

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**Caracterização do mecanismo de ação do composto natural
plumieridina contra *Cryptococcus gattii***

Dissertação de Mestrado

ADRIANA CORRÊA DA SILVA

Porto Alegre, março de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**Caracterização do mecanismo de ação do composto natural
plumieridina contra *Cryptococcus gattii***

Dissertação de Mestrado

ADRIANA CORRÊA DA SILVA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Prof^a Dr^a Marilene Henning Vainstein
Orientadora

Prof^a Dr^a Lívia Kmetzsch Rosa e Silva
Coorientadora

Porto Alegre, março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma com a conquista deste mestrado, do caminho até à pós-graduação, o apoio diário até o fim desta etapa e preparação para os próximos desafios que serão trilhados.

Às minhas orientadoras, Prof^a Marilene e Prof^a Lívia, pela confiança, oportunidade e orientação. Ao Prof^o Charley pelos aconselhamentos. O apoio de vocês foi fundamental para minha formação profissional.

À Prof^a Gilsane, que me recebeu com grande carinho em seu laboratório. Foi muito importante para este trabalho o acolhimento dado pela professora e por todo o grupo do laboratório de Farmacognosia.

À todos do Lab 220 e Lab 217, agradeço a companhia, risadas e momentos de ajuda. Em especial à Vanessa Barcelos que dividiu este trabalho comigo desde o início que sempre foi tão amiga ao longos destes anos.

Agradeço os debates e contribuições do grupo de Fármacos Antifúngicos.

À todos os funcionários do CBiot, que sempre foram muito cordiais e prestativos. Agradeço a todos da secretaria do PPGBCM pela atenção, em especial à Silvinha, pelo bom-humor e carinho sincero.

À comissão de acompanhamento, Prof^o Marcio Rodrigues e Prof^o Diego Bonatto pelas contribuições.

Por fim, mas não menos importante: À minha família!

À minha mãe, pelo grande amor e ajuda. Uma das minhas grandes motivações era te dar orgulho ao completar mais esta etapa. Espero tê-lo feito da melhor forma possível. Ao meu pai pelo apoio e ao Miguel, meu sobrinho, que espero servir de ser exemplo.

Às amigas Shariza, Lucila, Luciana e Gabriela. Desculpa pela ausência e obrigada pela amizade e apoio sempre.

À minha sogra, sogro, cunhado e toda família Rolim... Pelo carinho, torcida, apoio e finais de semana muito mais felizes e cheios de risadas!

Ao Guilherme Rolim... Obrigada pelo porto seguro que agora é nossa casa, juntos! Morar contigo foi o grande marco de vida durante o mestrado! Obrigada pelos conselhos de vida, os conselhos científicos, pelo amparo e apoio que nenhuma outra pessoa poderia dar.

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade".

Marie Curie

(a primeira mulher a receber o Prêmio Nobel - Prêmio Nobel de Física em 1903; Prêmio Nobel de Química em 1911).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Criptococose	10
1.1.1 <i>Cryptococcus gattii</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	13
1.1.2 Fatores de virulência dos agentes etiológicos	15
1.1.2.1 <u>Cápsula Polissacarídica</u>	15
1.1.2.2 <u>Produção de Melanina</u>	18
1.1.2.3 <u>Capacidade de crescimento à 37°C</u>	19
1.1.2.4 <u>Outros fatores de virulência</u>	20
1.1.3 Diagnóstico e tratamento da criptococose	21
1.2 Antifúngicos	23
1.2.1 Classe dos Azóis	26
1.2.2 Classe dos Polienos	27
1.2.3 Classe das Equinocandinas	28
1.2.4 Flucitosina	28
1.3 Desafios no tratamento das doenças fúngicas	29
1.4 Compostos naturais	30
1.4.1 Iridóides	31
1.4.2 Atividade antifúngica de iridóides.....	32
2 OBJETIVOS	34
3 MANUSCRITO CIENTÍFICO	35
Abstract.....	36
Introduction	37
Materials and methods	38
Results	44
Discussion	54
Acknowledgements	59
References	59
4 DISCUSSÃO GERAL	66
5 PERSPECTIVAS	73
6 REFERÊNCIAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
5-FC	5-Flucitosina
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
AmB	Anfotericina B
CCD	cromatografia em camada delgada
CO ₂	dióxido de carbono
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation</i>
FLC	Fluconazol
GXM	glucuronoxilomanana
H	Hora
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
L	Litros
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
MFC	<i>Minimum Fungicidal Concentrations</i>
mg	Miligramas
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
mL	mililitro
MM	Meio Mínimo
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -Morfolino) propanosulfônico
ng	nanogramas
OMPdecase	Orotidina 5'-Fosfato descaboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio de cultivo desenvolvido por <i>Roswell Park Memorial Institut</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
spp	referência a mais de uma espécie de determinado gênero
T-DNA	DNA de transferência
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UV	ultravioleta
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.1: Esquema ilustrativo da patogênese da criptococose.</i>	11
<i>Figura 1.2: Mecanismos de acesso ao SNC por C. gattii e C. neoformans.....</i>	12
<i>Figura 1.3: Diagrama da classificação molecular e sorotipagem das espécies C. gattii e C. neoformans.</i>	14
<i>Figura 1.4: Fotomicrografia de cápsula polissacarídica de bactérias e fungos corados com tinta Nanquin.....</i>	16
<i>Figura 1.5: Cápsula polissacarídica de Cryptococcus spp.</i>	17
<i>Figura 1.6: Melanização de C. neoformans em diferentes substratos.....</i>	19
<i>Figura 1.7: Diagnósticos utilizados na clínica para criptococose.....</i>	22
<i>Figura 1.8: Figura esquemática do mecanismo de ação dos fármacos antifúngicos.</i>	25
<i>Figura 1.9: Compostos iridóides com atividade antifúngica contra Cryptococcus spp.</i>	33
<i>Figura 4.1: Figura esquemática do início da via de sinalização UPR e seus processos celulares desencadeados em mamíferos, S. cerevisiae e Cryptococcus spp.....</i>	69
<i>Figura 4.2: Figura esquemática da interação retículo endoplasmático e mitocôndria na via de sinalização UPR.</i>	70

RESUMO

As leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os agentes etiológicos da criptococose. A infecção se desenvolve via inalação e disseminação até o sistema nervoso central, causando lesões pulmonares e meningoencefalite, a principal causa de morte da criptococose. Estes fungos patogênicos causam aproximadamente um milhão de casos por ano, principalmente entre pacientes imunocomprometidos, resultando em aproximadamente 625.000 mortes. O tratamento da criptococose emprega altas doses dos fármacos anfotericina B e 5-flucitosina, seguido de longa monoterapia com fluconazol. Este tratamento é caracterizado pela nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Além destes efeitos tóxicos, o surgimento de linhagens resistentes a estes compostos leva à necessidade de novas estratégias terapêuticas, dentre as quais podem ser citadas moléculas obtidas de fontes vegetais. O composto natural plumieridina, extraído de *Allamanda polyantha* (uma planta nativa brasileira), possui atividade antifúngica. Com o objetivo de elucidar as bases moleculares desta atividade, uma biblioteca de mutantes de *C. gattii* obtida por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foi triada utilizando distintas concentrações deste composto, tendo como referencial o valor de MIC para a linhagem selvagem de *C. gattii*. Foram encontrados dez mutantes sensíveis e um mutante resistente a plumieridina e os fatores de virulência clássicos foram avaliados. A identificação dos genes inativados pelo T-DNA revelou o possível envolvimento de algumas proteínas no mecanismo molecular de plumieridina, tais como lisofosfolípídeo aciltransferase, transportador de colina, protease romboide, transportador de arsenito ATPase, proteína BAG e subunidade N6 do complexo regulatório 26S proteasoma. Estas proteínas estão relacionadas com diferentes processos biológicos ligados a via de sinalização *Unfolded Protein Response* (UPR). Esses resultados indicam um complexo processo celular desencadeado por estresse de retículo endoplasmático, afetando indiretamente várias vias, o que sugere um novo mecanismo de ação para um fármaco antifúngico em potencial.

ABSTRACT

The basidiomycete yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the etiologic agents of cryptococcosis. The infection proceeds via inhalation and dissemination of yeast cells to the central nervous system, causing lung injury and meningoencephalitis, which is the major cause of death on cryptococcosis. These fungal pathogens cause one million cases per year among immunocompromised patients mainly, resulting in nearly 625,000 deaths. The treatment of cryptococcosis uses high doses of amphotericin B and 5-flucytoseine, followed by long fluconazole monotherapy. This regime is characterized by nephrotoxicity and hepatotoxicity. In addition to these toxic effects, the emergence of strains resistant to these compounds leads to the need of new therapeutic strategies, among which molecules obtained from plant sources. The natural compound plumieridine, extract from *Allamanda polyantha* (a Brazillian native plant), has antifungal activity. In order to elucidate the molecular basis of plumieridine antifungal activity, a *C. gattii* mutant library obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was screened using distinct plumieridine concentrations based on MIC value for *C. gattii* wild type. One resistant and ten susceptible mutants were found and the classical virulence factors were evaluated. The genome-wide screening revealed the possible involvement of some proteins in molecular mechanisms of plumieridine, such as lysophospholipid acyltransferase, choline transporter, rhomboid protease, arsenite transporting ATPase, BAG Protein and 26S proteasome regulatory subunit N6. These proteins are related with different biological process linked to Unfolded Protein Response (UPR) signaling pathway. This result suggests a complex cell process triggered by endoplasmic reticulum stress with many pathways indirectly affected by plumieridine, displaying a novel mechanism of action in a potential antifungal agent.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Criptococose

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica subaguda ou crônica ocasionada por leveduras do gênero *Cryptococcus* (SUN *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2015). Esta é uma das mais importantes doenças oportunistas relacionadas à AIDS. Em países de alta prevalência de HIV/AIDS, a meningite criptococócica é mais prevalente que as meningites bacterianas, como por exemplo, as causadas por *Streptococcus pneumoniae* ou *Neisseria meningitidis* (PARK *et al.*, 2009).

Dados epidemiológicos sobre a criptococose são escassos, entretanto Park e colaboradores estimam a ocorrência de aproximadamente um milhão de casos de criptococose por ano em todo mundo, sendo que 625 mil vêm a óbito. Entre os infectados, a maioria dos pacientes são imunocomprometidos. Aproximadamente 3,4% dos casos são registrados na América Latina (PARK *et al.*, 2009; PAPPAS, 2013). No Brasil, a espécie *Cryptococcus gattii* é endêmica nos estados do Norte e Nordeste brasileiro, em especial os estados da Bahia, Amazonas, Pernambuco, Piauí e Roraima. A criptococose acomete principalmente adultos, entretanto no Brasil, há maior frequência de casos em crianças (CHEN *et al.*, 2014). Quando são comparadas as causas de morte na África Subsaariana, excluindo-se o HIV, as mortes por meningite criptococócica superam o registrado para tuberculose e diversas doenças sexualmente transmissíveis como Hepatite B, Hepatite C, entre outras. Estima-se que no mínimo 13% das mortes registradas na população HIV positiva na África subsaariana sejam em decorrência da criptococose (PARK *et al.*, 2009).

Desde a década de 1990, foram registrados diversos surtos de criptococose. Os primeiros surtos notificados ocorreram na Ilha de Vancouver no Canadá e no Noroeste dos Estados Unidos acometendo indivíduos imunocompetentes. Dessa forma, a criptococose pode ser considerada uma doença oportunista ou primária dependendo do agente causador (PAPPAS, 2013; CHEN *et al.*, 2014).

Sobre a patogênese da criptococose, esquematizada na Figura 1, a doença é adquirida pela inalação de esporos ou células dessecadas que penetram nos alvéolos. Macrófagos pulmonares recrutam diversas células do sistema imune para a eliminação do patógeno. A maior parte dos hospedeiros consegue realizar esta tarefa de forma eficiente, como demonstram estudos sorológicos que apontam uma grande prevalência de infecções por *Cryptococcus* spp. sem resultar em doença. Entretanto, esta levedura é capaz de formar granulomas pulmonares ou linfáticos e desenvolver uma infecção latente (IDNURM *et al.*, 2005). O indivíduo ao ser (ou tornar-se) imunossuprimido possibilita, em maior grau, que as leveduras utilizem mecanismos de evasão, como por exemplo, a capacidade de se reproduzem no interior de macrófagos, através dos quais penetram na corrente sanguínea e se disseminam para outros tecidos, afetando diversos órgãos como pele, baço, ossos, olhos e sistema nervoso central e periférico (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

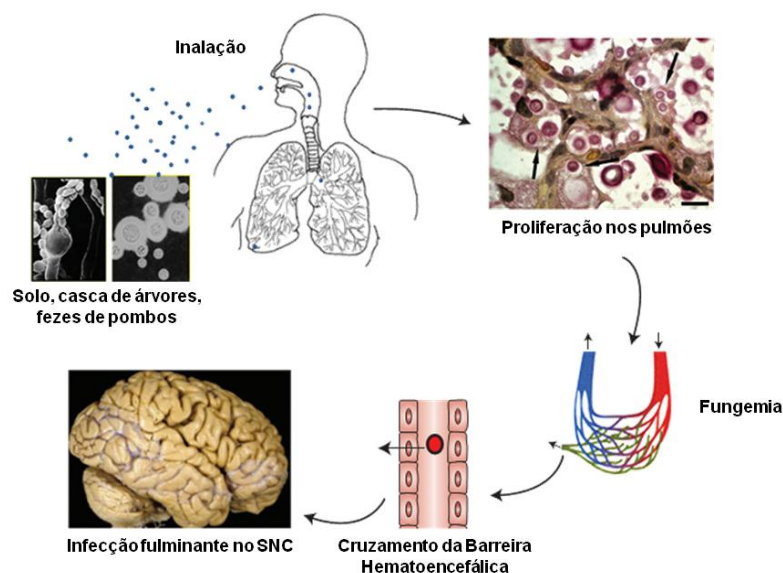


Figura 1.1: Esquema ilustrativo da patogênese da criptococose.

(Adaptado de KWON-CHUNG *et al.*, 2014)

Os macrófagos alveolares são a primeira linha de defesa contra o patógeno. No início da infecção há um grande número de leveduras internalizadas em macrófagos, mas com o avanço da doença, a população extracelular aumenta, visto que *Cryptococcus* spp. não são patógenos intracelulares obrigatórios, mas possuem fatores de virulência que permitem seu desenvolvimento

intrafagocítico. As leveduras internalizadas utilizam macrófagos mononucleares e neutrófilos para realizar a travessia do sistema respiratório para o circulatório através da diapedese das células imunes. Da mesma forma, utilizam as células do sistema imune para ultrapassar a barreira hematoencefálica, por mecanismo denominado "Cavalo de Tróia", ou ainda, por transporte paracelular ou transendotelial, como representado na Figura 2 (MA e MAY, 2009; KRONSTAD *et al.*, 2011).

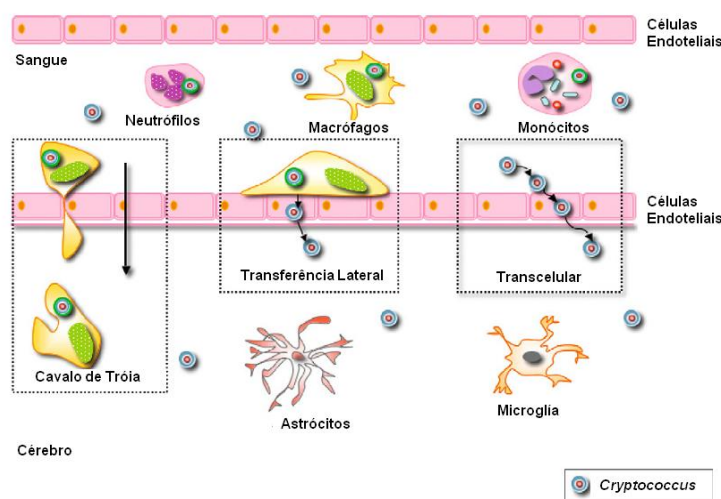


Figura 1.2: Mecanismos de acesso ao SNC por *C. gattii* e *C. neoformans*.

(Adaptado de MA e MAY, 2009)

A sintomatologia da criptococose depende do sítio de infecção. Sintomas sistêmicos como febre, calafrios e perda de peso são relatados com frequência. Quanto à doença pulmonar, são registrados casos clínicos com tosse, dispneia, dor no peito, hemoptise ou lesões assintomáticas diagnosticadas por exames de raio X. Sintomas relacionados ao SNC, geralmente são manifestados por dor de cabeça, vômitos e náuseas, rigidez no pescoço, alterações ou perdas auditivas e visuais, convulsões, e estado mental alterado (confusão, perda de memória, coma...). Alguns destes sintomas e complicações podem ser permanentes em decorrência das lesões geradas pelos criptococos (CHEN *et al.*, 2014).

Duas espécies são citadas como os agentes etiológicos da criptococose, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*. A patogenia da doença é semelhante entre as espécies, entretanto estas leveduras diferem em relação

aos hospedeiros que infectam. *C. neoformans* acomete principalmente pacientes imunocomprometidos (portadores de síndromes de imunodeficiências adquiridas ou congênitas, pacientes quimicamente imunossuprimidos como transplantados ou pacientes em tratamento com antineoplásicos), causando a doença de forma oportunista. Já *C. gattii* infecta principalmente indivíduos hígidos, sendo a espécie responsável pelo surto de criptococose no Canadá e região noroeste dos Estados Unidos (BYRNES *et al.*, 2010; PAPPAS, 2013). Em relação ao número total de casos de criptococose, a vasta maioria (>80%) é causada por *C. neoformans* em relação a *C. gattii* (CHEN *et al.*, 2014; KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

C. neoformans é relacionado principalmente ao acometimento do SNC, principal causa de morte da criptococose. Enquanto a morte causada por *C. gattii* é associada majoritariamente a falência da função respiratória devido às lesões pulmonares, sendo a evolução da doença mais rápida que a causada por *C. neoformans*. Estudos em modelos animais confirmam este tropismo tissular (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

1.1.1 ***Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans***

C. gattii e *C. neoformans* são leveduras basidiomicéticas dimórficas. Na forma leveduriforme a reprodução é assexuada por brotamento, ocorrendo nos hospedeiros mamíferos e no ambiente (IDNURM *et al.*, 2005; FUENTEFRÍA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010). Em sua forma filamentosa, a reprodução ocorre através de hifas, gerando micélio com basidiósporos. Estas espécies pertencem ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, família Tremellales e são registradas mais de 80 espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, mas somente *C. gattii* e *C. neoformans* são descritos com patógenos humanos (CHEN *et al.*, 2014). Sugere-se que estas espécies tenham divergido evolutivamente a mais de 50 milhões de anos, entretanto possuem identidade gênica de aproximadamente 87% e compartilham diversos fatores de virulência (CHEN *et al.*, 2014).

Baseado em especificidades da estrutura da glucuronoxilomanana (GXM), o principal componente da cápsula polissacarídica, estas leveduras são classificadas em cinco sorotipos (A, B, C, D, e o híbrido AD). *C. neoformans*

compreende os sorotipos A, D e AD e *C. gattii* os sorotipos B e C. Ainda podemos classificar estas leveduras conforme o padrão molecular estabelecido por técnicas como PCR *fingerprinting*, *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *multilocus microsatellite type* (MLMT) e *multilocus sequence typing analysis* (MLST). Por estes critérios, *C. neoformans* é classificado em cinco tipos moleculares (VNI, VNII, VNIII, VNIV e VNB e seus subtipos) e *C. gattii* em quatro tipos moleculares (VGI, VGII, VGIII e VGIV e seus subtipos), como abaixo esquematizado:

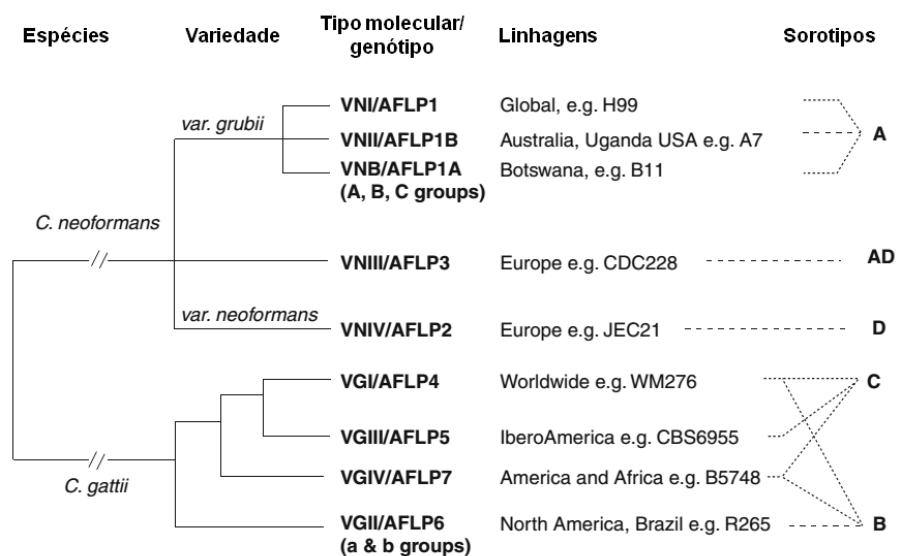


Figura 1.3: Diagrama da classificação molecular e sorotipagem das espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. (Adaptado de MA e MAY, 2009)

A classificação molecular utiliza como referência genes *housekeeping* e genes relacionados a fatores de virulência, de forma que cada sorotipo possui características antigênicas próprias. Assim, é possível comparar a virulência de cada linhagem e traçar estudos epidemiológicos sobre a origem e dispersão das linhagens. Sabe-se que as linhagens predominantes do surto em Vancouver e Noroeste dos EUA são pertencentes ao grupo VGII de *C. gattii*, grupo predominante na América do Sul e no Brasil em 64% dos isolados. Quanto a *C. neoformans*, o grupo VNI é hegemônico no Brasil, bem como em toda a América Latina. Estes dados são baseados em estudos clínicos e isolados ambientais (MA e MAY, 2009; COGLIATI, 2013; CHEN *et al.*, 2014). E ainda, recentemente foi proposta uma nova classificação das espécies *C.*

neoformans e *C. gattii*, subdividindo-a em sete novas espécies de acordo com padrões genéticos, proteômicos e bioquímicos (HAGEN *et al.*, 2015).

C. gattii era tradicionalmente considerado como predominante em regiões de clima tropical e subtropical, entretanto após os surtos na América do Norte, estas espécies são consideradas de distribuição mundial (CHEN *et al.*, 2014), tendo em vista a expansão das espécies para regiões de clima temperado. A importação de *Eucalyptus* da Austrália, as mudanças climáticas e o aumento do número de viagens internacionais das últimas décadas podem ter contribuído para a disseminação da levedura (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

1.1.2 Fatores de virulência dos agentes etiológicos

Um micro-organismo para ser patogênico deve possuir mecanismos que lhe conferem vantagens durante uma infecção, de forma que o patógeno supere ou subverta os sistemas de defesa do hospedeiro. Estas vantagens são denominadas Fatores de Virulência, que por definição são mecanismos moleculares e celulares que possibilitam que um patógeno se estabeleça, replique, e colonize o hospedeiro (VERONESI, 2009). *C. gattii* e *C. neoformans* necessitam driblar o sistema imune e ultrapassar barreiras físicas para disseminar a doença, e para isso utilizam fatores de virulência como: produção de cápsula polissacarídica, síntese de melanina, habilidade de crescimento a 37°C e secreção de enzimas de degradação.

1.1.2.1 Cápsula Polissacarídica

Cápsulas polissacarídicas são estruturas descritas em alguns organismos como *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, contudo são pouco comuns entre fungos. *C. gattii* e *C. neoformans* se destacam por possuírem uma cápsula no entorno do corpo celular (ZARAGOZA *et al.*, 2009).

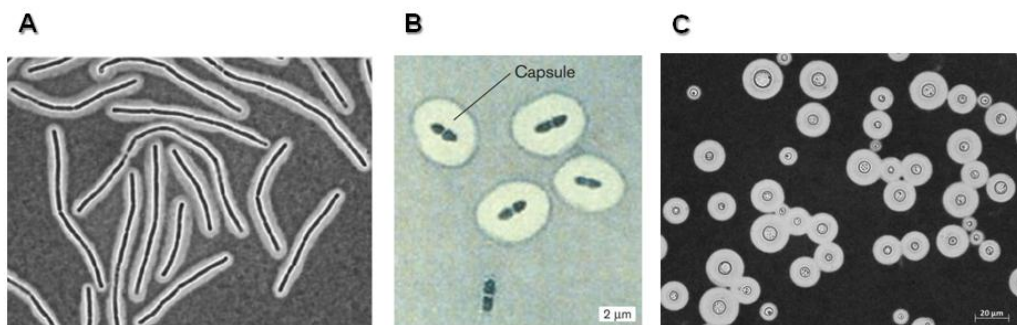


Figura 1.4: Fotomicrografia de cápsula polissacarídica de bactérias e fungos corados com tinta Nanquin.

B. anthracis (magificação 700x) (Adaptado de SCORPIO *et al.*, 2010). b) *S. pneumoniae*. (Adaptado de SLONCZEWSKI, 2015). C) *C. gattii* (Barra de escala: 20µm).

A cápsula polissacarídica é considerada o principal fator de virulência de *C. gattii* e *C. neoformans*. Ela interage com quitina, quitosana e glicoproteínas estando ligada à parede celular por glicanas. Em sua composição há dois polissacarídeos majoritários: 88% glucuronoxilomanana (GXM, 1–7 MDa), 10% de galactoxilomanana (GXMGal, 100kDa) e ainda manoproteínas, ácido hialurônico e ácido siálico (RODRIGUES *et al.*, 2008; DOERING, 2009; KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Há indícios de que a síntese da cápsula possa ocorrer no complexo de Golgi, havendo a incorporação de polissacarídeos em vesículas que são direcionadas à membrana plasmática e excretadas para superfície celular, onde ocorre a polimerização (DOERING, 2009). Até o momento não foi possível elucidar completamente como a cápsula está associada à parede celular, mas o envolvimento de quitina e α -glicanas são fundamentais para a correta organização da cápsula, bem como cátions divalentes (FRASES *et al.*, 2009; KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

O tamanho e potencial antigênico da cápsula são regulados pelas leveduras em resposta a estímulos do ambiente. A síntese da cápsula é induzida na presença de soro, condições nutricionais limitadas, níveis de CO₂ semelhantes ao do hospedeiro, pH, entre outros (IDNURM *et al.*, 2005). Estudos em roedores demonstram que esta modulação do tamanho da cápsula ocorre durante a infecção, sugerindo a importância da regulação da cápsula para disseminação da doença, bem como a ausência de cápsula (observada pela construção de mutantes acapsulares) torna a levedura completamente

avirulenta. Dessa forma, comprovou-se que este fator de virulência é fundamental para o processo infeccioso (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

A cápsula polissacarídica confere resistência a condições estressoras, provendo proteção ao organismo contra a desidratação no meio ambiente. No hospedeiro, a cápsula exerce um papel paradoxal: GXM possui alto potencial antigênico, inclusive compartilhando semelhanças com as bactérias patogênicas encapsuladas citadas anteriormente. Assim a cápsula promove a indução da liberação de citocinas por macrófagos, recrutando neutrófilos e outras células do sistema imune o que estimula a fagocitose da levedura (ZHANG *et al.*, 2015). Entretanto, também devido à cápsula, *C. gattii* e *C. neoformans* são mais resistentes à digestão lisossomal, sendo capazes de se replicarem no interior de macrófagos. A cápsula também interfere na eliminação por lise via sistema complemento (IDNURM *et al.*, 2005).

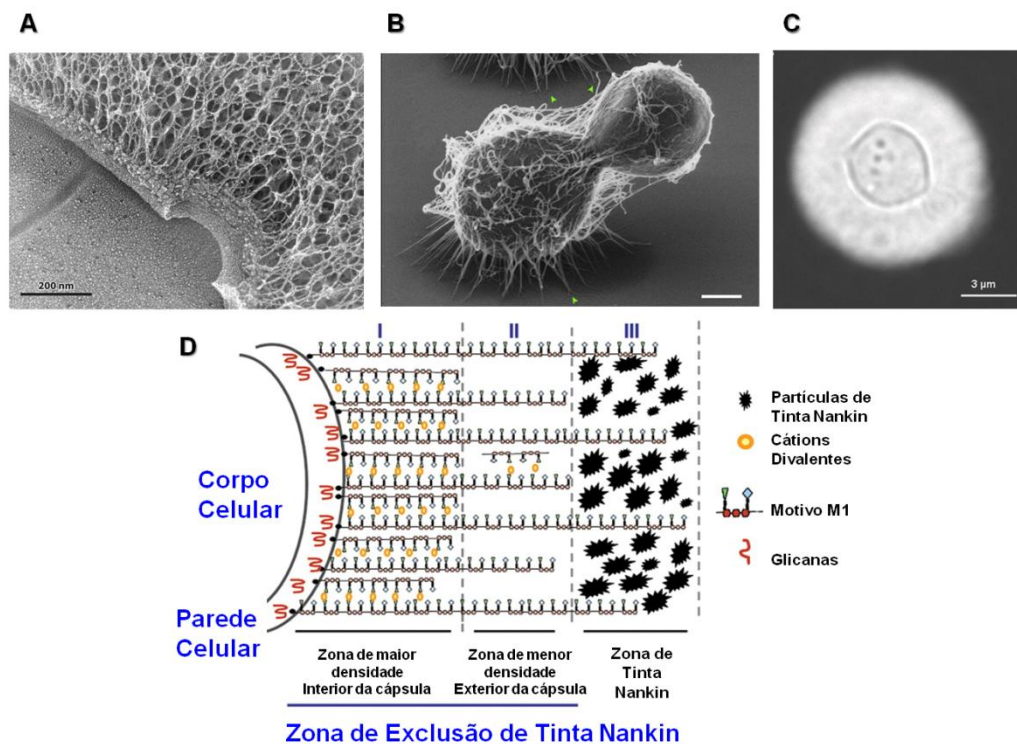


Figura 1.5: Cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp.

A) Eletromicrografia de criofratura da cápsula de *C. neoformans* (Adaptado de DOERING, 2009). B) Eletromicrografia dos filamentos cápsula polissacarídica vistos pela técnica de microscopia por íons de Hélio. (Adaptado de DE ARAUJO *et al.*, 2016). C) Fotomicrografia com tinta nanquin. (Adaptado de FRASES *et al.*, 2009). D) Desenho esquemático da estrutura da cápsula polissacarídica. (Adaptado de FRASES *et al.*, 2009).

1.1.2.2 Produção de Melanina

C. gattii e *C. neoformans* possuem a capacidade de produzir melanina, um pigmento negro ou marrom formado a partir de catecolaminas (derivados químicos do aminoácido tirosina) como adrenalina, noradrenalina, dopamina e seu precursor natural L-DOPA (3,4-dihidroxi-fenilalanina). Essas substâncias são encontradas em grandes quantidades no cérebro por serem neurotransmissores, podendo ser a razão do tropismo destas leveduras para SNC (WALTON *et al.*, 2005).

A síntese de melanina ocorre pela ação de enzimas lacases, expressas pelos genes *LAC1* e *LAC2*. Contudo, somente *LAC1* é expresso de forma significativa na presença de substratos catecolaminérgicos. A lacase é um membro da família das multicobre oxidases e está localizada na parede celular (WANG *et al.*, 1995; IDNURM *et al.*, 2005; KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Deste modo, o pigmento é depositado na parede e também exportado para o meio extracelular através vesículas (ZHU *et al.*, 200; RODRIGUES *et al.*, 2007; EISENMAN *et al.*, 2009; KRONSTAD *et al.*, 2011; RODRIGUES e DJORDJEVIC, 2012). A regulação da melanização ocorre em resposta ao ambiente, sendo a concentração de glicose e ferro importantes fatores para indução da síntese de melanina - na presença de substrato para a enzima lacase. Ao menos cinco famílias gênicas distintas e diversas rotas de sinalização estão envolvidas no processo de regulação, entre elas a sinalização através de adenosina monofosfato (AMP) cíclico, via que também regula a expressão de cápsula polissacarídica (ZHU *et al.*, 2001; PUKKILA-WORLEY *et al.*, 2005; WALTON *et al.*, 2005; MA e MAY, 2009).

A melanização confere proteção à levedura, no ambiente, contra radiação UV e altas temperaturas. Durante a infecção, células de *Cryptococcus* spp. são recuperadas do SNC no estado melanizado (MA e MAY, 2009). As leveduras na presença dos compostos fenólicos são menos suscetíveis a agentes oxidantes, fármacos antifúngicos como caspofungina, anfotericina B e azóis. A melanina se liga a diversos compostos químicos como canamicina, gentamicina, cocaína, anfetaminas, entre outros, de forma que interfere na incorporação destas drogas às células e sua ligação às moléculas alvo (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2006; KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Contudo,

há estudos que indicam a ação de antifúngicos como voriconazol que interferem na síntese de melanina por *C. neoformans*, sendo uma via em potencial para alvo de antifúngicos (MARTINEZ et al., 2007). A levedura melanizada é mais resistente à morte celular causada por células fagocíticas, uma vez que o sistema imune utiliza agentes oxidantes para efetuar a ação microbiana (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2006; MA e MAY, 2009).

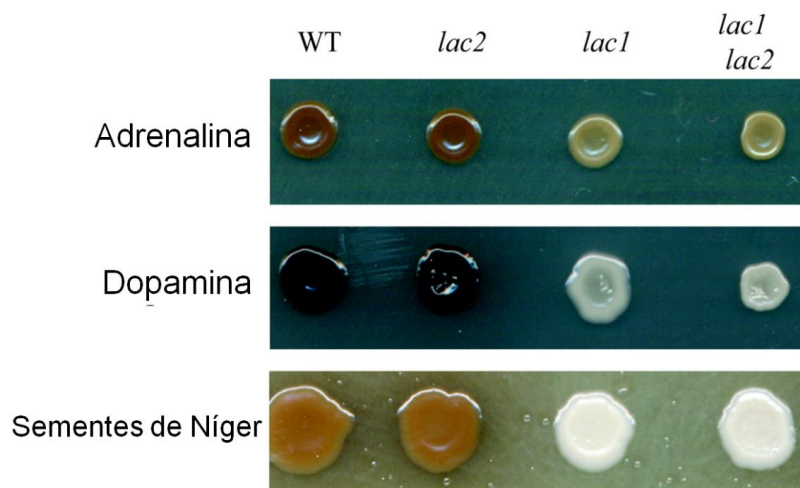


Figura 1.6: Melanização de *C. neoformans*.

Diferentes padrões de melanização apresentados pela linhagem selvagem (WT) e mutantes *knockout* para as enzimas lacase 1 (*lac1*) e lacase 2 (*lac2*) e duplo *knockout* (*lac1/lac2*) na presença de diferentes substratos catecolaminérgicos. (Adaptado de PUKKILA-WORLEY et al., 2005).

1.1.2.3 Capacidade de crescimento à 37°C

A habilidade de crescimento a 37°C *per se* é autoexplicativa, sendo este fator de virulência essencial para todas as doenças invasivas. Entretanto, a capacidade de crescimento à temperatura do hospedeiro não é suficiente para tornar um micro-organismo um patógeno humano. Dentre o gênero *Cryptococcus*, diversas espécies são capazes de produzir melanina (utilizando-a para camuflagem ou proteção contra insetos e parasitas) ou exibir cápsula polissacarídica (proteção contra fagocitose de protozoários) (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2006). Toda via, somente *C. gattii* e *C. neoformans* são eficazes em se reproduzir e se manter na temperatura fisiológica humana, sendo os únicos patógenos humanos de seu gênero (ROSA E SILVA et al., 2008; KWON-CHUNG et al., 2014).

C. gattii e *C. neoformans* são relativamente termotolerantes comparados a outros fungos. Por esta razão, foram identificadas as rotas diferencialmente expressas na temperatura do hospedeiro e a calcineurina, uma proteínofosfatase dependente de Ca^{2+} e calmodulina, é essencial para o crescimento a 37°C, mas não a 24°C (HEMENWAY e HEITMAN, 1999). Este gene, quando interrompido torna a levedura apatogênica, e ciclosporina A (inibidor da calcineurina) compromete a habilidade do fungo em se desenvolver a 37°C. Diversos estudos demonstram o envolvimento de componentes de importantes vias de sinalização como a da via das Proteínas Ativadas por Mitógenos (MAP) quinases, durante o desenvolvimento à temperatura do hospedeiro. Estes genes atuam em diversas funções na célula como montagem da parede celular, sinalização em resposta à estresse, integridade de membrana plasmática, metabolismo basal, *splicing* de RNA, remodelamento da cromatina, entre outros (KRAUS *et al.*, 2004; ROSA E SILVA *et al.*, 2008; KRONSTAD *et al.*, 2011; KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

1.1.2.4 Outros fatores de virulência

C. gattii e *C. neoformans* utilizam mecanismos especializados para se adaptarem ao ambiente do hospedeiro mamífero. Para tais adaptações serem executadas, a levedura exporta alguns fatores de virulência através de vesículas -"virulence factors delivery bags"- (RODRIGUES *et al.*, 2007; EISENMAN *et al.*, 2009; MA e MAY, 2009; KRONSTAD *et al.*, 2011; RODRIGUES e DJORDJEVIC, 2012).

Como descrito anteriormente, componentes da cápsula polissacarídica e melanina são exportados para o meio extracelular por vesículas, mas também diversas enzimas como urease e fosfolipase B, como veremos a seguir:

Fosfolipase B: Essa enzima está localizada na parede celular das leveduras e é responsável pela desestabilização da membrana plasmática das células mamíferas pela hidrólise de fosfolípidos facilitando a lise celular e a liberação de lípidos como segundos mensageiros. Quando a levedura é fagocitada, a fosfolipase B promove a ruptura do fagolisossomo (KRONSTAD *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2015). *C. gattii* e *C. neoformans* liberam no meio extracelular fosfolipase B, fosfolipase C, lisofosfolipase e aciltransferase

auxiliando a invasão da levedura pelos tecidos do hospedeiro. As fosfolipases também estão envolvidas na adesão da levedura ao epitélio pulmonar, importante processo para o estabelecimento da infecção. Essa ação se dá pela clivagem de dipalmitoil fosfatidilcolina, um dos principais componentes do surfactante pulmonar (MA e MAY, 2009). Sabe-se que além dos principais fatores de virulência, as fosfolipases também estão envolvidas com processos como homeostase, citocinese do brotamento e integridade da parede celular (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Urease: Esta enzima possibilita o desenvolvimento da levedura em ambientes hostis, como as fezes de aves, nas quais estão presentes metabólitos como creatinina, xantinas e ácido úrico. A urease catalisa a hidrólise da ureia em amônia e carbamato, e é uma importante enzima para a propagação das células fúngicas durante a disseminação da criptococose (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Diferente de patógenos não invasivos como *Helicobacter pylori*, em que a urease possui função de neutralizar ambiente ácido (MOBLEY, 1996), a ação da urease de *Cryptococcus* spp. tem papel fundamental na habilidade do fungo em cruzar a barreira hematoencefálica, facilitando a transcitose de *Cryptococcus* spp. pela produção local de amônia, que influencia na interação entre as células endoteliais, causando toxicidade às células do hospedeiro, aumento da aderência da levedura e conseqüentemente promovendo a internalização das leveduras nos microcapilares do SNC (KRONSTAD *et al.*, 2011; FEDER *et al.*, 2015).

Proteinases: Atuam na clivagem de estruturas do tecido conjuntivo do hospedeiro como colágeno, elastina, fibrinogênio e importantes moléculas do sistema imune como as imunoglobulinas e fatores do complemento. Ao mesmo tempo, fornece ao patógeno nutrientes proteicos durante a infecção. Juntamente com as fosfolipases promovem a ruptura do fagolisossomo (MA e MAY, 2009).

1.1.3 Diagnóstico e tratamento da criptococose

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) têm centrado esforços na

implementação do correto diagnóstico da criptococose a fim de que a doença seja notificada corretamente (WHO, 2011). O diagnóstico pode ser realizado por: (i) análise histológica com coloração de PAS (*Periodic acid-Schiff*) ou mucicarmina apresentando infiltrado inflamatório com grande número de leveduras com halo claro; (ii) pela visualização das leveduras presentes no líquido utilizando coloração negativa com tinta nanquim e, (iii) por avaliação da presença de antígeno pelo teste de aglutinação em látex (PARK *et al.*, 2009; BRASILEIRO FILHO, 2013).

Na Austrália, onde *C. gattii* é considerado endêmico, foi implementado na rotina clínica o teste azul de canavanina-glicina-bromotimol (CGB) em ágar, para a distinção de *C. gattii* e *C. neoformans* (Chen *et al.*, 2014).

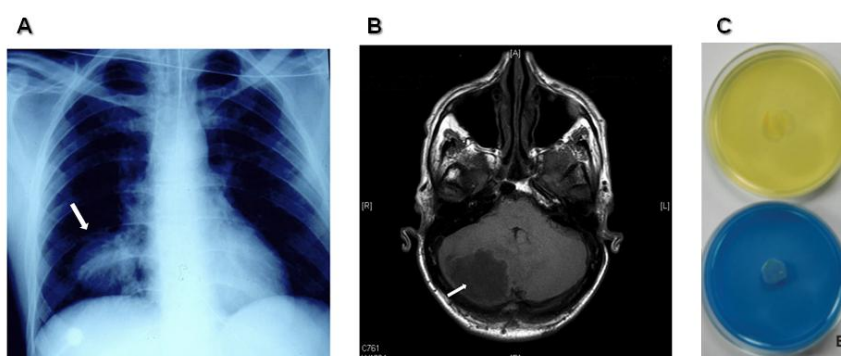


Figura 1.7: Diagnósticos utilizados na clínica para criptococose.

A) Raio X do tórax, evidenciando lesão pulmonar (indicada pela seta) no lóbulo inferior direito (Adaptado de CHEN *et al.*, 2014). B) Tomografia computadorizada de encéfalo com grande lesão (indicada pela seta). (Adaptado de CHEN *et al.*, 2014)) C) Placas de ágar CGB para diferenciação de *C. neoformans* (placa superior - sem reação) e *C. gattii* (placa inferior - reação positiva azul). (Adaptado de KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Os diagnósticos por imagem são os primeiros recursos para identificação da doença. O raio X torácico permite a visualização de anormalidades pulmonares como os criptocomas, bem como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear, exames que avaliam a presença de massas celulares fúngicas no encéfalo. Entretanto estes exames não são específicos para criptococose, mas são extremamente úteis para avaliação da resposta à farmacoterapia (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Recentemente a OMS e o CDC divulgaram o desenvolvimento de teste rápido (imunocromatografia) de baixo custo e grande margem de confiança

para detecção de antígeno em soro de pacientes, possibilitando o diagnóstico semanas antes do aparecimento dos sintomas. Testes desse tipo facilitam o diagnóstico em locais de difícil acesso e com poucos recursos financeiros (WHO, 2011).

Quanto à terapêutica, os indivíduos que são diagnosticados com criptococose, são submetidos a tratamento oral com fluconazol (FLC), em casos de menor complexidade, como lesões pulmonares leves e ausência de infecção neurológica. Quando encontradas lesões no SNC o tratamento utiliza anfotericina B (AmB) e flucitosina (5-FC) de 2 a 6 semanas (CHEN *et al.*, 2014). Em pacientes HIV positivos é aplicado um pré-tratamento de 2 semanas com a combinação de AmB (GREEN e SAMBROOK) e 5-FC ou AmB e FLC, seguido de no mínimo 8 semanas de tratamento com FLC até desaparecimento das lesões (PERFECT *et al.*, 2010; WHO, 2011; WHITNEY e BICANIC, 2015).

AmB e 5-FC são os antifúngicos utilizados que melhor tem demonstrado aumento na sobrevivência dos pacientes com a doença avançada e são os fármacos de escolha para tratamento da criptococose. Entretanto, esses medicamentos possuem alto custo e alguns países subdesenvolvidos não possuem recursos para aquisição conforme a necessidade da população. Ambos os fármacos exigem a realização de exames durante o tratamento para a avaliação da toxicidade por eles causada ao paciente (PERFECT *et al.*, 2010). Além disso, a AmB é um medicamento controlado de uso restrito hospitalar e via de administração intravenosa (que torna o tratamento ainda mais oneroso pela necessidade do uso de seringas e cateteres descartáveis, bem como o descarte destes materiais) (WHO, 2011). A 5-FC é um fármaco não autorizado em diversos países (MOREIRA, 2005). Essas desvantagens tornam ainda mais difícil o tratamento da criptococose.

1.2 Antifúngicos

Os antifúngicos podem ser classificados conforme seu mecanismo de ação em:

- Fármacos que atuam sobre a membrana plasmática:

Um importante alvo para drogas antifúngicas são os esteróis na membrana plasmática. Os fungos possuem como principal esterol de membrana o ergosterol, enquanto as células mamíferas possuem colesterol. Caso ocorra algum tipo de interrupção na síntese deste componente, a membrana plasmática se torna instável e permeável, ocasionando a lise celular (COWEN, 2008). Este é o mecanismo de ação de três classes de antifúngicos: os Azóis, os Polienos, e as Alilaminas.

- Fármacos que atuam sobre Parede Celular:

A parede celular dos fungos possui estrutura diferente da parede de bactérias e, mamíferos não possuem esta estrutura celular. Deste modo, fármacos que atuam sobre a parede celular tendem a possuir maior especificidade. Problemas acarretados na parede influenciam na estrutura da célula tornando-a mais sensível a agentes externos. A única classe de antifúngicos que atuam na parede celular são as Equinocandinas.

- Fármacos de atuação intracelular:

O número de opções terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas é bastante limitado quando em comparação ao disponível para o tratamento de infecções bacterianas (ROEMER e KRYSAN, 2014). Este fato é devido a grande semelhança entre a estrutura intracelular fúngica com a mamífera, por serem eucariotos. Dessa forma, estão disponíveis apenas dois fármacos antifúngicos que atuam a nível intracelular, sendo eles a Flucitosina e a Griseofulvina.

Quanto a estrutura os antifúngicos são classificados em quatro classes de fármacos, como demonstrado na figura 1.8.

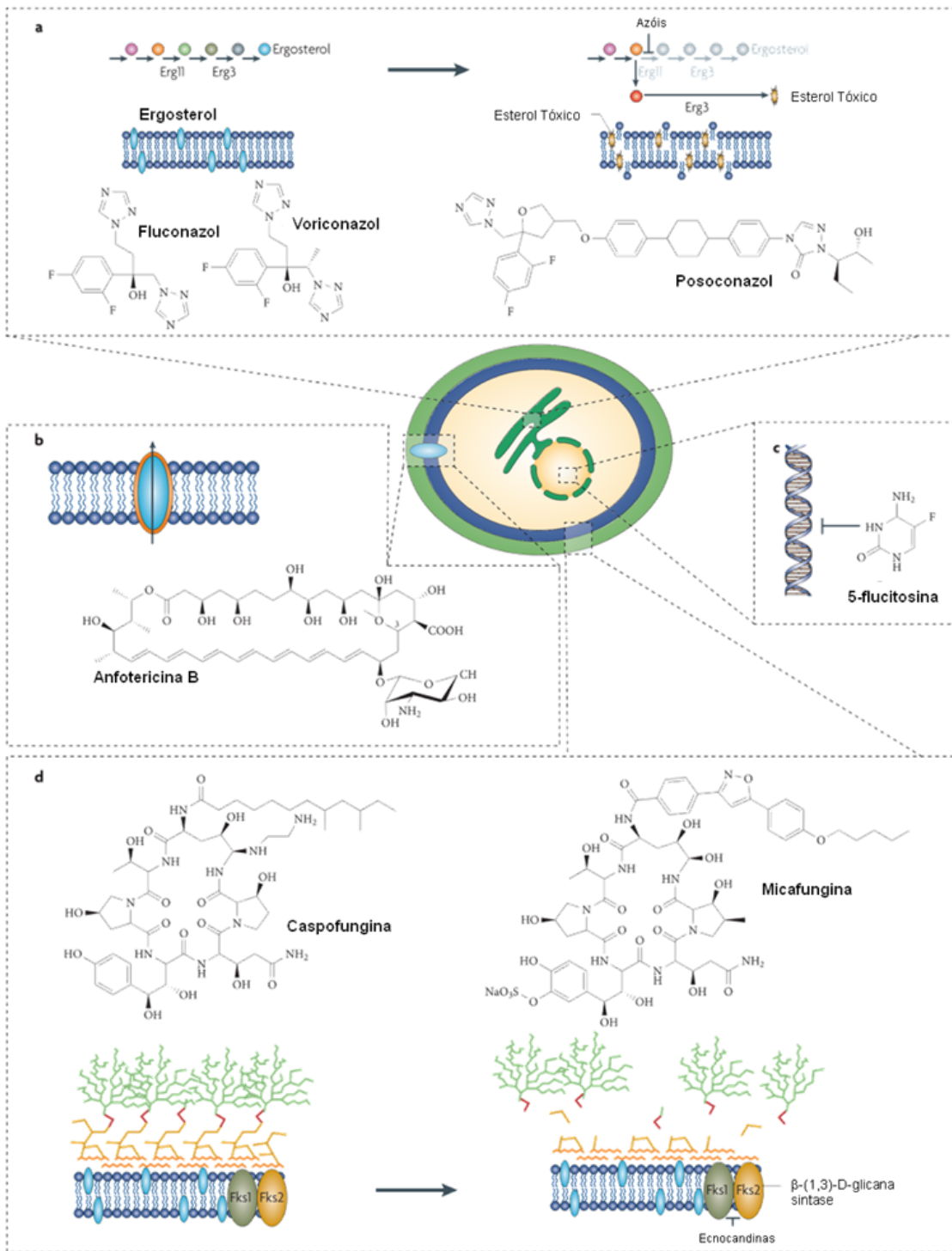


Figura 1.8: Figura esquemática do mecanismo de ação dos fármacos antifúngicos.
 (Adaptado de COWEN, 2008).

1.2.1 Classe dos Azóis

A ação dos azóis se dá pela inibição de uma enzima do complexo citocromo P450 fúngico, a lanosterol 14 α -demetilase, responsável pela síntese do ergosterol da membrana celular. Esta classe de enzimas também é presente nos hepatócitos humanos, entretanto os azóis possuem maior afinidade pela isoforma fúngica (GHANNOUM e RICE, 1999; COWEN, 2008).

Pertencem a esta classe as drogas mais utilizadas entre os antifúngicos (ROEMER e KRYSAN, 2014). Os fármacos do grupo dos imidazóis são utilizados como aplicações tópicas no tratamento de micoses cutâneas, sendo o fármaco cetoconazol um importante representante deste grupo. Enquanto as micoses sistêmicas são tratadas pelos fármacos do grupo dos triazóis, ao qual pertencem o itraconazol e fluconazol (citado anteriormente no tratamento da criptococose) e os mais recentes posaconazol e voriconazol (segunda geração dos triazóis). Este grupo se destaca pela maior solubilidade em água, grande penetrabilidade no SNC e menor toxicidade, devido a maior especificidade pela enzima alvo (CHEN e SORRELL, 2007).

O FLC está disponível para uso oral ou intravenoso, sendo muito bem absorvido pelo trato gastrointestinal, distribuindo-se rapidamente nos tecidos, incluindo o SNC e a eliminação é predominantemente renal. Devido aos triazóis inibirem as enzimas do complexo citocromo P450, a hepatotoxicidade é o efeito adverso mais relatado (em até 20% dos tratados), mas pode ser solucionada pela interrupção da terapia. Além disso, a inibição do complexo citocromo P450 altera a eliminação de outros fármacos que estejam sendo administrados concomitantemente aos triazóis, pois este complexo atua na destoxificação de diversas drogas, sendo necessário o monitoramento dos níveis séricos de outros fármacos (LEWIS, 2011; ROEMER e KRYSAN, 2014).

O FLC possui grande desvantagem por não ser fungicida, ou seja, é capaz somente de inibir o crescimento da célula fúngica, ficando ao encargo de outros fármacos ou do sistema imune do hospedeiro eliminar o patógeno, após a contenção da infecção (MOREIRA, 2005; CHEN e SORRELL, 2007). O uso generalizado de FLC como tratamento ou como medida profilática tem gerado o desenvolvimento de resistência. São considerados resistentes alguns isolados de *Candida não-albicans* e *C. neoformans*. Todos isolados de *Candida*

krusei apresentam resistência intrínseca, bem como *C. gattii* é naturalmente mais resistente que *C. neoformans*. Nestes casos voriconazol é uma alternativa, embora haja relatos de resistência cruzada (GHANNOUM e RICE, 1999; CHEN e SORRELL, 2007; CHEN *et al.*, 2014; WHITNEY e BICANIC, 2015).

1.2.2 Classe dos Polienos

Os polienos se ligam ao ergosterol de maneira que são formados poros na membrana plasmática, desestabilizando-a e causando a perda de eletrólitos (GHANNOUM e RICE, 1999; COWEN, 2008; LEWIS, 2011).

A anfotericina B e a nistatina são os membros dos polienos mais utilizados. A AmB é produzida por *Streptomyces nodosus* (bactéria de solo), e é o fármaco mais utilizado para o tratamento das micoses sistêmicas. O início da utilização da AmB ocorreu em meados da década de 1950 e se manteve por quase 30 anos (até a liberação dos azóis) como a terapia de padrão para micoses sistêmicas. E, ainda hoje, é amplamente utilizada por ser considerado o antifúngico mais efetivo disponível. Além disso, um grande número de organismos (fungos, algas e protozoários) possuem ergosterol em suas membranas, o que possibilita utilizar esta droga para diversas doenças além das micoses (GHANNOUM e RICE, 1999). A AmB possui atividade fungicida e boa penetração em biofilmes e dispositivos intravasculares (WHITNEY e BICANIC, 2015).

O desenvolvimento de resistência aos polienos é baixíssimo, e estão principalmente relacionados à nistatina. Interessantemente, há relatos do isolamento de uma linhagem de *Leishmania donovani* resistente à anfotericina B, devido à substituição do esterol presente na membrana plasmática. Os demais relatos de resistência são descritos por diminuição da quantidade de ergosterol na membrana (GHANNOUM e RICE, 1999).

Infelizmente, a sua utilização clínica é dificultada pela toxicidade intrínseca e a exigência de administração intravenosa. A anfotericina não é absorvida por via oral e, por isto, é usada apenas por via parenteral combinada com deoxicolato, que melhora sua solubilidade em água. Na corrente sanguínea, a AmB se dissocia do deoxicolato e se liga às proteínas plasmáticas,

distribuindo-se posteriormente nos tecidos. A penetrabilidade no SNC é muito baixa, mas ainda é o tratamento de escolha para meningite criptocócica (MOREIRA, 2005; LEWIS, 2011; CHEN *et al.*, 2014).

Os principais efeitos colaterais da anfotericina B incluem nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, mielotoxicidade (toxicidade à medula) e, menos frequentemente, cardiotoxicidade. A nefrotoxicidade é acumulativa, induzida por anormalidades eletrolíticas sistêmicas como hipocalcemia, hipopotassemia e hipomagnesemia. Anemia e trombocitopenia também são registradas. Durante o tratamento é necessário o monitoramento dos níveis de ureia, creatinina, magnésio, potássio sérico, hematócrito e plaquetas, o que eleva os custos do tratamento (MOREIRA, 2005; CHEN e SORRELL, 2007; LANIADO-LABORIN e CABRALES-VARGAS, 2009). Para minimizar os efeitos adversos (especialmente nefrotoxicidade), novas formulações lipossomais de anfotericina B foram desenvolvidas permitindo doses mais elevadas da droga. Entretanto essas formulações são extremamente caras (LANIADO-LABORIN e CABRALES-VARGAS, 2009).

1.2.3 Classe das Equinocandinas

O mecanismo de ação ocorre pela inibição do complexo de enzimas β -1,3-glicanas sintases, impedindo a síntese de um componente estrutural da parede celular. Dessa forma, a ação do fármaco resulta em uma parede celular frágil, o que propicia a lise da célula. A caspofungina, anidulafungina e micafungina são os principais fármacos desta nova classe, e já estão disponíveis comercialmente. Apesar de estar a pouco mais de 10 anos no mercado são descritos isolados resistentes a esta droga devido à tendência de mutação no gene que codifica a enzima (MOREIRA, 2005; CHEN e SORRELL, 2007; COWEN, 2008; LEWIS, 2011). Nenhum fármaco desta classe é utilizado para tratamento da criptococose (ROEMER e KRYSAN, 2014).

1.2.4 Flucitosina

A flucitosina (5-FC) é um pró-fármaco análogo fluorado de citosina, que é convertido em 5-fluorouracil. Esta molécula pode causar a morte do fungo por duas vias: (i) pela inibição da síntese de proteína, onde 5-fluorouracil é convertido por um processo de três etapas a 5-fluorouridina trifosfato, que ao

ser incorporado ao RNA interrompe a síntese proteica; e, (ii) pela inibição da síntese de DNA, no qual 5-fluorouracil é convertido a 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, que mimetiza o substrato da enzima timidilato sintetase, inibindo-a (VERMES *et al.*, 2000). A seletividade deste fármaco se dá pela ausência em mamíferos da enzima citosina deaminase conversora da flucitosina em 5-fluorouracil. Contudo, bactérias da flora intestinal são capazes de converter flucitosina em 5-fluorouracil, causando náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal difusa e supressão da medula óssea e hepatotoxicidade (VERMES *et al.*, 2000). Por esta razão foi proibida a comercialização de 5-FC em diversos países. Este fármaco é utilizado somente em associação a outras drogas, devido à ocorrência do desenvolvimento resistência por mutações na citosina permease e citosina deaminase. A 5-FC tem sido associada à AmB pelo seu sinergismo e boa penetração no SNC, já que independente da formulação, a AmB apresenta baixa penetração no SNC, mesmo durante inflamação meníngea (MOREIRA, 2005; LEWIS, 2011).

1.3 Desafios no tratamento das doenças fúngicas

Face ao exposto, é perceptível o pequeno número de medicamentos antifúngicos e a escassez de diferentes classes de fármacos disponíveis. O que por si só não seria um problema, se os resultados do tratamento das infecções fúngicas invasivas fossem satisfatórios. Entretanto, ao tratar-se de doenças causadas por micro-organismos, é imensa a quantidade de espécies, linhagens e mutações que estes organismos estão sujeitos. Aliado ao fato de que uma doença não depende somente do patógeno, mas do estado de saúde do hospedeiro e outras infecções simultâneas que podem ocorrer durante uma infecção fúngica. Outro elemento que não pode ser desconsiderado é o fator socioeconômico. Nos países desenvolvidos, com maior acesso a AmB e 5-FC, a mortalidade anual devido a criptococose é de aproximadamente 25%, enquanto nas regiões de recursos limitados, onde o FLC é a única terapia disponível a mortalidade é muito maior (ROEMER e KRYSAN, 2014). Dessa forma, é enorme o número de variáveis envolvidas no estabelecimento e tratamento de uma doença fúngica, para tão poucos fármacos disponíveis.

Há grandes dificuldades no desenvolvimento de novos antifúngicos. A classe mais nova de drogas, as equinocandinas, foram descobertas na década de 1970 e somente nos anos 2000 foi autorizado seu uso na clínica médica (CHEN e SORRELL, 2007). Da mesma forma, a melhor terapia para criptococose é baseada em duas drogas que existem a mais 50 anos (ROEMER e KRYSAN, 2014). Este atraso no desenvolvimento de novos fármacos se dá pela "quase" intrínseca toxicidade dos antifúngicos aos mamíferos, visto que se tratam de eucariotos e são compartilhados muitos processos biológicos semelhantes (IDNURM *et al.*, 2005). Outro fator que deve ser considerado é o custo dos medicamentos. Como dito anteriormente, a AmB já possui novas formulações que são consideradas tão eficazes quanto as antigas e mais seguras (LANIADO-LABORIN e CABRALES-VARGAS, 2009), diminuindo intensamente os efeitos colaterais. Toda via, o custo destas novas formulações as tornam pouco acessíveis, quando são passíveis de compra seu uso fica restrito aos casos mais delicados. Contudo, há países que não possuem recursos para aquisição, nem mesmo da formulação mais antiga de AmB (CHEN e SORRELL, 2007; WHO, 2011).

Deste modo, é importante a busca por novos fármacos que visem: (i) a melhora na terapêutica; (ii) tratamentos mais curtos, (iii) menor risco de toxicidade; (iv) o mínimo desenvolvimento de resistência e (v) uma obtenção a baixos custos.

1.4 Compostos naturais

Produtos naturais bioativos e seus derivados semissintéticos têm historicamente fornecido uma fonte inigualável de agentes terapêuticos para tratar doenças infecciosas. Aproximadamente 80% de todos os antibióticos utilizados na clínica médica são diretamente (ou indiretamente) derivados de produtos naturais (ROEMER *et al.*, 2011; NEGRI *et al.*, 2014). Isso fica bastante evidente ao lembrarmos que Alexander Fleming, em 1928, descobriu a atividade antibiótica da penicilina, o primeiro antibiótico, a partir de *Penicillium notatum*. E ainda hoje, os compostos naturais são fonte da grande maioria dos fármacos antimicrobianos (PROCOPIO *et al.*, 2012). Quanto aos antifúngicos,

duas das três principais classes atualmente utilizadas, são derivadas de produtos naturais (polienos e equinocandinas) (ROEMER e KRYSAN, 2014).

Newman e Cragg publicaram uma avaliação dos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (agência reguladora de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos) no período de 1981 a 2010 considerando a fonte destas moléculas. Foram avaliados 1.355 fármacos lançados neste período, destes, aproximadamente 70% são fármacos de origem natural (extratos proteícos, extratos e compostos de plantas, metabólitos secundários de fungos, bactérias e cultivo celular) ou produtos de semissíntese ou sintéticos miméticos de produtos naturais. Ainda sobre estes dados, 30% destes fármacos são obtidos de plantas por extração ou purificação e mais 24% dos produtos de semissíntese e sintéticos miméticos tem origem em moléculas provenientes de plantas (NEWMAN e CRAGG, 2012). Dessa forma as plantas fornecem grande parte dos compostos precursores dos fármacos atualmente utilizados na clínica médica.

1.4.1 Iridoides

Compreendendo que as plantas podem ser uma das maiores fonte de novas moléculas para antifúngicos, nosso grupo de pesquisa descreveu a presença de atividade antifúngica nos compostos extraídos da planta *Allamanda polyantha* contra *Cryptococcus* spp. Estes compostos pertencem a classe de moléculas iridoides (BRESCIANI, 2013).

O nome iridoide é um termo genérico derivado do nome dos primeiros compostos isolados (iridomirmecina, iridolactona e iridodial) obtidos de algumas espécies de *Iridomyrmex* (um gênero de formiga) em que estes compostos são secreções como defensivas (EL-NAGGAR e BEAL, 1980). Contudo, os iridoides são em sua maioria metabólitos secundários da flora e fauna terrestre e marinha, sendo encontrados em grande número de famílias de plantas geralmente como glicosídeos. Estruturalmente eles são caracterizados por serem monoterpnoídes ciclopentano-[c]-pirano e estão presentes em um grande número de plantas utilizadas na medicina popular como sedativos, antipiréticos, cicatrizantes e outras desordens da pele. Estudando a atividade biológica de algumas plantas, descobriu-se que muitas das propriedades

medicinais eram provenientes de compostos iridoides presentes nestas plantas. Dessa forma, dentro da classe dos iridóides podem ser encontrados compostos com amplo espectro de atividades biológicas como: protetor cardiovascular, hepatoprotetor, hipoglicêmico e hipolipidêmico, anti-inflamatório, antiespasmódico, antitumoral, antiviral, imunomodulador, antibiótico, antifúngico, entre outros (GHISALBERTI, 1998; DINDA *et al.*, 2007a; DINDA *et al.*, 2009). A quantidade de compostos iridoides é incerta devido a grande quantidade de possíveis combinações que podem ser feitas tendo como base a a estrutura central ciclopentano-[c]-pirano. Dinda e colaboradores (2007, 2009, 2011) descreveram revisões contendo as descobertas de novos iridoides e suas atividades biológicas. Em sua primeira revisão, Dinda e colaboradores publicaram a descrição de 418 moléculas descobertas entre 1994 a 2005, na edição seguinte (de 2005 a 2008) foram catalogados mais 172 compostos e em sua última revisão (2008 - 2010) mais 129 novos compostos foram descritos (DINDA *et al.*, 2007a; b; DINDA *et al.*, 2009; DINDA *et al.*, 2011). Ou seja, em média são descobertas aproximadamente 45 novas moléculas iridoides por ano, baseado no registro dos últimos 16 anos (sem considerar as moléculas anteriormente descritas - aproximadamente 600 moléculas). Esses dados fazem com que os iridoides sejam um grande campo de pesquisa para moléculas biologicamente ativas.

1.4.2 Atividade antifúngica de iridoides

Bresciani (2013) avaliou a atividade biológica do extrato aquoso das sementes da planta *Allamanda polyantha*, conhecida pelo seu conteúdo de iridoides. Esta planta pertence a família Apocynaceae, a qual já foram identificadas diversas outras plantas contendo iridoides como metabolitos secundários (COPPEN e COBB, 1983; ABDEL-KADER *et al.*, 1997). A *A. polyantha*, conhecida popularmente como Alamanda-ereta ou Alamanda-de-cerca, é um arbusto semilenhoso comum no litoral brasileiro principalmente nas regiões norte e nordeste. Possui florescimento durante grande parte do ano, sendo mais expressivo na primavera com flores amarelas. Possui frutos capsulares espinhacentes contendo numerosas sementes aladas (SOUZA *et al.*, 2008; MONDIN, 2010).

O extrato aquoso de sementes de *A. polyantha* apresentou atividade antifúngica contra *C. gattii* (MIC = 70 µg/mL) e *C. neoformans* (MIC = 563 µg/mL), induzindo a um fenótipo hipocapsular em ambas as espécies e deformações na parede celular de *C. neoformans*, impedindo a separação do broto celular entre a célula mãe e célula filha, sem perder a orientação axial do brotamento, gerando um fenótipo do tipo "cordão de contas" como é possível observar na Figura 1.9. *C. gattii* não apresenta o mesmo fenótipo de alteração morfológica, mas também sofre o efeito fungicida do extrato de sementes (BRESCIANI, 2013).

Foram identificados neste extrato aquoso dois compostos com atividade antifúngica, sendo eles: o composto plumierídeo (isolado pela primeira vez em 1897 pela empresa Merck) (FRANCHIMONT, 1899; BOROS e STERMITZ, 1991) e o composto plumieridina (BOROS e STERMITZ, 1991). Este último, sem atividade biológica descrita até o momento.

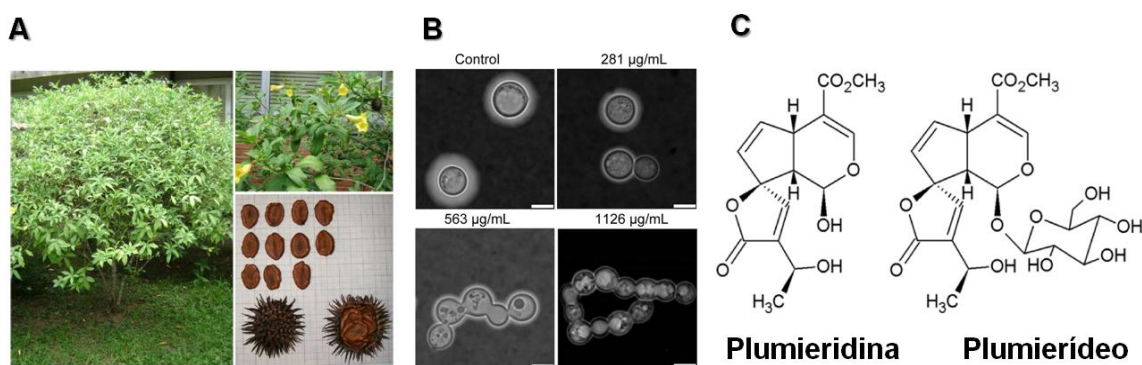


Figura 1.9: Compostos iridóides com atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp.

A) *Allamanda polyantha*. Arbusto ornamental (esquerda), flores (direita superior), frutos e semente (direita inferior). B) Células de *C. neoformans* em diferentes concentrações do extrato aquoso de sementes de *A. polyantha*. Barra de escala: 3µm. C) Compostos iridóides com atividade antifúngica. (Adaptado de BRESCIANI, 2013).

2 OBJETIVOS

Elucidar o mecanismo de ação do composto antifúngico plumieridina em *Cryptococcus gattii*.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar o *screening* de uma biblioteca de 7.000 mutantes haploides de *C. gattii* na presença do composto plumieridina;
- Selecionar mutantes de *C. gattii* sensíveis e resistentes ao composto em comparação à linhagem selvagem R265;
- Analisar os fenótipos relacionados aos principais fatores de virulência de *C. gattii* nos mutantes selecionados em comparação à linhagem selvagem R265;
- Determinar por PCR inverso e sequenciamento os genes inativados nas linhagens selecionadas;
- Avaliar através de ferramentas de biologia de sistemas a relação de interação entre as proteínas identificadas no estudo;

3 MANUSCRITO CIENTÍFICO

1 **Plumieridine antifungal action against *Cryptococcus gattii* through the**
2 **UPR pathway assessed by Genome-Wide Screening**

3

4 Adriana C, Silva¹, Vanessa A, Barcellos¹, Cláudia L, Fernandes¹, Renato K,
5 Corá¹, Charley C, Staats¹, Gilsane L, von Poser², Livia Kmetzsch¹, Marilene H,
6 Vainstein^{1*}.

7 1 - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
8 Porto Alegre, RS, Brazil;

9 2 - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
10 Porto Alegre, RS, Brazil;

11 *Corresponding author: Marilene Henning Vainstein. Centro de
12 Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa postal 15005.
13 91501-970. Porto Alegre. RS. Brazil. Phone: +55 (51) 3308-6060. E-mail:
14 mhv@cbiot.ufrgs.br.

15 **Keywords:** genome-wide screening; ER stress response; plumieridine;
16 iridoids; antifungal; *Cryptococcus gattii*.

17 **Abstract**

18 *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are etiological agents of
19 cryptococcosis, a disease characterized by meningoencephalitis and lung
20 injury. A high prevalence of cryptococcal infection has been reported among
21 immunocompromised patients in the last 20 years. The most common drugs
22 used for treatment are high-dose amphotericin B and 5-flucytosine, followed by
23 long fluconazole monotherapy. This leads to toxicity, antifungal resistance and
24 high costs. Antifungal activity found in the natural compound plumieridine,
25 extract from *Allamanda polyantha*, which may be a better option for the
26 development of new antifungal therapies. In order to elucidate the molecular
27 basis of plumieridine antifungal activity, a *C. gattii* mutant library obtained by
28 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was screened using
29 distinct plumieridine concentrations based on MIC value for *C. gattii*. One
30 resistant and ten susceptible mutants were found and the classical virulence
31 factors were evaluated. The genome-wide screening revealed the possible
32 involvement of some proteins in molecular mechanisms of plumieridine, such as
33 lysophospholipid acyltransferase, choline transporter, rhomboid protease,
34 arsenite transporting ATPase, BAG Protein and 26S proteasome regulatory
35 subunit N6. These proteins are related with different biological process linked to
36 Unfolded Protein Response (UPR) signaling pathway. This result suggests a
37 complex cell process triggered by endoplasmic reticulum stress with many
38 pathways indirectly affected by plumieridine, displaying a novel mechanism of
39 action in a potential antifungal agent.

40

Introduction

42 Cryptococcosis is an important opportunistic fungal infection that causes
43 1 million cases and 625,000 deaths per year among patients with HIV/AIDS
44 worldwide (Park, *et al.*, 2009, Pappas, 2013). This disease occurs globally and
45 is caused by *Cryptococcus neoformans* which generally infects severely
46 immunosuppressed patients (HIV-infected individuals, transplant recipients,
47 patients who are receiving immunosuppressive agents) or by *Cryptococcus*
48 *gattii* that predominantly affects immunocompetent individuals (Ma & May,
49 2009, Pappas, 2013). *C. gattii* was responsible for the Vancouver outbreak in
50 Canada in 1999, causing illness in hundreds of patients and animals (Idnurm, *et*
51 *al.*, 2005, Chen, *et al.*, 2014).

52 This systemic infection typically presents lung lesions including
53 cryptococcomas and frequently results in meningoencephalitis (Kronstad, *et al.*,
54 2011, Kwon-Chung, *et al.*, 2014, Zhang, *et al.*, 2015). *C. gattii* and *C.*
55 *neoformans* have three major virulence factors: (i) the ability to grow at human
56 body temperature; (ii) a polysaccharide capsule that protects fungal cells from
57 dehydration and interferes in phagocytosis by macrophages, and (iii) melanin
58 synthesis which protects the fungus from toxic free radicals that are produced
59 by the host defense system (Wang, *et al.*, 1995, Idnurm, *et al.*, 2005, Pukkila-
60 Worley, *et al.*, 2005, Doering, 2009, Ma & May, 2009, Zaragoza, *et al.*, 2009,
61 Zaragoza & Nielsen, 2013).

62 In general, the World Health Organization (WHO) recommends similar
63 treatment for *C. gattii* and *C. neoformans* infections, with amphotericin B (AmB)
64 plus 5-flucytosine (5-FC) for at least 6 weeks followed by oral fluconazole (FLC)
65 from 2 months to 1.5 years (Laniado-Laborin & Cabrales-Vargas, 2009, Lewis,
66 2011, WHO, 2011, Chen, *et al.*, 2014, Whitney & Bicanic, 2015). Nevertheless,
67 there are a large number of reports of cryptococcal resistance to antifungal
68 drugs. The isolation of FLC resistant strains is common, mainly in positive HIV
69 patients undergoing long-term azole maintenance therapy (Perfect, *et al.*, 2010,
70 Chen, *et al.*, 2014, Kwon-Chung, *et al.*, 2014). Besides that, all available
71 antifungal compounds have important adverse effects, such as hepatotoxicity in
72 20% of patients treated with FLC. Moreover, marrow toxicity and hepatotoxicity

73 may occur during treatment with 5-FC and intrinsic dose-dependent
74 nephrotoxicity is frequently associated with therapeutic doses of AmB (Vermes,
75 *et al.*, 2000, Chen & Sorrell, 2007).

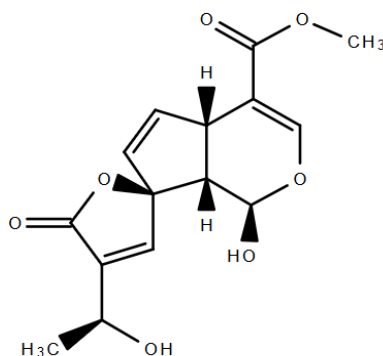
76 Therefore, the search for alternative treatments of invasive fungal infections
77 to minimize these problems is extremely necessary. Two out of the three major
78 classes of currently used antifungal agents are derived from natural products
79 (polyene and echinocandins). Echinocandins is effective against *Candida* spp,
80 but shows no activity against *Cryptococcus* (Roemer, *et al.*, 2011; Newman &
81 Cragg, 2012, 2016) In this context, the aim of this study was to investigate the
82 antifungal activity of plumieridine, an iridoid compound obtained from aqueous
83 seed extracts from *Allamanda polyantha* (Apocynaceae). Plumieridine has
84 antifungal activity against *C. neoformans* cells, promoting defects in bud
85 detachment (Bresciani, 2013). Toxicogenomics tools were used in order to
86 understand the molecular mechanisms of plumieridine action. Proteins involved
87 in the Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) process and in
88 the Unfolded Protein Response (UPR) pathway were identified.

89 **Materials and methods**

90 **Extraction and isolation of plumieridine**

91 The extraction and purification of plumieridine was performed according to the
92 method described by Bresciani (2013). Seeds (100 g) from *Allamanda*
93 *polyantha* were crushed, ultrapure water (300 mL) was added and the mixture
94 was incubated in a rotatory platform for 4 h at 200 rpm and 30 °C. The
95 suspension was centrifuged for 15 min at 3,500 x *g*. The supernatants were
96 collected and saved; the pellet underwent the same procedure twice, but for 90
97 min agitation. The saved supernatants were filtered in filter paper and glass
98 fiber filter AP25 (Merck Millipore). The final aqueous extract was completely
99 lyophilized at -50 °C and 0.040 mbar (Christ Alpha 1-4 LDplus, Germany) and
100 stored at -20 °C until use. Purification of the lyophilized extract was
101 accomplished by isocratic liquid chromatography. The column was prepared by
102 slurry packing with a dichloromethane:methanol (95:5) solvent mixture and
103 silica gel (70-320 mesh Merck) as the stationary phase. Fractions were
104 monitored by thin layer chromatography (TLC) using pre-coated silica gel 60

105 F₂₅₄ (Merck) plates and dichloromethane:methanol (95:5) and revealed with a
106 2 % anisaldehyde solution by heating at 110 °C. Fractions were compared to
107 the standard compound analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR).
108 Fractions containing the purified compound were pooled and stored as dry
109 powder at -20°C. When required, plumieridine was dissolved in 10 % DMSO
110 (Sigma) and a stock solution of 10 mg.mL⁻¹ was stored at 4 °C for no longer
111 than 7 days.



112

113 Fig 1: Chemical structure of the iridoid plumieridine isolated from *Allamanda*
114 *polyantha* crude seed extract.

115 Yeast strains, culture conditions and reagents

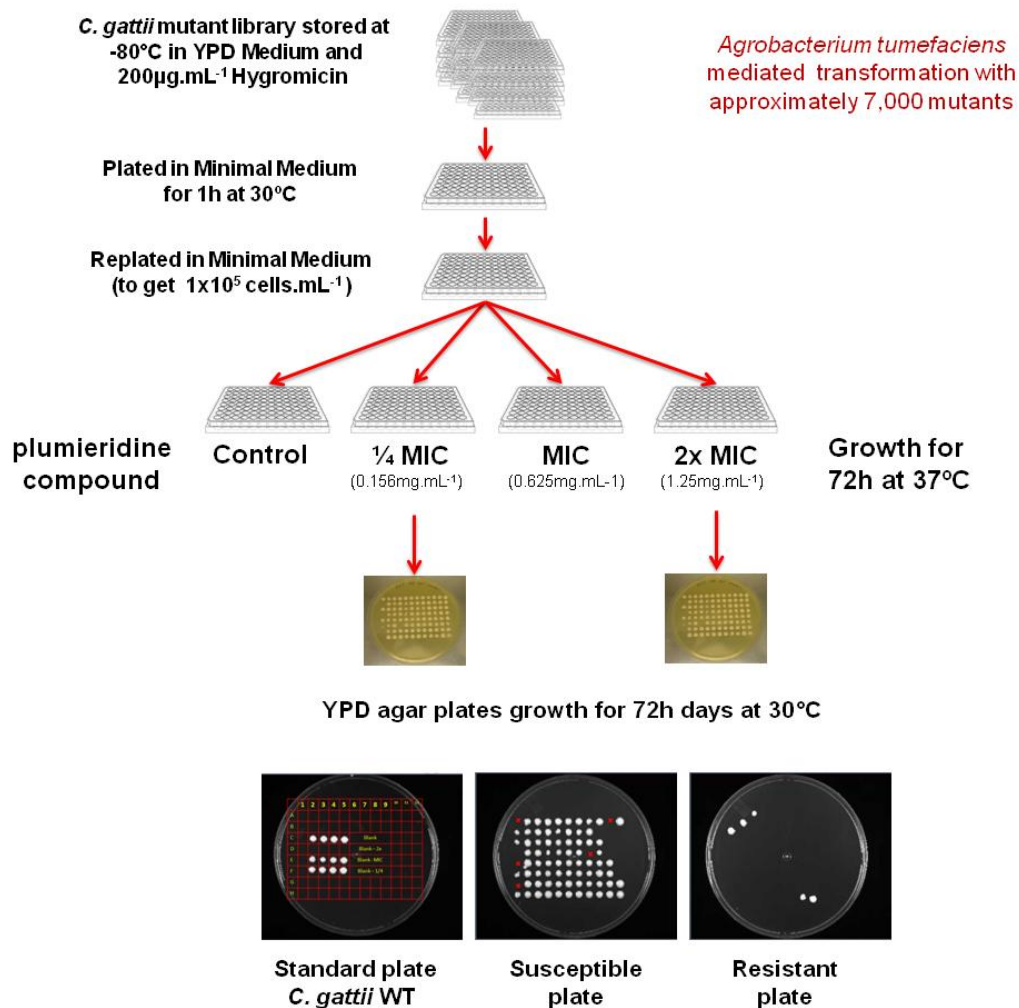
116 A *C. gattii* mutant library, with approximately 7,000 hygromycin resistant
117 mutants, was obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation
118 using the vector pPZP-HYG (*C. gattii* R265 background). Additional
119 experiments were conducted with *C. neoformans* H99 strain, *Candida albicans*
120 (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida glabrata* (ATCC
121 40136), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) and *Candida tropicalis* (ATCC
122 750). The *Candida* spp. strains were kindly provided by Dr. Alexandre
123 Fuentefria, from Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

124 The *C. gattii* mutant cells were grown and maintained in standard YPD
125 medium (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose) with 200 µg.mL⁻¹
126 hygromycin (Sigma) at 30 °C. For experimental procedures, minimal medium
127 (MM) (15 mM glucose, 10 mM MgSO₄, 29 mM KH₂PO₄, 13 mM glycine and 3
128 µM thiamine-HCl at pH 5.5) or RPMI-1640 Medium (Gibco) buffered with 0.165
129 mol.l⁻¹ 3-(Nmorpholino) propanesulfonic acid (MOPS) (Sigma) were used.

130 ***C. gattii* mutant library screening**

131 The mutant library was screened to search for plumieridine susceptible and
132 resistant mutants (Fig. 2). The library was replicated in 96-well plates with
133 minimal medium and incubated for 1 h at 30 °C. The fungal cells were stamped
134 onto 96-well plates with MM to obtain 1×10^5 cells.mL⁻¹. Afterwards, mutants
135 were inoculated in 96-well plates with MM containing distinct concentrations of
136 plumieridine (0.156 mg.mL⁻¹, 0.625 mg.mL⁻¹, 1.25 mg.mL⁻¹), based on the
137 minimal inhibitory concentration (MIC) value for the *C. gattii* R265 strain for 72 h
138 at 37 °C. Then, yeast cells were plated in YPD agar and incubated for a further
139 72 h at 30 °C. Resistant mutants were the ones that showed normal growth
140 after exposure to all compound concentrations; strains classified as susceptible
141 were the ones that exhibited growth inhibition at the concentrations tested. The
142 R265 wild-type (WT) strain was used as a control.

143 Protocol for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test (BDAST) was
144 conducted according to National Committee for Clinical Laboratory Standards
145 (NCCLS M27-A2). The MIC was defined as the lowest drug concentration that
146 prevents any visible growth at the condition tested. From each sample, 30 µl of
147 solution were plated in YPD agar. The Minimal Fungicide Concentration (MFC)
148 was also examined. Tests were performed in biological triplicates and technical
149 duplicates.



150

151 Fig 2: Genome-wide screening of plumieridine resistant and susceptible
 152 mutants.

153 **Genotypic analysis of *C. gattii* mutants**

154 General molecular biology manipulations were performed according to Green
 155 & Sambrook (2012). Genomic DNA was extracted following the phenol-
 156 chloroform protocol from selected mutants to identified flanking sequences of
 157 the insertion site by the inverse PCR method, as previously described by
 158 Idnurm *et al.* (2004), with minor modifications. Two µg of genomic DNA were
 159 digested with Bgl II, Sal I or Stu I (Promega) restriction enzymes overnight at 37
 160 °C. The digested DNA was ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen) by overnight
 161 incubation at 4 °C. Inverse PCR was performed using 1 µl of the ligation
 162 product and the primers AgRBI_n (5'-AACAGTTGCGCAGCCTGAATG-3') and
 163 AgLBI_n (5'-AGAGGCGGTTTGCGTATTGG-3'). The PCR products were gel-

164 purified by PureLink Gel Extraction Kit (Invitrogen) and sequenced. The high
165 quality sequences (Phred >20) were compared against the Broad Institute *C.*
166 *gattii* genome database (<http://www.broadinstitute.org/>) to determine the
167 position of the T-DNA insertion into the genome. Gene function was inferred by
168 comparison using the National Center for Biotechnology Information BLAST
169 network service (www.ncbi.nlm.nih.gov) and the Universal Protein Resource
170 (UniProt) database (<http://www.uniprot.org/>). Conserved domains analyses
171 were conducted using the Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) and Protein Sequence
172 Analysis & Classification (InterPro) platforms (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).
173 The Enzyme Commission (EC) and Transporter Classification (TC) numbers
174 were obtained in BRENDA Enzymes Database (<http://brenda-enzymes.org/>)
175 and Transporter Classification Database (<http://www.tcdb.org/>), respectively.

176 **Melanization assay and growth test**

177 Yeast cells were grown overnight in 20 mL YPD at 30 °C and 200 rpm in a
178 rotatory platform. The cells were washed with phosphate buffered saline (PBS)
179 and a 10-fold serial dilution was conducted starting with an OD₆₀₀ 0.1
180 (equivalent 1x10⁶ cells.mL⁻¹). Cells were plated in MM agar plates containing
181 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA 1 mM) with plumieridine (0.156
182 mg.mL⁻¹, 0.625 mg.mL⁻¹, 1.25 mg.mL⁻¹) or without it and the plates were
183 incubated for 5 days in the dark at 37 °C. For growth tests, fungal cells were
184 cultivated in YPD and MM agar plates with plumieridine (0.156 mg.mL⁻¹, 0.625
185 mg.mL⁻¹, 1.25 mg.mL⁻¹) or without it and incubated for 5 days in the dark at 30
186 °C and 37 °C.

187 **Capsule size measurement**

188 This assay was performed according to the method described by Zaragoza &
189 Casadevall (2004) with minor modifications. Briefly, yeasts cells were inoculated
190 in YPD and incubated overnight at 30 °C and 200 rpm. After centrifugation at
191 2760 x g for 15 min, the cells were washed and resuspended in PBS. Yeast
192 cells (1x10⁵ cells.mL⁻¹) were inoculated in MM with plumieridine (0.156 mg.mL⁻¹,
193 0.625 mg.mL⁻¹, 1.25 mg.mL⁻¹) or without it at 37 °C and 5 % CO₂ and incubated
194 for 72 h. After this period, the cells were washed with PBS, fixed with 4 %
195 paraformaldehyde, placed onto glass slides, mixed with India ink and visualized

196 in Axioplan 2 microscope (Zeiss, Germany). Images were acquired using a
197 digital camera and processed with the ImageJ software (NIH,
198 <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Capsule size was defined as the ratio between the
199 diameter of whole cell (including the polysaccharide capsule) and the cell body
200 (as limited by the cell wall). Capsule sizes of 100 cells were measured and
201 represented by the mean and the standard deviation.

202 **Protein-protein interaction analysis**

203 Protein sequences obtained from the Broad Institute database were analyzed
204 using the STRING 10 database tool (Szklarczyk, *et al.*, 2015). All matching
205 results belonged to *C. gattii* with identity higher than 85 %. The following
206 parameters were used: all active prediction methods were enabled except text
207 mining, no more than 200 interactions, and 0.400 medium confidence score.
208 The obtained network was analyzed in the Cytoscape 3.3.0 software
209 (<http://www.cytoscape.org>) using MCODE 1.4.1 App to evaluate global topology
210 and to find clusters. For the MCODE analysis, network degree cutoff 2 including
211 loops was utilized. In the cluster finding module the Haircut and Fluff
212 parameters were included. Node score cutoff was set to 0.2, node density to
213 0.1, K-core and maximum depth of network to 2 and 100, respectively. The
214 network centrality analyses were performed using CentiScaPe 1.21 App
215 through Cytoscape 3.3.0 software.

216 **Time-kill assay**

217 Yeast cells were grown overnight in YPD medium at 30 °C and 200 rpm.
218 Cells were washed with PBS and 1×10^4 cells.mL⁻¹ were incubated in RPMI-1640
219 medium (GIBCO, USA) with plumieridine (0.156 mg.mL⁻¹, 0.625 mg.mL⁻¹, 1.25
220 mg.mL⁻¹) or without it and incubated at 37 °C and 200 rpm. At predetermined
221 time points (0, 2, 4, 8 and 24 h), 100 µl of each sample were collected and 10-
222 fold serial dilutions were performed in PBS. Thirty µl of cell suspensions were
223 plated on YPD agar plates for colony forming unit (CFU) determination.
224 Experiments were performed in biological and technical duplicates (Klepser *et*
225 *al.*, 2000).

226

Results

227 Antifungal activity of plumieridine

228 In order to determine the susceptibility of *Cryptococcus* cells to plumieridine,
 229 BDAST was performed. *C. gattii* cells were less susceptible to plumieridine
 230 (MIC = 0.625 mg.mL⁻¹) than *C. neoformans* (MIC = 0.312 mg.mL⁻¹) (Table 1).
 231 The antifungal activity of plumieridine was also examined against *Candida* spp.
 232 We observed that the antifungal activity of plumieridine was not restricted to
 233 *Cryptococcus* spp. and *Candida krusei* was 4-times more susceptible than *C.*
 234 *gattii* (Table S1).

235 Additionally, time-kill assay was performed to provide critical information
 236 regarding whether plumieridine exhibits fungistatic and fungicide properties
 237 against cryptococcal cells. A time-kill plot of activity against *C. neoformans* and
 238 *C. gattii* is presented in Fig. 3. Plumieridine showed fungistatic activity at MIC
 239 concentration (0.625 mg.mL⁻¹), while an exposure of only 4 hours to 1.25
 240 mg.mL⁻¹ led to complete *C. gattii* cell death. The results obtained for *C.*
 241 *neoformans* were similar, with 0.625 and 1.25 mg.mL⁻¹ of plumieridine causing
 242 cell death after 24 h and 4 h of incubation, respectively. Interestingly, H99 and
 243 R265 have different times of response to the compound and H99 growth is
 244 inhibited in lower concentrations when compared to *C. gattii*.

245 **Table 1:** Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test (BDAST) for
 246 *Cryptococcus* spp. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal
 247 Fungicide Concentration (MFC) of plumieridine against *Cryptococcus*
 248 *neoformans* and *Cryptococcus gattii* in RPMI-1640 medium.

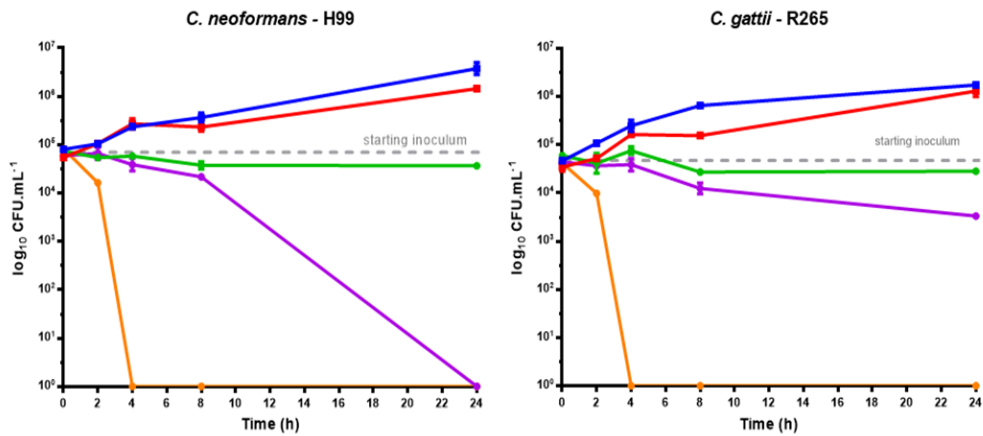
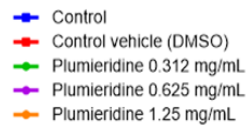
Specie	Strain	Plumieridine (mg.mL ⁻¹)	
		MIC	MFC
<i>Cryptococcus neoformans</i>	H99	0.312	0.625
<i>Cryptococcus gattii</i>	R265	0.625	1.25

249

250

251 A

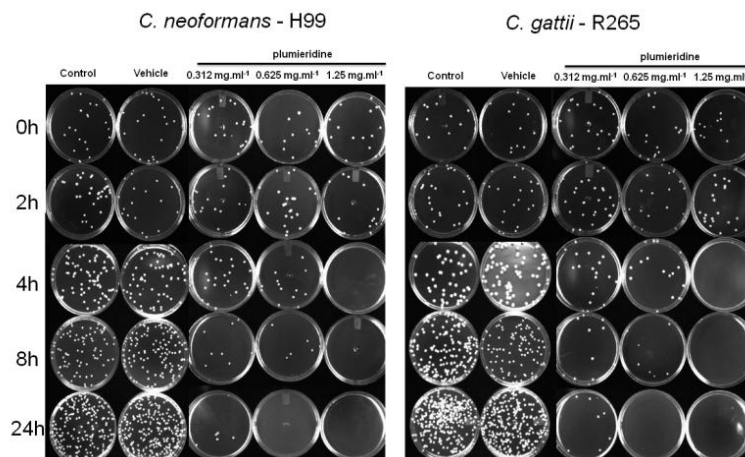
252



253

254

B



255

256

257

258

259

260

261

262

Fig 3: Time-Kill Curve. Yeast cells were grown in RPMI-1640 medium with or without plumieridine at 37 °C and 200 rpm. At predetermined time points (0, 2, 4, 8 and 24 h), 100 µl of each sample were collected and 10-fold serial dilutions were performed in PBS. Thirty µl of cell suspensions were plated on YPD agar plates for colony forming unit (CFU). Colony counts were determined after 48 h of incubation at 30 °C. A) Graphs expressed by mean and standard deviation; B) Representative agar YPD plates of each time.

263 **Genome-wide screening**

264 In the first phase of the screening test, 75 mutants were selected (29
265 plumieridine-resistant and 46 plumieridine-susceptible) according to the
266 established criteria. Secondary screening was performed by MIC determination
267 for each mutant compared to the WT strain in the same medium used during
268 the primary screening (MM). Finally, ten mutants were classified as susceptible
269 and one as resistant. The susceptibility tests results are shown in Table 2.

270 **Table 2:** Secondary screening of *C. gattii* selected mutants. Broth Dilution
271 Antifungal Susceptibility Test was performed in Minimal medium.

Strain	plumieridine(mg.mL ⁻¹)
	MIC
WT	0.156
LPLAT	0.312
RPN6	0.0195
RBD1	0.039
CTL1	0.039
GET3	0.039
S75-H4	0.039
BAG1	0.078
S64-G5	0.078
S66-B3	0.078
S66-G5	0.078
S74-B10	0.078

272

273 **Identification of loci containing the T-DNA insertion**

274 The selected mutants had their inactivated loci identified by inverse PCR and
275 DNA sequencing as described by Walton, *et al.* (2005). Identification of five
276 strains was not possible due to inherent technical difficulties, such as double T-
277 DNA insertion and to chromosomal rearrangements (data not shown). The
278 inactivated loci were identified for six mutants (Table 3).

279 **Table 3:** Gene identification of resistant and susceptible mutants.

Disrupted Gene	Gene Code*	Protein Name	Domains	EC/TC
CNBG_1524	LPLAT	Lysophospholipid Acyltransferases	Phospholipid/glycerol acyltransferase	2.3.1.51
CNBG_3091	BAG1	BAG1	BAG domain	Ligant**
CNBG_0044	RBD1	Rhomboïd protease	Peptidase S54. rhomboïd domain; UBA-like; Ubiquitin system component Cue	3.4.21.105
CNBG_3021	GET3	Arsenite transporting ATPase	Arsenical pump ATPase. ArsA/GET3	3.A.21.1.1
CNBG_3192	CTL1	Plasma-membrane Choline transporter	Choline transporter-like	2.A.3.4.1
CNBG_5095 [#]	RPN6	26S proteasome regulatory subunit N6	PCI/PINT associated module; Proteasome component (PCI) domain; Winged helix-turn-helix DNA-binding domain	Ligant**

280 * In this study we adopted the nomenclature shown in the column Gene Code based on the appointment of *Saccharomyces*
 281 *cerevisiae* genes to become more understandable the results.

282 **Proteins without catalytic action act as signaling ligants to other proteins.

283 # Hub bottleneck of the main network. (Betweenness unDir = 123.30 and Degree unDir = 27.14)

284 Enzyme Commission (EC) and Transporter Classification (TC).

285 The resistant mutant (R2-B10) had T-DNA inserted in the possible 5' UTR
286 region of the lysophospholipid acyltransferase (LPLAT) coding gene
287 (CNBG_1524). Regarding susceptible mutants, mutant S62-F3 had an insertion
288 next to 3' UTR of the gene coding for a choline transporter (*CTL1*)
289 (CNBG_3192). Mutant S62-C7 has the Rhomboid protease (*RBD1*) coding
290 gene (CNBG_0044) inactivated by the T-DNA inserted in the beginning of the
291 coding sequence. Mutant S74-A1 had the T-DNA inserted into 5' UTR region of
292 Arsenite transporting ATPase (*GET3*) (CNBG_3021) coding gene. Mutant S2-
293 E11 is inactivated in the 5' UTR region of the BAG Protein (*BAG*) coding gene
294 (CNBG_3091). Mutant S62-H4, the most sensitive to plumeridine, has the T-
295 DNA inserted into the 3' UTR of the 26S proteasome regulatory subunit N6
296 (*RNP6*) coding gene (CNBG_5095).

297 **Identified proteins network**

298 In order to evaluate the existence of relation between *GET3*, *RBD1*, *LPLAT*,
299 *BAG*, *CTL1* and *RPN6*, protein-protein interaction was designed employing
300 system biology methods and data from the orthologs from *Saccharomyces*
301 *cerevisiae*. The obtained network (109 nodes and 1485 edges) shows a non-
302 directed interaction among four proteins (Get3, Rbd1, LPLAT and Rpn6). Ctl1
303 and Bag could not be included in the network at first. Global topological analysis
304 was performed finding six valid clusters. Cluster 1 (score: 32.022) containing
305 Get3, Rbd1 and Rpn6, cluster 3 (score: 3.143) with Get3 and cluster 4 (score:
306 2.667) with LPLAT. Cluster 2 had a valid score, but had none identified protein.
307 Clusters 1, 3 and 4 were merged and the Ctl1 node was added to the original
308 network. Due to only a few studies being available about proteins with BAG
309 domain in yeast, this protein remained unconnected to the network. However,
310 since the human Bag6 protein is related with Get3 (related with human ASN1)
311 and polyubiquitin Ubi4 (related with human UBL4) (Chartron *et al.*, 2012), it was
312 included in the network with a dotted line (Fig. 4A).






313 In an attempt to understand the direct interaction between the Get3, Rbd1,
314 LPLAT and Rpn6 (in red), we found six proteins directly related to them.

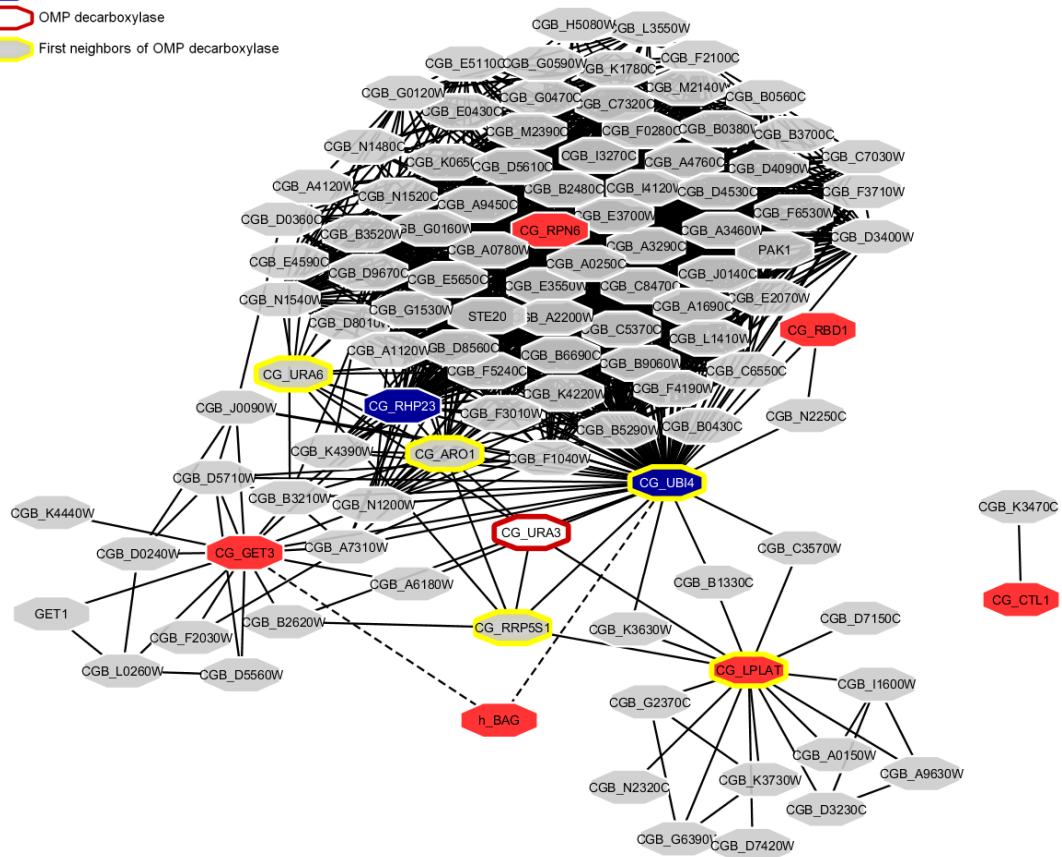
315 For intersection of the first neighbor networks of each identified protein,
316 polyubiquitin Ubi4 and UV excision repair protein Rhp23 (Ubi4 and Rhp23 are

317 hubs bottlenecks of main network, which have 17 hub bottlenecks). LPLAT
 318 interacts directly with orotidine 5'-phosphate decarboxylase (URA6 gene in *S.*
 319 *cerevisiae*, OMPdecase enzyme), an enzyme involved in *de novo* synthesis of
 320 uridine monophosphate (UMP). This pathway is the target of antifungal drug 5-
 321 flucytosine, which inhibits the enzyme thymidylate synthase. Among the first
 322 neighbors of OMPdecase (highlighted with yellow border) we found
 323 pentafunctional AroM protein (ARO1) (enzymes of shikimate pathway), the
 324 rRNA processing-related protein (RRP5S1) and the Uridine monophosphate
 325 kinase (URA3). These proteins connect Ubi4, Rhp23, Get3, Rbd1, LPLAT and
 326 Rpn6 (Fig. 4B). The complete list of all proteins in the network is present in
 327 Table S2.

328
 329

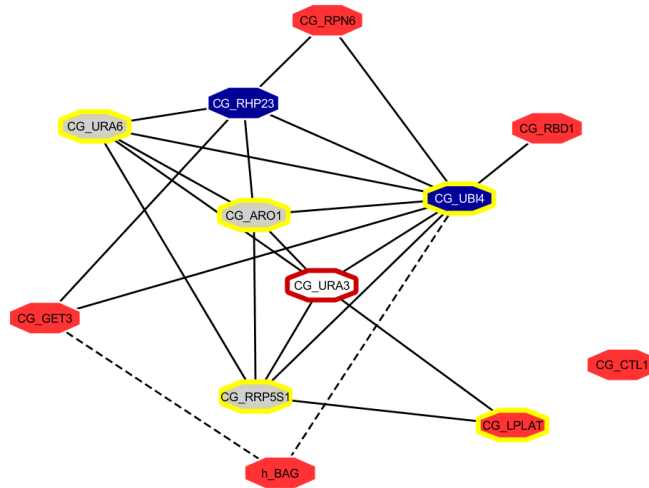
A

-  Proteins
-  Identified Proteins
-  Important Proteins
-  OMP decarboxylase
-  First neighbors of OMP decarboxylase



330
 331

332 B



333

334 Fig 4: Protein-protein interaction network. A) Network design by three
335 clusters containing one or more of the identified proteins (octagon nodes)
336 (Network: 109 nodes and 1479 edges). B) Direct connections between the
337 identified proteins and important proteins to interaction among them.

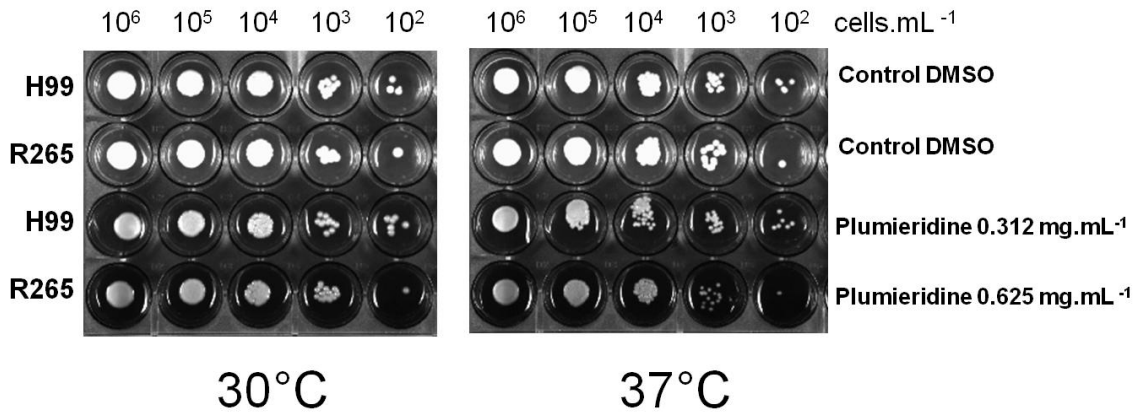
338 **Plumieridine affects *Cryptococcus* spp. growth in minimal medium at**
339 **37°C**

340 The effect of plumieridine on cryptococcal growth in distinct temperatures
341 was conducted in media: rich YPD and poor minimal medium containing. While
342 plumieridine did not affect the growth at 37 °C in YPD medium (Fig. 5A), the
343 effect on cryptococcal growth in minimal media was severely impacted (Fig.
344 5B). In addition, the production of melanin also appeared to be impaired.
345 Growth test (Fig. 6) and melanization assay (Fig. 7) for mutants were performed
346 in MM and 37 °C. All strains grown in the presence of plumieridine were
347 compared to the control at 30 °C. At 37 °C, RBD1 was more susceptible in
348 0.156 mg.mL⁻¹ (¼ MIC) and LPLAT more resistant. At MIC, none strain showed
349 a visible colony.

350 Regarding the melanization assay, apparently GET3 lacks melanin synthesis,
351 as possible see in control plate. All mutants grow less in the presence of L-
352 DOPA and ¼ MIC plumieridine in comparison to the same conditions without L-
353 DOPA. Differences in the melanization pattern of mutants in the presence of the
354 compound cannot be evaluated at 37 °C, because the compound affect the
355 growth at 37 °C in minimal medium.

356

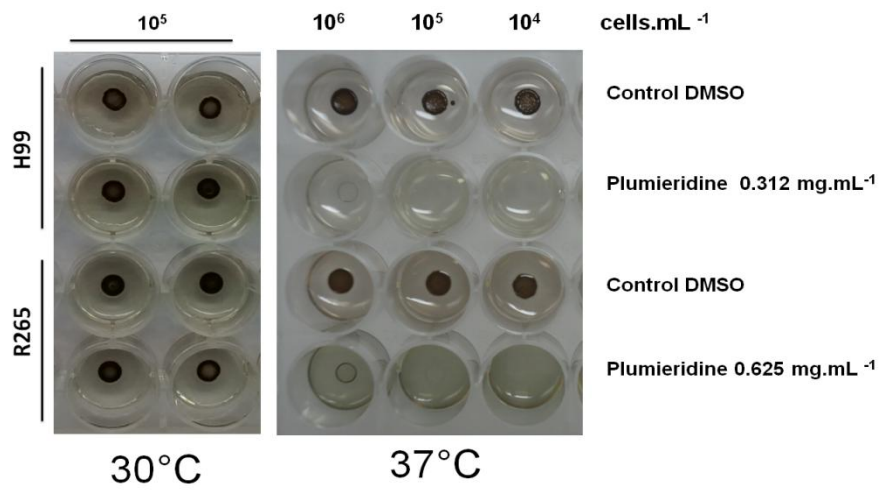
A



357

358

B



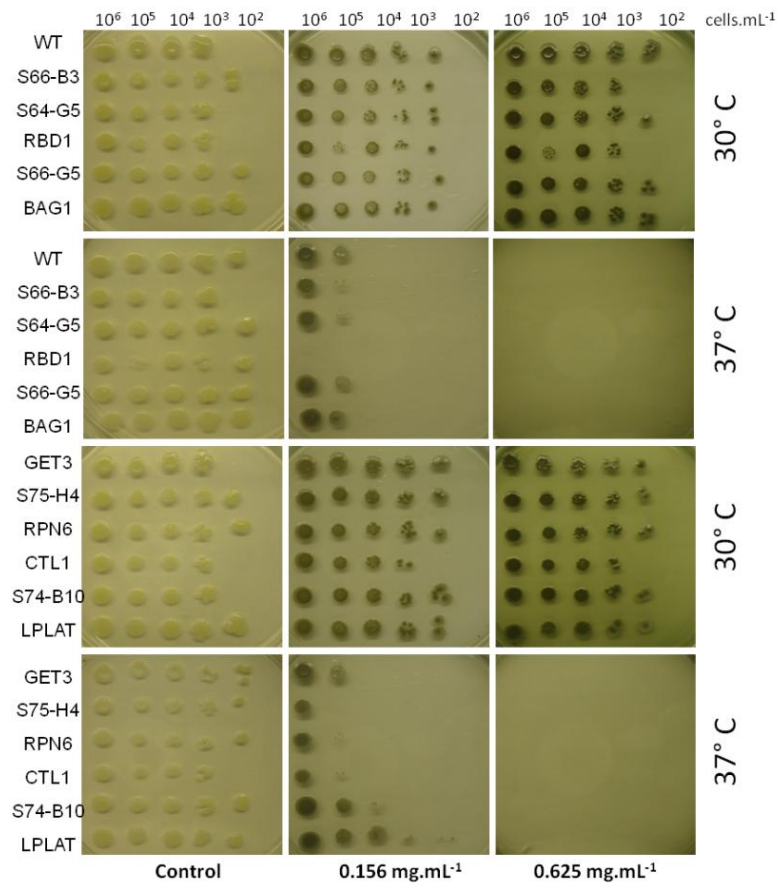
359

360

361

362

Fig 5: Growth comparison between wild-type strains of *Cryptococcus* spp. in the presence of plumieridine in 30 °C and 37 °C in minimal medium agar or YPD agar plates.



363

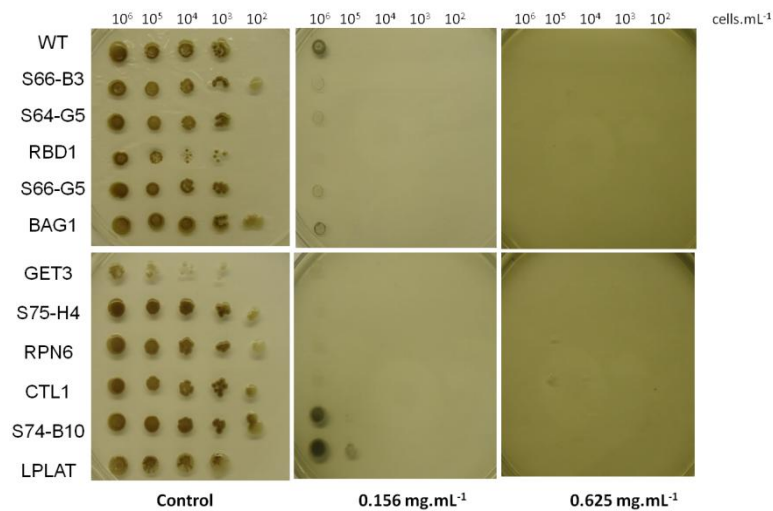
364

365

366

367

Fig. 6: Growth test in Minimal medium agar plates at 30 °C and 37 °C. Strains were diluted in 10-fold serial dilutions and plated in MM agar plates with or without plumieridine ($\frac{1}{4}$ MIC and MIC value for WT strain) and incubated for 5 days at 30 °C or 37 °C.



368

369

370

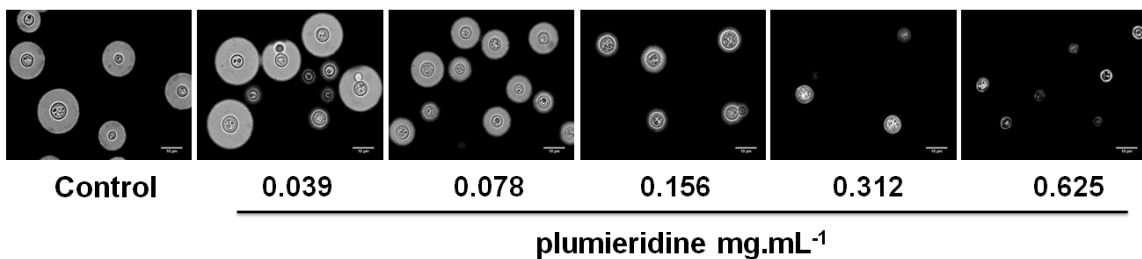
Fig. 7: Melanization assay in MM agar plates at 37 °C. Selected mutants and WT strain were grown on minimal medium with L-DOPA agar plates for 5 days

371 at 37 °C with plumieridine ($\frac{1}{4}$ MIC and MIC value for WT strain) or without
372 compound as control.

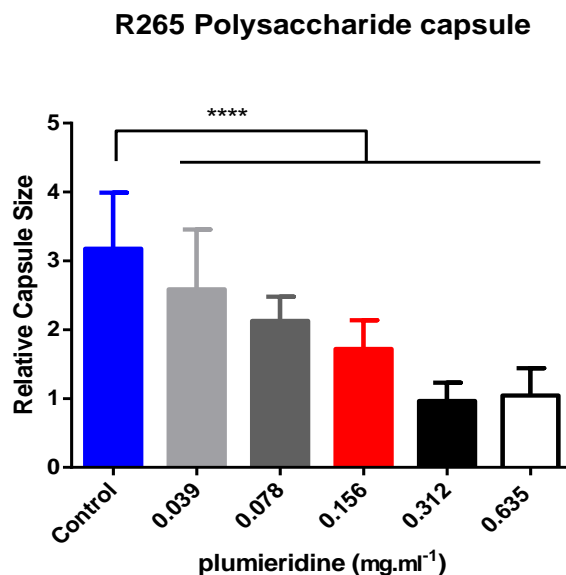
373 **Plumieridine affects the polysaccharide capsule**

374 Plumieridine decreases the polysaccharide capsule in WT strain and mutants
375 (Fig. 8). *C. gattii* displayed a smaller capsule than cells grown in the presence of
376 plumieridine. This effect is also reported in cells treated with drugs such as
377 amphotericin B, voriconazole and fluconazole *in vitro* and *in vivo* (van Duin, *et*
378 *al.*, 2004). The effect of capsule decrease is dose-dependent for the WT strain.
379 All mutants have a smaller capsule than the WT strain and show different
380 patterns in response to the presence of plumieridine. The capsule was not
381 completely removed, which can be seen by immunofluorescence using
382 monoclonal antibody against GXM (mAb 18B7, provided by Dr. Arturo
383 Casadevall) (data not show).

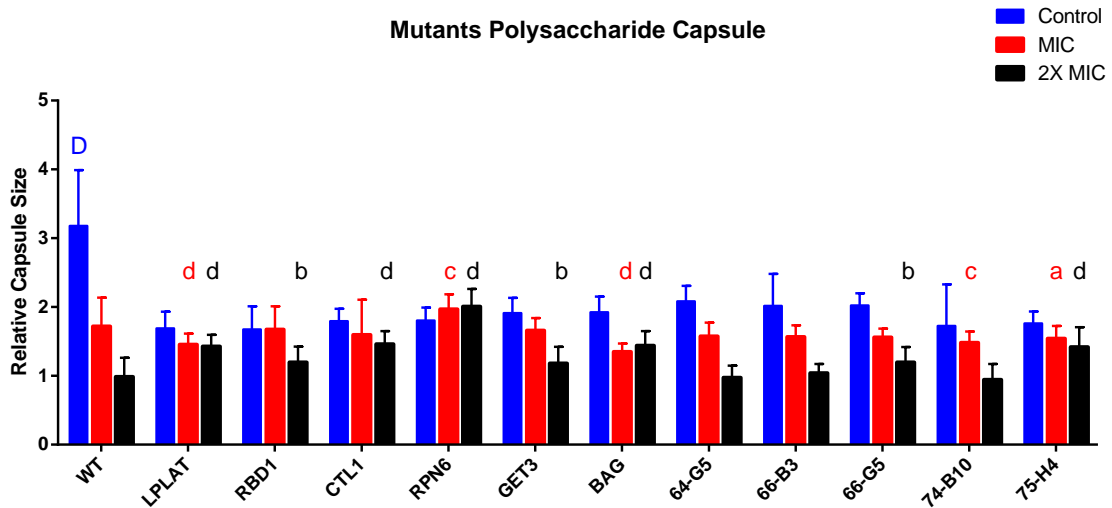
384 **A**



385 **B**



386



388

389

390

391

392

393

394

395

Fig 8: Polysaccharide Capsule Evaluation. Yeast cells were grown in MM with or without plumieridine at 37 °C and 5% CO₂ for 72h. A) Suspension of the cells in India Ink. Scale bar: 10 µm; B) Measurement of WT polysaccharide capsule. Statistical analysis: One-way ANOVA ****p≤0.0001; C) Measurement of mutants polysaccharide capsule. Statistical analysis: Two-way ANOVA. Compared to WT at the same concentration a: p≤0.05, b: p≤0.01; c: p≤0.005, d: p≤0.0001 and D p≤0.0001 for control data.

396

Discussion

397

398

399

400

401

To provide an integrative view about how cells interact with their environment, functional toxicogenomic is becoming an important methodology for studies of biological function of genes regarding the toxic effect of a compound or environmental stress, providing a direct link between gene and toxicant (Dos Santos, *et al.*, 2012).

402

403

404

405

406

407

408

In accordance with this, we performed a functional screening with a *C. gattii* mutant library in the presence of plumieridine. Our aim was identify possible targets of plumieridine in the *C. gattii* genome. After this analysis, we identified the inactivated loci of five susceptible mutants (GET3, RBD1, BAG, CTL1 and RPN6) and one resistant mutant (LPLAT). LPLAT is an enzyme that has 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase and 1-acylglycero-phosphocholine O-acyltransferase activities (Hishikawa *et al.*, 2014). O-acyltransferase

409 mediates incorporation of unsaturated acyl chains into phospholipids. According
410 to the classification of Gene Ontology, LPLAT is involved in glycerophospholipid
411 biosynthetic process, and is predicted as transmembrane enzyme (assessed by
412 Phobius webserver (Kall, *et al.*, 2007). However, in *S. cerevisiae* LPLAT is
413 localized at the endoplasmic reticulum (ER) membrane and some isoforms are
414 present in mitochondria (Testet, *et al.*, 2005).

415 Ctl1, which belongs to the plasma membrane cellular component, is a
416 transporter involved with (R)-carnitine and glycine transmembrane transport,
417 and with choline and ethanolamine transport according to Gene Ontology. In *S.*
418 *cerevisiae*, choline/ethanolamine transporters are also involved in the uptake of
419 nitrogen mustard (Zufferey, *et al.*, 2009). This transporter is co-regulated by
420 phospholipid biosynthetic genes and negatively regulated by choline and myo-
421 inositol (Yon, *et al.*, 1998).

422 Rbd1 is involved with regulation of mitochondrion organization and signal
423 peptide processing. *C. gattii*'s sequence has a mitochondrial signal peptide
424 (evaluated by MitoProt (Claros & Vincens, 1996)), which acts in the
425 mitochondrial inner membrane. This protease catalyzes the hydrolysis of
426 peptide bonds in transmembrane proteins (Cipolat, *et al.*, 2006).

427 Get3 is a required transporter for post-translational delivery of tail-anchored
428 (TA) proteins to ER. Get3 recognizes and selectively binds to transmembrane
429 domain of TA proteins in the cytosol cooperates with HDEL receptor ERD2 to
430 mediate ATP-dependent retrieval of resident ER proteins, which contain a
431 retention signal from Golgi to the ER. (Hemmingsson, *et al.*, 2009; Voth, *et al.*,
432 2014). Get3 form together with other proteins an arsenite pump to catalyze
433 extrusion of arsenite, arsenate and antimonite (Zhou, *et al.*, 2000). This ATPase
434 acts also in heat tolerance (Shen, *et al.*, 2003). This protein is involved in ATP-
435 independent chaperone mediated protein folding, pheromone-dependent signal
436 transduction, conjugation with cellular fusion, post translational protein targeting
437 to membrane, response to arsenic-containing substance, response to heat and
438 retrograde vesicle-mediated transport (Voth, *et al.*, 2014).

439 BAG protein is well known for their interaction with *Bcl-2* in humans
440 (Takayama, *et al.*, 1995; Doong, *et al.*, 2002). As previously reported in yeast,
441 BAG inhibits the chaperone activity of HSP70 by promoting substrate release

442 (Briknarová, *et al.*, 2001). This protein is involved with nucleus-associated
443 proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process and is localized in
444 ER and nuclear membranes (Mock, *et al.*, 2015). In humans, BAG plays a key
445 role in various processes such as apoptosis, insertion of tail-anchored (TA)
446 membrane proteins to the ER membrane and regulation of chromatin. BAG
447 regulates the stability and the degradation of proteins by the proteasome (Mock,
448 *et al.*, 2015).

449 Subunit N6 is a 26S proteasome lid subcomplex component, a multiprotein
450 complex involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins
451 (Voges, *et al.*, 1999; Kim, *et al.*, 2011). Studies of human *RPN6* showed the
452 involvement of Rpn6 in activation of MAPKK activity. Gene Ontology classified
453 *RPN6* as anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-
454 dependent protein catabolic process, apoptotic process, cellular nitrogen
455 compound metabolic process, DNA damage response, signal transduction by
456 p53 class mediator resulting in cell cycle arrest, negative regulation of ubiquitin-
457 protein ligase activity involved in mitotic cell cycle, protein polyubiquitination and
458 others.

459 All of these proteins are related to cell death. For instance: Sphingo- and
460 glycerophospholipids and the enzymes involved in lipids pathways (such as
461 LPLAT) participate in signaling cascades related to lipoapoptosis (Reina-Pinto &
462 Yephremov, 2009). In *Schizosaccharomyces pombe*, the choline transporter-
463 like protein interacts with *atg9* and is required for autophagosome formation
464 (Sun, *et al.*, 2013). *S. cerevisiae* $\Delta RBD1$ cells display fragmented mitochondria,
465 being more sensible to oxidative phosphorylation. This process occurs due to
466 lack of Mgm1p cleavage, which control mitochondrial morphology and fusion.
467 $\Delta RBD1$ in *S. cerevisiae* presents mitochondrial swelling (Herlan, *et al.*, 2003), a
468 classical apoptosis characteristic.

469 Protein-protein interaction analysis provided an interesting connection among
470 the identified proteins in this study. Polyubiquitin Ubi4 plays a central role in the
471 interaction among proteins in the ubiquitin process. Ubiquitin is covalently
472 attached to substrate proteins by a protein complex usually including an
473 activating enzyme (E1), a conjugating enzyme (E2) and a protein ligase (E3).
474 When polyubiquitin chains are attached to a target protein, depending on the

475 Lys residue of the ubiquitin, different functions can be triggered: DNA repair,
476 ERAD through protein degradation via proteasome, cell-cycle regulation,
477 lysosomal degradation, kinase modification, endocytosis and DNA-damage
478 responses. Among the identified proteins, four play a part in the ubiquitin
479 process. Rpn6 is a subunit of the proteasome, which, when inhibited, activates
480 the mitochondrial pathway of apoptosis by disrupting the equilibrium of pro-
481 apoptotic and anti-apoptotic proteins at the outer mitochondrial membrane and
482 by inducing the generation of reactive oxygen species (ROS). Proteasome
483 inhibition leads to accumulation of pro-apoptotic proteins (Berges, *et al.*, 2009).
484 Not only Rpn6, but also Bag are required for selective ubiquitin-mediated
485 degradation of defective nascent chain polypeptides by the proteasome. Bag
486 participates in ER stress-induced apoptosis via interaction with AIFM1/AIF by
487 regulating stability and preventing degradation in mammals (Wu, *et al.*, 2004,
488 Leznicki, *et al.*, 2010, Rodrigo-Brenni, *et al.*, 2014)

489 In yeast, ER stress is monitored by the transmembrane sensor protein Ire1. It
490 is activated by either direct binding of unfolded proteins, or from the release of
491 the molecular chaperone BiP from the luminal domain of Ire1. When activated,
492 the cytosolic ribonuclease domain of Ire1 cleaves the intron of pre-messenger
493 RNA HAC1 to initiate synthesis of Hac1 transcription factor. Hac1 then
494 translocates into the nucleus to regulate the expression of UPR target genes.
495 The UPR can alleviate stress by reversing severe dysfunctions through the up-
496 regulation of nearly 400 target genes. These target genes include ER
497 chaperones, lipid biosynthesis enzymes and ERAD (ER-associated
498 degradation) machinery. UPR pathway regulates ER homeostasis upon
499 exposure to environmental changes causing ER stress. In general, the UPR
500 program activates hundreds of genes to alleviate ER stress but it can lead to
501 apoptosis if the system fails to restore homeostasis (Wang & Kaufman, 2014,
502 Wu, *et al.*, 2014). In *Cryptococcus* spp. UPR pathway regulates ER stress,
503 antifungal drug resistance, and virulence in an Ire1/ Hxl1-dependent manner,
504 *Ire1* has *Hxl1*-independent roles in capsule biosynthesis and thermotolerance
505 (Cheon, *et al.*, 2014, Wu, *et al.*, 2014).

506 Signaling in response of plumieridine possibly involves UPR pathway, and
507 this can be observed in virulence factors assays. Plumieridine cause decrease

508 on polysaccharide capsule. This phenomenon is induced by other drugs (van
509 Duin, *et al.*, 2004, Santos, *et al.*, 2014) and not necessarily means some step in
510 the capsule biosynthesis pathway is a target, but as a consequence of cell
511 stress. About the influence of rich or poor nutrient conditions, in this study we
512 performed polysaccharide capsule induction in MM and in RPMI-1640 medium
513 at 5%CO₂. In both conditions plumieridine decrease polysaccharide capsule,
514 not being the amount of nutrients a factor that alters the polysaccharide capsule
515 synthesis. Although, in H99 strains the amount of cell with aberrant morphology
516 is 5.5-fold increased in poor medium (Fig S2). Besides that, very interesting
517 results are show in melanization and growth tests. *Cryptococcus* spp. are less
518 tolerant to plumieridine when is incubated in MM and 37°C, worst in presence of
519 L-DOPA. Minimal Medium is a poor nutrient condition which mimic low glucose
520 environment, such as cerebrospinal fluid. Different nutrient conditions could
521 potentially change the compound efficacy (Rabjohns, *et al.*, 2014). For this
522 reason, tested conditions mimicry environment host, being very stressful for
523 pathogens. All things considered, plumieridine could be very good activity
524 during disease.

525 Plumieridine is a compound first isolated more than 100 years ago
526 (Franchimont, 1899; Boros and Stermitz, 1991), however have its antifungal
527 activity recently described (Bresciani, 2013). Having a completely different
528 structure from other antifungal agents, plumieridine presented a peculiar mode
529 of action and important effects against *Cryptococcus* spp., which may lead to a
530 reduction of virulence during infection.

531 Finally, we propose the mechanism of action of plumieridine may be
532 implicate endoplasmic-associated protein degradation (ERAD) stress response
533 and consequently, an indirect way the Unfolded Protein Response (UPR)
534 pathway, possibly triggered by inhibition of orotidine 5'-phosphate
535 decarboxylase, considering the interaction of this enzyme into network.
536 Moreover, in another front of this search, OMPdecase was listed as a potential
537 target protein of plumieridine by pharmacophore mapping approaches and
538 molecular docking (unpublished data). In comparison with 5-flucytosine, which
539 affects the same pathway, iridoids are structurally distinct than 5-FC, and it
540 might be an alternative for antifungal drugs.

541

Acknowledgements

542 This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
543 de Nível Superior (CAPES), Brazil (grant toxicologia – CAPES nº 063/2010) to
544 M.H.V. We kindly thank Prof Márcio Rodrigues and Prof Mendeli H. Vainstein
545 for the critical review and correction of the manuscript.

546

References

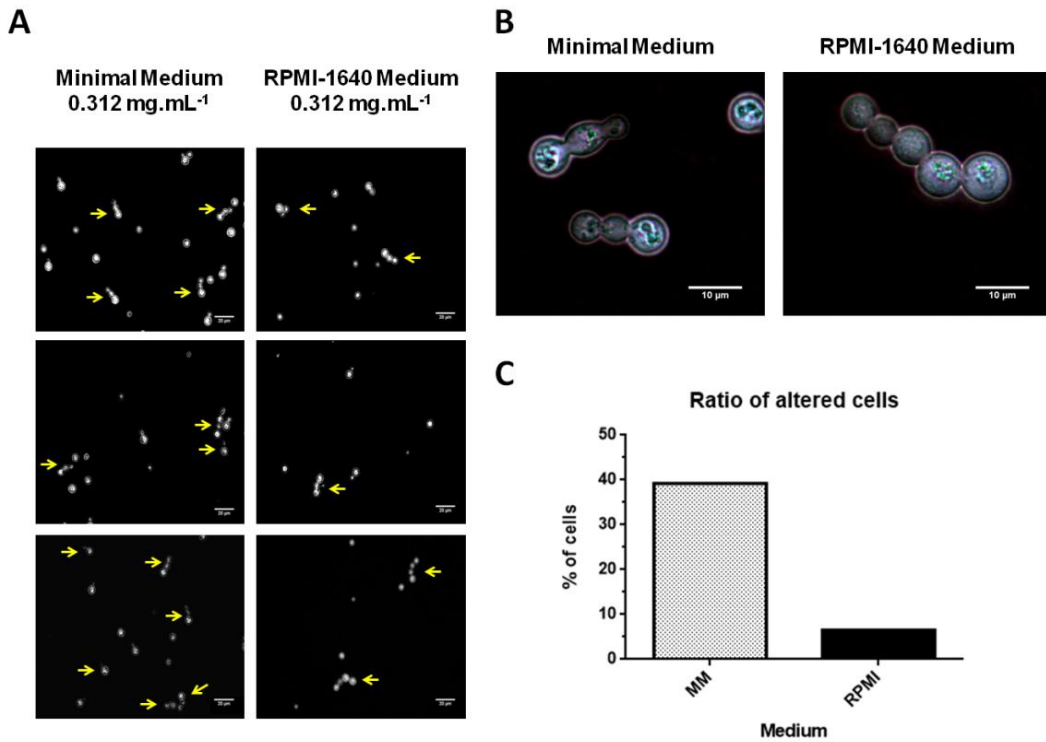
- 547 Berges C, Haberstock H, Fuchs D, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V & Naujokat C (2009)
548 Proteasome inhibition activates the mitochondrial pathway of apoptosis in human CD4+ T
549 cells. *J Cell Biochem* **108**: 935-946.
- 550 Bresciani FR (2013) Caracterização da atividade antifúngica de extrato aquoso de sementes de
551 Allamanda polyantha. Dissertação Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. ,
552 Porto Alegre.
- 553 Briknarova K, Takayama S, Brive L, *et al.* (2001) Structural analysis of BAG1 cochaperone and
554 its interactions with Hsc70 heat shock protein. *Nat Struct Biol* **8**: 349-352.
- 555 Chen SC & Sorrell TC (2007) Antifungal agents. *Med J Aust* **187**: 404-409.
- 556 Chen SC, Meyer W & Sorrell TC (2014) Cryptococcus gattii infections. *Clin Microbiol Rev* **27**:
557 980-1024.
- 558 Cheon SA, Jung KW, Bahn YS & Kang HA (2014) The unfolded protein response (UPR)
559 pathway in Cryptococcus. *Virulence* **5**: 341-350.
- 560 Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, *et al.* (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates
561 cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**:
562 163-175.
- 563 Claros MG & Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported
564 proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786.
- 565 Danielson TJ, Hawes EM & Bliss CA (1975) The identification of iridoids of Mentzelia
566 decapetala by two-dimensional paper chromatography. *Journal of Chromatography A*
567 **103**: 216-218.
- 568 Doering TL (2009) How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation
569 in Cryptococcus neoformans. *Annu Rev Microbiol* **63**: 223-247.
- 570 Doong H, Vrailas A & Kohn EC (2002) What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the
571 BAG-family proteins. *Cancer Lett* **188**: 25-32.
- 572 Dos Santos, SC, (2012) Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses
573 with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. *Front Genet*,
574 **3**(63):1-17 .
- 575 Girmenia C, Venditti M & Martino P (2003) Fluconazole in combination with flucytosine in the
576 treatment of fluconazole-resistant Candida infections. *Diagnostic Microbiology and*
577 *Infectious Disease* **46**: 227-231.
- 578 Green MR & Sambrook J (2012) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor
579 Laboratory.
- 580 Hemmingsson O, Zhang Y, Still M & Naredi P (2009) ASNA1, an ATPase targeting tail-
581 anchored proteins, regulates melanoma cell growth and sensitivity to cisplatin and
582 arsenite. *Cancer Chemother Pharmacol* **63**: 491-499.
- 583 Herlan M, Vogel F, Bornhvd C, Neupert W & Reichert AS (2003) Processing of Mgm1 by the
584 rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology
585 and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* **278**: 27781-27788.
- 586 Hishikawa D, Hashidate T, Shimizu T & Shindou H (2014) Diversity and function of membrane
587 glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J Lipid*
588 *Res* **55**: 799-807.
- 589 Idnurm A, Reedy JL, Nussbaum JC & Heitman J (2004) Cryptococcus neoformans virulence
590 gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryot Cell* **3**: 420-429.

- 591 Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA & Heitman J (2005) Deciphering the model
592 pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* **3**: 753-764.
- 593 Kall L, Krogh A & Sonnhammer EL (2007) Advantages of combined transmembrane topology
594 and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Res* **35**: W429-432.
- 595 Kim HM, Yu Y & Cheng Y (2011) Structure characterization of the 26S proteasome. *Biochim*
596 *Biophys Acta* **1809**: 67-79.
- 597 Klepser ME, Malone D, Lewis RE, Ernst EJ & Pfaller MA (2000) Evaluation of voriconazole
598 pharmacodynamics using time-kill methodology. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1917-
599 1920.
- 600 Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, *et al.* (2011) Expanding fungal pathogenesis:
601 *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Micro* **9**: 193-203.
- 602 Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A & Bahn YS (2014)
603 *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of
604 cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**: a019760.
- 605 Laniado-Laborin R & Cabrales-Vargas MN (2009) Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev*
606 *Iberoam Micol* **26**: 223-227.
- 607 Lewis RE (2011) Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* **86**: 805-817.
- 608 Lewis RE, Klepser ME & Pfaller MA (2000) In vitro pharmacodynamic characteristics of
609 flucytosine determined by time-kill methods☆. *Diagnostic Microbiology and Infectious*
610 *Disease* **36**: 101-105.
- 611 Leznicki P, Clancy A, Schwappach B & High S (2010) Bat3 promotes the membrane integration
612 of tail-anchored proteins. *J Cell Sci* **123**: 2170-2178.
- 613 Ma H & May RC (2009) Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol* **67**: 131-190.
- 614 Martinez LR, Ntiamoah P, Gacser A, Casadevall A & Nosanchuk JD (2007) Voriconazole
615 inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:
616 4396-4400.
- 617 Mock JY, Chartron JW, Zaslaver M, Xu Y, Ye Y & Clemons WM, Jr. (2015) Bag6 complex
618 contains a minimal tail-anchor-targeting module and a mock BAG domain. *Proc Natl Acad*
619 *Sci U S A* **112**: 106-111.
- 620 Newman DJ & Cragg GM (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years
621 from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **75**: 311-335.
- 622 Pappas PG (2013) Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. *Trans Am Clin Climatol*
623 *Assoc* **124**: 61-79.
- 624 Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG & Chiller TM (2009)
625 Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living
626 with HIV/AIDS. *Aids* **23**: 525-530.
- 627 Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, *et al.* (2010) Clinical practice guidelines for the
628 management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of
629 america. *Clin Infect Dis* **50**: 291-322.
- 630 Pukkila-Worley R, Gerrald QD, Kraus PR, *et al.* (2005) Transcriptional network of multiple
631 capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP
632 cascade. *Eukaryot Cell* **4**: 190-201.
- 633 Rabjohns JLA, Park Y-D, Dehdashti J, *et al.* (2014) A High Throughput Screening Assay for
634 Fungicidal Compounds against: *Cryptococcus neoformans*. *Journal of biomolecular*
635 *screening* **19**: 270-277.
- 636 Reina-Pinto JJ & Yephremov A (2009) Lipid determinants of cell death. *Plant Signal Behav* **4**:
637 625-628.
- 638 Rodrigo-Brenni MC, Gutierrez E & Hegde RS (2014) Cytosolic quality control of mislocalized
639 proteins requires RNF126 recruitment to Bag6. *Mol Cell* **55**: 227-237.
- 640 Roemer T, Xu D, Singh SB, *et al.* (2011) Confronting the challenges of natural product-based
641 antifungal discovery. *Chem Biol* **18**: 148-164.
- 642 Sandoval-Denis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW & Guarro J (2014) In vitro
643 pharmacodynamics and in vivo efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin
644 in a murine infection by *Candida lusitanae*. *Int J Antimicrob Agents* **43**: 161-164.
- 645 Santos JR, Holanda RA, Frases S, *et al.* (2014) Fluconazole alters the polysaccharide capsule
646 of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. *PLoS*
647 *One* **9**: e112669.
- 648 Shen J, Hsu CM, Kang BK, Rosen BP & Bhattacharjee H (2003) The *Saccharomyces*
649 *cerevisiae* Arr4p is involved in metal and heat tolerance. *Biometals* **16**: 369-378.

- 650 Sun LL, Li M, Suo F, *et al.* (2013) Global analysis of fission yeast mating genes reveals new
651 autophagy factors. *PLoS Genet* **9**: e1003715.
- 652 Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, *et al.* (2015) STRING v10: protein-protein interaction
653 networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* **43**: D447-452.
- 654 Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA & Reed JC (1995) Cloning and
655 functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity.
656 *Cell* **80**: 279-284.
- 657 Testet E, Laroche-Traineau J, Noubhani A, *et al.* (2005) Ypr140wp, 'the yeast tafazzin', displays
658 a mitochondrial lysophosphatidylcholine (lyso-PC) acyltransferase activity related to
659 triacylglycerol and mitochondrial lipid synthesis. *Biochem J* **387**: 617-626.
- 660 van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A & Nosanchuk JD (2004) Effects of
661 voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2014-
662 2020.
- 663 Vermes A, Guchelaar HJ & Dankert J (2000) Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical
664 indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* **46**:
665 171-179.
- 666 Voges D, Zwickl P & Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine
667 designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068.
- 668 Voth W, Schick M, Gates S, *et al.* (2014) The protein targeting factor Get3 functions as
669 ATP-independent chaperone under oxidative stress conditions. *Mol Cell* **56**: 116-127.
- 670 Wang M & Kaufman RJ (2014) The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding
671 environment on cancer development. *Nat Rev Cancer* **14**: 581-597.
- 672 Wang Y, Aisen P & Casadevall A (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence:
673 mechanism of action. *Infect Immun* **63**: 3131-3136.
- 674 Whitney LC & Bicanic T (2015) Treatment principles for *Candida* and *Cryptococcus*. *Cold
675 Spring Harb Perspect Med* **5**.
- 676 WHO WHO (2011) Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal
677 disease in HIV-infected adults, adolescents and children. (Press W, ed.^eds.), p.^pp.
678 Geneva, Switzerland.
- 679 Wu H, Ng BS & Thibault G (2014) Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans.
680 *Biosci Rep* **34**.
- 681 Wu YH, Shih SF & Lin JY (2004) Ricin triggers apoptotic morphological changes through
682 caspase-3 cleavage of BAT3. *J Biol Chem* **279**: 19264-19275.
- 683 Yon JO, Nakamura H, Ohta A & Takagi M (1998) Incorporation of extracellular phospholipids
684 and their effect on the growth and lipid metabolism of the *Saccharomyces cerevisiae*
685 *cho1/pss* mutant. *Biochim Biophys Acta* **1394**: 23-32.
- 686 Zaragoza O & Casadevall A (2004) Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus
687 neoformans*. *Biol Proced Online* **6**: 10-15.
- 688 Zaragoza O & Nielsen K (2013) Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant
689 impact. *Curr Opin Microbiol* **16**: 409-413.
- 690 Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E & Casadevall A (2009) The
691 capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* **68**: 133-
692 216.
- 693 Zhang M, Sun D & Shi M (2015) Dancing cheek to cheek: *Cryptococcus neoformans* and
694 phagocytes. *Springerplus* **4**: 410.
- 695 Zhou T, Radaev S, Rosen BP & Gatti DL (2000) Structure of the ArsA ATPase: the catalytic
696 subunit of a heavy metal resistance pump. *EMBO J* **19**: 4838-4845.
- 697 Zufferey R, Santiago TC, Brachet V & Ben Mamoun C (2004) Reexamining the role of choline
698 transporter-like (Ct1p) proteins in choline transport. *Neurochem Res* **29**: 461-467.

699
700

SUPPLEMENTARY MATERIAL



701

702 **Fig S1:** Different amount of altered cells between MM and RPMI-1640 in *C.*
703 *neoformans*. Yeasts were grown in MM or RPMI-1640 with plumieridine at 37
704 °C and 5% CO₂ for 72 h. A) Cells in India Ink. Scale bar: 20 µm. Yellow arrows
705 indicated altered cells. B) Cell morphology cells treated with plumieridine showing
706 defect in bud detachment. C) Percentage of cells counting with attached cells.

707

Table S1: *Candida* spp. Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test

Specie	Strain	Plumieridine (mg.mL ⁻¹)	
		MIC	MFC
<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804	1.25	2.5
<i>Candida krusei</i>	ATCC 34135	0.156	0.156
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 40136	1.25	5.0
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	1.25	2.5
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 750	0.3125	1.25

708

Table S2: List of genes present on interaction network

<i>C. gattii</i> Gene Code	Protein Name
CGB_A2200W	endopeptidase (414 aa)
CGB_E3700W*	26S proteasome regulatory subunit 4 (438 aa)
CGB_B0560C	26S proteasome regulatory subunit (535 aa)
CGB_B2480C*	metalloprotease subunit of 19S regulatory of the 26S proteasome lid (310 aa)
CGB_J0140C*	6S protease subunit rpt4 (405 aa)
CGB_G1530W*	26S protease regulatory subunit 7 (450 aa)
CGB_B5290W	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 (288 aa)
CGB_D4530C*	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 (514 aa)
CGB_M2390C	subunit 26S proteasome (1005 aa)
CGB_M2140W	26S protease regulatory subunit 6A (468 aa)
CGB_B0380W*	proteasome regulatory subunit 12 (351 aa)
CGB_D8560C	26S protease regulatory subunit 6B (407 aa)
CGB_A0780W	proteasome regulatory particle subunit (RpnI) (412 aa)
CGB_A4760C*	RPN10-like protein (371 aa)
CGB_K4220W	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 (381 aa)
CGB_D9670C*	26S proteasome regulatory subunit (1006 aa)
CGB_E2070W	hypothetical protein (298 aa)
CGB_F4190W	proteasome subunit alpha type 4 (285 aa)
CGB_C7320C	proteasome subunit beta type 2 (224 aa)
CGB_A1120W	20S proteasome subunit alpha 1 (256 aa)
CGB_L1410W	proteasome subunit alpha type 5 (277 aa)
CGB_I4120W	proteasome subunit alpha type 3 (256 aa)
CGB_K0650W	proteasome subunit beta type 4 (280 aa)
CGB_F5240C	20S proteasome beta-type subunit (272 aa)
CGB_A0250C	proteasome subunit alpha type 1 (299 aa)
CGB_A1690C	20S proteasome subunit (252 aa)
CGB_A3290C	20S proteasome beta-type subunit (213 aa)
CGB_C5370C	proteasome subunit, beta type, 7 (303 aa)
CGB_D4090W	proteasome subunit alpha type 7 (289 aa)
CGB_A3460W	proteasome subunit beta type 3 (210 aa)
CGB_B3700C	ubiquitin-dependent protein catabolism-related protein (188 aa)
CGB_D3400W	ubiquitin-specific protease (327 aa)
CGB_F3710W	proteasome component (301 aa)
CGB_G0160W	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6 (483 aa)
CGB_K1780C	proteolysis and peptidolysis-related protein (236 aa)
CGB_L3550W	hypothetical protein (569 aa)
CGB_G0590W	COP9 signalosome complex subunit 4 (457 aa)
GET1	post-translational delivery of tail-anchored (TA) protein (194 aa)
CGB_F1040W	vesicular-fusion protein sec18 (844 aa)

CGB_A7310W	cytoplasm protein (345 aa)
CGB_D5710W	hypothetical protein (249 aa)
CGB_B9060W	hypothetical protein (424 aa)
CGB_N2250C	hypothetical protein (220 aa)
CGB_A9660W	RING finger ubiquitin ligase (834 aa)
CGB_H5080W	hypothetical protein (309 aa)
CGB_F6530W	membrane protein (2107 aa)
CGB_E0430C	cop9 signalosome complex subunit 1 (566 aa)
RHP23*	uv excision repair protein rhp23 (394 aa)
UBI4*	ATP-dependent protein binding protein (381 aa)
CGB_C7030W	hypothetical protein (297 aa)
CGB_B3210W	cytoplasm protein (334 aa)
CGB_J0090W	integral membrane protein sed5 (364 aa)
CGB_D0240W	t-SNARE (413 aa)
CGB_D3230C	phosphatidate cytidyltransferase (645 aa)
CGB_B0430C	hypothetical protein (1534 aa)
CGB_K3470C	hypothetical protein (305 aa)
CGB_D5560W	hypothetical protein (138 aa)
CGB_B2620W	isoleucine-tRNA ligase (1094 aa)
CGB_N1200W	hypothetical protein (100 aa)
CGB_C8470C	sin3 protein (1322 aa)
CGB_N1540W*	cullin, structural protein of SCF complexes (775 aa)
CGB_I3270C*	COP9 signalosome complex subunit 5a (371 aa)
CGB_D8010W	hypothetical protein (1063 aa)
CGB_F2100C	COP9 complex subunit 6 (336 aa)
CGB_F0280C	hypothetical protein [Component of translation initiation factor 3 (eIF-3)] (303 aa)
CGB_C3570W	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (393 aa)
CGB_B1330C	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (344 aa)
CGB_F2030W	hypothetical protein (476 aa)
CGB_N1520C	hypothetical protein (201 aa)
CGB_E5650C	fatty-acid synthase complex protein (1438 aa)
CGB_D5610C*	ribosomal chaperone (159 aa)
CGB_A6180W	vacuolar ATP synthase subunit E (228 aa)
CGB_K4440W	arsenite transporter (435 aa)
CGB_E1430C	rRNA processing-related protein (1486 aa)
CGB_B5500W	aromatic amino acid family biosynthesis-related protein (1610 aa)
CGB_A9630W	phosphatidate cytidyltransferase (372 aa)
CGB_A0150W	dolichol kinase (1005 aa)
CGB_E5110C	cell division control protein 16 (840 aa)
CGB_E4590C	negative regulator of mitosis (1932 aa)
CGB_N1480C	F-box and WD40 domain protein (604 aa)

CGB_A4120W	F-box/wd-repeat protein lin-23 (758 aa)
CGB_A9450C*	ubiquitin-protein ligase (166 aa)
CGB_E3550W	poly(a)+ rna export protein (358 aa)
CGB_B3520W	ubiquitin-protein ligase (719 aa)
CGB_K4390W	ubiquitin-specific protease (1089 aa)
CGB_D0360C	hypothetical protein (776 aa)
CGB_G0470C	ubiquitin-protein ligase (811 aa)
CGB_G0120W	ubiquitin-protein ligase (812 aa)
STE20	protein STE20 (651 aa)
PAK1	p21-activated kinase (862 aa)
CGB_D7150C	acyl carrier (127 aa)
CGB_D7420W	acyl carrier protein (acp) (128 aa)
CGB_L0260W	intra-Golgi transport-related protein (734 aa)
CGB_I1600W	nuclear elongation and deformation protein 1 (1154 aa)
CGB_G3620C	uridine kinase (582 aa)
CGB_C6550C*	ribosomal chaperone (71 aa)
CGB_B6690C	nuclear-enriched ubiquitin-like polyubiquitin-binding protein (409 aa)
CGB_N2320C	acyl-CoA oxidase (427 aa)
CGB_K3730W	hypothetical protein (253 aa)
CGB_G6390W	acyl-coenzyme A oxidase I (702 aa)
CGB_G2370C	glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor (424 aa)
CGB_D0260W	orotidine-5'-phosphate decarboxylase (274 aa)
CGB_F3010W	ubiquitin-conjugating enzyme E2-16 kDa (147 aa)
CGB_K3630W	RAB small monomeric GTPase (206 aa)

710

711

*Hubs bottleneck of the main network. (Betweenness unDir = 123.30 and Degree unDir = 27.14)

4 DISCUSSÃO GERAL

Com uma estrutura completamente diferente dos outros antifúngicos, a plumieridina revela um mecanismo de ação peculiar que causa importantes efeitos em *C. gattii* e *C. neoformans*, afetando dois dos principais fatores de virulência. De modo que, possivelmente, este composto pode reduzir a virulência durante a infecção por *Cryptococcus* spp.

A plumieridina causa diminuição da cápsula polissacarídica, fato também observado com outras drogas como AmB, FLC e 5-FC (VAN DUIN *et al.*, 2004). Esta diminuição de cápsula, não significa necessariamente que um dos passos da via de síntese da cápsula polissacarídica seja alvo da ação do composto, mas uma consequência do estresse celular, visto que a expressão de fatores de virulência são fortemente regulados por mais de uma via de sinalização (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Assim, é esperado que ocorra a diminuição da cápsula polissacarídica.

Além da interferência com as vias de sinalização, pode ser considerado o fator de demanda energética como um agravante do estresse. Durante injúria celular, há grande gasto energético direcionado para as vias de homeostase, efluxo da molécula causadora da perturbação e até mesmo, apoptose quando o dano não consegue ser revertido, um processo de morte celular que requer grande gasto de energia. Essa condição sofre direta interferência do meio de cultivo, visto que em meios com menos nutrientes, é necessário utilizar rotas metabólicas mais laboriosas para a geração dos precursores metabólicos de várias rotas e energia (SCHRODER e KAUFMAN, 2005). Meios de cultivo como MM, fornecem poucos nutrientes para a célula, como alguns minerais que atuam como cofatores enzimáticos, glicose para fornecimento rápido de energia e poucos aminoácidos que podem ser metabolizados para fornecimento de outros produtos nitrogenados. Essa condição leva a célula a diminuir seu metabolismo pela pouca oferta de nutrientes. Enquanto, em um meio rico em nutrientes a levedura encontra-se em seu ótimo estado de crescimento e atuando em capacidade máxima de produção de energia. Talvez por esta razão, os efeitos causados por plumieridina são mais aparentes em meios pobres, possivelmente, pela maior indução de estresse celular.

Neste estudo, os principais fatores de virulência foram avaliados na presença do composto e foi possível estabelecer uma relação de tolerância a plumieridina em meios ricos em comparação a meios pobres em nutrientes. A cápsula polissacarídica é reduzida na presença de plumieridina em ambas as condições. Entretanto, as alterações morfológicas vistas em *C. neoformans* estão presentes em maior número de células crescidas em MM do que em RPMI. As condições testadas mimetizam o ambiente do hospedeiro, como a baixa quantidade de nutrientes presentes no líquido, presença de compostos catecolaminérgicos disponíveis no cérebro como neurotransmissores e a temperatura corporal humana. Sabendo que plumieridina interfere no metabolismo da levedura causando grande estresse a ponto de impossibilitar o crescimento da célula em condições hostis, pode-se inferir que o composto estudado apresenta potencial antifúngico diferenciado, sobretudo, em condições adversas *in vitro* que mimetizam algumas características de ambientes como SNC, principal sítio de infecção da criptococose. Contudo, são necessários diversos experimentos para confirmar esta suposição. Aliando os dados fenotípicos e genotípicos sugerimos a possibilidade de que a maior sensibilidade da levedura à plumieridina em 37°C e meio com baixa concentração de nutrientes se dá através de estresse no Reticulo Endoplasmático (RE). Esta organela orchestra processos-chave para a célula como armazenamento de cálcio, biossíntese de lipídios, dobramento de proteínas e seu transporte, bem como a regulação de processos de secreção vesicular (WANG e KAUFMAN, 2014). O RE é uma das maiores organelas da célula e está relacionado a outras organelas como mitocôndria, complexo de Golgi e núcleo por contato direto a estas (THIBAULT e NG, 2012; CHEN *et al.*, 2013; HONSCHER e UNGERMANN, 2014).

O dobramento de proteínas está intimamente relacionado a mudanças no ambiente como estado redox da célula, condições nutricionais, aumento na taxa de síntese proteica, estímulos inflamatórios entre outros, que acarretam processos de mau dobramento (*unfolding*) de proteínas, e desencadeiam o estresse do RE (WANG e KAUFMAN, 2014). Para a manutenção da homeostase no RE, a célula ativa várias respostas adaptativas, como a Degradação Associada ao Reticulo Endoplasmático (ERAD - do inglês

Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation), desencadeada pela via de sinalização *Unfolded Protein Response* (UPR) (SCHRODER e KAUFMAN, 2005).

A via UPR possui dois desfechos: um adaptativo, que preza pela homeostase (ou como alguns autores denominam proteostase) e um apoptótico, quando o estresse é muito severo e não consegue ser corrigido. O controle pela UPR ocorre no citosol, no RE e em mitocôndrias. No citosol, a homeostase ocorre com o auxílio de chaperonas e da maquinaria de degradação de proteínas, que elimina proteínas mal dobradas, agregados proteicos e proteínas não funcionais via sistema ubiquitina-proteasoma. No RE e nas mitocôndrias, ocorre por intermédio de produtos regulados via UPR, por moléculas específicas para cada organela. Dessa forma a via UPR está ligada a estrutura e função mitocondrial (INAGI *et al.*, 2014).

A via UPR exerce um importante papel na percepção do acúmulo de proteínas mal dobradas e transmissão de sinal para núcleo, onde ocorre aumento da expressão de genes como chaperonas e componentes do complexo proteassoma (WU *et al.*, 2014). Resumidamente, a via UPR adaptativa, em *Cryptococcus* spp, é monitorada pela proteína transmembrana *inositol-requiring protein1* (Ire1), que é ativada pela ligação direta de proteínas mal dobradas. Ire1 ativada, promove a remoção de um íntron não convencional do mRNA *HXL1*, resultando na ativação do fator de transcrição bZIP, que regula a transcrição de aproximadamente 400 genes, entre eles chaperonas, enzimas de síntese de lipídeos e proteínas associadas a ERAD. A proteína Ire1 é extremamente conservada entre eucariotos, mas os demais passos da via são diferentes, como mostrado na Figura 4.1 (CHEON *et al.*, 2014).

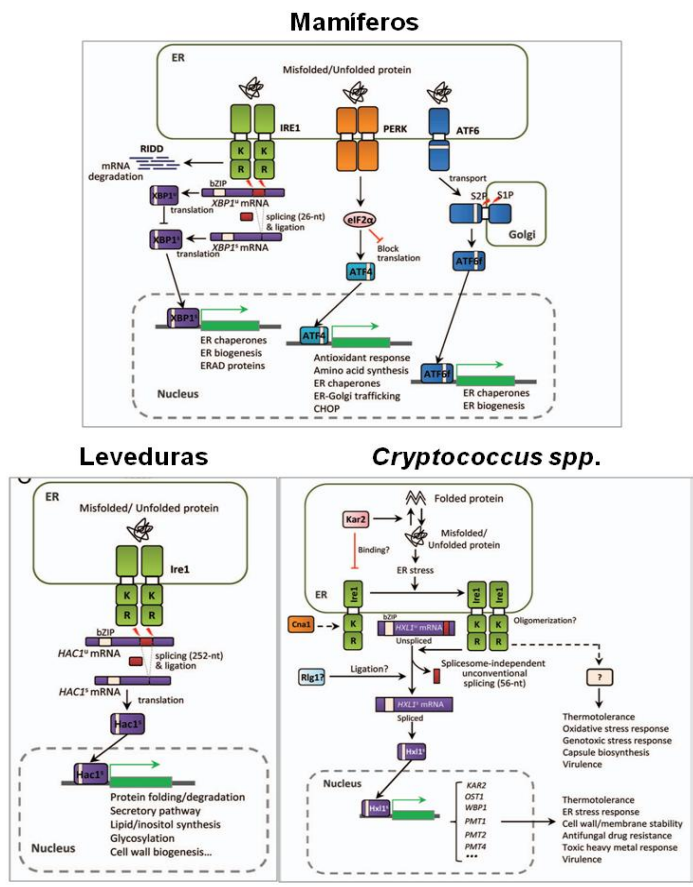


Figura 4.1: Figura esquemática do início da via de sinalização UPR e seus processos celulares desencadeados em mamíferos, *S. cerevisiae* e *Cryptococcus spp.*

Adaptado de (CHEON *et al.*, 2014),

Quando a via adaptativa não é capaz de estabelecer a homeostase, sinais apoptóticos se tornam predominantes, desencadeando a morte celular. A excessiva ativação de Ire1 induz a apoptose pela liberação de Ca^{2+} do RE para a mitocôndria que ativa a via de apoptose sinalizada pela liberação de citocromo c. A dinâmica da estrutura mitocondrial é regulada pela combinação de fusão e fissão mitocondrial e envolve o controle da interação ER e mitocôndria, de forma que a homeostase do RE influencia na homeostase da mitocôndria (INAGI *et al.*, 2014), como esquematizado na Figura 4.2. Estas organelas estão intimamente associadas por proteínas tetraméricas, como mitofusina-2, que regula a forma de ambas organelas, entre outras proteínas. Assim, o estresse RE influencia na morfologia e atividade energética da mitocôndria (KORNMANN, 2013), e possivelmente o contrário também seja válido.

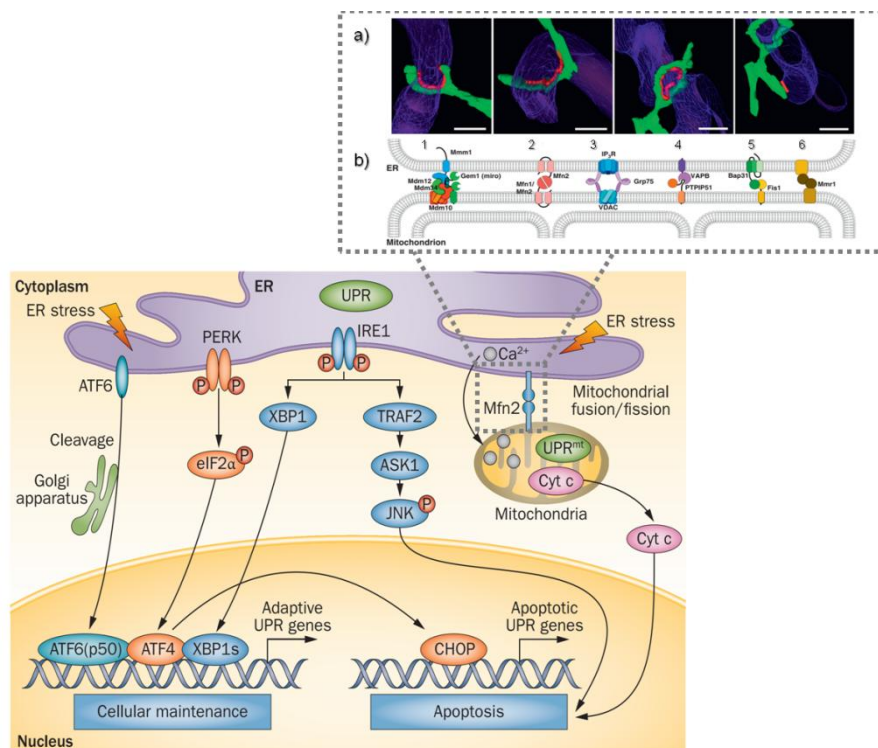


Figura 4.2: Figura esquemática da interação retículo endoplasmático e mitocôndria na via de sinalização UPR.

Homeostase realizada pela via UPR ativada por estresse no RE e sinalização para núcleo e mitocôndria. Adaptado de (INAGI *et al.*, 2014). Em detalhe: a) Reconstituição 3D de microscopia eletrônica de túbulos do RE (verde) em contato com a mitocôndria (azul) e sítio da junção molecular (vermelho). b) Figura esquemática das proteínas de contato RE-Mitocôndria: 1- Complexo *ER-mitochondria encounter structure* (ERMES) em leveduras. 2- Complexo tetramêro mitofusina-2 (Mfn2) em mamíferos 3- Sistema de canais de cálcio que permitem o fluxo de Ca^{2+} ER/Mitocôndria. 4- Completo proteico acessório em mamíferos. 5-Proteínas de recrutamento de prócaspase-8 para indução de apoptose. 6-Proteínas de ancoramento em leveduras, importante durante o brotamento da levedura. Adaptado de (KORNMANN, 2013).

De acordo com a literatura, foi observado o envolvimento de estresse do RE através da via UPR em *C. albicans*, utilizando abordagem toxicogenômica semelhante à deste estudo, em resposta a um composto monoterpênico, tendo como resultado o aumento da expressão de processos catabólicos de proteínas, translocação de fosfolípidos, processos metabólicos de pirimidinas, entre outros (CHAILLOT *et al.*, 2015). *Candida glabrata* é descrita como altamente tolerante ao estresse de RE pelo bloqueio da via canônica de sinalização UPR (Ire1p e Hac1p) (MIYAZAKI e KOHNO, 2014). Este dado vem ao encontro dos resultados obtidos quando avaliada a atividade antifúngica de plumieridina em *Candida* spp, no qual, *C. glabrata* é a linhagem mais resistente a plumieridina. Em *Cryptococcus* spp. UPR regula resistência a antifúngicos,

virulência, biossíntese de cápsula polissacarídica, síntese de melanina, termotolerância, integridade da membrana celular e parede celular. Sendo a via UPR considerada como um possível alvo de novos fármacos antifúngicos (CHEON *et al.*, 2014; KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Neste estudo, todos os genes identificados estão envolvidos com processos biológicos que podem ser controlados (de forma direta ou indireta) pela sinalização da via UPR. Sendo:

- Lisofosfolípídeo aciltransferase e transportador de colina relacionados ao metabolismo de lipídeos;
- Protease Rhomboide envolvida com estrutura e sinalização mitocondrial. Esta proteína também possui o domínio CUE, pertencente ao complexo "*holdase*" de direcionamento ao complexo proteassoma;
- O transportador de arsenato, regulado pela via UPR para processo de tolerância ao calor, é associado ao RE de forma especialmente importante no processo ancoramento de proteínas destinadas à ERAD atuando como molécula-guia no complexo "*holdase*";
- Proteína BAG atua como ligante ativador Bcl-2 antiapoptótico, auxilia o transportador de arsenato no papel de molécula-guia junto ao complexo "*holdase*";
- Subunidade N6 do complexo proteassoma, regulado para degradação de proteínas no citosol.

Desse modo, sugerimos o possível envolvimento dos genes identificados neste estudo com a associação ao processo de Degradação Associada ao Reticulo Endoplasmático, que é regulado pela via de sinalização UPR, na busca conter os danos causados pelo composto plumieridina. Parte das proteínas encontradas deste trabalho está relacionada de forma estrutural ao processo de ERAD, fazendo parte ou estando associadas ao complexo "*holdase*", e outras podem estar relacionadas através da regulação da expressão gênica (CHARTRON *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2012; VOTH *et al.*, 2014).

Além disso, foi possível correlacionar, com base na literatura que descreve os efeitos da via UPR sobre os fatores de virulência, os fenótipos e genótipos

dos mutantes selecionados neste estudo e efeitos gerados por plumieridina no crescimento à 37°C e cápsula polissacarídica.

Ao final deste trabalho, conclui-se a importância das ferramentas toxicogenômicas para a avaliação integrativa das células em relação ao ambiente a elas exposto. Este conjunto de ferramentas, que aliam abordagens ômicas à toxicologia, tem ganhado força e, a exemplo deste trabalho, podem prover informações mais detalhadas quando métodos clássicos são inconclusivos (DOS SANTOS *et al.*, 2012). A utilização de coleções genômicas de organismos patogênicos, quando disponível, é de grande importância para avaliação de mecanismo de ação de fármacos, visto que é possível avaliar diretamente a correlação de fatores de virulência à resposta a droga, mesmo que ainda seja necessária a confirmação através de geração de mutantes e modelos de infecção animal para afirmar tais possibilidades.

5 PERSPECTIVAS

- Faz-se importante a confirmação da ativação da via UPR canônica, pela avaliação dos níveis de transcritos de *IRE1*, *HXL* e quantificação da proteína BiP dissociada, utilizando como controle tucanamicina, conhecido ativador da via UPR. Bem como o melhor detalhamento da função e participação das proteínas identificadas no estudo no processo de ERAD, relacionado ao complexo "*holdase*".

- Conforme a literatura, testes de estresse aos reagentes Calcofluor e Congo Red são importantes indicadores do estresse de RE, de forma a serem realizados em complementação aos testes de virulência.

- Através das fotomicrografias obtidas neste trabalho, é notável a formação de grandes agregados vesiculares no citoplasma da levedura. Entretanto, é importante a utilização de corantes ou marcação por imunofluorescência para Retículo Endoplasmático e Mitocôndria, a fim de avaliar a morfologia destas organelas na presença do composto plumieridina.

- Avaliação de ciclo celular e tamanho do corpo celular de *Cryptococcus gattii* por citometria de fluxo.

- Avaliar de forma comparativa a via UPR entre *C. neoformans* e *C. gattii* a fim de avaliar diferenças entre as espécies, visto que *C. neoformans* manifesta diferentes características na presença do composto.

- Avaliar a interação entre OMPdecase e a via UPR para compreender como o possível alvo de plumieridina induz o estresse de RE.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M. S. et al. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod*, v. 60, n. 12, p. 1294-7, Dec 1997.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, v. 14, n. 12, p. 1173-85, Dec 2015.
- BOROS, C. A.; STERMITZ, F. R. Iridoids. An Updated Review, Part II. *Journal of Natural Products*, v. 54, n. 5, p. 1173-1246, 1991/09/01 1991.
- BRESCIANI, F. R. Caracterização da atividade antifúngica de extrato aquoso de sementes de *Allamanda polyantha*. 2013. Dissertação (Mestrado). Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. , Porto Alegre.
- BYRNES, E. J., 3RD et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010.
- CHAILLOT, J. et al. The Monoterpene Carvacrol Generates Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, p. 4584 – 4592, 2015.
- CHARTRON, J. W.; VANDERVELDE, D. G.; CLEMONS JR, W. M. Structures of the Sgt2/SGTA Dimerization Domain with the Get5/UBL4A UBL Domain Reveal an Interaction that Forms a Conserved Dynamic Interface. *Cell Reports*, v. 2, p. 1620–1632, 2012.
- CHANG, C. C.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. Pulmonary Cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*, v. 36, n. 5, p. 681-91, Oct 2015.
- CHEN, S.; NOVICK, P.; S., F.-N. ER structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 25, p. 428–433, 2013.
- CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin Microbiol Rev*, v. 27, n. 4, p. 980-1024, Oct 2014.
- CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. *Med J Aust*, v. 187, n. 7, p. 404-9, Oct 1 2007.
- CHEON, S. A. et al. The unfolded protein response (UPR) pathway in *Cryptococcus*. *Virulence*, v. 5, n. 2, p. 341-50, Feb 15 2014.
- COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica (Cairo)*, v. 2013, p. 675213, 2013.
- COPPEN, J. J. W.; COBB, A. L. The occurrence of iridoids in *Plumeria* and *Allamanda*. *Phytochemistry*, v. 22, n. 1, p. 125-128, // 1983.
- COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, n. 3, p. 187-98, Mar 2008.
- DE ARAUJO, S. G. R. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides form branched and complex filamentous networks viewed by high-resolution microscopy. *J Struct Biol*, v. 193, n. 1, p. 75-82, Jan 2016.

- DINDA, B.; CHOWDHURY, D. R.; MOHANTA, B. C. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v. 57, n. 8, p. 765-96, Aug 2009.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; BANIK, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v. 59, n. 7, p. 803-33, 2011.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v. 55, n. 2, p. 159-222, Feb 2007a.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v. 55, n. 5, p. 689-728, May 2007b.
- DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol*, v. 63, p. 223-47, 2009.
- DOS SANTOS, S. C. et al. Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. *Front Genet*, v. 3, p. 63, 2012.
- EISENMAN, H. C. et al. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, v. 155, n. Pt 12, p. 3860-7, Dec 2009.
- EL-NAGGAR, L. J.; BEAL, J. L. Iridoids. A review. *J Nat Prod*, v. 43, n. 6, p. 649-707, Nov 1980.
- FRANCHIMONT, A. Organic chemistry. *Journal of the Chemical Society, Abstracts*, v. 76, n. 0, p. A841-A968, 1899.
- FEDER, V. et al. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *FEBS J*, v. 282, n. 8, p. 1406-18, Apr 2015.
- FRASES, S. et al. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106, n. 4, p. 1228-33, Jan 27 2009.
- FUENTEFRIA, A. M. et al. Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates by two Brazilian killer yeasts. *J Basic Microbiol*, v. 46, n. 2, p. 87-93, 2006.
- GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*, v. 12, n. 4, p. 501-17, Oct 1999.
- GHISALBERTI, E. L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, v. 5, n. 2, p. 147-163, 4// 1998.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2012.
- HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*, v. 78, p. 16-48, May 2015.
- HEMENWAY, C. S.; HEITMAN, J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys*, v. 30, n. 1, p. 115-51, 1999.
- HONSCHER, C.; UNGERMANN, C. A close-up view of membrane contact sites between the endoplasmic reticulum and the endolysosomal system: from yeast to man. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 49, n. 3, p. 262-8, May-Jun 2014.

- IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*, v. 3, n. 10, p. 753-64, Oct 2005.
- INAGI, R.; Y., I.; M., N. Proteostasis in endoplasmic reticulum —new mechanisms in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol*, v. 10, p. 369–378, 2014.
- KORNMANN, B. The molecular hug between the ER and the mitochondria. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 25, p. 443–448, 2013.
- KRAUS, P. R. et al. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryot Cell*, v. 3, n. 5, p. 1249-60, Oct 2004.
- KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Micro*, v. 9, n. 3, p. 193-203, 03//print 2011.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 4, n. 7, p. a019760, Jul 2014.
- KORNMANN, B. The molecular hug between the ER and the mitochondria. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 25, p. 443–448, 2013.
- LANIADO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*, v. 26, n. 4, p. 223-7, Dec 31 2009.
- LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc*, v. 86, n. 8, p. 805-17, Aug 2011.
- MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol*, v. 67, p. 131-90, 2009.
- MARTINEZ, L. R. et al. Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, n. 12, p. 4396-400, Dec 2007.
- MITCHELL, A. et al. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res*, v. 43, n. Database issue, p. D213-21, Jan 2015.
- MIYAZAKI, T.; KOHNO, S. ER stress response mechanisms in the pathogenic yeast *Candida glabrata* and their roles in virulence. *Virulence*, v. 5, n. 2, p. 365-370, 2014.
- MOBLEY, H. L. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 10 Suppl 1, p. 57-64, Apr 1996.
- MONDIN, C. A. E., LILIAN; FERREIRA, PEDRO MARIA DE ABREU;. *Catálogo ilustrado de plantas : espécies ornamentais da PUCRS*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010.
- MOREIRA, M. E. Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants. *J Pediatr (Rio J)*, v. 81, n. 1 Suppl, p. S52-8, Mar 2005.
- NEGRI, M. et al. Early state research on antifungal natural products. *Molecules*, v. 19, n. 3, p. 2925-56, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, v. 75, n. 3, p. 311-35, Mar 23 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, Feb 7 2016.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, n. 11, p. 3519-28, Nov 2006.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, v. 124, p. 61-79, 2013.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 20 2009.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 1 2010.

PROCOPIO, R. E. et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis*, v. 16, n. 5, p. 466-71, Sep-Oct 2012.

PUKKILA-WORLEY, R. et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryot Cell*, v. 4, n. 1, p. 190-201, Jan 2005.

RODRIGUES, M. L. et al. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryot Cell*, v. 7, n. 4, p. 602-9, Apr 2008.

RODRIGUES, M. L.; DJORDJEVIC, J. T. Unravelling secretion in *Cryptococcus neoformans*: more than one way to skin a cat. *Mycopathologia*, v. 173, n. 5-6, p. 407-18, Jun 2012.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell*, v. 6, n. 1, p. 48-59, Jan 2007.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 4, n. 5, May 2014.

ROEMER, T. et al. Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery. *Chem Biol*, v. 18, n. 2, p. 148-64, Feb 25 2011.

ROSA E SILVA, L. K. et al. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Res Microbiol*, v. 159, n. 3, p. 221-9, Apr 2008.

SCHRODER, M.; KAUFMAN, R. J. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, v. 569, n. 1-2, p. 29-63, Jan 6 2005.

SCORPIO, A. et al. Capsule depolymerase overexpression reduces *Bacillus anthracis* virulence. *Microbiology*, v. 156, n. Pt 5, p. 1459-67, May 2010.

SLONCZEWSKI, J. F., *J. Microbiology - An Evolving Science*. 2015. Disponível em: < <http://books.wwnorton.com/books/webad.aspx?id=4294977366> >. Acesso em: 13/01/2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; FLORA, I. P. D. E. D. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

SOUZA, L. K. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. *Mycoses*, v. 53, n. 1, p. 62-7, Jan 2010.

- SUN, L. et al. Pulmonary cryptococcosis with trachea wall invasion in an immunocompetent patient: a case report and literature review. *Respiration*, v. 87, n. 4, p. 324-8, 2014.
- THIBAUT, G.; NG, D. T. The endoplasmic reticulum-associated degradation pathways of budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 4, n. 12, Dec 2012.
- VAN DUIN, D. et al. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 6, p. 2014-20, Jun 2004.
- VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother*, v. 46, n. 2, p. 171-9, Aug 2000.
- VERONESI, R. F., R. . *Tratado de Infectologia*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2009.
- VOTH, W. et al. The protein targeting factor Get3 functions as ATP-independent chaperone under oxidative stress conditions. *Mol Cell*, v. 56, n. 1, p. 116-27, Oct 2 2014.
- WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, v. 57, n. 5, p. 1381-96, Sep 2005.
- WANG, M.; KAUFMAN, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*, v. 14, n. 9, p. 581-597, 09//print 2014.
- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun*, v. 63, n. 8, p. 3131-6, Aug 1995.
- WHITNEY, L. C.; BICANIC, T. Treatment principles for *Candida* and *Cryptococcus*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 5, n. 6, Jun 2015.
- WHO, W. H. O. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. PRESS, W. Geneva, Switzerland 2011.
- WOLF, E. V. et al. A new class of rhomboid protease inhibitors discovered by activity-based fluorescence polarization. *PLoS One*, v. 8, n. 8, p. e72307, 2013.
- WU, H.; NG, B. S.; THIBAUT, G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Biosci Rep*, v. 34, n. 4, 2014.
- XU, Y. et al. SGTA Recognizes a Noncanonical Ubiquitin-like Domain in the Bag6-Ubl4A-Trc35 Complex to Promote Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Cell Reports*, v. 2, p. 1633–1644, 2012.
- ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*, v. 68, p. 133-216, 2009.
- ZHANG, M.; SUN, D.; SHI, M. Dancing cheek to cheek: *Cryptococcus neoformans* and phagocytes. *Springerplus*, v. 4, p. 410, 2015.
- ZHU, X. et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun*, v. 69, n. 9, p. 5589-96, Sep 2001.