de ação, como os azóis (fluconazol, itraconazol e cetoconazol), os polienos (anfotericina B e nistatina) e FK506.



Os polienos - anfotericina B e nistatina, atuam diretamente no ergosterol (CLARCK *et al.*,1996; KARKOWSKA-KULETA, 2009), seu mecanismo de ação está relacionado à forte ligação da droga ao ergosterol prejudicando a homeostase da membrana celular (SHAPIRO; ROBBINS; COWER, 2011). A terbinafina é utilizada principalmente para o tratamento tópico de infecções superficiais e atua inibindo a enzima presente na via da biossíntese do ergosterol, a Erg1, esqualeno epoxidase, consequentemente impedindo a síntese de lanosterol resultando em morte da célula fúngica (KATHIRAVAN *et al.*,2012). A classe dos azóis atua inibindo a enzima Erg11 (14 alfa demetilase) da via da biossíntese do ergosterol (KANAFANI & PERFECT, 2008), como consequência altera a fluidez da membrana e sua integridade, inibindo a replicação celular. (RANG *et al.*,2007). Outras drogas atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos, como as fluoropiridinas (KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009), 5'-Fluocitosina, um antifúngico sintético análogo da pirimidina que possui espectro de ação limitada atuando melhor em infecções sistêmicas por leveduras. A droga tacrolimos (FK 506), possui o mecanismo de ação inibindo a calcineurina, afetando o crescimento celular. (PAPPAS, 2011).

Foram realizados testes a fim de determinar a concentração mínima inibitória de cada uma das drogas estudadas, com o intuito de verificar se o mutante *rad53Δ* poderia acumular mutações decorrentes de danos no DNA não reparados, que poderiam vir a gerar resistências às drogas antifúngicas. Para todas as drogas avaliadas, não foram detectadas diferenças de susceptibilidade entre as linhagens selvagem e mutante *rad53Δ*, sendo as CMI representadas na **Figura 16**.

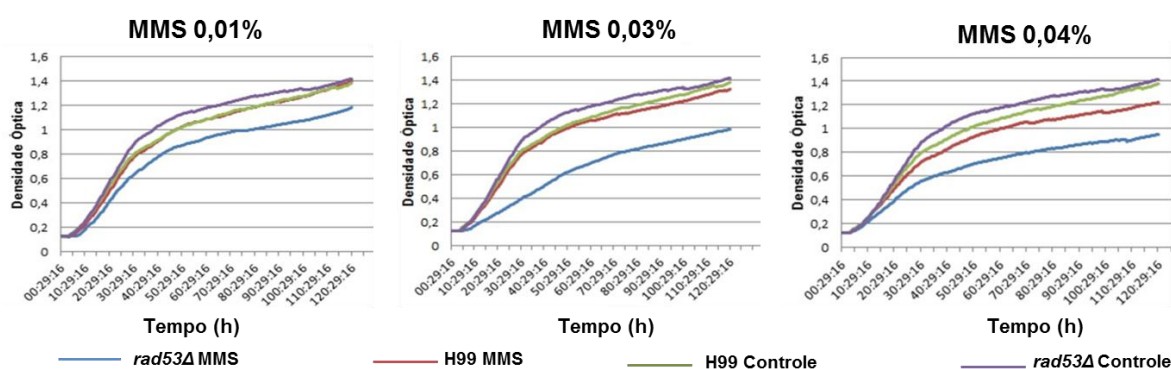




**Figura 16. Avaliação *in vitro* da susceptibilidade do mutante *rad53Δ* as drogas antifúngicas comercialmente disponíveis para tratamento de micoses.** Ensaio realizado com os antifúngicos 5-Fluocitosina, FK 506, anfotericina B, nistatina, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e terbinafina em meio RPMI, usando como controle positivo a linhagem selvagem H99 em comparação com o mutante *rad53Δ* em meio RPMI e meio com 1 % de DMSO sem a presença de drogas, e somente o meio RPMI.

## 5.4 Sincronização celular e citometria de fluxo

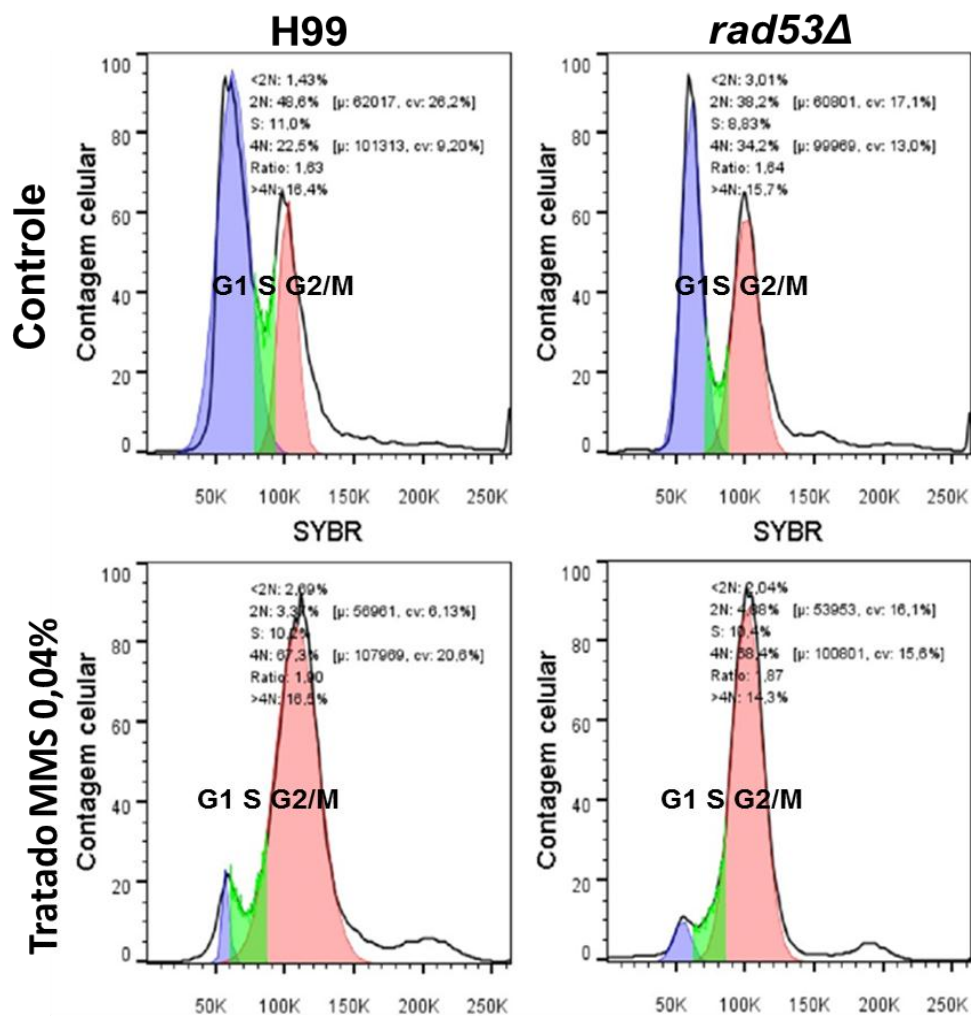
A **figura 17** representa a curva de crescimento do mutante e da linhagem selvagem na presença do agente estressor MMS nas concentrações de 0,01 %, 0,03 % e 0,04 %. Este ensaio foi realizado com o objetivo de se identificar a concentração de MMS em que o mutante *rad53Δ* apresentasse dificuldade de crescimento (devido ao acúmulo de danos no DNA) quando comparado com o selvagem H99, para a realização do experimento de citometria de fluxo. Foi observada uma diminuição de crescimento do mutante *rad53Δ* em relação a H99 em todas as concentrações utilizadas, assim a concentração de MMS de 0,04 % foi definida para o ensaio de citometria de fluxo, onde o mutante *rad53Δ* apresenta defeito de crescimento, mas ainda é capaz de crescer e atingir a fase estacionária.



**Figura 17. Avaliação de crescimento do mutante *rad53Δ* em meio YPD contendo MMS.** Foi avaliado o crescimento do mutante *rad53Δ* em diferentes concentrações de MMS – 0,01; 0,03 e 0,04 %. Observa-se diminuição de crescimento de *rad53Δ* quando comparado com o selvagem H99 em todas as concentrações avaliadas.

Como anteriormente relatado, a proteína Rad53 é uma proteína quinase que exerce um papel importante na via de transdução de sinal, ativada quando há lesão do DNA para evitar rearranjos do genoma. Em *S. cerevisiae* Rad53 está envolvida na regulação do ponto de verificação na fase G2/M do ciclo celular por fosforilar vários substratos envolvidos na progressão do ciclo celular e / ou reparo de danos do DNA (WANG *et al.*, 2012). Pelo fato do mutante *rad53Δ* apresentar defeito de

crescimento quando exposto a agentes genotóxicos, ou seja, agentes que causam danos ao DNA, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo com a linhagem mutante *rad53Δ* e a selvagem H99, após tratamento com MMS 0,04 % por 1 hora para avaliar se o dano gerado no DNA promove alteração na progressão do ciclo celular, na ausência de Rad53. A **figura 18** representa o histograma da distribuição das células da linhagem selvagem H99 e do mutante *rad53Δ* na presença ou ausência do agente estressor MMS nas diferentes fases do ciclo celular. Foi observado que a linhagem selvagem H99 sem tratamento apresenta maior porcentagem de células na fase G1 que G2 e S, enquanto sob tratamento diminui-se na fase G1 e aumenta em G2. O mutante *rad53Δ* sem a presença do agente estressor encontra-se igualmente distribuído na fase G1 e G2, enquanto sob tratamento com MMS apresenta mais células na fase G2. Entretanto essas diferenças analisadas estatisticamente não são significativas. Diferentemente, o mutante *rad53Δ* de *C. albicans*, apresentam um maior acúmulo de células na fase G2, já que a ausência de Rad53 não promove atraso da replicação do DNA em resposta ao tratamento com MMS, consistente com um defeito no ponto de checagem intra-S (SHI et al, 2007). Nota-se que apesar de não haver uma diferença significativa entre o selvagem H99 tratado e o mutante *rad53Δ* tratado, há um aumento sutil do número de células do mutante *rad53Δ* na fase G2, entretanto as condições experimentais, como por exemplo o tempo de recuperação após o tratamento com MMS (2 h) ou a não sincronização das células, não foram adequados para detectar possíveis diferenças na distribuição das células ao longo do ciclo celular em função da ausência de Rad53.

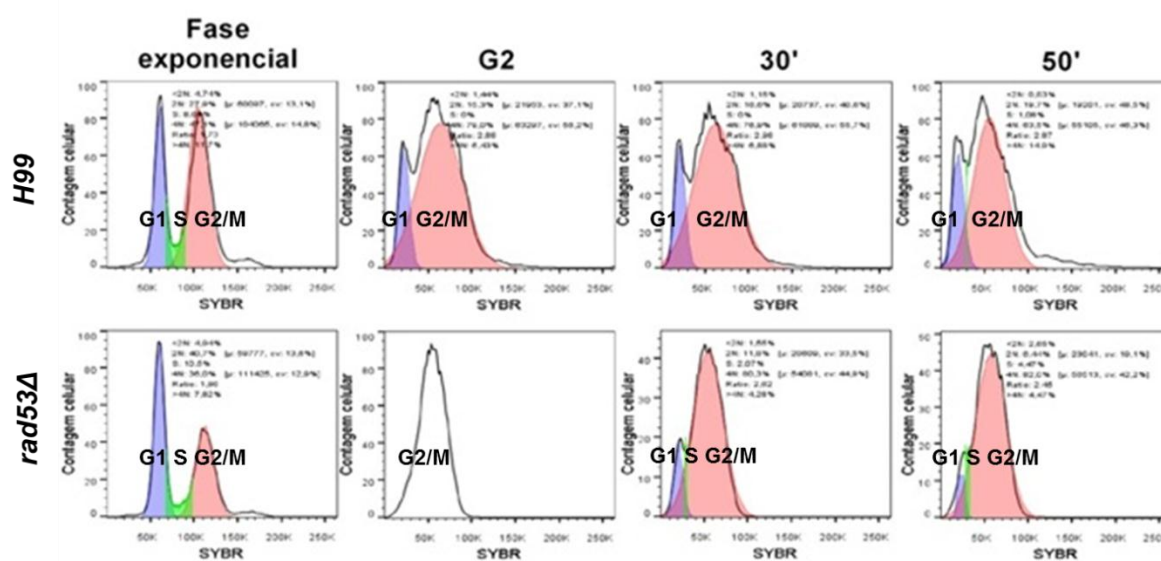


		Controle	MMS
H99	Fase G1	49,6%	3,37%
	Fase S	11%	10,2%
	Fase G2	22,5%	67,3%
<i>rad53Δ</i>	Fase G1	38,2%	4,68%
	Fase S	8,83%	10%
	Fase G2	34,2%	58,4%

**Figura 18. Avaliação do ciclo celular do mutante *rad53Δ* após exposição ao agente genotóxico MMS 0,04 %.** As células foram cultivadas em meio YPD por 1 h e tratadas com 0,04 % de MMS por 1 h. Posteriormente, as células foram cultivadas na ausência de MMS em YPD por 2 h. Histograma da linhagem selvagem H99 e o mutante *rad53Δ* na presença ou ausência do agente estressor MMS e tabela com a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular.

A sincronização celular das leveduras da linhagem selvagem H99 e do mutante *rad53Δ* foi realizada a fim de avaliar o ciclo celular. A **figura 19** representa o histograma das linhagens em cada tempo determinado: fase exponencial, fase G2 tomada como após 5 horas de incubação com aeração limitada, e liberação do ciclo celular em 30 minutos e 50 minutos. Observou-se que na fase exponencial (células não sincronizadas) o mutante *rad53Δ* apresenta maior número de células na fase G1 (40,7%) do que na fase G2 (36%), diferente do seu selvagem H99 que apresenta 27% das células em G1 e 47% em G2. Quando as células são submetidas a aeração limitada por 5 horas, para sincronização do ciclo celular, o mutante *rad53Δ* passa a apresentar 100% das células na fase G2, enquanto que H99 que apresenta a maior parte da população de células na mesma fase (79 %). Após esse período, o ciclo foi liberado uma vez que as células foram submetidas a crescimento sob aeração por período de 30 e 50 minutos. Após 30 minutos de liberação do ciclo celular o mutante *rad53Δ* já apresenta uma diminuição da porcentagem de células na fase G2 (80 %) e aumento nas fases S (2 %) e fase G1 (11 %), enquanto o selvagem H99 diminui sua população em G2 (76%), S mantém-se em zero por cento e em G1 observa-se 16 % das células. Após 50 minutos o mutante *rad53Δ* apresenta sua população distribuída da seguinte forma: G2 (82 %), fase S (4,5 %) e G1 (6,4 %), diferente do selvagem que apresenta 63 % na fase G2 ,1 % em S e 19 % em G1.

Estes resultados corroboram com o trabalho de Ohkusu *et al.*, (2004), em que quando se limita a aeração, as células ficam retidas na fase G2, validando que a sincronização celular ocorreu de maneira efetiva. Estas diferenças de distribuição podem indicar que o *rad53Δ* teria um atraso no ciclo celular quando comparado com o selvagem H99.



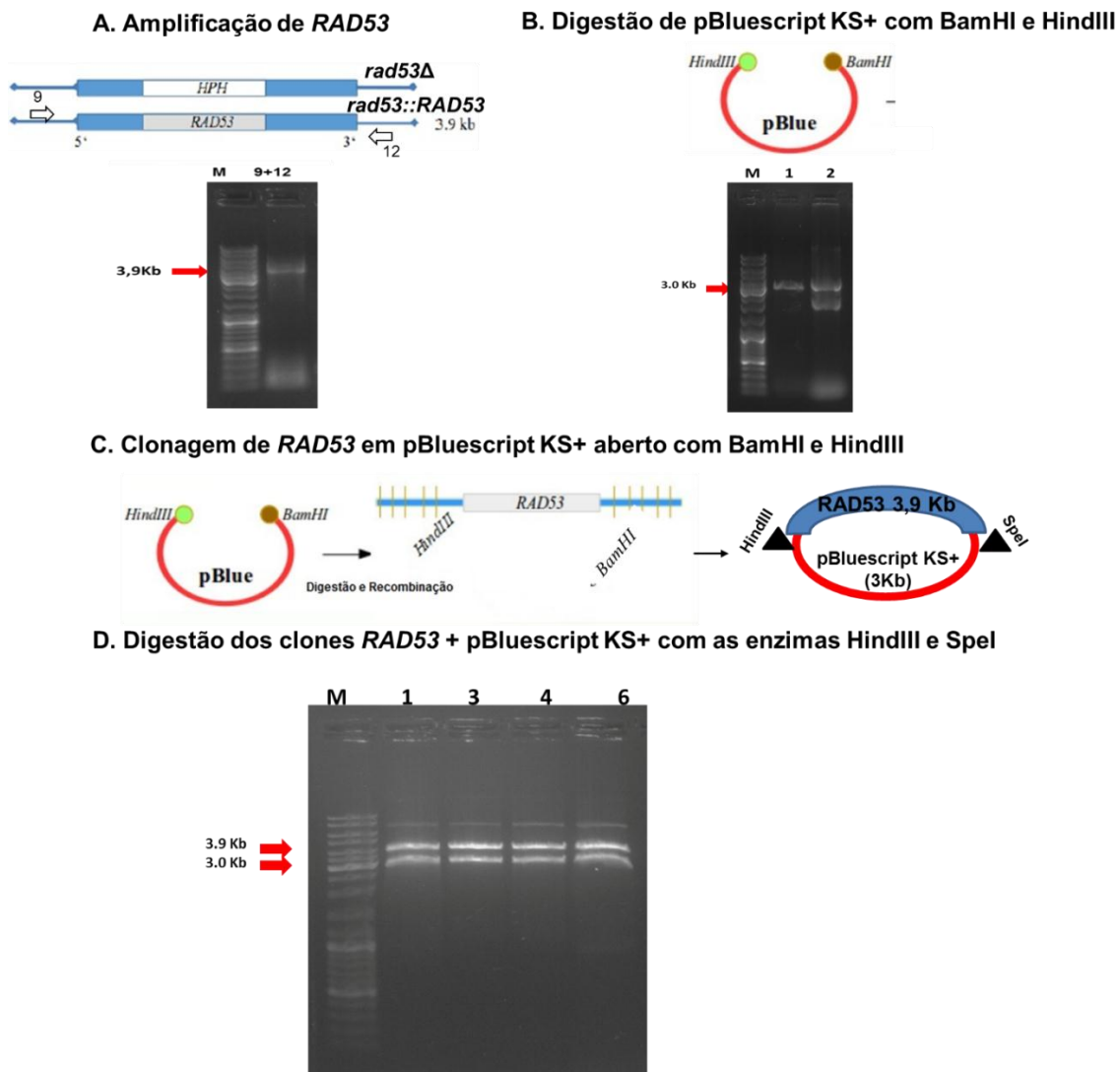
		Fase exponencial	Tempo 0 (5h)	30 minutos	50 minutos
H99	Fase G1	27%	15,3%	16%	19%
	Fase S	8,6%	0%	0%	1%
	Fase G2	47%	79%	76%	63%
<i>rad53Δ</i>	Fase G1	40,7%	0%	11%	6,4%
	Fase S	10,5%	0%	2%	4,5%
	Fase G2	36%	100%	80%	82%

**Figura 19. Sincronização celular das células do mutante *rad53Δ*.** Sincronização celular do selvagem H99 e mutante *rad53Δ*, utilizando técnica de controle de aeração para sincronização celular. Histograma das linhagens em cada tempo determinado: fase exponencial, fase G2 após 5 horas de incubação com aeração limitada, e liberação do ciclo celular em 30 minutos e 50 minutos e tabela com a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular.

### 5.5 Reconstituição do gene *RAD53* no mutante

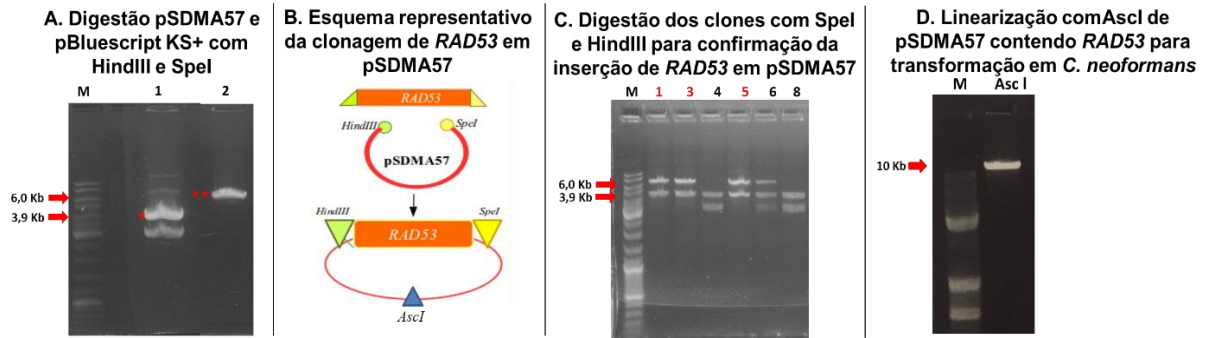
Para a reconstituição do mutante, inicialmente o gene foi amplificado um fragmento de 3,9 Kb por PCR, com os oligonucleotídeos externos 9+12 desenhados para o locus de *RAD53* (Figura 20). Em seguida, este fragmento foi sub-clonado no plasmídeo pBluescript KS+ nos sítios de restrição BamHI e HindIII. Posteriormente o plasmídeo contendo *RAD53* foi digerido com HindIII e SpeI para liberação do inserto que foi purificado e clonado no plasmídeo pSMAD57 digerido previamente com estas mesmas enzimas. Os clones 1,3 e 5 após digestão com HindIII e SpeI

apresentaram duas bandas, a primeira no tamanho de 6,0 Kb correspondente plasmídeo pSMAD57, e outra de tamanho 3,9 Kb correspondente ao fragmento de *RAD53*. Um clone foi linearizado com *Ascl* para transformação por biobalística do mutante *rad53Δ* (todas as etapas de construção do cassete de reconstituição estão descritas nas **figuras 20 e 21**).



**Figura 20. Construção do cassete de reconstituição de *RAD53*.** **A)** Representação esquemática da posição dos oligonucleotídeos para amplificação de *RAD53* para reconstituição do mutante *rad53Δ* e eletroforese em gel de agarose 0,8%, do fragmento de 3,9 Kb referente à amplificação de *RAD53* a partir do DNA genômico de H99. **B)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% confirmando a digestão com as enzimas HindIII e BamHI do plasmídeo pBluescript KS+ para clonagem de *RAD53*, sendo (1) plasmídeo digerido (2) plasmídeo não digerido - 3,0 Kb **C)** Esquema de clonagem de *RAD53* em pBluescript KS+. **D)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% da confirmação dos clones contendo o fragmento de *RAD53*, após a digestão com as enzimas HindIII e SpeI. Observa-se um fragmento de 3,9 Kb correspondente *RAD53* e outro de 3,0 Kb correspondente ao plasmídeo pBluescript KS+. M, marcador de peso molecular 1 Kb.



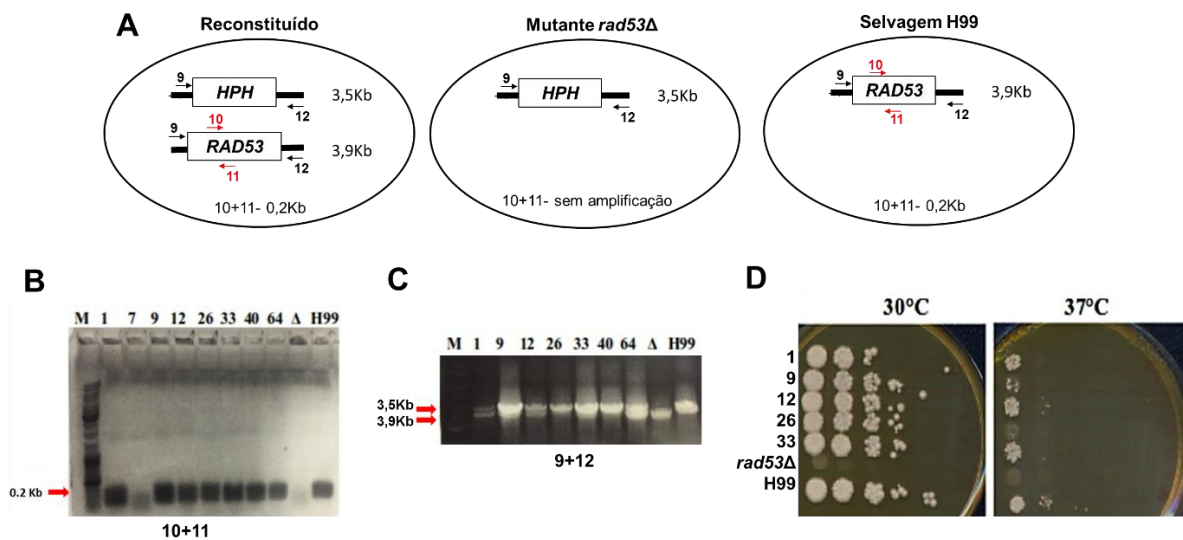


**Figura 21. Clonagem de *RAD53* no plasmídeo pSMAD57 para transformação em *C. neoformans*** **A)** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da digestão com as enzimas HindIII e SpeI do plasmídeo pBLuescript KS+/*RAD53* (3,0 Kb e 3,9Kb) (1) e pSMAD57 (6,0 Kb) (2). Os asteriscos indicam os fragmentos purificados para as etapas subsequentes **B)** Esquema da ligação do fragmento de *RAD53* ao plasmídeo pSMAD57. **C)** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da digestão com as enzimas HindIII e SpeI dos clones de *E. coli*, para confirmação da inserção de *RAD53*. O fragmento de 3,9 Kb corresponde a *RAD53* e 6,0 Kb correspondente ao pSMAD57. **D)** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % da digestão do plasmídeo contendo fragmento de *RAD53*, gerando uma única banda de 10 Kb. M, marcador de peso molecular 1 Kb

## 5.6 Confirmação da reconstituição do gene *RAD53*

A confirmação da reconstituição do gene *RAD53* primeiramente foi realizada através do PCR com oligonucleotídeos internos (10+11) desenhados para amplificar a ORF de *RAD53* (fragmento de 0,2 Kb) e também foram usados oligonucleotídeos externos desenhados para amplificar o cassete *HPH* e *RAD53* (9+12) (**Figura 22A**). Utilizando os oligonucleotídeos 10+11 as amostras positivas foram: 1, 9, 12, 26, 33, 40 e 64, sendo o controle negativo DNA genômico de *rad53* que não apresenta o gene (**Figura 22B**). As amostras confirmadas foram selecionadas para a PCR com os oligonucleotídeos externos 9+12, sendo observado nos possíveis reconstituídos 1,9,12,26,33 e 64 dois fragmentos, sendo de 3,9 Kb referente a presença de *RAD53* (*no locus safe haven*) e outra de tamanho de 3,5 Kb, referente a amplificação de *HPH* presente no locus de *RAD53*. Assim, a linhagem selvagem H99 utilizada como controle positivo apresentou uma banda de tamanho 3,9 Kb e o mutante *rad53Δ* utilizado como controle negativo apresentou uma banda de tamanho 3,5 Kb, os

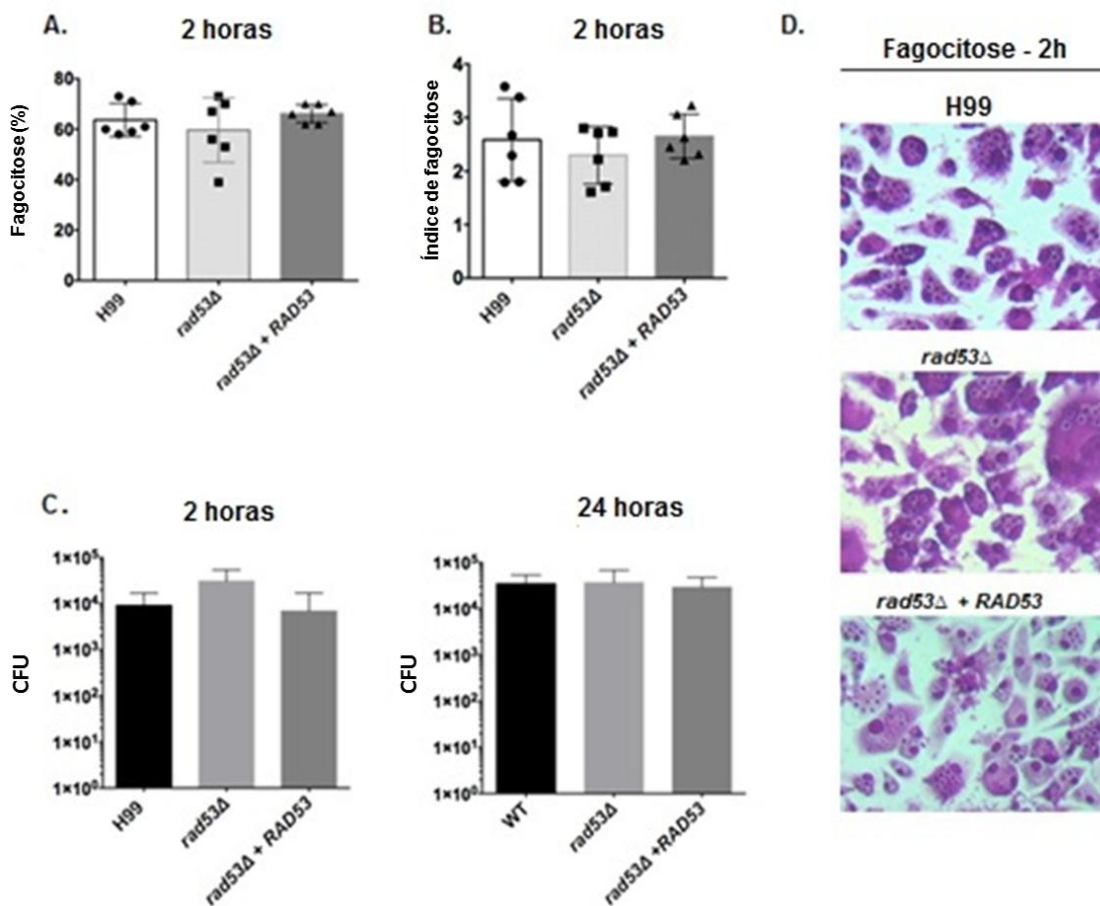
possíveis reconstituídos apresentaram os dois fragmentos e indicam a reconstituição do gene *RAD53* (**Figura 22C**), que por sua vez foi confirmada pelo fenótipo de resistência a MMS 0,04 % (**Figura 22D**). Foi observado o crescimento das colônias dos possíveis reconstituídos 1, 9, 12, 26 e 33 comportando-se de maneira igual ao selvagem H99 tanto na temperatura de 30°C e 37°C, confirmando assim que houve a reconstituição do gene *RAD53*, pois reconstituídos e o selvagem apresentaram-se resistentes a MMS enquanto que o mutante foi incapaz de crescer nesta condição.



**Figura 22. Confirmação da Reconstituição do gene *RAD53* por PCR.** **A)** Esquema de confirmação de reconstituição do gene *RAD53*. Ao utilizar oligonucleotídeos apropriados, as amplificações verificaram a reconstituição do gene *RAD53* que foi inserido via plasmídeo pSDMA57 na linhagem *rad53Δ*. **B)** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do produto da PCR utilizando oligonucleotídeos internos (10 +11) gerando um fragmento de 0,2 Kb (1, 9, 12, 26, 33, 40, 64) para referente ao gene *RAD53*. **C)** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % utilizando os oligonucleotídeos 9+12 que gerou dois fragmentos (linhas 1, 9, 12, 33 e 64), um de 3,5 Kb correspondente ao HPH inserido no mutante *rad53Δ* e um fragmento de 3,9 Kb correspondente ao *RAD53*. **D.** Confirmação de reconstituição do gene *RAD53* por teste *in vitro* de fenótipo YPD + MMS 0,04 %. As células de tipo selvagem (H99), *rad53Δ* mutante e várias cepas que expressam o gene reconstituído (*RAD53*) foram diluídas em série ( $1 \times 10^8$  células / mL), aplicadas em placas YPD contendo 0,04% de MMS e incubou-se a 30 °C e a 37 °C durante 120 h. M, marcador de peso molecular 1 Kb

### 5.7 Avaliação da sobrevivência do mutante *rad53*Δ em macrófagos M1

Sabe-se que as leveduras de *C. neoformans* são capazes de sobreviver e proliferar dentro de macrófagos (FELDMESSER *et al.*,2000). Utilizando desta informação fez-se necessária a avaliação da capacidade de sobrevivência do mutante *rad53*Δ após fagocitose. A virulência do mutante *rad53*Δ de *C. neoformans* pode ser inferida a partir da avaliação da taxa de fagocitose e sobrevivência dos fungos. Os resultados deste ensaio mostraram que o mutante *rad53*Δ não apresentou diferença de porcentagem de fagocitose quando comparado com o selvagem H99, assim como o seu reconstituído, que também apresentou taxas semelhantes à cepa selvagem H99, ou seja, estes foram fagocitados em número igual (**Figura 23**). O índice de fagocitose foi calculado através da quantidade total de leveduras fagocitadas pelo número de macrófagos que participaram da fagocitose (**Figura 23B**), corroborando com o dado anterior, não há diferenças quanto à fagocitose, ao comparar o mutante *rad53*Δ com a cepa selvagem H99. Após os macrófagos serem lisados, as leveduras internalizadas foram semeadas em meio YPD para a contagem de colônias (**Figura 23C**). O mutante *rad53*Δ não apresentou UFC diferente do selvagem H99, no período de 2 horas corroborando com o fato do mutante *rad53*Δ não apresentar diferença de fagocitose no período de 2 horas, e no período de 24 horas dessa forma pode-se afirmar que o mutante *rad53*Δ não é essencial para a sobrevivência de *C. neoformans* no interior de macrófagos.



**Figura 23. Avaliação da sobrevivência do mutante *rad53Δ* após fagocitose por macrófagos M1.** As células de *C. neoformans* pré-opsonizadas com 18B7 foram adicionadas aos macrófagos numa proporção de 2: 1 (leveduras : macrófagos) e as placas foram incubadas durante 2 h a 37°C em 5 % de CO<sub>2</sub>. **A)** Gráfico de porcentagem de fagocitose, determinada pelo número de macrófagos com levedura internalizada. **B)** Índice de fagocitose determinado por número de levedura por macrófago. **C)** Determinação de UFC após fagocitose por macrófagos M1, após 2 e 24 horas. Os macrófagos foram lisados e alíquotas iguais de cada condição foram plaqueadas em ágar YPD e incubadas a 30 °C durante 2 dias. **D)** Imagem da fagocitose após 2 horas de incubação. Teste estatístico: ANOVA de sentido único.

## 6. CONCLUSÕES

Conclui-se que *RAD53* que codifica uma proteína quinase envolvida no processo de checagem de dano ao DNA, não interfere em alguns dos principais fatores de virulência de *C. neoformans*, não apresentando defeito na produção de melanina, urease, fosfolipase B e capacidade de crescimento a 37°C. O mutante *rad53Δ* também não apresentou sensibilidade quando exposto a agentes estressores da parede celular, osmóticos ou oxidativos. Ao avaliar a susceptibilidade do mutante *rad53Δ* às drogas antifúngicas não foi observado aumento da resistência por possíveis acúmulos de danos no genoma decorrentes da ausência de reparo ao DNA. Ao avaliar a sobrevivência do mutante *rad53Δ* após fagocitose por células de macrófago M1, foi observado que o mutante *rad53Δ* apresentou mesma taxa de sobrevivência quando comparado com o selvagem H99. Entretanto quando o mutante *rad53Δ* foi submetido a agentes genotóxicos como MMS, HU e radiação UV, foi observado um defeito de crescimento. Assim, o ensaio de citometria de fluxo na presença do agente genotóxico MMS ou mesmo na sincronização celular sugere que o mutante *rad53Δ* possui um atraso no ciclo celular na fase G2, quando comparado com o selvagem H99. Além disso, o mutante *rad53Δ* apresentou cápsula diminuída quando comparado com o seu selvagem H99. Todos os nossos dados corroboram com os de LEE *et al* (2016) e JUNG *et al* (2016). Este trabalho de biologia molecular básica gerou maior conhecimento da patobiologia e do ciclo celular de *C. neoformans* que poderá futuramente ser aplicado para o desenvolvimento de estratégias para tratamento desta doença. Assim, devido ao crescente aumento do número de indivíduos acometidos por infecções causadas por este fungo patogênico oportunista, este trabalho de biologia molecular básica se mostrou relevante para obter maior conhecimento da patobiologia de *C. neoformans*.

## 7. PERSPECTIVAS

Como perspectiva deste trabalho pretende-se avaliar a expressão dos genes envolvidos na via de regulação e resposta do dano ao DNA na ausência de *RAD53*. Além disso, o trabalho tem como perspectiva avaliar por citometria de fluxo o ciclo celular das células sincronizadas submetidas a estressores genotóxicos além da susceptibilidade do mutante às drogas antifúngicas após tratamento com agentes genotóxicos.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BÄHLER, Jürg. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 69-94, 2005.
- BUCHANAN, Kent L.; MURPHY, Juneann W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.
- CALVO, Belinda M. et al. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2348-2350, 2001.
- CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington, DC: ASM press, 1998.
- CLARK, F. S. et al. Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in *Candida* species: possible role for drug efflux in drug resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 419-425, 1996.
- Comas-Riu J, Rius N. Flow cytometry applications in the food industry. **J Ind Microbiol Biotechnol** 36 8: 999-1011, 2009.
- DA SILVA DANTAS, Alessandra et al. Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 19, p. 4550-4563, 2010.
- 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
- DROMER, F.; LEVITZ, S. M. Invasion of *Cryptococcus* into the central nervous system. ***Cryptococcus: from human pathogens to model yeasts***. Washington, DC: ASM, p. 465-71, 2011.
- ENSERINK, Jorrit M. et al. Checkpoint proteins control morphogenetic events during DNA replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of cell biology**, v. 175, n. 5, p. 729-741, 2006.

- ENSERINK, Jorrit M.; KOLODNER, Richard D. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. **Cell division**, v. 5, n. 1, p. 11, 2010.
- FELDMESSER, Marta et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225-4237, 2000.
- FINN, Karen; LOWNDES, Noel Francis; GRENON, Muriel. Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 9, p. 1447-1473, 2012.
- FRASES, Susana et al. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1228-1233, 2009.
- FOX, Deborah S.; DJORDJEVIC, Julianne T.; SORRELL, Tania C. Signaling cascades and enzymes as *Cryptococcus* virulence factors. In: **Cryptococcus**. American Society of Microbiology, 2011. p. 217-234.
- GARCÍA-RODAS, Rocío et al. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e00945-14, 2014.
- GARCÍA-RODAS, Rocío et al. Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.
- GHANNOUM, Mahmoud A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.
- GÓMEZ, Beatriz L.; NOSANCHUK, Joshua D. Melanin and fungi. **Current opinion in infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 91-96, 2003.
- HEISS, Christian et al. The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains  $\beta$ -D-glucuronic acid. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 7, p. 915-920, 2009.
- HOGAN, Laura H.; KLEIN, Bruce S.; LEVITZ, Stuart M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-488, 1996.
- HULL, Christina M.; HEITMAN, Joseph. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Genetics**, v. 36, n. 1, p. 557-615, 2002.
- IDNURM, Alexander et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753-764, 2005.
- 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.
- JUNG, Kwang-Woo et al. Unraveling Fungal Radiation Resistance Regulatory Networks through the Genome-Wide Transcriptome and Genetic Analyses of *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 7, n. 6, p. e01483-16, 2016.
- KANAFANI, Zeina A.; PERFECT, John R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.
- KARKOWSKA-KULETA, Justyna et al. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211, 2009.
- KATHIRAVAN, Muthu K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.
- KELLIHER, Christina M.; HAASE, Steven B. Connecting virulence pathways to cell-cycle progression in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Current Genetics**, p. 1-9, 2017.
- KELLIHER, Christina M. et al. Investigating Conservation of the Cell-Cycle-Regulated Transcriptional Program in the Fungal Pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 12, p. e1006453, 2016.
- KIM, Min Su et al. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. **BBRC 390**, 983-988, 2009
- KWON-CHUNG, Kyung J. et al. Systematics of the genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. In: **Cryptococcus**. American Society of Microbiology, 2011. p. 3-15.
- KWON-CHUNG, Kyung J. et al. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357-16, 2017.
- LEE, Kyung-Tae et al. Systematic functional analysis of kinases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Nature Communications**, v. 7, 2016.
- LIU, Oliver W. et al. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 174-188, 2008.
- LOLL-KRIPPLEBER, Raphaël et al. A study of the DNA damage checkpoint in *Candida albicans*: uncoupling of the functions of Rad53 in DNA repair, cell

- cycle regulation and genotoxic stress-induced polarized growth. **Molecular microbiology**, v. 91, n. 3, p. 452-471, 2014.
- LUTZ, Manfred B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of immunological methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999
- MEYER, Wieland et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical mycology**, v. 47, n. 6, p. 561-570, 2009.
- MORGAN, David Owen. **The cell cycle: principles of control**. New Science Press, 2007.
- NICOLA, André Moraes et al. Macrophage autophagy in immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 80, n. 9, p. 3065-3076, 2012.
- NOSANCHUK, Joshua D.; CASADEVALL, Arturo. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003.
- NOVERR, Mairi C. et al. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1538-1547, 2003.
- OHKUSU, Misako; RACLAVSKY, Vladislav; TAKEO, Kanji. Induced synchrony in *Cryptococcus neoformans* after release from G2-arrest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 1, p. 37-44, 2004.
- PAPPAS, Peter G. Antifungal Trials: Progress, Approaches, New Targets, and Perspectives in Cryptococcosis. In: **Cryptococcus**. American Society of Microbiology, 2011. p. 527-536.
- PARK, B. J. et al. Public health importance of cryptococcal disease: epidemiology, burden and control. **Cryptococcus: from Human Pathogen to Model Yeast**, p. 585-593, 2011.
- PELLICIOLI, Achille; FOIANI, Marco. Signal transduction: how rad53 kinase is activated. **Current biology**, v. 15, n. 18, p. R769-R771, 2005.

- PIROFSKI, Liise-Anne; CASADEVALL, Arturo. Acquired Humoral Immunity to *Cryptococcus neoformans*. In: **Cryptococcus**. American Society of Microbiology, 2011. p. 397-428.
- RAJASINGHAM, Radha et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, 2017.
- SHAPIRO, Rebecca S.; ROBBINS, Nicole; COWEN, Leah E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.
- SHI, Qing-Mei et al. Critical Role of DNA Checkpoints in Mediating Genotoxic-Stress-induced Filamentous Growth in *Candida albicans*. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 3, p. 815-826, 2007.
- SILVA, Fabiana Brandão Alves. Aspectos epigenéticos da virulência em *Cryptococcus neoformans*: papel das histonas desacetilases. 2016.
- SINGH, Arpita et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013.
- STEENBERGEN, Judith N.; CASADEVALL, Arturo. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and infection**, v. 5, n. 7, p. 667-675, 2003.
- SUN, Ling Ling et al. Protein phosphatase Pph3 and its regulatory subunit Psy2 regulate Rad53 dephosphorylation and cell morphogenesis during recovery from DNA damage in *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 11, p. 1565-1573, 2011.
- TOFFALETTI, DENA L. et al. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 5, p. 1405-1411, 1993.
- 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.
- VIRTUDAZO, Eric V. et al. The single Cdk1-G1 cyclin of *Cryptococcus neoformans* is not essential for cell cycle progression, but plays important roles in the proper

- commitment to DNA synthesis and bud emergence in this yeast. **FEMS yeast research**, v. 10, n. 5, p. 605-618, 2010.
- ZARAGOZA, Oscar; CASADEVALL, Arturo. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biol Proced Online**, v. 6, n. 1, p. 10-15, 2004.
- ZARAGOZA, Oscar et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, v. 68, p. 133-216, 2009.
- WANG, Yulin; CASADEVALL, Arturo. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 541-545, 1996.
- WANG, Haitao et al. Pph3 dephosphorylation of Rad53 is required for cell recovery from MMS-induced DNA damage in *Candida albicans*. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e37246, 2012.