



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Bases moleculares da resposta de *Cryptococcus neoformans* a peptídeos antimicrobianos derivados da peçonha de escorpião.

Fernanda Guilhelmelli Costa

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira

Coorientadora: Prof. Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade

Coorientador no estágio sanduíche: Dra. Andrew Alspaugh

Brasília

2019

FERNANDA GUILHELMELLI COSTA

Bases moleculares da resposta de *Cryptococcus neoformans* a peptídeos antimicrobianos derivados da peçonha de escorpião.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof. Dra Ildinete Silva Pereira
Coorientadora: Prof. Dra Patrícia Albuquerque de Andrade
Coorientador no estágio sanduíche: Dra Andrew Alspaugh

Brasília

2019

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, por todo amor, apoio incondicional e educação que me deram. Devo muito a vocês por sempre estarem ao meu lado, me dando a força e o suporte que eu precisava desde os meus primeiros passos e por sempre investirem na minha educação, mesmo que muitas vezes isso significasse um grande sacrifício.

À minha querida orientadora Ildinete Silva Pereira por todos esses anos de convivência, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto, pela confiança, amizade, paciência e compreensão nos momentos mais difíceis dessa trajetória e por ser um grande exemplo tanto profissional quanto pessoal.

À minha querida coorientadora Patrícia, que muito além de ensinar e ajudar a solucionar problemas com seu grande conhecimento, foi uma grande companheira durante essa jornada e é uma das minhas maiores inspirações e exemplo de profissionalismo, dedicação, competência e amor pelo que faz.

Ao grupo do Lab MOA, em especial à Calliandra, Phill e Andrezinho, por proporcionarem um bom ambiente de trabalho e por me ajudarem nas pequenas emergências do dia a dia.

Aos meus estagiários Andressa Alves, Luís Felipe e Bárbara Luísa por terem me dado a oportunidade de orientá-los e por me ajudarem em diversos momentos no meu projeto de pesquisa.

A todos os grupos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial ao Lab2, pelas pequenas ajudas do dia a dia e pelos excelentes momentos de descontração e descanso na copa.

Ao Dr. Andrew Alspaugh, meu coorientador no estágio sanduíche, por ter abertos as portas do seu laboratório para mim e ter me proporcionado uma experiência profissional maravilhosa que me enriqueceu de maneiras que eu jamais imaginei que iriam. Agradeço também por ter me feito sentir tão bem acolhida em um país estrangeiro.

À Hanna Brown, Hanna Shepard, Calla Telzrow, Connie Nichols, Sandra e Kaila Pianalto, por terem sido muito receptivas à minha chegada e por me acolherem de forma maravilhosa. Agradeço a todo o apoio e colaboração de vocês para o projeto desenvolvido durante o estágio sanduíche. Faço um agradecimento especial à Kaila por ter me proporcionado minha primeira experiência esculpindo uma abóbora de Dia das Bruxas.

Ao professor André Nicola pela colaboração direta nesta tese, por ser um grande exemplo de profissionalismo e pelos ótimos momentos de convivência fora do laboratório. Também agradeço à Stefânia, do seu grupo de pesquisa, por sua ajuda em etapas desse projeto e por tornar o ambiente do laboratório mais agradável e muito mais organizado.

Ao professor Hugo Paes, pelas boas conversas científicas e, sobretudo, pelas conversas não científicas. Agradeço também à sua estagiária Larissa pela ótima convivência e pelo suporte para o laboratório.

Ao professores Márcio Poças, Márcia Mortari, Cynhtia Kyaw, Anamélia Bocca e Larissa Matos e seus respectivos grupos por sempre me acolherem quando eu precisei de ajuda e colaborarem, de forma direta ou indireta, para a realização desse projeto de pesquisa.

Ao Marco Antônio e Fabiana Silva. Eu não tenho palavras suficientes para descrever a importância de vocês dois para mim. A ajuda de vocês para o desenvolvimento dessa tese foi imprescindível! Obrigada por todos os momentos de discussão, pelas brilhantes ideias e por me ajudarem em etapas cruciais desse trabalho. E acima de tudo, obrigada por essa linda amizade, por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis, por sempre ouvirem minhas angústias e desabafos e me darem forças para continuar essa caminhada. Sem vocês eu não estaria defendendo esta tese hoje.

Às minhas amigas de profissão Nathália Vilela, Bárbara Paes e Aline Belmok pelos bons momentos de descontração e sobretudo pelos momentos de desabafo. Sei que aluguei de mais a orelha de vocês, então meus sinceros agradecimentos.

Aos meus queridos amigos da vida Roxanne, Guilherme, Bruna e Thiago por serem os melhores amigos que uma pessoa poderia desejar ter. A amizade de vocês é um dos bens mais preciosos da minha vida.

À todos os colaboradores desse projeto.

À Dona Fátima, Dona Ivonildes, Ivone, Márcia, Thompson, Seu Antônio e ao José por facilitarem a vida de todos do Laboratório de Biologia Molecular.

Aos professores que compõe a banca por terem disponibilizado seus tempos para avaliar esse trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAP-DF pelo apoio financeiro.

À Sociedade Brasileira.

RESUMO

Nas últimas décadas, tem se observado um aumento na incidência de infecções fúngicas, enquanto o número de classes de antifúngicos disponíveis para a terapia continua o mesmo. A resistência de algumas espécies de fungos aos fármacos usados atualmente na clínica, associada à alta toxicidade impõe a busca por novas moléculas, mais eficientes e menos tóxicas, para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de micoses. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas de defesa evolutivamente conservadas, multifuncionais produzidas por diversos organismos e são potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos. Uma fonte interessante desses AMPs é a peçonha de escorpiões. Em trabalhos prévios, nosso grupo descreveu a atividade antifúngica de diversos AMPs da peçonha de escorpião contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida spp.* Este trabalho visa melhor caracterizar a atividade antifúngica e elucidar o mecanismo de ação de peptídeos de peçonha de escorpião, em especial do peptídeo ToAP2. Os peptídeos ToAP1 e ToAP2 foram testados em linhagens de *Cryptococcus spp* com diferentes tamanhos basais de cápsula, sendo observado que a cápsula não protege o fungo contra a atividade do peptídeo. Testes utilizando células submetidas a tratamentos prévios para indução da cápsula ou melanização demonstraram que a modulação desses dois atributos de virulência de *C. neoformans* aumentam a susceptibilidade do fungo aos peptídeos. Observou-se que o peptídeo ToAP2 é capaz de permeabilizar a membrana plasmática das leveduras de *C. neoformans* e destruir organelas membranosas dentro da célula. Além disso, o tratamento com esse peptídeo causou um aparente aumento na espessura das fibras dos polissacarídeos da cápsula. Também foi avaliada a atividade dos dois peptídeos contra biofilmes de *C. neoformans* e o peptídeo ToAP2 inibiu fortemente a formação do biofilme, interferindo possivelmente na adesão das células. Para melhor elucidar o mecanismo de ação do peptídeo ToAP2, foi realizada uma varredura de uma biblioteca de mutantes de *C. neoformans* para identificar processos moleculares importantes para tolerância do fungo a esse AMP. Foram identificados 42 mutantes mais sensíveis ao peptídeo que a linhagem selvagem. A maioria dos genes cuja deleção leva a um aumento na suscetibilidade do fungo está envolvida com o tráfego de membrana. Também observou-se um envolvimento de genes relacionados à biossíntese de ergosterol e esfingolipídeos, à síntese e manutenção da parede celular e ao transporte de membrana na tolerância desse fungo ao AMP. Por fim, uma análise do perfil transcritômico do fungo tratado com o peptídeo ToAP2, anfotericina B e com a combinação dessas duas moléculas

é apresentada nesta tese. Nossos dados sugerem que a membrana é o principal alvo desse peptídeo e que a permeabilização da bicamada lipídica possa ser o seu principal mecanismo de ação. Os resultados aqui obtidos reforçam o potencial dessas moléculas no desenvolvimento de novas terapias antifúngicas.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, peptídeos antimicrobianos, peçonha de escorpião, cápsula, novos antifúngicos.

ABSTRACT

The incidence of fungal infections has been increasing in the last decades, while the number of available antifungal classes remains the same. The natural and acquired resistance of some fungal species to available therapies, associated with the high toxicity of currently available antifungals imposes the search for new, more efficient and less toxic therapeutic choices. Antimicrobial peptides (AMPs) are a potential class of antimicrobial drugs consisting of evolutionarily conserved multifunctional molecules of the innate immune response of diverse organisms. An interesting and potential source of AMPs is scorpion venom. Our group has previously described several scorpion venom AMPs with promising antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* and *Candida spp.* This work aims to further characterize the antifungal activity and to elucidate the mechanism of action of those AMPs, in particular peptide ToAP2. The scorpion peptides ToAP1 and ToAP2 were tested against several *Cryptococcus spp* strains contrasting in terms of basal capsule thickness. It was observed that the capsule does not protect the fungi from the peptide antifungal activity. Tests using cells with induced capsule and melanin showed that modulation of these two virulence factors of *C. neoformans* increases the susceptibility of the yeast to peptides. ToAP2 permeabilizes the membrane of *C. neoformans* and destroys the membrane-bound organelles inside the cell. ToAP2-treated cells showed an apparent increase in polysaccharide fiber density. Also, ToAP1 and ToAP2 were tested against *C. neoformans* biofilms. ToAP2 strongly inhibited biofilm formation, possibly interfering with fungal initial adhesion. We performed a genetic screen to identify important molecular processes that mediate tolerance of *C. neoformans* to the AMPs in order to further elucidate ToAP2 mechanism of action. We identified 42 mutants which were more sensitive to the peptide than the wild-type strain. The largest group of genes whose deletion increase the yeast susceptibility to the peptide are involved in membrane trafficking. Ergosterol and sphingolipid biosynthesis pathway, cell wall synthesis and maintenance and transporters are also necessary for fungal tolerance to the peptide. Finally, an initial analysis of the transcriptomic profile of the yeast treated with ToAP2, amphotericin B and the combination of both antifungals is presented in this work. Our data indicate that the fungal membrane is the main target of ToAP2 and permeabilization of the lipid bilayer might be its main mechanism of action. Our results reinforce the potential of those AMPs as promising candidates for the development of new antifungal drugs.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, antimicrobial peptides, scorpion venom, capsule, new antifungals.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- °C – Graus Celsius
- 5-FC** – 5-Fluocitosina
- 5-FU** – 5-Fluorouracil
- AMB** – Anfotericina B
- AFP** – Peptídeo Antifúngico
- AMP** – Peptídeo Antimicrobiano
- BFA** – Brefeldina A
- cDNA** – Sequência DNA complementar
- CG** – Complexo de Golgi
- CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute
- CFM** – Concentração fungicida mínima
- CIM** – Concentração inibitória mínima
- CMEB** – Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme
- CMIB** – Concentração Mínima Inibitória de Formação do Biofilme
- CWI** – Via de manutenção da integridade da parede celular
- DBP** – Peptídeo com Ponte Dissulfeto
- DMSO** – Dimetil sulfóxido
- FLC** – Fluconazol
- g** – Gramas
- GlcCer** – Glicosilceramida
- GXMGal** – Glicuronoxilomanogalactana
- GXM** – Glicuronoxilomanana
- h** – Hora
- HIV** – Vírus da imunodeficiência humana
- Hst-5** – Histatina-5
- HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- HOG** – Via de alta osmolaridade do glicerol
- IC** – Isolado Clínico
- ICIF** - Índice de Concentração Inibitória Fracionada
- IP** – Iodeto de propídeo
- L-DOPA** - 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine
- LPS** – Lipopolissacarídeo

M – Molar

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MIPC - Manosil-inositol-fosforil-ceramida

min - Minutos

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MOPS – Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

mRNA – RNA mensageiro

NaPB – Tampão Fosfato de Sódio

NAT – Nourseotricina

NEO – Neomicina

NDBP – Peptídeo Sem Pontes Dissulfeto

nm – Nanômetros

OD – Densidade óptica ou absorbância

PBS – Tampão de fosfato

pH – Potencial hidrogeniônico

PA – Ácido fosfatídico

PC – Fosfatidilcolina

PE – Fosfatidiletanolamina

PI –Fosfatidilinositol

PS – Fosfatidilserina

p/v – Peso/volume

RE – Retículo Endoplasmático

RNA – Ácido ribonucléico

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio

rpm – Rotações por minuto

SC – Meio Sintético Completo

SDS – Dodecil sulfato de sódio

V – Volume

v/v – Volume/volume

µg – Micrograma

µL – Microlitro

μM – Micromolar

μm – Micrômetros

% – Por cento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência anual de infecções por <i>Cryptococcus</i> por país.	18
Figura 2. Classificação do complexo de espécies do gênero <i>Cryptococcus</i> em sorotipos e tipos moleculares.	19
Figura 3. O ciclo infeccioso de <i>C. neoformans</i>	21
Figura 4. Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos.	27
Figura 5. Mecanismos de permeabilização da membrana por peptídeos antimicrobianos.	31
Figura 6. Projeções da hélice dos peptídeos ToAP1 e ToAP2.	38
Figura 7. Esquema de combinação do teste de Tabuleiro de Xadrez.	49
Figura 8. Diâmetro do corpo celular e espessura da cápsula das diferentes linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp crescidas em meio Sabouraud pH 7,2.	61
Figura 9. Cinética de viabilidade de <i>C. neoformans</i> H99 tratado com ToAP1, ToAP2 e Anfotericina B nas doses de suas respectivas CFM.	63
Figura 10. Viabilidade das células de <i>C. neoformans</i> H99 crescidas em meio Sabouraud (Cápsula Basal), Meio Mínimo (Cápsula Induzida) e Meio Mínimo com 1mM de L-DOPA (Melanizado), após tratamento de 4 horas com AMB (A) e diferentes doses de ToAP1 (B) e ToAP2 (C).	67
Figura 11. Viabilidade das leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 tratadas com diferentes doses do peptídeo ToAP2 em diferentes meios.	75
Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura de leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 tratadas com 55 µM do ToAP1 e 60 µM do ToAP2.	77
Figura 13. Microscopia Eletrônica de Transmissão de leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 tratadas com 60 µM do ToAP2. 1 µm.	78
Figura 14. Permeabilização da membrana após tratamento com o peptídeo ToAP2.	79
Figura 15. Quantidade de genes diferencialmente expressos após o tratamento com 15 µM e 30µM do peptídeo ToAP2, 0,125 µg/mL de AMB e da Combinação do peptídeo ToAP2 (15 µM) e AMB (0,125 µg/mL).	81
Figura 16. Diagrama de Venn com a sobreposição dos transcritos diferencialmente expressos em cada um dos tratamentos.	82
Figura 17. Fluxograma da varredura na busca de mutantes sensíveis ao peptídeo ToAP2.	90
Figura 18. Categorização funcional dos genes identificados na varredura por linhagens sensíveis ao peptídeo.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de NDPBs da peçonha de escorpião com atividade antifúngica e seus respectivos valores de CIM para diferentes espécies de fungo.	36
Tabela 2. Lista das linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp utilizadas no trabalho.....	44
Tabela 3. Sequência dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 da peçonha do escorpião <i>T. obscurus</i> e suas propriedades físico-químicas.	46
Tabela 4. Concentrações finais utilizadas dos peptídeos ToAP1, ToAP2 e AMB no ensaio de sinergismo.....	50
Tabela 5. CIM dos peptídeos ToAP1, ToAP2, Anfotericina B e Fluconazol contra diferentes linhagens e isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.	59
Tabela 6. CIM ₅₀ e CFM dos peptídeos ToAP1, ToAP2 e de Anfotericina B contra diferentes linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp.....	60
Tabela 7. Interação dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 com Anfotericina B (AMB) contra <i>C. neoformans</i> H99 in vitro.....	65
Tabela 8. CIM do peptídeo ToAP2 para as linhagens selvagem e mutantes de <i>C. neoformans</i>	70
Tabela 9. CMIB, CMIB ₅₀ , CMEB e CMEB ₅₀ peptídeos ToAP1, ToAP2 e de Anfotericina B para o biofilme de <i>C. neoformans</i> B3501.	72
Tabela 10. Composição de sais dos meios RPMI-1640 e de PBS.....	74
Tabela 11. Genes de <i>C. neoformans</i> regulados em comum na resposta ao tratamento com 15µM e 30µM do peptídeo ToAP2	83
Tabela 12. Genes de <i>C. neoformans</i> regulados em comum na resposta ao tratamento com 15µM do ToAP2, 0,125 µg/mL de AMB e a combinação de ambas as doses.....	84
Tabela 13. Lista das linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp. utilizadas no trabalho.....	87
Tabela 14. CIM do peptídeo ToAP2 para linhagens selvagens e mutantes de <i>C. neoformans</i>	92
Tabela 15. Lista dos genes de <i>C. neoformans</i> envolvidos na tolerância ao peptídeo ToAP2, seus respectivos CIM dos seus mutantes e fenótipo de sensibilidade a SDS e BFA.	94
Tabela 16. CIM do peptídeo ToAP2 para as linhagens mutantes do complexo ESCRT.	103
Tabela 17. CIM do peptídeo ToAP2 para as linhagens mutantes PAT.....	109

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Cryptococcus</i> spp. e a criptococose	18
1.1.1 Atributos de virulência	21
1.1.2 Tratamento da criptococose	24
1.2 Peptídeos Antimicrobianos	25
1.2.1 Peptídeos Antifúngicos	26
1.3 Peptídeos antifúngicos em testes clínicos.	33
1.4 Peptídeos Antimicrobianos presentes em peçonhas de escorpião.	34
2. Objetivos.....	40
2.1 Objetivo Geral do Capítulo 1	40
2.1.1 Objetivos específicos do Capítulo 1	40
2.2 Objetivo Geral do Capítulo 2.....	40
2.2.1 Objetivos específicos do Capítulo 2	40
Capítulo 1	42
Atividade dos peptídeo ToAP1 e ToAP2 em células plactônicas e biofilme de <i>Cryptococcus spp.</i>	42
3. Material e Métodos	43
3.1 Linhagens Celulares e Manutenção	43
3.2 Meios de cultura e Soluções	45
3.3 Síntese e preparo das soluções estoque dos peptídeos ToAP1 e ToAP2.....	46
3.4 Medição do tamanho da cápsula de <i>Cryptococcus spp.</i>	46
3.5 Teste de microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (CIM e CIM ₅₀) dos peptídeos	47
3.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).	48
3.7 Avaliação do possível efeito sinérgico dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 combinados à Anfotericina B por meio do teste do Tabuleiro de Xadrez.	48
3.8 Determinação da curva de cinética de viabilidade de <i>C. neoformans</i> tratado com os peptídeos ToAP1 e ToAP2.	51
3.9 Efeito do possível papel protetor da cápsula e melanina de <i>C. neoformans</i> contra a ação dos peptídeos ToAP1 e ToAP2.	51
3.10 Análise do efeito dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 na morfologia e ultraestrutura de <i>C. neoformans</i>	52

3.11 Avaliação da integridade da membrana após tratamento com o peptídeo ToAP2.	54
3.12 Análise do efeito dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 na formação do biofilme e na viabilidade de biofilmes maduros de <i>C. neoformans</i> .	54
3.13 Avaliação da interferência de sais na atividade do peptídeo ToAP2.	56
3.14 Análise transcritômica em larga escala (RNAseq) de <i>C. neoformans</i> após tratamento com ToAP2 e AMB.	57
4. Resultados e discussão	59
4.1 Atividade antifúngica dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 contra as diferentes linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp.	59
4.2 Cinética de viabilidade de <i>C. neoformans</i> tratado com os peptídeos ToAP1 e ToAP2.	63
4.4 Avaliação do papel protetor da cápsula e melanina de <i>C. neoformans</i> H99 contra a atividade dos peptídeos ToAP1 e ToAP2.	65
4.6 Efeito dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 na formação do biofilme e na viabilidade de biofilmes maduros de <i>C. neoformans</i> .	71
4.7 Efeito da presença de sais na atividade antifúngica do peptídeo ToAP2.	73
4.8 Efeito do peptídeo ToAP2 na morfologia, ultraestrutura e integridade da membrana de <i>C. neoformans</i> H99.	76
4.9 Perfil transcricional de <i>C. neoformans</i> H99 após tratamento com o peptídeo ToAP2, Anfotericina B e a combinação dos dois antifúngicos.	80
Capítulo 2- Genes envolvidos na tolerância de <i>C. neoformans</i> ao peptídeo ToAP2.	85
5. Material e Métodos.	86
5.1 Linhagens e condições de crescimento.	86
5.2 Varredura primária para busca de mutantes sensíveis aos peptídeo ToAP2.	87
5.3 Varredura secundária para a seleção das linhagens sensíveis ao peptídeo ToAP2 e definição da CIM.	89
5.4 Bioinformática	90
5.5 Teste de sensibilidade a SDS e Brefeldina A	91
6. Resultados e Discussão	92
7. Conclusão	115
8. Perspectivas	117
9. Referências Bibliográficas	118
APÊNDICE A – Artigos e patente publicados durante o doutorado.	140
APÊNDICE B – FIGURAS SUPLEMENTARES	142
APÊNDICE C – TABELAS SUPLEMENTARES	145

1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas invasivas teve um aumento significativo nas últimas décadas, de forma que essas doenças hoje são um problema sério de saúde pública mundial. Esse crescimento é devido principalmente ao aumento do número de indivíduos imunodeficientes, em especial pacientes em tratamento quimioterápico, pacientes submetidos a terapias imunossupressoras, como pacientes transplantados, e principalmente pacientes vivendo com HIV (Venkatesan et al., 2005; Romani, 2011; Armstrong-James et al., 2014; Limper et al., 2017).

A epidemia global do vírus HIV é um dos principais fatores que levam pacientes a óbito por causa de infecções fúngicas no mundo (Brown et al., 2012). Os principais gêneros fúngicos associados a infecções em pacientes HIV-positivos são *Pneumocystis*, *Cryptococcus* e *Histoplasma* (Armstrong-James et al., 2014; Limper et al., 2017). Em países desenvolvidos, a incidência de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes HIV-positivos tem diminuindo em razão da maior disponibilidade da terapia antirretroviral e do tratamento para controle da infecção (Limper et al., 2017). Porém, nas regiões mais pobres e com menor acesso a essas terapias a alta incidência dessas infecções em pacientes soropositivos ainda se mantem (Limper et al., 2017).

Esse cenário é agravado pelo surgimento de linhagens resistentes aos principais antifúngicos disponíveis na clínica atualmente (Li et al., 2012b; Pan et al., 2012; Perlin et al., 2017; Robbins et al., 2017). O repertório de fármacos antifúngicos é bastante limitado, sendo disponíveis apenas cinco classes de antifúngicos: os polienos, azóis, alilaminas, análogos de pirimidina e equinocandinas (Vandeputte et al., 2012). A resistência natural ou adquirida desses fungos patogênicos a uma ou mais classes de antifúngicos impacta seriamente as opções de tratamento. Além disso, alguns desses antifúngicos são muito tóxicos para o paciente, principalmente para o fígado e para os rins (Lewis et al., 1984; Fanos and Cataldi, 2000; Shapiro et al., 2011).

Assim, em razão do grande impacto das doenças fúngicas na atualidade, do número crescente de linhagens resistentes a antifúngicos utilizados na clínica e da toxicidade das terapias convencionais, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais eficientes e menos tóxicos ao paciente é de grande urgência. É neste contexto que esta tese de doutorado se insere, com o objetivo de caracterizar a atividade de peptídeos antimicrobianos para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

1.1 *Cryptococcus* spp. e a criptococose

Um dos principais gêneros causadores de infecções fúngicas invasivas com altos índices de mortalidade é o gênero *Cryptococcus*. Park e colaboradores, 2009, estimaram que ocorriam cerca de um milhão de novos casos de criptococose por ano em pacientes HIV-positivos e cerca de 625 mil mortes em decorrência da meningite causada pelo fungo (Park et al., 2009).

Um estudo mais recente estima uma incidência global de 223.100 casos anuais de criptococose com 181 mil mortes, correspondendo a cerca de 15% de todas as mortes relacionadas à AIDS no mundo (Rajasingham et al., 2017). Apesar do número de casos anuais terem diminuído, muito em função da expansão das terapias antirretrovirais, a proporção de mortalidade em relação ao estudo anterior ainda é semelhante. Segundo essa nova estimativa, a maior parte dos casos ainda ocorre na África sub-Saariana, cerca de 73% dos casos. Na América Latina, estima-se cerca de 5.300 casos anuais com 2.400 mortes por ano (Rajasingham et al., 2017). O Brasil é um dos países com a maior incidência da doença na América Latina com cerca de 1.001 a 2.500 casos anuais (**Figura 1**).

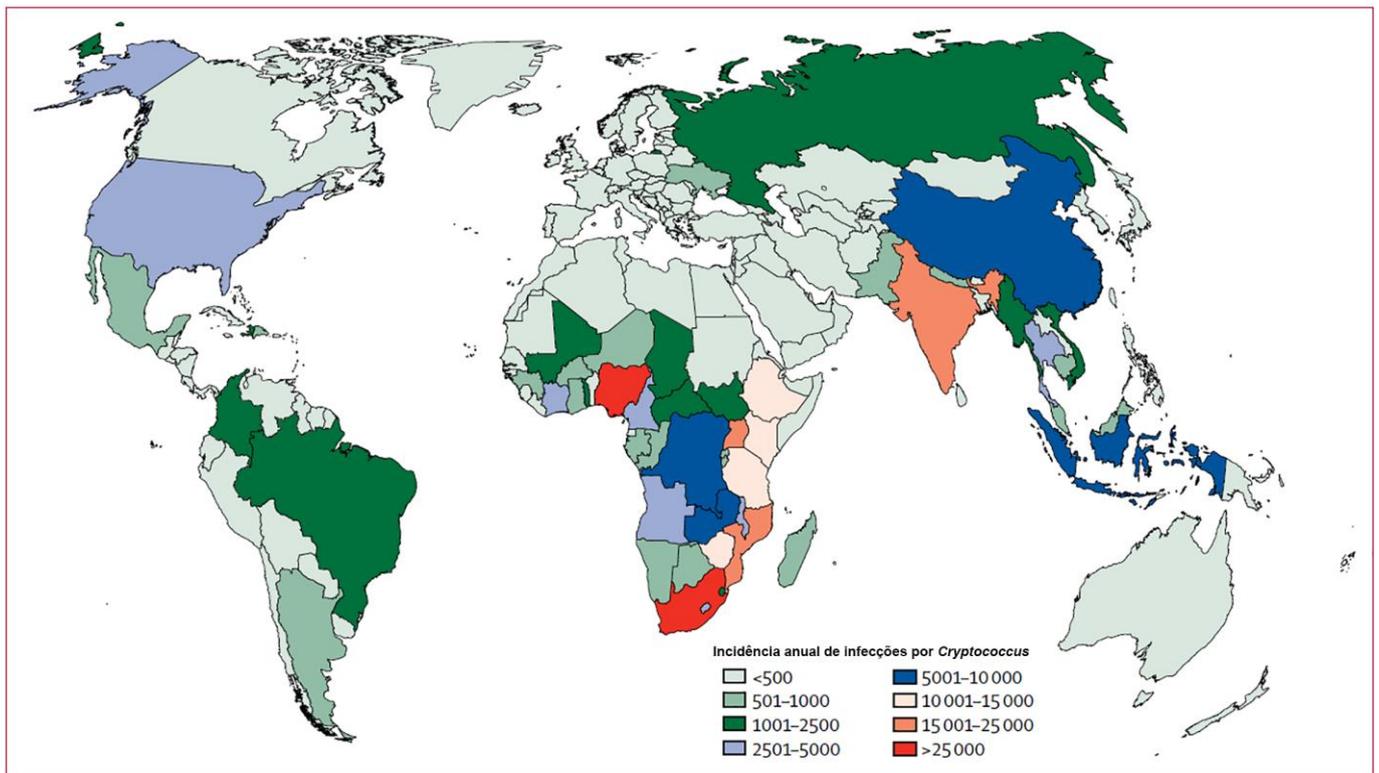


Figura 1. Incidência anual de infecções por *Cryptococcus* por país. Adaptado de (Rajasingham et al., 2017).

Os agentes etiológicos da criptococose são os fungos do gênero *Cryptococcus*, filo Basidiomycota (Lin, 2009). Dos fungos pertencentes a esse filo, o gênero *Cryptococcus* é o único de relevância médica. *Cryptococcus* spp. são fungos encapsulados que vivem primariamente no meio ambiente na forma de levedura, se reproduzindo principalmente por brotamento. São encontrados sobretudo em solos contaminados com excretas de aves, especialmente de pombos, e em troncos de árvores (Lin, 2009). A classificação das variantes e a diferenciação entre as duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, foi baseada em testes de aglutinação de componentes da cápsula, sendo identificados cinco sorotipos (**Figura 2**). O sorotipo A corresponde a *C. neoformans* var. *grubii*, enquanto os sorotipos D e AD correspondem a *C. neoformans* var. *neoformans*. Os sorotipos B e C correspondem a *C. gattii*. (Idnurm et al., 2005).

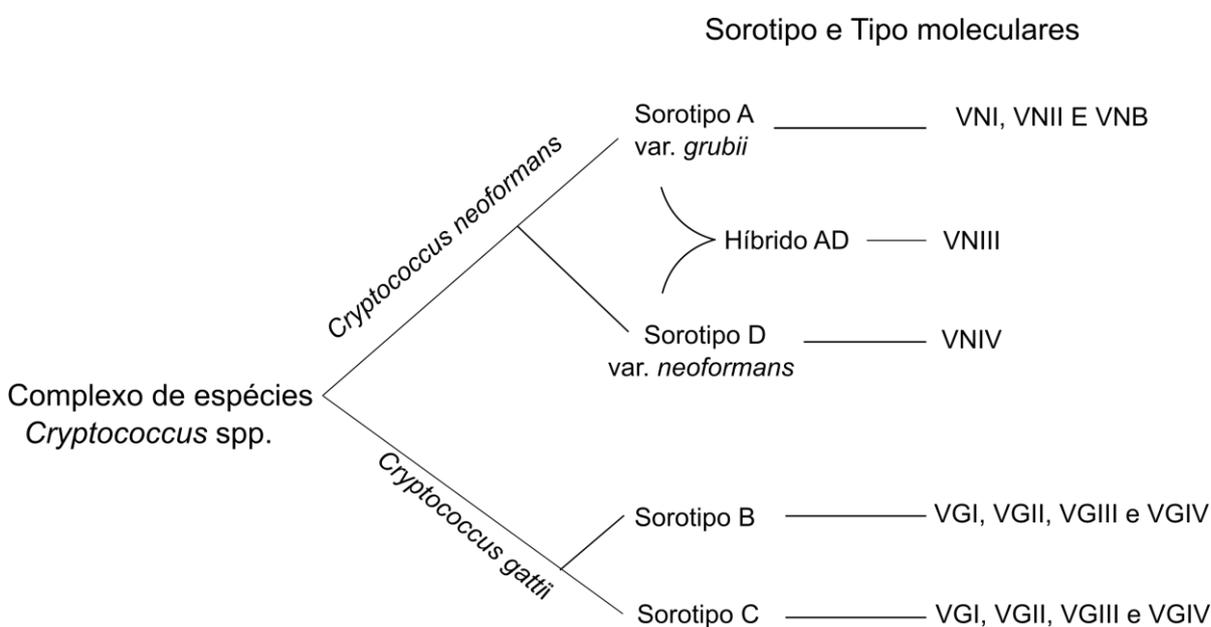


Figura 2. Classificação do complexo de espécies do gênero *Cryptococcus* em sorotipos e tipos moleculares. Adaptado de Lin, 2009.

Todavia, essa classificação baseada nos sorotipos está sendo substituída por genotipagem molecular. Nesse modelo, os tipos moleculares VNI, VNII e VNB correspondem a *C. neoformans* var. *grubii*, VNIV a *C. neoformans* var. *neoformans* e VNIII aos híbridos (sorotipo AD). *C. gattii* pode ser classificado em quatro tipos moleculares, o VGI, VGII, VGIII e VGIV (Kwon-Chung et al., 2017). Recentemente, com base em análises genéticas e filogenéticas, foi proposta a separação de *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* em duas espécies distintas e *C. gattii* em

cinco espécies distintas (Hagen et al., 2015). Apesar dessa nova divisão em espécies ainda estar sendo debatida, esses dados revelam o quão complexo e diverso é o gênero *Cryptococcus*. Dentre todos esses tipos moleculares, o tipo VNI parece ser o de maior distribuição mundial, sendo o tipo encontrado com maior frequência em pacientes acometidos pela doença (Bertout et al., 2013; Hagen et al., 2016).

A forma leveduriforme e a divisão celular por brotamento é predominante na natureza. Todavia, o fungo também pode se apresentar nas forma de hifa e pseudo-hifa e também possui ciclo sexual (Lin, 2009). Os parceiros sexuais são chamados α e \mathbf{a} . A fusão dos parceiro sexuais leveduriformes resulta no crescimento filamentosos e formação de uma hifa dicaritótica. A região terminal desse filamento se transforma no basídio, onde ocorre a fusão nuclear. Após a fusão dos núcleos, ocorre a meiose e então a formação das cadeias dos basidiósporos com a subsequente dispersão dos esporos. Esses basidiósporos germinam em novas leveduras (Lin, 2009). Todo o ciclo de vida de *C.neoformans* pode ser feito no ambiente, no entanto, eventualmente o fungo pode se instalar em hospedeiros mamíferos.

A infecção ocorre através da inalação de basidiósporos ou leveduras dissecadas do ambiente (Lin and Heitman, 2006). A infecção se instala primeiramente no pulmão (**Figura 3**), sendo geralmente assintomática. As leveduras de *Cryptococcus* spp. podem ser eliminadas do organismo pela células do sistema imune do hospedeiro ou podem permanecer dormentes. Se o sistema imune do hospedeiro for comprometido, as formas dormentes são reativadas, podendo sair do pulmão e se disseminar pelo organismo, dirigindo-se principalmente para o sistema nervoso central levando a meningites e meningoencefalites, as formas mais graves da doença (Lin and Heitman, 2006).

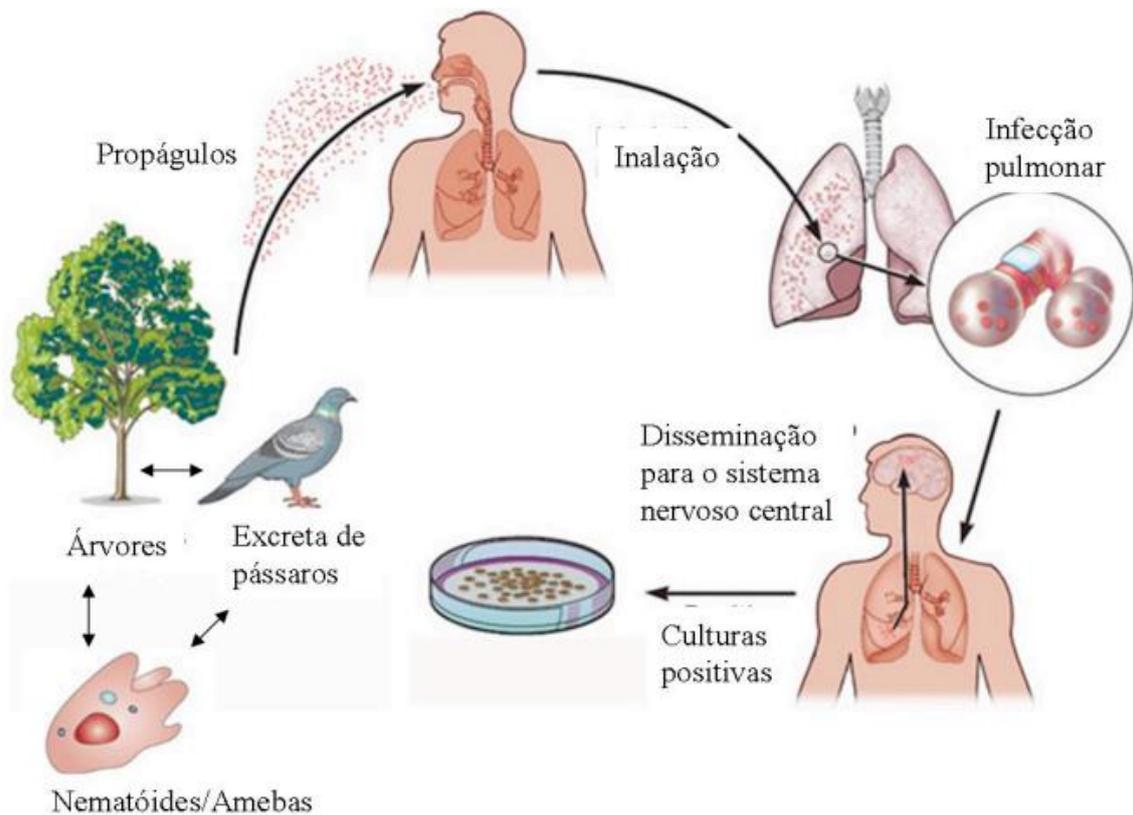


Figura 3. O ciclo infeccioso de *C. neoformans*. O fungo *C. neoformans* é encontrado no ambiente, estando associado a árvores e a excretas de pombos. No solo, os fungos mantêm interação com seus predadores, como amebas e nematóides. Propágulos ou leveduras do fungo podem ser inaladas, se instalando no pulmão e causando uma infecção local que pode se disseminar para o sistema nervoso central. Adaptado de Hull & Heitman, 2002.

1.1.1 Atributos de virulência

Cryptococcus spp. apresentam diversos atributos de virulência, como a termotolerância, a produção de ureases, fosfolipases entre outros. Três desses atributos já foram mostrados estarem bem relacionados à resistência contra os antifúngicos usados na clínica. Esses atributos são cápsula, melanina, e a capacidade de formar biofilmes.

Cápsula

A cápsula é a estrutura mais estudada em *Cryptococcus* spp. Ela é composta primariamente por dois polissacarídeos complexos, a glicuronoxilomanana (GXM), o componente majoritário da cápsula, a glicuronoxilomanogalactana (GXMGal), e manoproteínas (Wang et al., 2018). Ácido hialurônico também já foi detectado na cápsula (Chang et al., 2006).

A GXM é formada por um esqueleto linear de manoses ao qual se apresentam ligadas a unidades de ácido glicurônico e xilose (Cherniak et al., 1998). Esse cerne se repete formando os polissacarídeos da cápsula. As unidades de manose também podem ser O-acetiladas no seu carbono 6 (Cherniak et al., 1998). A GXMGal é menor que a GXM e é constituída por um esqueleto linear de galactose com cadeias laterais de galactose e mananas (Vaishnav et al., 1998). A cápsula é extremamente hidrofílica e possui uma alta carga negativa em função das moléculas de ácido glicurônicos (Maxson et al., 2007a; Maxson et al., 2007b).

A síntese desses polissacarídeos ocorre no Complexo de Golgi de onde são transportadas por meio de vesículas secretórias até o exterior da célula, para então se ligarem à parede celular (Yoneda and Doering, 2006; Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). Os polissacarídeos recém-sintetizados são incorporados às fibras da cápsula já existentes. Alguns modelos propõem que os polissacarídeos são incorporados na parte interna da cápsula, próximo à parede celular (Pierini and Doering, 2001; Cordero et al., 2013a) ou na sua face distal (Zaragoza et al., 2006).

A cápsula protege o fungo no meio ambiente contra a desidratação, radiação e contra predadores naturais, como nematóides e amebas (Steenbergen et al., 2001; Mylonakis et al., 2002; Chrisman et al., 2011). No hospedeiro essa estrutura dificulta a fagocitose pelos macrófagos e, quando a levedura é fagocitada, protege o fungo contra as espécies reativas de oxigênio (Macura et al., 2007; Zaragoza et al., 2008). Os componentes da cápsula também modulam a resposta imune do hospedeiro, desregulando a produção de citocinas inflamatórias entre outras funções, o que favorece a sobrevivência do fungo (Karkowska-Kuleta et al., 2009; Vecchiarelli et al., 2011).

A cápsula é fundamental para a virulência de *C. neoformans*, dado que linhagens não encapsuladas são avirulentas e linhagens hipercapsulares tendem a ser hipervirulentas (Chang and Kwon-Chung, 1994; Chang et al., 1996; D'Souza et al., 2001; Fernandes et al., 2018). Durante a infecção no hospedeiro mamífero, o fungo tende a expandir o tamanho da sua cápsula por sinais ainda não completamente elucidados, mas que envolvem, por exemplo, a concentração de CO₂ nos tecidos, presença de alguns nutrientes, baixas concentrações de ferro, entre outros (Vartivarian et al., 1993; Zaragoza et al., 2003; Zaragoza and Casadevall, 2004).

É possível que a expansão da cápsula no hospedeiro aumente a sua resistência aos antifúngicos utilizados. Foi demonstrado em diferentes estudos que, uma vez que se induz a cápsula do fungo, as leveduras são protegidas da ação antifúngica de anfotericina B

(AMB) em comparação à leveduras sem indução de cápsula (Zaragoza et al., 2008; Cordoba et al., 2011; Vitale et al., 2012; Rossato et al., 2015). O mecanismo de proteção ainda não está claro, porém, especula-se que essa proteção se dê pela ação antioxidante que os componentes da cápsula parecem ter (Zaragoza et al., 2008). Dado que um dos mecanismos pelo qual a AMB mata as células fúngicas é pela geração de ROS (Sangalli-Leite et al., 2011), é plausível que a cápsula proteja o fungo desse fármaco por meio da sua ação antioxidante.

Melanina

A melanina é um pigmento escuro de carga negativa, hidrofóbico e resistente a ácidos concentrados (Casadevall et al., 2000; Nosanchuk and Casadevall, 2003). A síntese da melanina é realizada pela enzima lacase por meio da utilização de substratos fenólicos (Nosanchuk and Casadevall, 2003). A melanina se deposita na parede celular do fungo onde protege a levedura de condições ambientais adversas, como radiação UV e altas temperaturas (Nosanchuk and Casadevall, 2003).

As linhagens que produzem mais melanina também são mais virulentas do que as que produzem menos do pigmento (Fircative et al., 2014). A produção da melanina também está implicada no aumento da resistência a antifúngicos. Diversos estudos mostram que células melanizadas têm maior viabilidade após o tratamento com Fluconazol (FLC) e AMB do que leveduras não melanizadas (Wang and Casadevall, 1994; van Duin et al., 2002; Ikeda et al., 2003; Liaw et al., 2010). Um dos possíveis mecanismo de ação é também pela proteção contra ROS, dado que a melanina tem propriedades antioxidantes, no caso do tratamento da levedura com AMB (Romero-Martinez et al., 2000; Nosanchuk and Casadevall, 2003). Além disso, outras evidências sugerem que a melanina é capaz de se ligar à AMB e sequestrar o antifúngico, impedido que ele chegue a seu alvo (van Duin et al., 2002; Ikeda et al., 2003). Esse pigmento reduz a porosidade da parede celular, impedido que moléculas grandes consigam atravessá-la, sendo esta a possível razão da resistência das células melanizadas a FLC (Eisenman et al., 2005).

Biofilme

Outro importante atributo de virulência associado à resistência a antifúngicos é a habilidade de formar biofilme. Já é bem documentado que biofilmes microbianos, em geral são mais resistentes a antibióticos (Anderson and O'Toole, 2008; Algburi et al.,

2017; Chong et al., 2018). Os biofilmes de *C. neoformans* não fogem a essa regra. Em comparação às células planctônicas, os biofilmes de *C. neoformans* são menos suscetíveis a AMB e completamente resistentes aos azóis (Martinez and Casadevall, 2006b). A melanização do biofilme também confere maior resistência a AMB em comparação ao biofilme não melanizado (Martinez and Casadevall, 2006b). Curiosamente, anticorpos que se ligam à cápsula do fungo aumentam a resistência de biofilmes maduros a AMB, em uma espécie de efeito antagonista (Martinez et al., 2006). Os autores desse estudo sugerem que esses anticorpos se ligariam à matriz extracelular do biofilme, que é composta por diversos polissacarídeos da cápsula do fungo, e formariam uma capa de proteção na qual impediria o acesso da AMB às células do biofilme. Se for esse o caso, é possível que os próprios componentes do sistema imune do paciente, como anticorpos e sistema complemento, dificultem o tratamento contra o biofilme de *C. neoformans*.

1.1.2 Tratamento da criptococose

O regime de tratamento consolidado como padrão ouro para o tratamento da meningoencefalite causada por *Cryptococcus* spp. é a associação do polieno AMB e do análogo de pirimidina 5-Fluocitosina (5-FC) (Day et al., 2013). Os polienos são uma classe de antifúngicos fungicidas cujo mecanismo principal é a ligação do fármaco ao ergosterol, desestabilizando a membrana com a formação de poros e subsequente extravasamento do conteúdo citoplasmático levando o fungo à morte (Ermishkin et al., 1976).

Já 5-FC atua principalmente interferindo com a síntese de ácidos nucleicos (Waldorf and Polak, 1983). Esse fármaco fungistático é transportado para o interior da célula por uma citosina permease, onde sofre uma série de modificações químicas cujos produtos finais podem ser incorporados ao mRNA, inibindo a síntese proteica, ou inibir a enzima timidilato sintase, interrompendo a síntese de DNA (Waldorf and Polak, 1983). As principais complicações a respeito desse regime de tratamento é o seu alto custo e a necessidade de uma boa infraestrutura médica para administração do tratamento, limitando o seu acesso em regiões menos desenvolvidas do mundo (Krysan, 2015).

Outra complicação é a toxicidade desse tratamento, já que a AMB é nefrotóxica e a 5-FC é tóxica para a medula óssea, necessitando, portanto, de uma administração acompanhada (Stamm et al., 1987; Krysan, 2015). Em regiões com limitações de recursos, a alternativa a esse tratamento é a utilização do fluconazol. Esse fármaco fungistático inibe a proteína lanosterol 14- α -demetilase, uma enzima chave para a

biossíntese de ergosterol na célula (Shapiro et al., 2011). O bloqueio da síntese do ergosterol resulta no acúmulo de 14 α -metil-3,6-diol, um esteroide tóxico para a membrana da célula, e na redução do conteúdo de ergosterol na membrana do fungo (Vandeputte et al., 2012).

Além do tratamento com fluconazol ser menos efetivo, já há vários relatos do advento de linhagens resistentes a esse antifúngico, reduzindo as opções de tratamento (Chong et al., 2010; Pfaller et al., 2011; Li et al., 2012b; Pan et al., 2012). Apesar de ser bastante rara, a resistência a AMB também já foi documentada (Shapiro et al., 2011; Andrade-Silva et al., 2013). Além disso *Cryptococcus* spp. é intrinsecamente resistente a equinocandinas, lipopeptídeos que inibem a β -1,3 glicana sintase, enzima envolvida na síntese de componentes da parede celular, não sendo essas moléculas uma opção, portanto, para o tratamento da criptococose (Feldmesser et al., 2000; Denning, 2002).

Fica evidente assim a necessidade de novas estratégias para o controle da infecção causada por *Cryptococcus* spp. O desenvolvimento de novos fármacos a partir de peptídeos antimicrobianos pode aumentar o repertório de terapias antifúngicas.

1.2 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são pequenas moléculas que fazem parte de um mecanismo de defesa antigo e evolutivamente conservado contra microrganismos. Essas moléculas são importantes efetores do sistema imune inato nos organismos multicelulares e são multifuncionais, possuindo outras atividades além da microbicida, como por exemplo atividade imunomodulatória (Lai and Gallo, 2009). AMPs já foram identificados em organismos de todos os três grandes domínios e possuem atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos, como bactérias, archaeas, fungos, vírus e protozoários (Price and Shand, 2000; Jenssen et al., 2006; Nakatsuji and Gallo, 2012; Bang et al., 2017).

A maioria dos AMPs tem como seu principal alvo a membrana do patógeno, levando à permeabilização da bicamada lipídica, matando o microrganismo (Jenssen et al., 2006; Guilhelmelli et al., 2013). O fato de poderem ter como principal alvo a membrana citoplasmática de bactérias e fungos, o desenvolvimento de resistência a esses AMPs é menos provável, tornando-os excelentes candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos. Todavia, existem relatos de algumas estratégias de resistência a essas moléculas (Zasloff, 2002; Guilhelmelli et al., 2013). A expressão desses AMPs ocorre

onde há mais probabilidade de invasão ou circulação do patógeno, como a pele e mucosas gastrointestinais, e ocorre tanto constitutivamente, como também pode ser induzida em resposta a um sinal desencadeado por um patógeno (Cowland and Borregaard, 1999; Harder et al., 2001; Harder et al., 2004; Selsted and Ouellette, 2005; Menard et al., 2008).

1.2.1 Peptídeos Antifúngicos

Peptídeos antimicrobianos são capazes de inibir uma grande variedade de organismos. Uma vez que organismos procariotos e eucariotos diferem em diversos aspectos, é de se esperar que os AMPs com atividade antifúngica tenham algumas diferenças em relação aos peptídeos antibacterianos. Nessa tese, será dado enfoque nas características e mecanismo de ação de peptídeos antifúngicos (AFPs).

Classificação e Estrutura de Peptídeos Antifúngicos

Até o presente momento, há pelo menos 1131 AFPs registrados no banco de dados APD (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, acessado no dia 15 de setembro de 2019). Todos esses AFPs apresentam grande diversidade na sua estrutura primária, de forma que a classificação desses peptídeos também se dá principalmente pela estrutura secundária, tamanho, e composição de aminoácidos (De Lucca and Walsh, 1999; Zasloff, 2002).

Os AFPs são em geral moléculas catiônicas devido principalmente à presença de múltiplos resíduos de argininas e lisinas. Sua sequência também é constituída por 30% ou mais de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Um estudo demonstrou que AFPs tendem a ter mais cisteínas, glicinas, histidinas, lisinas e argininas em sua composição do que peptídeo sem atividade antifúngica (Agrawal et al., 2018). Os resíduos de aminoácidos arginina, lisina e valina se encontram preferencialmente na posição N-terminal do peptídeo, enquanto os resíduos de cisteína e histidina se apresentam na região C-terminal (Agrawal et al., 2018).

A carga positiva dos AFPs parece ter uma grande importância na atividade antifúngica. Sabe-se que análogos da Histatina-5 que possuem maior carga residual positiva têm sua atividade antifúngica contra *C. albicans* aumentada em quase 2 vezes, enquanto as variantes que têm os resíduos básicos substituídos por resíduos sem carga perdem a atividade antifúngica (Helmerhorst et al., 1997; Rothstein et al., 2001). Nikawa e colaboradores mostraram que quanto maior o ponto isoelétrico de AMPs, maior é a sua atividade antifúngica (Nikawa et al., 2004). Análogos da catelicidina CAP11 com maior

carga residual também se mostraram mais eficientes contra *C. albicans* (Okuda et al., 2009).

Quando o peptídeo se dobra na sua estrutura secundária, em geral é formada uma face catiônica e uma face hidrofóbica conferindo assim uma propriedade anfipática à molécula (Hancock and Sahl, 2006). Em relação à estrutura secundária, essas moléculas podem ser classificadas em pelo menos quatro grupos (Figura 4): peptídeos que formam α -hélice, peptídeos que se dobram em folhas- β estabilizadas por ligações dissulfeto, peptídeos estendidos e peptídeo em loop, sendo os dois primeiros tipos de AMPs os mais comuns na natureza (De Lucca and Walsh, 1999; Epanand and Vogel, 1999; Brogden, 2005; Lai and Gallo, 2009). Dentre essas estruturas, os peptídeos que formam α -hélice são os mais interessantes para nosso trabalho por ser a possível estrutura secundária adotada pelos AMPs trabalhados nesta tese. Alguns representantes dessa classe com atividade antifúngica são as cecropinas, magaininas e a catelicidina humana LL-37 (Zasloff, 1987; Andersson et al., 2003; Wang, 2008).

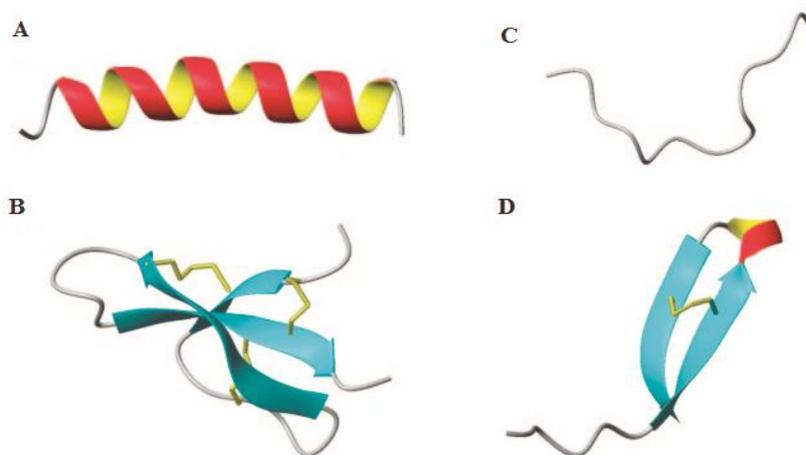


Figura 4. Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos. (A) α -hélice da magainina-2. (B) folhas- β da defensina-1 de rim de coelho. (C) Estrutura estendida da indolicidina. (D) Estrutura em loop da tanatina. Adaptado de Jessen *et al.* 2006.

A maioria dos peptídeos que formam α -hélice apresentam uma estrutura randômica e desordenada quando em solução aquosa (Tossi et al., 1994; Gennaro et al., 1998; Skerlavaj et al., 1999). Quando esses peptídeos passam da solução aquosa para ambientes que mimetizam a membrana plasmática, eles assumem a conformação em α -hélice em sua totalidade, ou pelo menos em grande parte da molécula. A hélice formada apresenta uma face polar catiônica e outra face composta hidrofóbica, sendo essa

disposição essencial para a interação do peptídeo com as membranas biológicas e para seu mecanismo efetor.

Apesar de alguns estudos apontarem que o aumento do conteúdo de α -hélice melhora a atividade antibacteriana, este não parece ser um parâmetro importante para a atividade antifúngica. O aumento do conteúdo de α -hélice no peptídeo buforina II melhora a atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas não interfere na atividade antifúngica (Park et al., 2000). Nós demonstramos que o aumento da α -hélice no análogo do peptídeo ToAP2 leva à perda da sua atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans* (Guilhelmelli et al., 2016).

Especificidade a fungos e mecanismo de ação

Considerando que a maioria dos AFPs possuem como alvo a membrana do patógeno, é necessário que o AFP seja seletivo para a membrana fúngica e não a do hospedeiro. A especificidade desses AFPs para as membranas fúngicas é determinada principalmente pelas diferenças das propriedades físico-químicas entre as suas superfícies.

Da mesma forma que em procaríotos, a membrana fúngica é, em geral, mais negativa do que a membrana celular de mamíferos e isso se deve principalmente à diferença nas suas composições. As membranas de eucariotos são compostas por fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA) (Itoh and Kaneko, 1977; Leidl et al., 2008; Ejsing et al., 2009; Singh and Prasad, 2011; Singh et al., 2017). Nas membranas fúngicas há uma maior concentração de PI e PA, tornando a membrana mais negativa do que a membrana de mamíferos que apresentam alto conteúdo de PC (Theis and Stahl, 2004; Rautenbach et al., 2016).

A diferença eletrostática entre as membranas do hospedeiro e do fungo faz com que os peptídeos catiônicos tenham preferência pela membrana do patógeno. A eletronegatividade da superfície do fungo é importante para atração e interação inicial dos peptídeos catiônicos (Brogden, 2005). Outros componentes do fungo estão envolvidos na seletividade, e por consequência no mecanismo de ação dos AFPs e serão abordados nas próximas seções.

Parede celular

A parede celular é uma organela fundamental para a sobrevivência e viabilidade de fungos (Levin, 2011; Gow et al., 2017). Para que o peptídeo antifúngico atinja a membrana ou penetre na célula é necessário que ele ultrapasse a parede celular, de forma que a interação do peptídeo com essa estrutura é inevitável.

A parede celular pode ser uma barreira que dificulta o acesso do peptídeo à célula (Dielbandhosing et al., 1998). Todavia, alguns desses AFPs dependem da ligação a componentes da parede para que consigam realizar sua atividade. Um exemplo é a defensina NaD1 que só é capaz de permeabilizar a membrana de *Fusarium oxysporum* por meio da sua ligação a manoproteínas presente na parede das hifas do fungo (van der Weerden et al., 2010). A digestão dessas proteínas por proteinases abole a atividade antifúngica desse AMP. Outro AMP que depende da ligação a componentes da parede para a sua atividade é a Histatina-5 (Hst-5), peptídeo rico em histidina presente na saliva humana com alta atividade fungicida contra *C. albicans* (Jang et al., 2010). A ligação de Hst-5 a β -glicanas da parede celular é essencial para que ocorra a morte do fungo. As células que apresentam defeito na parede celular, com a perda de β -glicanas, são menos suscetíveis ao AMP (Jang et al., 2010). Outro componente da parede que auxilia na especificidade a fungos é a quitina. Já foram descritos peptídeos de plantas e uma defensina de mamífero que se ligam a esse componente da parede celular de fungos (Levitz et al., 1986; Fujimura et al., 2004; 2005).

Alguns peptídeos interferem com a síntese de componentes da parede celular, sendo parte do seu mecanismo de ação. As equinocandinas inibem a síntese de β -glicanas (Denning, 2002). A nikkomicina, atua como competidor da quitina sintase em *C. albicans* impedindo a síntese de quitina (McCarthy et al., 1985).

Membrana plasmática

A composição da membrana fúngica é diferente da membrana de mamífero. Muitos AFPs se ligam a um tipo de componente da bicamada lipídica de fungos. Os peptídeos NaD1 e TPP3 se ligam preferencialmente a fosfatidilinositol – bifosfato, desestabilizando a membrana plasmática e levando à ruptura da bicamada lipídica (Baxter et al., 2015; Payne et al., 2016). A ligação de MtDef4 a PA é importante para a internalização desse peptídeo e sua subsequente atividade microbicida em *Fusarium graminearum* (Sagaram et al., 2013).

Diversos AFPs se ligam a esfingolipídeos e ao ergosterol. O ergosterol é um esterol presente nas membranas fúngicas e é um importante componente envolvido na

seletividade do AFP. A Cecropina B e dermaseptina se ligam ao ergosterol como parte dos seus mecanismos de ação que levam à morte de espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium* (De Lucca et al., 1998).

A defensina DmAMP1 interage com o a Manosil-inositol-fosforil-ceramida (MIPC) e, na presença do ergosterol, essa interação é potencializada, levando à permeabilização da membrana de *Saccharomyces cerevisiae* (Thevissen et al., 2003b). Essa interação é fundamental para a atividade do peptídeo, uma vez que mutantes dessa levedura cujas MIPC sintases foram deletadas são resistentes ao peptídeo (Thevissen et al., 2000).

Os peptídeos RsAFP2, Psd1 e Psd2 também interagem com glicosilceramida (GlcCer) e essa interação é necessária para a atividade antifúngica, dado que mutantes com deficiências na via da síntese de GlcCer são resistentes aos peptídeos (Thevissen et al., 2004; de Medeiros et al., 2014; Goncalves et al., 2017; Amaral et al., 2019).

Uma vez interagindo com a membrana, se esse for seu alvo, os peptídeos antifúngicos permeabilizam essa estrutura, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e perda da função da membrana. Diversos peptídeos de origens diferentes permeabilizam a membrana plasmática de fungos, dentre eles podem ser destacados as catelicidinas BMAP-27, BMAP-28 e SMAP-29, que possuem atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans* (Benincasa et al., 2006). Outros peptídeos que também formam poros na membrana são os AFPs de peçonha de escorpião Parabutoporina e Opistoporina 1, que possuem atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Neurospora crassa* e *S. cerevisiae* (Moerman et al., 2002). A permeabilização da membrana se dá principalmente pela formação de poros na bicamada lipídica.

Após a interação inicial, os AMPs geralmente se orientam paralelamente em relação à membrana. Somente após a concentração do peptídeo atingir um limiar específico para cada antimicrobiano que as moléculas orientam-se perpendicularmente para então se inserem na bicamada lipídica, constituindo os poros (Yang et al., 2001). A face catiônica constitui o lúmen do poro, enquanto a face hidrofóbica interage com o interior da membrana plasmática.

Os principais modelos de permeabilização da membrana propostos são o modelo “barrel-stave”, o modelo de poro toroidal e o modelo “carpete” (Figura 5).

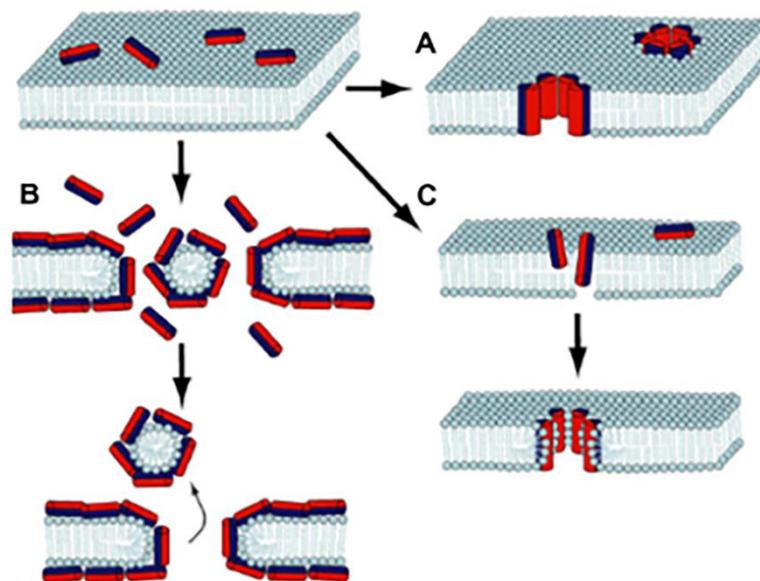


Figura 5. Mecanismos de permeabilização da membrana por peptídeos antimicrobianos. Nessa figura, três dos principais modelos são propostos: A. Modelo “barrel-stave”. B. Modelo “carpete”. C. Poro toroidal. Adaptado de (Teixeira et al., 2012)

Brevemente, no modelo “barrel-stave” os monômeros de peptídeos se inserem na membrana e se oligomerizam formando o poro (Baumann and Mueller, 1974). O lúmen desse poro é constituído apenas pela face catiônica pelo AMP, enquanto a face hidrofóbica interage com os lipídeos da membrana. Já no modelo do poro toroidal, os peptídeos se inserem na membrana e distorcem a orientação dos fosfolipídeos na bicamada que se dobra formando uma espécie de monocamada. O lúmen do poro é formado tanto pelo peptídeo inserido quanto pelas cabeças polares dos fosfolipídeos da membrana (Brogden, 2005).

Por fim, no modelo “carpete”, os AMPs são atraídos eletrostaticamente à membrana, cobrindo-a como se fosse um carpete (Pouny et al., 1992). Esses AMPs agem como uma espécie de detergente, não sendo necessária a inserção do peptídeo na bicamada ou a adoção de uma estrutura secundária. Quando a concentração de peptídeos na superfície supera um determinado limiar, a bicamada lipídica é desintegrada podendo inclusive gerar micelas.

Outros mecanismos de ação.

Além da permeabilização da membrana, os AFPs podem inibir o crescimento do fungo por outros tipos de mecanismos. Alguns AFPs desencadeiam a formação de ROS como parte do seu mecanismo de ação (Aerts et al., 2011; Mello et al., 2011). A ligação

do peptídeo RsAFP2 aos esfingolípídios da membrana desencadeia a produção de ROS provavelmente através da ativação de uma cascata de sinalização iniciada pela interação com GlcCer (Aerts et al., 2007). Nesse caso, a produção de ROS é o mecanismo principal que leva à morte celular, já que o tratamento das células com um antioxidante reduz a atividade antifúngica do peptídeo. A formação de ROS pode ser também um efeito secundário à desestabilização da membrana, como no caso das tirocidinas, não sendo essencial para a atividade do peptídeo (Troskie et al., 2014).

O acúmulo de ROS pode disparar uma cascata de sinalização que culmina na apoptose da célula fúngica (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016; Yeaman et al., 2018). *C. albicans* tratada com os peptídeos Scolopedina e PMAP-23 apresenta diversos fenótipos apoptóticos, como acúmulo de cálcio no interior da célula, produção de ROS, fragmentação do DNA e exposição de fosfatidiserina na camada externada da membrana plasmática (Lee et al., 2017; Kim and Lee, 2019).

O mecanismo de ação da Histatina-5 também não envolve a permeabilização da membrana. Esse peptídeo causa o efluxo de ATP, potássio e magnésio provocando o desbalanço iônico e osmótico mediado pelo transportador de potássio Trk1 em *C. albicans* (Koshlukova et al., 1999; Xu et al., 1999; Baev et al., 2004; Puri and Edgerton, 2014).

Resistência a peptídeos antifúngicos.

Da mesma forma que em bactérias, fungos também possuem estratégias de defesa contra a atividade de AFPs (Swidergall and Ernst, 2014). Os principais mecanismos de defesa do fungo contra AFPs envolvem a secreção de proteínas que ou degradam ou sequestram o peptídeo e da expressão de bombas de efluxo. Esses mecanismos foram mais estudados no modelo de *C. albicans*.

C. albicans utiliza as proteases Sap9 e Sap10 ancoradas na parede celular para degradar a Hst-5, abolindo a sua atividade (Meiller et al., 2009). Essa levedura também cliva a o domínio extracelular da glicoproteína associada à membrana plasmática Msb2, de forma que esse domínio, chamado de Msb2*, inativa uma série de peptídeos antifúngicos como as defensinas hNP1-1, hBD1, a catelicidina LL-37 e a própria Hst-5 (Szafranski-Schneider et al., 2012; Swidergall et al., 2013). Por fim, a bomba de efluxo Flu1 reduz a concentração citoplasmática de Hst-5 por meio do bombeamento desse peptídeo para fora da célula. Quando o gene desse transportador é deletado a levedura se torna mais sensível ao peptídeo (Li et al., 2013).

1.3 Peptídeos antifúngicos em testes clínicos.

Apesar de já terem sido descritos diversos peptídeos com atividade antifúngica promissora em testes *in vitro* e em modelos animais, apenas alguns peptídeos avançaram para testes clínicos (Greber and Dawgul, 2017). Ainda são necessários superar diversos obstáculos para o desenvolvimento de fármacos a partir de AMPs. Um dos problemas enfrentados é ainda o alto custo de síntese e produção em larga escala desses AMPs. Apenas peptídeos com poucos resíduos de aminoácidos são viáveis para a produção (Greber and Dawgul, 2017; Nicola et al., 2019).

Esses AMPs também apresentam alta toxicidade sistêmica, atividade reduzida em condições fisiológicas (em função principalmente na presença de sais e de outros componentes do sêrum humano), suscetibilidade à atividade proteolítica, possibilidade de desenvolvimento de alergia ao fármaco após diversas aplicações entre outros (Nicola et al., 2019).

Diversas estratégias têm sido adotadas para superar essas adversidades. Uma dessas estratégias é formulação de fármacos para uso tópico, uma alternativa mais segura, menos tóxica e de desenvolvimento mais fácil. Modificações químicas dos peptídeos, como amidação, acetilação e introdução de aminoácidos não naturais tem se mostrado promissores para manter a estabilidade do peptídeo em condições fisiológicas (Greber and Dawgul, 2017).

Dos peptídeos em teste clínico podemos destacar o AMP NP339 (Novamycin). Esse peptídeo está em desenvolvimento para o tratamento de candidíase e aspergilose e também foi demonstrado possuir atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp e *Trichosporum* spp (Greber and Dawgul, 2017). Esse peptídeo foi formulado tanto para uso tópico como para a uso por inalação, podendo ser utilizado para o tratamento de infecções sistêmicas e muco cutâneas (Greber and Dawgul, 2017).

Outro peptídeo em Fase 2 de testes clínicos é um AMP derivado da histatina-5, o PAC-113. Os resultados dos ensaios clínicos mostram que essa nova formulação pode ser utilizada para o tratamento tópico de candidíase oral em pacientes convivendo com HIV e gengivite causada por fungos. Além disso, essa nova formulação é eficaz contra células planctônicas e células em biofilme (Greber and Dawgul, 2017; Nicola et al., 2019).

Apesar das dificuldades, esses dados mostram que é possível o desenvolvimento de novos fármacos e que essas novas formulações são promissoras.

1.4 Peptídeos Antimicrobianos presentes em peçonhas de escorpião.

AMPs de praticamente todas as formas de vida já foram identificados. Em organismos multicelulares, a produção e circulação de AMPs ocorrem em diversos tipos de tecidos. Esses peptídeos são comumente presentes na peçonha de animais vertebrados e invertebrados como cobras, vespas, abelhas, centopeias, aranhas e escorpiões (de Oliveira Junior et al., 2013). Nesta tese será dado ênfase aos AMPs de peçonha de escorpião.

A peçonha de escorpião é composta de aminoácidos, nucleotídeos, aminas, peptídeos, enzimas, sais inorgânicos e outros compostos (Ortiz et al., 2015). Os peptídeos de peçonha, em geral, são divididos em duas classes: os peptídeos com ligação dissulfeto (Disulfide-bridged peptides – DBPs), contendo três a quatro ligações e os peptídeos sem ligações dissulfeto (Non-disulfide-bridged peptides – NDBPs) (Zeng et al., 2005). Em ambas as classes existem peptídeos com atividade antimicrobiana, todavia, a maioria dos AMPs de peçonha de escorpião são os NDBPs, e por consequência os mais estudados (Almaaytah and Albalas, 2014; Harrison et al., 2014).

Os DBPs geralmente são toxinas cujos alvos são os canais de íons presentes nas membranas das células, entre eles os canais de Na^+ , Ca^{2+} , K^+ e Cl^- (DeBin et al., 1993; Possani et al., 1999; Schwartz et al., 2013), constituindo uma fonte de possíveis novos fármacos para tratamento de diversas doenças neurológicas, como as Doenças de Parkinson e Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia entre outras (Gati et al., 2012). Dos DBPs com atividade antimicrobiana, podemos citar os peptídeos da família das Opiscorpinas, do escorpião *Opisththalmus carinatus* (Zhu and Tytgat, 2004). Esses peptídeos possuem atividade antibacteriana e antifúngica contra fungos do gênero *Fusarium*.

Os NDBPs de escorpião possuem entre 13 a 56 resíduos de aminoácidos e exibem uma grande diversidade de sequências (Almaaytah and Albalas, 2014). Esse grupo representa mais de um terço dos peptídeos da peçonha de escorpião e apresentam atividades biológicas diversas, dentre elas a atividade antimicrobiana e imunomodulatória (Uzair et al., 2018).

A classificação dos NDBPs é baseada nas suas propriedades farmacológicas e no tamanho de sua sequência (Zeng et al., 2005). Com base nesse critério, existem 6 subfamílias, as primeiras duas reservadas a peptídeos com atividade vasodilatadora e a de peptídeos sem função caracterizada, respectivamente. As terceira, quarta e quinta subfamílias são reservadas para peptídeos antimicrobianos de cadeia longa, média e curta, respectivamente. A última subfamília é de peptídeos acídicos sem atividade caracterizada.

A maioria desses NDBPs são peptídeos catiônicos, anfipáticos e estruturaram-se em α -hélices. Os peptídeos em α -hélice podem ser divididos em dois grupos: os peptídeos que possuem um único domínio central α -helicoidal e cujas ambas as extremidades permanecem como um “random coil”, como o caso dos NDBPs Pandinina2, BmKb1 e IsCT (Corzo et al., 2001; Dai et al., 2002; Zeng et al., 2004) e os peptídeos que possuem duas regiões α -helicoidais separadas por uma região de “random coil. Esse tipo de estrutura é observado nos NDPBs Hadrurina, Pandinina 1, Opistoporina 1 e Parabutoporina (Corzo et al., 2001; Moerman et al., 2002). Assim como AMPs helicoidais, esses NDBPs tendem a se apresentar em conformação randômica em solução aquosa passando para a forma em hélice em soluções ou micelas que mimetizam o ambiente da membrana citoplasmática (Corzo et al., 2001; Dai et al., 2002).

Da mesma forma que outros AMPs, os NDBPs inibem o crescimento de um amplo espectro de organismos, tais como bactérias, fungos e protozoários, tendo como o principal mecanismo de ação a formação de poros e permeabilização da membrana (Belokoneva et al., 2004; Gao et al., 2010; Primon-Barros and Jose Macedo, 2017). Esses peptídeos também possuem atividade antiviral e anticâncer (Chen et al., 2012; Guo et al., 2013; Uzair et al., 2018).

Outra atividade interessante desses peptídeos é a atividade imunomodulatória. Os peptídeos Opistoporina 1, Opistoporina 2 e Parabutoporina modulam a atividade de neutrófilos humanos (Willems et al., 2002). Esses peptídeos também induzem a desgranulação de granulócitos humanos por meio do aumento da concentração de cálcio no interior da célula (Moerman et al., 2003). Recentemente também foi demonstrando que os peptídeos ToAP3, ToAP4 possuem atividade imunomodulatória (Velooso Junior et al., 2019). Esses peptídeos reduzem a produção das citocinas TNF- α de macrófagos e células dendríticas derivadas de medula estimuladas com LPS.

Todavia, diversos desses peptídeos também apresentam uma alta atividade hemolítica limitando o potencial desses AMPs para o uso terapêutico (Almaaytah and Albalas, 2014). Ainda assim, esses peptídeos podem servir de base para o desenho racional de novos fármacos, para o desenvolvimento de fármacos de uso tópico ou mesmo para a confecção de biomateriais hospitalares que impedissem a adesão e formação de biofilmes (Etienne et al., 2005; Alves and Olivia Pereira, 2014).

A maioria dos AMPs de peçonha foi testada contra o modelo bacteriano, de forma que os estudos em modelo fúngico ainda são incipientes. Dos aproximadamente 60 NDBPs caracterizados, cerca de um terço teve a sua atividade antifúngica avaliada e estão

listados na **Tabela 1**. É possível observar também na Tabela 1 que a maioria desses AMPs são testados apenas contra espécies do gênero *Candida*, em especial *Candida albicans*.

Tabela 1. Lista de NDPBs da peçonha de escorpião com atividade antifúngica e seus respectivos valores de CIM para diferentes espécies de fungo.

Origem do peptídeo	NDBP	Fungo	CIM (μ M)
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP1	<i>C.albicans</i>	5,8
<i>Androctonus aeneas</i>	AaeAP2	<i>C.albicans</i>	5,8
<i>Androctonus amoreuxi</i>	AamAP1	<i>C.albicans</i>	64
<i>Androctonus amoreuxi</i>	AamAP2	<i>C.albicans</i>	64
<i>Chaerilus tricostatus</i>	Ctriporin	<i>C.albicans</i>	9,9
<i>Heterometrus spinifer</i>	HsAp	<i>Candida tropicalis</i>	48,6
<i>Mesobuthus eupeus</i>	Meucin-13	<i>C.albicans</i>	42,8
		<i>S. cerevisiae</i>	18,3
<i>Mesobuthus eupeus</i>	Meucin-18	<i>C.albicans</i>	25,1
		<i>S. cerevisiae</i>	10,9
<i>Opisthacanthus cayaporum</i>	Con10	<i>C.albicans</i>	100
		<i>C.tropicalis</i>	12,5
		<i>Candida parapsilosis</i>	200
		<i>Candida glabrata</i>	200
		<i>C.neoformans</i> VNI	50
		<i>C.neoformans</i> VNIV	25
<i>Opisthacanthus cayaporum</i>	NDBP-5.7	<i>C.albicans</i>	25
		<i>C.tropicalis</i>	25
		<i>C.neoformans</i> VNI	25
		<i>C.neoformans</i> VNIV	12,5
<i>Opisthacanthus cayaporum</i>	NDBP-5.8	<i>C.albicans</i>	100
		<i>C.tropicalis</i>	25
		<i>C.parapsilosis</i>	200
		<i>C.neoformans</i> VNI	100
		<i>C.neoformans</i> VNIV	50
<i>Opisthoptalmus carinatus</i>	Opistoporina 1	<i>Neurospora crassa</i>	0,8
		<i>Botrytis cinerea</i>	3,1
		<i>F.culmorum</i>	0,8
		<i>S. cerevisiae</i>	2
<i>Opisthoptalmus carinatus</i>	Parabutoporin	<i>N.crassa</i>	2,5
		<i>B. cinerea</i>	3,5
		<i>F.culmorum</i>	0,3
		<i>S. cerevisiae</i>	2
<i>Pandinus imperator</i>	Pandinina 2	<i>C.albicans</i>	19,1
<i>Pandinus imperator</i>	Pantinin-1	<i>C.tropicalis</i>	16
<i>Pandinus imperator</i>	Pantinin-2	<i>C.tropicalis</i>	16
<i>Pandinus imperator</i>	Pantinin-3	<i>C.tropicalis</i>	17
<i>Tityus obscurus</i>	ToAP1	<i>C.albicans</i>	50

		<i>C.tropicalis</i>	12,5
		<i>C.parapsilosis</i>	200
		<i>C.neoformans</i> VNI	25
		<i>C.neoformans</i> VNIV	12,5
<i>Tityus obscurus</i>	ToAP2	<i>C.albicans</i>	12,5
		<i>C.tropicalis</i>	3,1
		<i>C.parapsilosis</i>	50
		<i>C.glabrata</i>	200
		<i>C.neoformans</i> VNI	12,5
		<i>C.neoformans</i> VNIV	6,2
<i>Tityus obscurus</i>	ToAP3	<i>C.albicans</i>	25
		<i>C.tropicalis</i>	12,5
		<i>C.parapsilosis</i>	100
		<i>C.neoformans</i> VNI	100
		<i>C.neoformans</i> VNIV	25
<i>Tityus serrulatus</i>	TsAP-1	<i>C.albicans</i>	16
<i>Tityus serrulatus</i> / <i>Tityus costatus</i> / <i>Tityus obscurus</i>	TsAP-2/ NDBP 4.23	<i>C.albicans</i>	50
		<i>C.tropicalis</i>	6,2
		<i>C.parapsilosis</i>	100
		<i>C.neoformans</i> VNI	25
		<i>C.neoformans</i> VNIV	12,5
<i>Tityus stigmurus</i>	Stigmurin	<i>C. albicans</i>	34,7
		<i>C. glabrata</i>	69,5
		<i>Candida krusei</i>	69,5
<i>Vaejovis punctatus</i>	VpAmp1.0	<i>C.albicans</i>	6,2
<i>Vaejovis punctatus</i>	VpAmp2.0	<i>C.albicans</i>	12,5
		<i>C.glabrata</i>	50

Tabela adaptada de Primos-Barros et. al 2017 com atualizações feita pela autora dessa tese.

Nosso grupo avaliou a potencial atividade antifúngica de 10 peptídeos da peçonha de escorpião (Guilhelmelli et al., 2016) dos quais dois apresentaram resultados promissores, os peptídeos ToAP1 e ToAP2. Esses dois peptídeos foram escolhidos para ser dado prosseguimento aos trabalhos no nosso grupo, com ênfase no peptídeo ToAP2.

ToAP1 e ToAP2

Os dados aqui apresentados foram publicados recentemente por nosso grupo (Guilhelmelli et al., 2016). Esses dois peptídeos foram identificados e desenhados a partir de sequências de cDNA da glândula de peçonha do escorpião *Tityus obscurus*. Os peptídeos ToAP1 e ToAP2 fazem parte da subfamília de NDBPs 4 e 6 respectivamente. As características físico-químicas desses peptídeos estão resumidas na **Tabela 3** no Material e Métodos. Em linhas gerais, os dois peptídeos são catiônicos e tendem a formar

α -hélice em ambientes de membrana. As projeções da hélice (**Figura 6**) mostram a característica anfipática desses peptídeos.

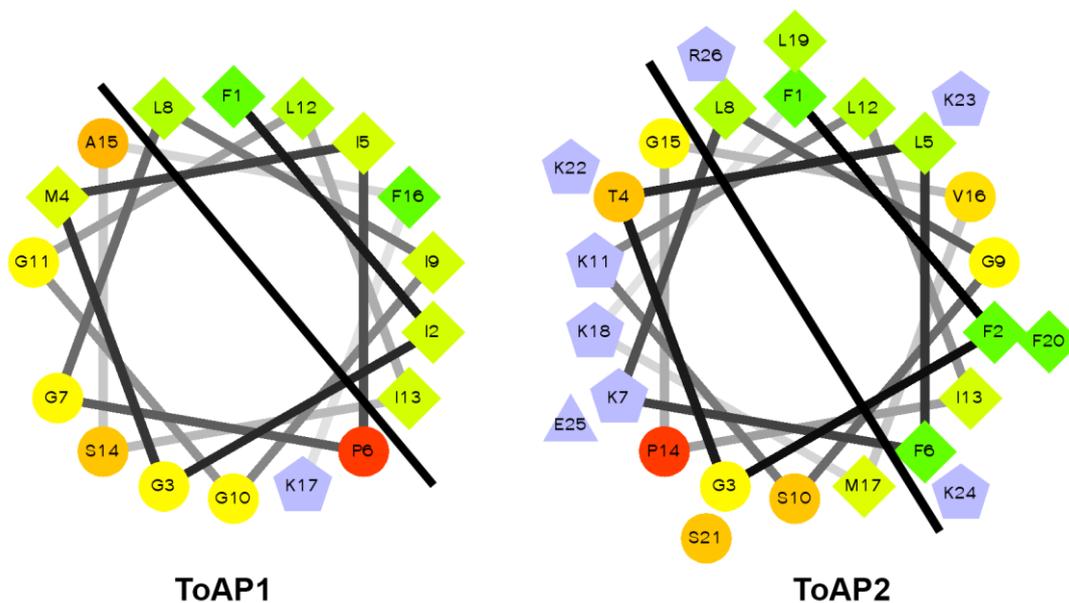


Figura 6. Projeções da hélice dos peptídeos ToAP1 e ToAP2. Diamantes - resíduos hidrofóbicos; círculos - resíduos hidrofílicos não carregados; pentágonos – resíduos carregados positivamente; triângulos, resíduos negativamente carregados. Adaptado de Guilhelmelli et al 2016

Análises por dicroísmo circular do peptídeo ToAP2 mostraram que em ambiente aquoso, o peptídeo não apresenta uma estrutura secundária definida. À medida que se adiciona TFE, na tentativa de mimetizar o ambiente de membrana, o peptídeo passa a estruturar-se em α -hélice. Esses peptídeos foram testados contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*, sorotipo A (VNI) e D (VNIV). O peptídeo ToAP1 inibiu todos os fungos nas concentrações testadas, com exceção de *C. glabrata*, com a concentração inibitória mínima variando de 200 a 12,5 μ M.

Já o peptídeo ToAP2 foi capaz de inibir todas as linhagens usadas, com as concentrações mínimas inibitórias variando de 200 a 3,12 μ M. Ambos os peptídeos foram capazes de interferir na adesão inicial do biofilme de *C. albicans*, bem como reduzir a viabilidade do biofilme maduro desse fungo. Ambos os peptídeos têm propriedades imunomodulatórias e estimulam a produção de citocinas (dados não publicados do grupo). Recentemente foi demonstrado que o peptídeo ToAP2 é capaz de recrutar monócitos, neutrófilos e eosinófilos em modelo murino (Marques-Neto et al., 2018).

Outras informações a respeito desses AMPs, bem com os demais peptídeos caracterizados, podem ser encontradas em nosso artigo (Guilhelmelli et al., 2016). A

caracterização da atividade e mecanismo de ação desses dois peptídeos, com enfoque no peptídeo ToAP2 serão aprofundados nesta tese.

Justificativa

Assim, considerando o grave cenário atual da incidência de doenças fúngicas invasivas, em especial da criptococose, e da limitação do tratamento atualmente disponível na clínica, fica claro que o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o controle dessas doenças é de grande importância e urgência. Peptídeos antimicrobianos podem ser uma fonte interessante de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos. A maioria dos estudos cujo foco é caracterizar a atividade de AMPs contra fungos são realizados principalmente com no modelo de *C. albicans*. Assim, pouco se compreende ainda a respeito das bases moleculares da resposta de *C. neoformans* a AMPs. Dessa forma, a caracterização da atividade antifúngica de AMPs bem como a compreensão da resposta do fungo a esses peptídeos é de grande importância e pode pavimentar o caminho para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle e erradicação da criptococose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral do Capítulo 1

Caracterizar a atividade dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 em células planctônicas e biofilmes de *C. neoformans*.

2.1.1 Objetivos específicos do Capítulo 1

1. Determinar a concentração inibitória mínima e concentração mínima letal dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 para diferentes linhagens e isolados clínicos de *Cryptococcus spp*;
2. Avaliar o possível efeito sinérgico dos AMPs ToAP1 e ToAP2 juntamente com Anfotericina B;
3. Avaliar o papel da cápsula e melanina na suscetibilidade de *C. neoformans* ao tratamento com os peptídeos;
4. Caracterizar o efeito dos peptídeos na inibição da formação de biofilme de *C. neoformans*, bem como avaliar a atividade dos AMPs em biofilmes maduros;
5. Avaliar a possível interferência de sais do meio de cultura na atividade do peptídeo ToAP2.
6. Avaliar o efeito dos peptídeos na morfologia, ultraestrutura e integridade da membrana do fungo;
7. Caracterizar a resposta de *C. neoformans* H99 ao peptídeo ToAP2, AMB e da combinação do peptídeo e AMB por meio da análise do perfil transcritômico do fungo com cápsula basal após os diferentes tratamentos.

2.2 Objetivo Geral do Capítulo 2

Identificar os genes envolvidos na tolerância de *C. neoformans* ao peptídeo ToAP2

2.2.1 Objetivos específicos do Capítulo 2

1. Realizar varreduras de bibliotecas de mutantes para identificar genes potencialmente relacionados à susceptibilidade de *C. neoformans* ao peptídeo ToAP2;
2. Determinar a concentração inibitória mínima do peptídeo ToAP2 para esses mutantes;

3. Avaliar a sensibilidade dos mutantes a agentes estressores de membrana e estressor da via de tráfego de vesículas para identificar potenciais genes envolvidos nesses processos.

Capítulo 1

Atividade dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 em células planctônicas e biofilmes de *Cryptococcus* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens Celulares e Manutenção

As diferentes linhagens de *Cryptococcus* spp. (**Tabela 2**) foram crescidas por 48 horas em meio líquido Sabouraud pH 7,2 (Sabouraud Dextrose Broth, Difco) a 30°C, 150 rpm para posterior preparo de estoques da cultura em glicerol 35%, os quais foram mantidos e armazenados a -80°C. Os isolados clínicos (IC) foram obtidos da Coleção de Fungos Patogênicos da FIOCRUZ. As linhagens mutantes foram obtidas nas bibliotecas de mutantes com deleções dirigidas geradas pelo grupo do Dr. Hiten Madhani. Mais informações acerca dessas bibliotecas podem ser obtidas no site (<http://www.fgsc.net/crypto/crypto.htm>).

Esses estoques foram usados para a semeadura por esgotamento em placas de meio Sabouraud sólido (Sabouraud + ágar 1,5%, pH 7,2). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 48h e armazenadas posteriormente a 4°C. Antes de cada um dos experimentos realizados, uma colônia isolada do fungo foi inoculada em meio Sabouraud líquido e crescida por aproximadamente 20h a 30°C, 150 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 1200g/25°C/5 min e lavadas 3 vezes em tampão fosfato (PBS). As células então foram contadas em Câmara de Neubauer e a concentração do inóculo ajustada de acordo com o tipo de ensaio realizado.

A maior parte do trabalho foi realizada com a linhagem ATCC *C. neoformans* H99 por se tratar da linhagem mais bem caracterizada e mais trabalhada na literatura. As demais linhagens foram utilizadas em contextos específicos indicados no texto. Essa linhagem é oriunda de um isolado clínico e tem sido extensivamente utilizada nos trabalhos com *C. neoformans* por diversos motivos. Dentre eles podemos destacar que essa linhagem representa o sorotipo e tipo molecular predominante nas infecções causadas por essa levedura e por ser uma linhagem virulenta cuja patogenicidade foi bem descrita em múltiplos modelos animais. Além disso, é possível realizar de forma fácil a manipulação genética dessa linhagem, como transferência de genes, mutação dirigida e produção de bibliotecas de mutantes.

Tabela 2. Lista das linhagens de *Cryptococcus* spp utilizadas no trabalho

Linhagem	ATCC	Sorotipo	Genótipo
<i>C. neoformans</i> H99	ATCC 208821	A	VNI/ <i>MATα</i>
<i>C. neoformans</i> B3501	ATCC 34873	D	VNIV
<i>C. neoformans</i> 24067	ATCC 24067	D	VNIV
<i>C. gattii</i> NIH 198		B	VGIII
CNF 01	Isolado Clínico		VNI
CNF 02	Isolado Clínico		VNI
CNF 03	Isolado Clínico		VNI
CNF 04	Isolado Clínico		VNI
CNF 05	Isolado Clínico		VNI
CNF 06	Isolado Clínico		VNI
CNF 07	Isolado Clínico		VNI
CNF 08	Isolado Clínico		VNI
CNF 09	Isolado Clínico		VNI
CNF 10	Isolado Clínico		VNI
CNF 11	Isolado Clínico		VNI
CNF 12	Isolado Clínico		VNI
CNF 13	Isolado Clínico		VNI
CNF 14	Isolado Clínico		VNI
CNF 15	Isolado Clínico		VNI
CNF 16	Isolado Clínico		VNI
<i>cap59</i> Δ	Linhagem mutante		<i>MATα cap59Δ::NEO</i>
<i>cap10</i> Δ	Linhagem mutante		<i>MATα cap10Δ::NAT</i>
<i>cap60</i> Δ	Linhagem mutante		<i>MATα cap60Δ::NAT</i>
<i>cap64</i> Δ	Linhagem mutante		<i>MATα cap64Δ ::NAT</i>
<i>cps1</i> Δ	Linhagem mutante		<i>MATα cps1Δ ::NAT</i>
<i>cas1</i> Δ	Linhagem mutante		<i>MATα cas1Δ ::NAT</i>
<i>cas35</i> Δ	Linhagem mutante		<i>MATα cas35Δ ::NAT</i>

3.2 Meios de cultura e Soluções

Sabouraud

Peptona 1% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

pH = 7,2

Esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 minutos.

Para o meio sólido, houve a adição de 1,5% de ágar.

Tampão Fosfato de Sódio (NaPB)(0,2 M)

Na₂HPO₄ 0,2M

NaH₂PO₄ 0,2 M

Para 100 mL misturar 77 mL de Na₂HPO₄ e 23 mL de NaH₂PO₄.

pH = 7,2

Esterilização por filtração em membranas do tipo millipore 0,22 µm.

Tampão Fosfato Salina (PBS) 1X

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 10 mM

KH₂PO₄ 2 mM

pH = 7,4

Esterilização por autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

Meio RPMI-1640-MOPS 1X (Thermo Fisher, cat# 31800-022)

RPMI-1640 1,04 % (p/v)

MOPS 0,165 M

pH = 7,0

Esterilização por filtração em membranas do tipo millipore 0,22 µm.

Meio Mínimo 1X

Glicose 15 mM

KH₂PO₄ 29,4 mM

MgSO₄ 10 mM

Glicina 13 mM

Tiamina 3 μ M

pH = 5,5 esterilização por filtração em membranas do tipo millipore 0,22 μ m.

3.3 Síntese e preparo das soluções estoque dos peptídeos ToAP1 e ToAP2

Os peptídeos ToAP1 e ToAP2, já descritos previamente (Guilhelmelli et al., 2016) foram sintetizados quimicamente por Fmoc-Butila e purificados por RP- HPLC pela empresa FastBio Ltda com pureza igual ou superior a 95% (**Tabela 3**). Os peptídeos foram mantidos liofilizados a -20°C até o momento de uso. Para os experimentos, uma alíquota de cada peptídeo foi solubilizada em água MilliQ estéril, segundo as instruções recomendadas no manual do fabricante, sendo também armazenadas a -20°C.

Uma alíquota de cada peptídeo foi analisada em espectrômetro de massa (MALDI-TOF/TOF UltraFlex III Bruker Daltonics®, Alemanha) para a confirmação da massa molecular de cada peptídeo e avaliação da pureza da síntese. Os peptídeos foram misturados a uma matriz de ácido α -cyano-4-hidroxi-cinâmico, volume/volume (1:1), sendo posteriormente aplicados em triplicada em uma placa Bruker MTP Massive 384. Após a cristalização, as amostras foram analisadas. Os espectros de massa foram obtidos com o equipamento sendo operado no modo refletido positivo. A interpretação dos espectros obtidos foi realizada manualmente e com o auxílio do software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Alemanha) por colaboradores participantes do projeto.

Tabela 3. Sequência dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 da peçonha do escorpião *T. obscurus* e suas propriedades físico-químicas.

Peptídeo	Sequência	N° de acesso Uniprot	N° de resíduos	Hidrofo-bicidade	Momento Hidrofóbico	Carga Residual
ToAP1	FIGMIPGLIGGLISAFK-NH ₂	LT576029	17	0.906	0.597	+ 6
ToAP2	FFGTLFKLGSKLIPGVMKLFSSKKKER	LT576030	26	0.443	0.460	+ 2

Adaptado de Guilhelmelli et. al 2016

3.4 Medição do tamanho da cápsula de *Cryptococcus* spp.

Uma alíquota de 2 μ L do inóculo crescido do fungo foi misturada a 2 μ L de tinta nanquim (Becton Dickinson, NJ) sobre a superfície de uma lâmina de vidro para a posterior observação das células em um microscópio invertido de luz (Axio Observer Z1 – Carl Zeiss Microscopy). Pelo menos quatro diferentes campos aleatórios foram escolhidos e fotografados. A cápsula foi detectada por meio da zona de exclusão do

nanquim. Para calcular o tamanho da cápsula, foram medidos tanto o tamanho do corpo celular (região delimitada pela parede celular), quanto a dimensão da célula inteira (corpo celular + cápsula), usando-se o programa ZEN (Carl Zeiss Microscopy). A espessura da cápsula foi definida como a diferença entre o diâmetro total da célula menos o diâmetro do corpo celular. Pelo menos 50 células foram contadas em cada réplica. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* com pós test de Dunn.

3.5 Teste de microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (CIM e CIM₅₀) dos peptídeos

A determinação da possível atividade antifúngica dos peptídeos foi realizada de acordo com a norma M27-A3 estabelecida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, (antigo NCCLS) com modificações. Foi feita uma diluição seriada em razão de 2 das soluções dos peptídeos diluídos em água e do antifúngico anfotericina B (AMB) (Sigma, A2942). A diluição seriada foi feita em placas estéreis descartáveis de 96 poços de fundo chato e em água estéril, de forma que ao final os poços tivessem 50 µL de uma solução 2X da concentração de peptídeo final desejada. As leveduras de cada linhagem, após serem coletadas e lavadas como descrito acima, foram ressuspensas em meio RPMI-1640 2X. As células foram contadas em Câmara de Neubauer e a concentração do inóculo ajustada para 2×10^4 células/mL. Foi acrescentado aos poços 50 µL desse inóculo, de forma que o volume final de cada poço fosse 100 µL.

A concentração final inoculada foi de 10^4 células/mL, as concentrações de peptídeo variaram de 100 µM a 0,78 µM e de anfotericina B variou de 16 µg/mL a 0,0078 µg/mL. Em cada placa foi feito controle de crescimento (inóculo de leveduras + água estéril) e um controle de contaminação contendo meio sem células (RPMI + água estéril). As placas foram seladas com filme estéril e incubadas a 37°C, 200 rpm e após 48 horas de incubação a avaliação do crescimento do fungo foi feita por meio de análise visual, sendo CIM considerada a menor concentração que inibiu o crescimento visível do fungo.

A partir dos resultados obtidos pelo ensaio acima descrito, determinou-se as faixas de atividade antifúngica de cada peptídeo para cada linhagem. Para a determinação da CIM₅₀, as leveduras foram cultivadas na presença de concentrações crescentes dos peptídeos em intervalos regulares de concentração, dentro da faixa de atividade antimicrobiana obtida pela análise visual. Após 48 horas de incubação, a avaliação do crescimento do fungo foi realizada por densitometria óptica a 630 nm utilizando espectrofotômetro de placa. A CIM₅₀ foi calculado por meio de regressão não linear

usando-se o software GraphPad Prism versão 6.00. Cada ensaio foi realizado em triplicata biológica, em dias separados. Antes de cada ensaio, as espessuras das cápsulas de cada linhagem foram aferidas com o uso da tinta nanquim, como descrito no tópico acima.

3.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

A determinação da CFM foi realizada de acordo com Torre-Rodriguez e colaboradores, com modificações (Torres-Rodriguez et al., 2008). Após a realização do ensaio para a determinação da CIM₅₀, uma alíquota de 10 µL dos poços sem crescimento visível foi semeada, juntamente com 40 µL de PBS estéril 1x, em placas de Sabouraud sólido. Alíquotas dos poços do controle de crescimento e do branco também foram semeadas. As placas foram incubadas em estufa a 30° C por 48 horas. A CFM foi definida como a menor concentração do peptídeo em que se observou crescimento de no máximo três colônias do fungo. Cada ensaio foi realizado em triplicata biológica, em dias separados.

3.7 Avaliação do possível efeito sinérgico dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 combinados à Anfotericina B por meio do teste do Tabuleiro de Xadrez.

O possível efeito sinérgico dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 em combinação com AMB foi avaliado com base no protocolo acima descrito para a determinação da CIM, empregando-se o método do Tabuleiro de Xadrez, como descrito por Bonapace e colaboradores (Bonapace et al., 2002). Neste método, cria-se uma matriz de combinação que permite que as concentrações escolhidas para o teste, de ambas as drogas, sejam combinadas de todas as maneiras possíveis, como é mostrado na **Figura 7** abaixo.

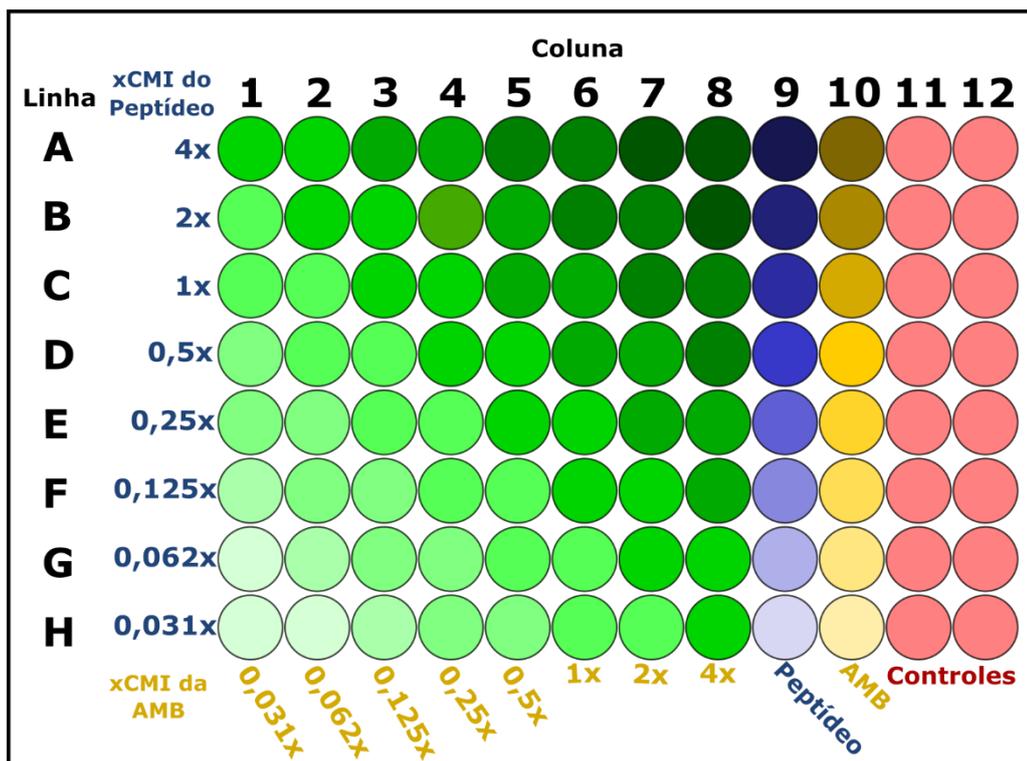


Figura 7. Esquema de combinação do teste de Tabuleiro de Xadrez. A cor azul representa as diferentes concentrações do peptídeo, a cor amarela representa as diferentes cores da AMB e a cor verde representa a combinação entre o peptídeo e a AMB. As colunas em vermelho indicam os poços reservados para o controle.

As diferentes doses usadas no ensaio são definidas a partir da CIM. As concentrações finais na placa de ambos os peptídeos e de AMB variaram de 4x até 0,031x o valor da CIM, em uma diluição seriada de razão 2. Na **Tabela 4** se encontram as concentrações utilizadas no ensaio.

Tabela 4. Concentrações finais utilizadas dos peptídeos ToAP1, ToAP2 e AMB no ensaio de sinergismo

	ToAP1 (μM)	ToAP2 (μM)	AMB ($\mu\text{g/mL}$)
4x CIM	100	50	2
2x CIM	50	25	1
1x CIM	25	12,5	0,5
0,5x CIM	12,5	6,25	0,25
0,25x CIM	6,25	3,125	0,125
0,125x CIM	3,125	1,56	0,062
0,062x CIM	1,56	0,78	0,031
0,031x CIM	0,78	0,39	0,015

Em negrito estão destacados os valores de CIM de *C.neoformans* H99

Cada uma dessas doses é preparada para ser pipetadas na placa numa concentração quatro vezes maior que a concentração final do poço. Exemplificando, se a concentração final na placa é de 100 μM , o peptídeo é preparado a 400 μM e assim por diante.

A montagem da placa ocorre da seguinte forma: 25 μL da alíquota 4x CIM do peptídeo é pipetado na linha A, colunas 1 a 8 com o auxílio de uma pipeta multicanal; 25 μL da dose 2x CIM do peptídeo é pipetado na linha B, colunas 1 a 8, e assim por diante para as demais doses até a linha H. Após essa etapa, as doses de AMB são adicionadas na placa no seguinte esquema: 25 μL da dose 0,031x da CIM da AMB é pipetado em toda coluna 1; 25 μL da dose 0,062x da CIM da AMB é pipetado em toda coluna 2, e assim por diante para as demais doses até a coluna 8. Dessa forma, ao final dessa etapa, cada poço apresenta um volume de 50 μL e uma combinação única de peptídeo e AMB. Nas colunas 9 a 12 são colocados os controles do experimento. Nas colunas 9 e 10 são adicionados 25 μL de água estéril e 25 μL de cada dose testada do peptídeo e de AMB, respectivamente. Essas duas colunas das drogas sozinhas servem como controle da atividade dos antifúngicos, certificando que as drogas estão funcionando da forma esperada. As colunas 11 e 12 são destinadas aos demais controles que forem necessários, como o controle de crescimento do fungo e o controle de contaminação. Após a adição das doses e de água, 50 μL do inóculo do fungo a 2x da concentração final desejada (10^4 células/mL) são pipetados em todos os poços, exceto os do controle de contaminação. Dessa forma, cada poço tem um volume final de 100 μL no final da montagem da placa

e o peptídeo e a AMB foram diluídas para a concentração final desejada.

A placa foi selada e incubada conforme descrito no item 3.5. Após as 48 horas de incubação, a avaliação do crescimento do fungo foi realizada por densitometria óptica a 630 nm utilizando espectrofotômetro de placa.

Para a determinação se a combinação é sinérgica ou não, adotou-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) como já descrito na literatura (Meletiadis et al., 2010). O ICIF é calculado pela seguinte fórmula:

$$\sum FIC = FIC_A + FIC_B = (C_A/CIM_A) + (C_B/CIM_B)$$

Sendo que CIM_A e CIM_B são os CIM das drogas A e B sozinhas, respectivamente, e C_A e C_B são as concentrações das drogas em combinação que correspondem ao efeito da CIM. São consideradas combinações sinérgicas quando o ICIF for $\leq 0,5$, combinações aditivas quando ICIF for $> 0,5$ e $< 0,4$, e combinações antagonistas quando ICIF for ≥ 4 . O ensaio foi realizado quatro vezes em dias diferentes.

3.8 Determinação da curva de cinética de viabilidade de *C. neoformans* tratado com os peptídeos ToAP1 e ToAP2.

As leveduras de *C. neoformans* H99, na concentração de 10^4 células/mL, foram tratadas com as doses letais de ToAP1, ToAP2 e AMB, em meio RPMI-1640-MOPS, e incubadas a 37°C, 200 rpm, por até 10 horas. Em diferentes tempos determinados (0h, 2h, 4h, 6h, 8h e 10h), 30 μ L de cada amostra foram retirados e semeados em placas de meio Sabouraud sólido. As leveduras não tratadas, crescidas apenas no meio RPMI-1640-MOPS, também foram semeadas nos períodos determinados como controle de crescimento. As placas foram incubadas em estufa a 30° C por 48 horas para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A porcentagem de células viáveis em cada tempo foi calculada por meio da razão entre o número de UFC contadas em cada um dos tempos dividido pelo número de UFC contadas no tempo de 0h, multiplicado por 100. Cada ensaio foi realizado em triplicata biológica, em dias diferentes.

3.9 Efeito do possível papel protetor da cápsula e melanina de *C. neoformans* contra a ação dos peptídeos ToAP1 e ToAP2.

Para avaliar o possível papel protetor da cápsula e melanina do fungo contra a ação dos peptídeos, as leveduras de H99 tiveram a cápsula e a melanina previamente induzidas. Para a indução de cápsula, as células fúngicas foram crescidas em meio mínimo, enquanto para a indução de melanina as células foram crescidas em meio mínimo

suplementado com L-DOPA (1mM). Ambos os inóculos foram incubados a 30°C, 150 rpm, por 48 horas, protegidos da luz. Também foi feito um inóculo em meio Sabouraud líquido sob as mesmas condições para obtenção de leveduras com cápsula basal e sem melanização. Para simplificação, as células com cápsula basal e não melanizadas, com cápsula induzida e com melanina induzidas serão tratadas como tipos celulares. Após a incubação, as células dos três tipos celulares foram coletadas, lavadas em PBS e tiveram a cápsula mensurada conforme já descrito. Cada um dos tipos celulares, na concentração de 10^4 células/mL de leveduras, foi tratado com a dose letal de AMB e com cinco diferentes doses sub letais dos peptídeos ToAP1 e ToAP2, sendo a maior dose correspondente à dose letal de cada peptídeo. O tratamento foi realizado em meio RPMI-1640-MOPS e as células incubadas a 37°C, 200 RPM por 4 horas. Esse tempo foi escolhido com base na curva de cinética de viabilidade do fungo tratado com os peptídeos.

As células de cada tipo crescidas apenas em meio RPMI-1640-MOPS, livre de qualquer antifúngico, foram usadas como controle de crescimento. No início da incubação (0 horas) e após as 4 horas de incubação, 30 μ L de cada amostra foram retirados e semeados em placas de meio Sabouraud sólido. As placas foram incubadas em estufa a 30° C por 48 horas para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O cálculo da porcentagem de viabilidade foi feito como já descrito no tópico 3.8. Cada ensaio foi realizado em triplicata técnica e biológica, em dias diferentes, e antes de cada ensaio a cápsula foi medida para confirmar a indução. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico One-way ANOVA com pós teste de Tukey.

3.10 Análise do efeito dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 na morfologia e ultraestrutura de *C. neoformans*.

A avaliação do efeito dos peptídeos na morfologia de *C. neoformans* H99 foi realizada utilizando-se as metodologias de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

MEV

As leveduras, na concentração de 10^6 células/mL, foram tratadas com 55 μ M do peptídeo ToAP1 ou 60 μ M do peptídeo ToAP2, em meio RPMI-1640-MOPS e as células incubadas a 37°C, 200 RPM por 24 horas. Tais concentrações foram escolhidas com bases em ensaios de inibição do crescimento de *C. neoformans* com a concentração de células de 10^6 células/mL. Células incubadas sob as mesmas condições porém sem tratamento foram usadas como controle.

Após o tratamento, as amostras foram coletadas por centrifugação, lavadas 3 vezes em PBS e fixadas conforme descrito por Araújo *et al.*, 2015 (Araujo et al., 2016). Brevemente, as amostras foram fixadas em uma solução de 2,5% de glutaraldeído tipo 1 em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), por 1 hora a temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2) contendo 0,2 M de sacarose e 2 mM de MgCl₂. As amostras foram aderidas a lamínulas pré-tratadas com poly-L-lisina por 20 minutos, para posterior processo de desidratação em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70% - 5 minutos cada, 95% - 10 minutos, e 100% - duas etapas de 10 minutos cada). Imediatamente após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico (EM CPD 300, Leica), montadas em suportes metálicos e revestidas com ouro (Balzers Union FL-9496 – Balzers). O material foi observado no microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss Evo LS operado a 10-20 kV. A fixação das amostras e posteriores processamentos foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na Universidade Federal do Rio de Janeiro, em parceria com o grupo da professora Dr. Susana Frases.

MET

As leveduras, na concentração de 10⁶ células/mL, foram tratadas com 60 µM do peptídeo ToAP2, em meio RPMI-1640-MOPS e as células incubadas a 37°C, 200 RPM por 2 horas. Após o tratamento, as amostras foram coletadas por centrifugação, lavadas 3 vezes em PBS e levadas para a centro especializados em imagens do *Albert Einstein College of Medicine*. As amostras foram fixadas em uma solução de 2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, para então serem embebidas em gelatina 4%. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1%, seguido por acetato de uranila 2%, para então as amostras serem desidratadas em gradientes crescentes de etanol e incluídas em resina Spurr's (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Os cortes ultrafinos foram feitos em um ultramicrotomo Reichert Ultracut UCT e os cortes obtidos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes foram visualizados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX transmission electron microscope a 80kv. Todo esse ensaio foi realizado, na época, no laboratório do Dr. Arturo Casadevall por colaboradora. As informações aqui descritas a respeito do processamento da amostra foram passadas pela equipe do centro de imagens do *Albert Einstein College of Medicine* (Bronx, NY, EUA).

3.11 Avaliação da integridade da membrana após tratamento com o peptídeo ToAP2.

A integridade da membrana plasmática de *C. neoformans* H99 após tratamento com os peptídeos ToAP1 e ToAP2 foi testada por citometria de fluxo. As leveduras, na concentração de 10^6 células/mL, foram tratadas com 55 μ M e 60 μ M dos peptídeos ToAP1 e ToAP2, respectivamente, em meio RPMI-1640-MOPS a 37°C, 200 rpm por 1 hora e 30 minutos. Tais concentrações foram escolhidas com bases em ensaios de inibição do crescimento de *C. neoformans* com a concentração de células de 10^6 células/mL.

Após esse período de tratamento foi adicionado iodeto de propídio (IP) em todos os tubos na concentração final de 1 μ g/mL e os tubos foram protegidos da luz. As células não tratadas com peptídeo foram utilizadas como controle negativo (membrana intacta) e leveduras tratadas com etanol 70% por uma hora foram usadas como controle positivo (membrana permeabilizada).

As células foram incubadas por 30 minutos com o PI para então serem analisadas em um citômetro de fluxo BD LSR Fortessa equipado com lasers de 405, 488 e 640 nm. As células do controle negativo e controle positivo foram utilizadas para configurar os parâmetros da coleta. Todas as amostras seguintes foram coletadas com os mesmos parâmetros, com no mínimo 20000 eventos registrados por amostra. O sinal no canal do iodeto de propídio foi configurado em modo linear.

Os eventos correspondentes a células fúngicas foram separados de restos celulares por uma região no gráfico *Forward Scatter area x Side Scatter area* (FSC-A x SSC-A). A seleção das células únicas (*doublet discrimination*) foi realizada com base no gráfico *Forward Scatter width x Forward Scatter height* (FSC-W x FSC-H). Os dados coletados foram analisados no software FlowJo X por um colaborador do projeto. O teste estatístico utilizado foi o teste paramétrico One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Esse ensaio foi realizado três vezes em dias diferentes.

3.12 Análise do efeito dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 na formação do biofilme e na viabilidade de biofilmes maduros de *C. neoformans*.

O efeito dos peptídeos em biofilmes de *C. neoformans* foi testados de acordo com as metodologias já descritas na literatura com algumas modificações (Martinez and Casadevall, 2006b; a).

Ensaio de formação de biofilme

As células de *C. neoformans* B3501 foram crescidas em meio Sabouraud,

coletadas e lavadas conforme já descrito no tópico 3.1. Ao final da última lavagem, as leveduras foram ressuspensas em meio mínimo 2X e tiveram seu inóculo ajustado para 2×10^7 células/mL. Em uma placa de poliestireno de 96 poços, de fundo chato (Corning, cat# 3595), foram adicionadas 50 µl de diferentes doses dos peptídeos ou AMB a 2X da concentração final desejada em cada poço da placa. Nos poços destinados ao controle de crescimento do biofilme e ao branco foram adicionados 50 µl de água. Nos poços com os antifúngicos ou água estéril (controle de crescimento) foram adicionados 50 µL do inóculo. Já nos poços com água destinados para o branco foram adicionados 50 µL de meio mínimo 2X. Dessa forma, o volume final de cada poço foi de 100 µL, e a concentração final de células de 10^7 células/mL. As placas foram seladas com parafilme e mantidas em estufa a 37°C, por 48 horas sem agitação. Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de PBS para a remoção de células não aderidas. Após as lavagens, o efeito dos peptídeos na formação do biofilme foi avaliado através da atividade metabólica das células pelo teste colorimétrico XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) (Thermo Fisher X6493). Em cada poço foram adicionados 100 µL de uma solução de XTT (0,5 mg/mL) e menadiona (80 µM) em PBS 1X. Após a adição do reagente, a placa foi protegida da luz e mantida a 37°C por 4 horas. Ao fim da incubação, 80 µL do sobrenadante foram retirados e colocados em uma nova placa de 96 poços para análise por densitometria óptica a 490 nm utilizando espectrofotômetro de placa. A concentração que inibe a formação de 50% do biofilme (CMIB₅₀) foi então calculada por meio de regressão não linear usando-se o software GraphPad Prism versão 6.00.

Ensaio de extinção de biofilme maduro

As células de *C. neoformans* B3501 foram crescidas em meio Sabouraud, coletadas e lavadas conforme já descrito no tópico 3.1. Ao final da última lavagem, as leveduras foram ressuspensas em meio mínimo 1X e tiveram seu inóculo ajustado para 10^7 células/mL. Desse inóculo, 100 µL foram pipetados em toda placa de poliestireno de 96 poços, de fundo chato (Corning, cat# 3595), com exceção da coluna 12 destinada ao controle de contaminação. Nessa coluna, 100 µL do meio mínimo 1X foram pipetados. As placas foram seladas com parafilme e mantidas em estufa a 37°C, por 48 horas sem agitação. Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de PBS, para a remoção de células não aderidas. As células aderidas foram considerados biofilmes maduro. Nos poços destinados aos tratamentos, 50 µL de diferentes doses dos peptídeos e AMB a 2X da concentração final desejada foram adicionados. No poço destinado ao

branco e ao controle de crescimento, 50 μL de água estéril foram adicionados. Em seguida, 50 μL de meio mínimo 2X foram adicionados em todos os poços, de forma que no final do ensaio, todos os poços continham o volume de 100 μL . As placas foram novamente seladas com parafilme e mantidas em estufa a 37°C, por 24 horas, para então serem lavadas 3 vezes com 100 μL de PBS para a remoção de células não aderidas. A viabilidade do biofilme maduro empregando-se o reagente XTT e o cálculo da concentração que extingue 50% do biofilme maduro (CMEB₅₀) foram realizados conforme descrito no subtópico anterior.

3.13 Avaliação da interferência de sais na atividade do peptídeo ToAP2.

A possível interferência de sais na atividade do peptídeo ToAP2 foi realizada segundo protocolo descrito em Vylkova e colaboradores (Vylkova et al., 2007). Brevemente, células de *C. neoformans* H99 foram crescidas, coletas e lavadas como descrito acima, porém para a lavagem foi utilizado o tampão NaPB 10mM. Ao final as células foram ressuscitadas nesse mesmo tampão e tiveram seu inóculo ajustado para 10⁴ células/mL. Outros dois inóculos também foram preparados com esta mesma concentração de células, um em meio RPMI-1640-MOPS e outro em PBS. Cada um desses inóculos foi tratado com 16 μM , 4 μM , 1 μM ou 0,25 μM do peptídeo ToAP2. Células não tratadas para cada um desses inóculos foram utilizadas como controle. As células foram incubadas por duas horas a 37° C, 200 rpm. Ao final da incubação, 30 μL de cada amostra foram retirados e semeados em placas de Sabouraud sólido. As placas foram mantidas na estufa a 30° C por 48 horas para a contagem de UFC.

Concomitantemente, a avaliação da interferência de sais específicos também foi realizada. As leveduras de *C. neoformans* na concentração 10⁴ células/mL foram tratadas com 16 μM , 4 μM , 1 μM ou 0,25 μM do peptídeo ToAP2 em tampão NaPB com a adição de NaCl nas concentrações de 100mM, 150 mM e 200 mM ou MgCl₂ nas concentrações de 1 mM, 5 mM e 25 mM, separadamente. Como controle foram utilizadas as amostras tratadas com cada um desses sais, porém sem o tratamento do peptídeo ToAP2. As células foram incubadas e semeadas em placa de Petri como descrito acima. Para cada uma das condições testadas, a porcentagem de células viáveis foi calculada por meio da razão entre o número de UFC contadas em cada um dos tratamentos com o peptídeo dividido pelo número de UFC contadas no controle sem tratamento com o peptídeo ToAP2, multiplicado por 100.

A análise dos dados foi feita por meio do teste paramétrico One-way ANOVA

com pós-teste de Tukey. Esse ensaio foi realizado três vezes em dias diferentes.

3.14 Análise transcritômica em larga escala (RNAseq) de *C. neoformans* após tratamento com ToAP2 e AMB.

Condições de tratamento e preparo das amostras biológicas

Leveduras de *C. neoformans* H99, na concentração celular de 2×10^7 células/mL, volume total de cinco mL, foram tratadas com diferentes concentrações do peptídeo ToAP2 (30 μ M, 15 μ M e 7,5 μ M), uma dose de AMB (0,125 μ g/mL) e uma combinação de AMB e ToAP2 (0,125 μ g/L e 15 μ M, respectivamente). Essas concentrações foram escolhidas por não interferirem na viabilidade celular das leveduras nessa condição específica de ensaio. O tratamento foi feito por incubação das células em meio RPMI-1640-MOPS, 37°C, 200 rpm por uma hora. As amostras tratadas, incluindo o controle (células crescidas nas mesmas condições sem tratamento), foram então resfriadas em um banho de água e gelo por cinco minutos para diminuição do seu metabolismo. As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 2°C por 5 minutos, 1200g, e lavadas duas vezes com PBS gelado, mantendo as células sempre no gelo. Após a última lavagem, o máximo de sobrenadante foi removido e as amostras foram congeladas em gelo seco. As amostras congeladas foram então crio-dissecadas em liofilizador (Liotop, modelo L101) durante a noite. As amostras já secas foram mantidas a -80°C até o momento da extração de RNA. O ensaio foi realizado três vezes, em dias diferentes.

Extração de RNA e condições do sequenciamento em larga escala

O RNA do fungo foi extraído com o kit RNEasy® Plant RNA Extraction Kit (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações. Foram adicionados às amostras secas aproximadamente 200 μ L de micropérolas de vidro (400 a 600 μ m). Os tubos com as pérolas foram mantidos no gelo seco e levados para quebra mecânica no Precellys24 homogenizer, um equipamento de alto desempenho para quebra e homogeneização de amostras. Os tubos resfriados foram submetidos a um ciclo de 5000 rpm por 10 segundos para que o pellet seco assumisse a aparência de um pó fino. Imediatamente após a quebra, foram adicionados 750 μ L do tampão RLT do kit e a extração de RNA seguiu conforme instrução do fabricante. Durante a etapa de extração do RNA também foi feito tratamento com DNase empregando o kit de DNase (QIAGEN), também conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. A qualidade do RNA extraído foi verificada primeiramente por eletroforese de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), e em seguida a integridade foi avaliada pela análise por

Bioanalyzer 2000 (Agilent) utilizando o kit Nano 6000 para a determinação do RIN – RNA Integrity Number. A quantificação do RNA foi feita por espectrofotometria (NanoDrop One – Thermo Fischer), sendo também avaliada a pureza das amostras pelas razões das absorbâncias A260/A280 e A260/A230. Para maior precisão, a quantificação final dos RNAs foi determinada pela quantificação das amostras por um método fluorimétrico, utilizando-se o aparelho Qubit 2.0 (Thermo Fisher) e o kit Qubit™ RNA BR Assay.

Alíquotas do RNA total de cada experimento, entre 1,5 a 2 µg de RNA total, foram preparadas para o transporte estável em temperatura ambiente por meio do RNAsable®, - Biomatrix, segundo as instruções do fabricante. As amostras foram secas em speedvac à temperatura ambiente. As amostras secas foram enviadas para a empresa especializada Macrogen Ink, Coréia do Sul para o sequenciamento.

O sequenciamento em larga escala foi realizado na plataforma HiSeq 4000 da Illumina. As bibliotecas foram preparadas com a tecnologia de barcode, empregando RNA poli (A) +, de acordo com o kit TruSeq RNA Sample Prep Kit v2. No total, 15 amostras foram enviadas para a empresa e as bibliotecas geradas foram sequenciadas em duas “lanes”, de forma que duas réplicas do experimento ficaram na “lane” 1 e a terceira réplica na “lane” 2. Outras amostras de projetos do grupo também foram sequenciadas, de forma que o número total de amostras por “lane” ficou equilibrado. Os tamanhos das sequências geradas foram de aproximadamente 100 pares de bases, do tipo paired-end (2 x 100 bp).

Bioinformática

Todo o processamento dos dados e análise dos dados obtidos do sequenciamento foram feitos por integrantes do grupo do Dr. Alspaugh segundo a pipeline utilizada em trabalhos prévios (Brown et al., 2018). Brevemente, as *reads* foram mapeadas no genoma de referência da linhagem *C. neoformans* H99 (obtidos do NCBI em Janeiro de 2019) usando o software de alinhamento STAR (Dobin et al., 2013). A análise de expressão diferencial dos genes foi feita no R utilizando-se um fluxograma do Bioconductor para RNA-seq (Love et al., 2015), seguido do pacote de análise DESeq2 com taxa de falsa descobertas (FDR) de 5% (Love et al., 2014). Os genes cujo valor de *p* ajustado foi menor do que 0,05 foram considerados diferencialmente expressos. Os diagramas de Venn foram gerados no site (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/beg/tools/venn-diagrams>) utilizando as IDs dos genes (número da CNAG) como input.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade antifúngica dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 contra as diferentes linhagens de *Cryptococcus* spp.

Tendo em vista os resultados promissores obtidos anteriormente (Guilhelmelli et al., 2016), a análise da ação dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 foi testada contra outras linhagens e espécies de *Cryptococcus* spp. e, os dados estão apresentados nas **Tabela 5**.

Tabela 5. CIM dos peptídeos ToAP1, ToAP2, Anfotericina B e Fluconazol contra diferentes linhagens e isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

Linhagens e isolados	ToAP1 (µM)	ToAP2 (µM)	Fluconazol (µg/mL)	Anfotericina B (µg/mL)
Cn H99	25	12,50	2	0,5
CNF 01	25	6,25	2	0,12
CNF 02	25	12,50	2	0,25
CNF 03	25	12,50	0,5	0,12
CNF 04	25	12,50	2	0,25
CNF 05	25	12,50	4	0,25
CNF 06	25	12,50	4	0,12
CNF 07	25	6,25	4	0,12
CNF 08	25	12,50	8	0,12
CNF 09	25	12,50	2	0,25
CNF 10	25	6,25	4	0,12
CNF 11	25	12,50	0,5	0,12
CNF 12	25	12,50	0,5	0,25
CNF 13	25	6,25	1	0,12
CNF 14	25	6,25	1	0,12
CNF 15	25	12,50	8	0,12
CNF 16	25	12,50	2	0,12
Cn B3501	12,5	6,25	0,5	0,12
Cn 24067	25	6,25	0,5	0,5
Cg NIH 198	25	6,25	0,5	0,5

Cn – *Cryptococcus neoformans*, Cg – *Cryptococcus gattii* - 25 µM de ToAP1 equivale a 43,3 µg/mL; 12,50 µM e 6,25 µM de ToAP2 equivale a 37,5 µg/mL and 18,25 µg/mL, respectivamente.

Quando comparado à linhagem H99 (nossa linhagem de referência), nenhum dos isolados clínicos (ICs) mostrou resistência aos peptídeos ou grande suscetibilidade, com apenas diferença de uma diluição para alguns isolados clínicos. Parece também não haver

correlação entre os valores de CIM de AMB e em especial do fluconazol em comparação aos valores de CIM dos peptídeos. Exemplificando, as linhagens CNF 15 e CNF 11 cuja CIM de fluconazol é de 8 µg/mL e 0,5 µg/mL respectivamente possuem o mesmo valor de CIM para os peptídeos ToAP1 e ToAP2 (25 e 12,5 µM, respectivamente). É possível que os mecanismos moleculares envolvidos na resistência e suscetibilidade da levedura ao fluconazol e os AMPs sejam diferentes.

A seguir, a CIM₅₀ e CFM das linhagens *C. neoformans*, 24067, *C. gattii* NIH 1989 e dos isolados clínicos CNF 11 e CNF 14 foram determinados (**Tabela 6**). A CIM₅₀ e CFM das linhagens H99 e B3501 já tinham sido determinadas durante meu trabalho de mestrado e estão na tabela como forma de comparação.

Tabela 6. CIM₅₀ e CFM dos peptídeos ToAP1, ToAP2 e de Anfotericina B contra diferentes linhagens de *Cryptococcus* spp.

Linhagens	ToAP1 (µM)		ToAP2 (µM)		Anfotericina B (µg/mL)	
	CIM ₅₀	CFM	CIM ₅₀	CFM	CIM ₅₀	CFM
Cn H99	15,1 (14,2 a 15,7)	40	4,5 (4,3 a 4,7)	16	0,12 (0,11 a 0,13)	0,5
Cn B3501	6,1 (5,7 a 6,3)	12	1,6 (1,4 a 1,8)	4	0,02 (0,01 a 0,03)	0,125
Cn 24067	9,5 (8,3 a 10,8)	18	2,8 (2,7 a 2,9)	6	0,08 (0,07 a 0,09)	0,5
CNF 11	14,4 (13,9 a 14,9)	36	2,4 (2,1 a 2,6)	8	ND	0,125
CNF 14	14,1 (13,4 a 15,0)	33	2,4 (2,1 a 2,5)	8	ND	0,125
Cg NIH 198	10,3 (9,0 a 11,6)	18	1,8 (1,6 a 2,0)	4	ND	0,5

Cn – *Cryptococcus neoformans*, Cg – *Cryptococcus gattii*; CIM₅₀ – Concentração inibitória mínima que inibe 50% do crescimento; CFM – Concentração fungicida mínima; ND – não determinado. Todos R² das curvas de dose resposta dos peptídeos e Anfotericina B tiveram valores acima de 0,9. Observação: Os dados apresentados na tabela de CIM₅₀ das linhagens H99 e B3501 foram obtidos durante o período do mestrado.

Essas linhagens foram selecionadas para a determinação de CIM₅₀ e CFM por serem de tipos moleculares diferentes (H99, CNF 11 e CNF 14 – VNI; B3501 e 24067 – VNIV; NIH 198 – VGIII) e por possuírem tamanho de cápsula basal distintos em relação

à nossa linhagem padrão H99 quando crescidos em meio Sabouraud pH 7,2, com exceção do isolado clínico CNF11 (**Figura 8**).

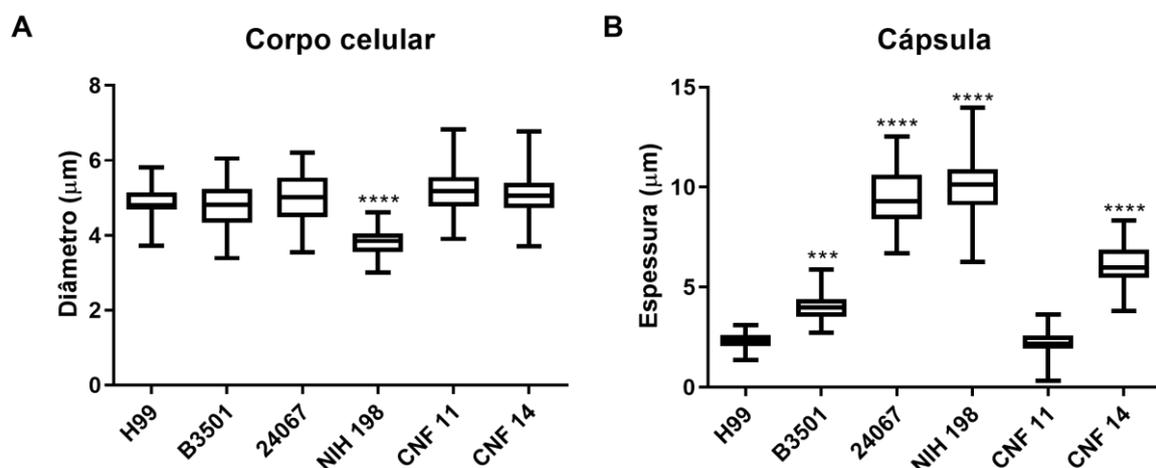


Figura 8. Diâmetro do corpo celular e espessura da cápsula das diferentes linhagens de *Cryptococcus* spp crescidas em meio Sabouraud pH 7,2. As caixas representam 75 % da distribuição da população e as linhas horizontais representam as medianas. Barras indicam os valores máximos e mínimos. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* com pós test de Dunn. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, considerando a linhagem H99 como grupo controle. Os resultados mostrados são representativos de 2 ensaios independentes.

Os valores de CIM₅₀ e CFM do peptídeo ToAP1 para as linhagens H99, CNF 11 e CNF 14 foram bastantes similares entre si de forma que os isolados clínicos (IC) são igualmente tolerantes ao peptídeo em comparação à linhagem H99. As demais linhagens são mais sensíveis ao peptídeo ToAP1 em comparação à linhagem de referência. A linhagem B3501 mostrou-se mais suscetível ao ToAP1, enquanto *C. neoformans* 24067 e *C. gattii* NIH 198 apresentaram suscetibilidade intermediária a esse peptídeo, com as concentrações de CIM₅₀ e CFM praticamente idênticas.

Os valores de CIM₅₀ e CFM do peptídeo ToAP2 para as linhagens *C. neoformans* 24067, B3501 e *C. gattii* NIH 198, CNF 11 e CNF 14 foram bastante similares entre si, sendo as doses para *C. neoformans* 24067 discretamente elevadas. Todas as linhagens são mais sensíveis ao peptídeo ToAP2 em comparação à linhagem H99.

Alguns estudos sugerem que há uma correlação entre a suscetibilidade antifúngica das espécies do Complexo *C. neoformans/C.gattii* com o seu tipo molecular, especialmente em relação à suscetibilidade aos azóis em geral (Trilles et al., 2012; Hagen

et al., 2016). Nesses estudos, o tipo VGII (sorotipo B e C) é o mais resistente, seguido por VGI (sorotipo B e C), VNI (sorotipo A) e VNIV (sorotipo D). Levando em conta apenas o peptídeo ToAP1, de fato as linhagens do tipo VNI são mais resistentes do que as linhagens VNIV, todavia essa relação não se aplica muito bem para o peptídeo ToAP2.

Não existe na literatura nenhum trabalho que mostre se há correlação entre os tipos moleculares e suscetibilidade a AMPs. A maioria dos trabalhos com AMPs não indicam nem sorotipo nem genótipo das linhagens e isolados clínicos testados, o que dificulta associar a menor suscetibilidade da linhagem H99 ao seu genótipo.

Uma vez que essas linhagens apresentam espessuras de cápsulas distintas (**Figura 8**), as diferentes suscetibilidades poderiam ser explicadas pelo tamanho dessa estrutura, que está associada à proteção do fungo contra antifúngicos. Considerando apenas as linhagens ATCC (H99, B3501, 24067 e NIH 198), é possível perceber que as linhagens mais suscetíveis foram aquelas com maior espessura de cápsula em relação à linhagem H99.

A suscetibilidade aos AMPs, no entanto, não parece ser proporcional à espessura da cápsula, uma vez que *C. neoformans* B3501, que dentre todos os organismos testados apresenta uma espessura de cápsula intermediária, foi tão sensível ou mais aos peptídeos que *C. neoformans* 24067 e *C. gattii* NIH 198.

Essa relação de tamanho cápsula e suscetibilidade também não se aplica aos isolados clínicos CNF 11 e CNF 14. Esses dois isolados possuem tamanho de cápsula basal bem distintos e seus valores de CIM, CIM₅₀ e CFM são praticamente os mesmos (**Figura 8 e Tabela 6**). Assim, a cápsula não parece ser um fator determinante para a suscetibilidade do fungo aos AMPs testados.

De fato, os dados apresentados na literatura mostram que a cápsula não tem papel claro na determinação da resistência ou suscetibilidade de diferentes linhagens de *C. neoformans* a AMPs com atividade antifúngica. Estudos com catelicidinas de mamíferos mostraram não haver diferença na inibição do crescimento de linhagens capsulares e acapsulares (Skerlavaj et al., 2001; Benincasa et al., 2004; Benincasa et al., 2006). Já um trabalho com a defensina NP-1, também de mamífero, foi inconclusivo a respeito do papel protetor da cápsula, uma vez que dentre todas as linhagens acapsulares, apenas uma foi hipersensível à defensina, as demais tiveram a CIM semelhante aos da linhagem capsulares (Alcouloumre et al., 1993a). Esse fenômeno também foi observado para a atividade de AMPs de não-mamíferos. A gomesina, isolada de uma espécie de aranha, tem praticamente a mesma atividade fungicida entre linhagens com grande produção de

cápsula, pouca produção e acapsulares, sendo observado também que o peptídeo promove a diminuição da espessura da cápsula e da concentração de GXM liberada no sobrenadante, tornando as leveduras mais suscetíveis à morte pelas células do sistema imune (Barbosa et al., 2007).

Dessa forma, é possível afirmar que a cápsula não protege o fungo contra a atividade dos AMPs ToAP1 e ToAP2. O tamanho da cápsula não deve ser utilizado como parâmetro para comparação de resistência e suscetibilidade entre diferentes linhagens à AMPs.

Outros aspectos acerca do papel da cápsula na suscetibilidade do fungo serão discutidos mais à frente mas já é possível afirmar que a maior espessura da cápsula não confere proteção às diferentes linhagens de *C. neoformans* da ação dos AMPs de escorpião aqui testados.

4.2 Cinética de viabilidade de *C. neoformans* tratado com os peptídeos ToAP1 e ToAP2.

A partir dos dados obtidos na etapa anterior, o efeito fungicida dos peptídeos foi avaliado pelo ensaio de cinética de viabilidade do fungo tratado com as respectivas doses letais de ToAP1 (40 μ M), ToAP2 (16 μ M) e da AMB (0,5 μ g/mL) para *C. neoformans* H99 (Figura 9).

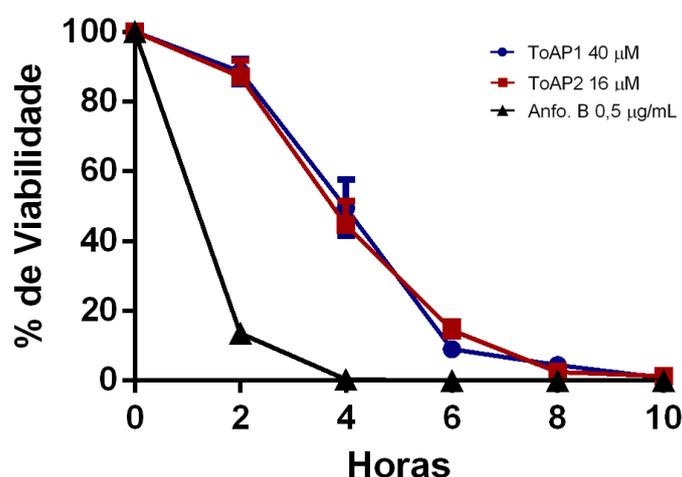


Figura 9. Cinética de viabilidade de *C. neoformans* H99 tratado com ToAP1, ToAP2 e Anfotericina B nas doses de suas respectivas CFM. As células foram incubadas em meio RPMI-1640/MOPS, a 37° C, 200 rpm por 10 horas. Alíquotas foram retiradas em cada tempo indicado e semeadas em meio sólido para contagem de unidades formadoras de colônia. Valores estão representados como a média (pontos) e o erro padrão da média (barras) de três experimentos independentes.

Ambos os peptídeos apresentam uma atividade muito similar. Tanto ToAP1 quanto ToAP2 não reduziram a viabilidade do fungo nas primeiras 2 horas de tratamento. Com 4 horas, os AMPs reduziram em aproximadamente 50% a viabilidade das leveduras, enquanto foram necessárias entre 8 a 10 horas para zerar as contagens de UFC. Em geral é descrito na literatura que os AMPs matam os patógenos de forma rápida, em questão de minutos ou poucas horas. Os peptídeos NP-1, uma defensina, e as catelicidinas PG-1, SMAP-29, BMAP-27 e BMAP-28 são capazes de matar completamente as leveduras de *C. neoformans* em até 90 min (Alcouloumre et al., 1993b; Benincasa et al., 2006; Zaragoza et al., 2008). Ainda assim, não é possível afirmar se os AMPs ToAP1 e ToAP2 apresentam menor eficiência uma vez que esses estudos foram realizados com um desenho experimental distinto ao nosso. Em específico, as concentrações dos AMPs utilizadas para os trabalhos não foram as correspondentes ao CFM, outras linhagens foram utilizadas, o meio de cultura do teste e inóculo inicial de células também são diferentes. Assim a aquisição de alguns desses peptídeos descritos na literatura e o teste nas nossas condições de ensaio poderão responder se os AMPs ToAP1 e ToAP2 tem menor ou maior eficiência para reduzir a viabilidade do fungo.

Um dos motivos pelo qual os peptídeos levam muitas horas para reduzir completamente a viabilidade das células pode ser a transição da temperatura de crescimento do inóculo (30° C) para a temperatura do ensaio (37° C). O choque de temperatura leva o fungo a remodelar a sua parede celular, através da ativação da via de sinalização da integridade da parede celular (Levin, 2011; Yang et al., 2017).

A parede celular e a ativação da sua via de integridade e remodelagem é importante para a tolerância de *C. neoformans* ao peptídeo ToAP2 (estes resultados serão discutidos no Capítulo 2 desta tese). Assim, o remodelamento da parede celular pode dar uma sobrevida às leveduras. Ensaio mantendo a mesma temperatura de crescimento e a temperatura do teste serão realizados para responder se o longo período necessário para a redução completa da viabilidade das leveduras é em função do choque de temperatura.

Já AMB reduziu drasticamente a viabilidade das células com 2 horas de tratamento e zerou a contagem de UFC com 4 horas de tratamento, condizendo com o apresentado na literatura (Zaragoza et al., 2008; Sangalli-Leite et al., 2011).

4.3 Avaliação da atividade combinatória entre os peptídeos ToAP1 e ToAP2 com AMB.

No desenvolvimento de novas terapias antifúngicas, a combinação de agentes

antimicrobianos tem tido destaque especial nas estratégias de tratamento (*pipeline*). A combinação de fármacos aumenta a potência e eficácia da terapia e diminui seus efeitos tóxicos no paciente, além de contribuir com a redução do aparecimento de linhagens resistentes (Krysan, 2015; Perfect, 2017; Scorzoni et al., 2017). O ensaio para avaliar o possível sinergismo entre os peptídeos e AMB foi realizado por meio do teste do tabuleiro de xadrez, e os resultados estão apresentados na **Tabela 7**. Esse ensaio é feito a partir da CIM dos agentes antifúngicos.

Tabela 7. Interação dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 com Anfotericina B (AMB) contra *C. neoformans* H99 in vitro.

CIM da AMB sozinha ($\mu\text{g/mL}$)	CIM do Peptídeo sozinho (μM)	CIM em combinação de AMB ($\mu\text{g/mL}$) e do peptídeo (μM)	ICIF	Efeito
0,5	25 (ToAP1)	0,125 (AMB) + 0,78 (ToAP1)	0,28	Sinérgico
0,5	12,5 (ToAP2)	0,125 (AMB) + 0,39 (ToAP2)	0,28	Sinérgico

CIM – concentração mínima inibitória; ICIF – o Índice de Concentração Inibitória Fracionada. O ensaio foi realizado quatro vezes em dias diferentes

Tanto a combinação de ToAP1 + AMB, quanto ToAP2 + AMB foram sinérgicas, apresentando $\text{ICIF} \leq 0,5$. Em ambos os casos, a CIM da AMB foi reduzido de $0,5 \mu\text{g/mL}$ para $0,125 \mu\text{g/mL}$, quando em combinação. Já os peptídeos tiveram uma redução drástica dos CIM em combinação, passando de $25 \mu\text{M}$ e $12,5 \mu\text{M}$ para $0,39$ e $0,078$ para ToAP1 e ToAP2, respectivamente. A redução da concentração dos peptídeos em combinação com anfotericina B é muito interessante, dado que AMPs de escorpião costumam ser citotóxicos e o custo de produção de drogas baseadas em AMPs ainda é alto (Greber and Dawgul, 2017), de forma que o seu uso combinado a outros antifúngicos no tratamento pode ser mais vantajoso do que seu uso isoladamente.

4.4 Avaliação do papel protetor da cápsula e melanina de *C. neoformans* H99 contra a atividade dos peptídeos ToAP1 e ToAP2.

A cápsula e melanina aumentam a resistência do fungo contra a ação de antifúngicos convencionais. Para avaliar se a cápsula e melanina de *C. neoformans* H99 protegem o fungo contra a ação dos peptídeos ToAP1 e ToAP2, foram testados três

diferentes inóculos de H99. Um inóculo que foi crescido em meio não indutor (cápsula basal pequena, sem melanização), meio indutor de cápsula (cápsula grande, sem melanina), e meio indutor de melanina (células melanizadas). Cada inóculo foi testado com concentrações letais e sub letais dos peptídeos ToAP1 e ToAP2. Os resultados estão apresentados na **Figura 10**. Antes da análise dos resultados é importante ressaltar dois pontos. O primeiro ponto é que o tempo de tratamento do fungo foi escolhido com base na cinética de viabilidade do fungo em função do tratamento com antifúngicos, sendo selecionado o tempo de 4 horas por esse representar o tempo necessário para reduzir em aproximadamente 50% a viabilidade das células (**Figura 9**). O segundo ponto a ser levado em consideração é que o teste é feito no meio RPMI-1640-MOPS, que por si só não é um meio indutor de cápsula nem melanina. À medida que o fungo se divide, a cápsula e a melanina são passadas para as células filhas até o momento em que a maioria das leveduras terão apenas cápsula basal e nenhuma melanina em suas paredes. Assim, o tempo de 4 horas também é interessante pela pequena taxa de divisão celular, como mostrado na **Figura 10A (barras dos controles)** onde é possível observar o número de UFC permanece praticamente o mesmo entre o tempo 0 e 4 horas. Esse controle foi realizado em todos os ensaios em que os inóculos foram tratados tanto pelos peptídeos quanto pela AMB. Portanto, as células tratadas e recuperadas nesse ensaio, *a priori*, estavam com suas características do início do ensaio mantidas. Antes de cada ensaio, a cápsula dos três tipos de inóculo foi mensurada de acordo com o descrito anteriormente. As espessuras médias das cápsulas para o inóculo crescido em meio não indutor, indutor apenas de cápsula e indutor de melanina foram de 2,4 μm , 6,0 μm e 3,8 μm respectivamente (**Figura complementar 1 – Apêndice B**).

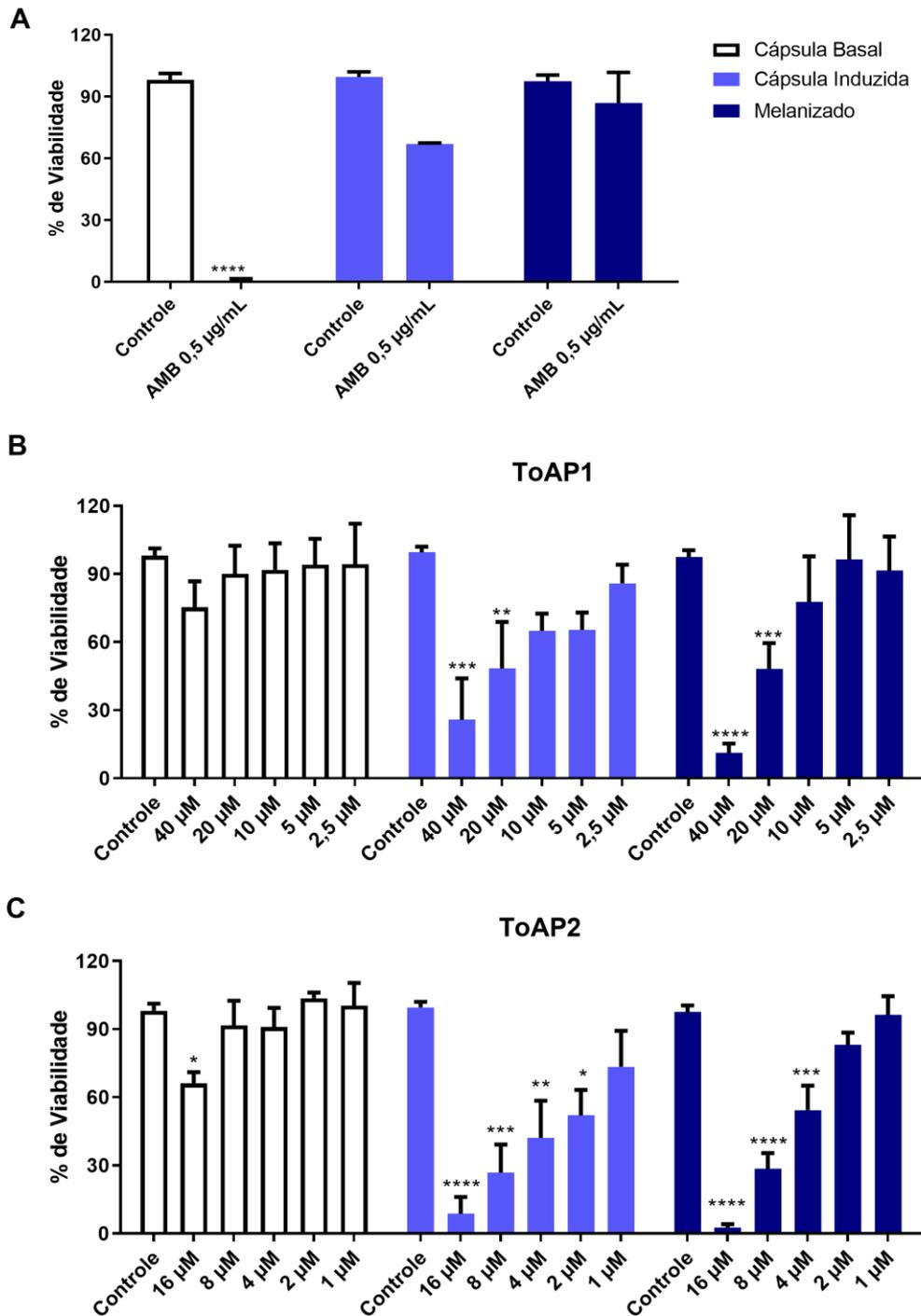


Figura 10. Viabilidade das células de *C. neoformans* H99 crescidas em meio Sabouraud (Cápsula Basal), Meio Mínimo (Cápsula Induzida) e Meio Mínimo com 1mM de L-DOPA (Melanizado), após tratamento de 4 horas com AMB (A) e diferentes doses de ToAP1 (B) e ToAP2 (C). Em branco são as leveduras com cápsula basal, azul claro as leveduras com cápsula induzidas e azul escuro as leveduras melanizadas. As barras coloridas representam a média dos valores e as barras pretas o erro padrão da média. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico One-way ANOVA com pós teste de Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $n = 3$.

Na **Figura 7A**, é possível observar que a indução da cápsula e a melanina aumentaram a sobrevivência do fungo tratado com AMB, na sua concentração letal, o que é condizente com os dados da literatura (van Duin et al., 2002; Ikeda et al., 2003). Apesar da comparação entre o fungo com cápsula induzida e o fungo melanizado tratados com AMB não ter apresentando diferença estatisticamente significativa ($p = 0,068$) é possível que a melanina tenha protegido mais o fungo contra AMB quando comparado à condição de indução de cápsula. Entretanto, deve-se considerar que na condição indução de melanina, a capsula é ligeiramente mais espessa que no meio não indutor (média de 3,8 μm versus 2,4 μm) e poderia se pensar em um efeito conjunto desses dois atributos.

Em relação ao peptídeo ToAP1 (**Figura 7B**), nota-se que não há diferença na viabilidade das leveduras sem indução de cápsula e melanina tratadas com as doses fungicidas e sub fungicidas em comparação ao controle. Todavia, nas doses de 40 μM e 20 μM , observa-se que tanto a presença de melanina quanto um aumento no tamanho da cápsula reduziram a viabilidade do fungo em comparação aos seus respectivos controles. Não houve diferença significativa nos demais tratamentos. Esse fenômeno fica mais evidente ao se observar os resultados obtidos depois do tratamento com o peptídeo ToAP2. O tratamento com a dose fungicida desse AMP reduziu drasticamente a viabilidade das células com cápsula induzida e quase matou todas as leveduras melanizadas. Mesmo em doses muito baixas, como 4 μM que nas células com cápsula basal não interferem na viabilidade da célula, tanto as leveduras com cápsula induzida como as células melanizadas tiveram a sua viabilidade reduzida de forma significativa em comparação ao controle. A melanina apenas aparenta um papel protetor quando comparado ao grupo de cápsula induzida (**Figura Suplementar 2 – Apêndice B**), e mesmo assim na concentração de 2 μM . O estudo de Doering *et al.*, mostrou que as leveduras da linhagem 24067, quando melanizadas, foram mais resistentes aos AMPs protegrina PG-1 e a defensina NP-1 comparado às leveduras com apenas cápsula induzida (Doering et al., 1999). Porém esse efeito só foi observado em culturas com mais de nove dias de crescimento. Dado que nossas leveduras foram testadas após cultivo por 2 dias, é possível que se testarmos tempos maiores de indução seja possível observar de modo mais conclusivo se a melanização de fato protege mais as células melanizadas em comparação às células com apenas a cápsula induzida.

A cápsula e a melanina possuem papéis importantes na proteção do fungo contra a ação de drogas antifúngicas em geral (Grossman and Casadevall, 2017), porém poucos

estudos verificaram se esses atributos de virulência também contribuem para o aumento da resistência aos AMPs. Já foi demonstrado que o aumento da cápsula e a melanização diminuem a suscetibilidade a protegrina PG-1 e a defensina NP-1 (Doering et al., 1999; Zaragoza et al., 2008), peptídeos que permeabilizam a membrana do patógeno. Em ambos os estudos, uma mesma linhagem teve a sua cápsula/melanina induzidas e foram comparadas ao respectivo controle sem indução. Dado que tanto a cápsula quanto a melanina possuem carga negativa (Nosanchuk and Casadevall, 1997), uma hipótese é que esses peptídeos catiônicos seriam sequestrados pelos polissacarídeos da cápsula e pela melanina, sendo impedidos de ter acesso seu alvo de ação. No trabalho de Doering *et al.*, 1999, foi mostrado que a melanina é capaz de se ligar aos AMPs e sequestrá-los do meio, impedindo a atividade fungicida contra *C. neoformans* (Doering et al., 1999). Para a cápsula ainda não se tem algum experimento semelhante realizado.

Nossos dados, no entanto, não corroboram com esses achados. O fenômeno aqui observado se assemelha ao relatado por Zhai e Lin, 2013, em que as células de H99 com cápsula induzida são mais suscetíveis à morte do que as com cápsula basal após tratamento com a polimixina B, um peptídeo também catiônico conhecido por perturbar a integridade da membrana e interagir com o LPS (carga negativa) das bactérias gram-negativas (Zhai and Lin, 2013). A hipótese levantada pelo grupo é que a cápsula aumenta a concentração efetiva do fármaco no microambiente da superfície celular do fungo. Precisa-se ressaltar, no entanto, que no trabalho realizado por Zaragoza *et al.* 2008 o AMP utilizado foi a PG-1, uma catelicidina de carga +7, cuja estrutura secundária consiste em duas folhas- β estabilizadas por 2 pontes dissulfeto, diferente dos nossos AMPs cuja estrutura secundária é uma α -hélice quando em ambiente de membrana. A influência da estrutura secundária na interação do AMP com a cápsula é um tópico a ser investigado no futuro.

É importante ressaltar um ponto. No nosso ensaio temos uma população que foi crescida em um meio rico e pH neutro (Sabouraud, pH 7,2), e duas populações que cresceram em meio mínimo e ácido (Meio Mínimo, pH 5,5). Apesar do ensaio ser realizado em meio RPMI-1640-MOPS, não se pode descartar que as condições de crescimento do inóculo tenham interferido nos resultados.

Para averiguar essa possibilidade, a CIM do peptídeo ToAP2 em mutantes com deleções em genes importantes para a biossíntese da cápsula foi determinada. Esses ensaios foram realizados no meu doutorado sanduíche, utilizando um protocolo de terminação de CIM diferente do utilizado até aqui na tese. A metodologia desse ensaio

está descrita no Capítulo 2 desta tese bem como os motivos do valor de CIM ser diferente do que foi apresentado aqui até então. Todas as linhagens usadas nesse ensaio foram crescidas nas mesmas condições e meios.

Para este ensaio, foram utilizados os mutantes acapsulares *cap59Δ*, *cap10Δ*, *cap60Δ*, *cap64Δ* e *cas35Δ* (Chang and Kwon-Chung, 1994; Chang et al., 1996; Chang and Kwon-Chung, 1998; 1999; Moyrand et al., 2004) e os mutantes *cas1Δ* e *cps1Δ*. A cápsula do mutante *cas1Δ* não apresenta as O-acetilações características dos polissacarídeos, já o mutante *cps1Δ* não produz o ácido hialurônico que também é encontrado na cápsula (Janbon et al., 2001; Chang et al., 2006; Jong et al., 2007). As CIM desses mutantes e da linhagem selvagem se encontram na **Tabela 8**.

Tabela 8. CIM do peptídeo ToAP2 para as linhagens selvagem e mutantes de *C. neoformans*.

Linhagens	CIM
H99 (selvagem)	3 μM
Kn99α	3 μM
<i>cap59Δ</i>	3 μM
<i>cap10Δ</i>	3 μM
<i>cap60Δ</i>	6 μM
<i>cap64Δ</i>	6 μM
<i>cas1Δ</i>	3 μM
<i>cas35Δ</i>	3 μM
<i>cps1Δ</i>	6 μM

Como observado na **Tabela 8** nenhuma linhagem acapsular foi mais suscetível que a linhagem selvagem. As linhagens acapsulares *cap60Δ* e *cap64Δ* foram mais resistentes ao peptídeo do que a linhagem selvagem. De acordo com esses resultados, a O-acetilação da cápsula não interfere na atividade do peptídeo. Já o ácido hialurônico é importante para a suscetibilidade do fungo ao peptídeo ToAP2, uma vez que o mutante *cps1Δ* é mais resistente ao peptídeo. Esse polímero é fundamental para a adesão do fungo às células endoteliais, etapa necessária para que ocorra a infecção do fungo no cérebro (Jong et al., 2007). Esse polímero possui carga negativa, assim é possível que a sua ausência torne a superfície do fungo menos eletronegativa, dificultando a interação do peptídeo com a membrana.

Levando-se em conta os resultados aqui mostrados a respeito da suscetibilidade de linhagens com diferentes tamanhos de cápsula e a resistência de leveduras com cápsula basal comparadas às células com cápsula induzida, podemos afirmar que esse atributo de virulência não protege *C. neoformans* da atividade antifúngica dos AMPs ToAP1 e ToAP2.

O tamanho cápsula, no nosso caso em específico, parece ser um parâmetro importante para inferir a suscetibilidade aos nossos AMPs apenas quando comparamos uma mesma linhagem com espessuras de cápsula diferente. Maiores cápsulas tenderiam a reduzir a resistência aos AMPs. Dado que esse efeito é mais pronunciado para o ToAP2, que é bem mais catiônico que o ToAP1, é plausível hipotetizar que a carga negativa da melanina e cápsula atraiam eletrostaticamente os AMPs, facilitando o encontro do peptídeo com seu alvo.

Já é demonstrado na literatura, que as leveduras de *Cryptococcus spp.* melanizam e expandem a sua cápsula nos tecidos do hospedeiro (Rivera et al., 1998; Nosanchuk et al., 2000; Feldmesser et al., 2001; Robertson et al., 2014), dificultando assim a ação dos antifúngicos usados na clínica. Novos antimicrobianos que não tenham a sua atividade inibida por esses atributos de virulência poderiam melhorar e aperfeiçoar o tratamento dessas infecções. Assim, os peptídeos aqui testados são bastante promissores para o desenvolvimento de novos fármacos.

Ensaio com mutantes hipercapsulares serão realizados para averiguar se o aumento da cápsula implica em maior susceptibilidade da levedura. Também estão previstos ensaios de competição entre os peptídeo e os componentes da cápsula e da melanina para verificar se há interação entre eles.

4.6 Efeito dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 na formação do biofilme e na viabilidade de biofilmes maduros de *C. neoformans*.

O efeito dos peptídeos de escorpião no biofilme de *C. neoformans* B3501 foi avaliado em dois estágios: durante a formação do biofilme e no biofilme já maduro e os valores de CMIB, CMIB₅₀, CMEB e CMEB₅₀ estão apresentados na **Tabela 9**. Esse ensaio foi realizado com a linhagem B3501 por ser uma linhagem que faz biofilme já bem caracterizada na literatura.

Tabela 9. CMIB, CMIB₅₀, CMEB e CMEB₅₀ peptídeos ToAP1, ToAP2 e de Anfotericina B para o biofilme de *C. neoformans* B3501.

Antifúngico	CMIB	CMIB ₅₀	CMEB	CMEB ₅₀
ToAP1	300 µM	143,7 µM (151,3 a 170,2)	400 µM	160,5 µM (127,9 a 161,5)
ToAP2	60 µM	10,0 µM (9,4 a 10,7)	400 µM	39,2 µM (33,4 a 46,2)
AMB	1 µg/mL	0,12 µg/mL	8 µg/mL	1,8 µg/mL

CMIB - concentração que inibe totalmente a formação do biofilme; CMIB₅₀ - concentração que inibe em 50% a formação do biofilme; CMEB - concentração que extingue totalmente o biofilme maduro; CMEB₅₀ concentração que reduz em 50% a viabilidade do biofilme maduro. Entre parênteses estão representados os valores do intervalo de confiança de 95%. Todos os valores de R^2 das curvas de dose resposta dos peptídeos e Anfotericina B tiveram valores acima de 0,9. As concentrações de 300 µM, 143,7 µM, 400 µM e 160,5 µM do peptídeo ToAP1 equivalem a 520 µg/mL, 248,9 µg/mL, 692,8 µg/mL e 278 µg/mL respectivamente. As concentrações de 60 µM, 10 µM, 400 µM e 39,2 µM do peptídeo ToAP2 equivalem a 180 µg/mL, 30 µg/mL, 1200 µg/mL e 117,6 µg/mL respectivamente.

Comparado ao peptídeo ToAP2, o peptídeo ToAP1 não apresentou uma atividade eficiente contra biofilme de *C. neoformans* B3501. Foram necessárias as mais altas doses testadas para a inibir e extinguir 100% do biofilme e aproximadamente metade dessas doses para inibir a formação do biofilme e reduzir a viabilidade do biofilme maduro em 50%. Ainda assim, a atividade anti-biofilme desse peptídeo em *C. neoformans* foi melhor do que o descrito para *C. albicans*, que nem na maior concentração (400 µM) foi capaz de extinguir completamente o biofilme maduro (Guilhelmelli et al., 2016).

Já o peptídeo ToAP2 inibiu totalmente a formação do biofilme com uma dose de 60 µM, e inibiu em 50% a formação do biofilme com uma dose 6x menor. A necessidade de doses pequenas do peptídeo ToAP2 para inibir a formação do biofilme é intrigante. É conhecido que a produção, secreção e adesão da GXM nas superfícies é fundamental para a formação do biofilme (Martinez and Casadevall, 2005; 2007). Quando o anticorpo monoclonal anti-cápsula 18B7 interage com a cápsula do fungo, este impede a liberação da GXM, prevenindo assim a formação do biofilme (Martinez et al., 2004; Martinez and Casadevall, 2005). Se o peptídeo ToAP2 se liga à cápsula, pode ser que tenha um efeito similar ao observado com o anticorpo 18B7 e também impeça a liberação de GXM, inibindo, portanto, a formação de biofilme. Uma vez que esse peptídeo é bem mais catiônico que o ToAP1, e aparenta interagir melhor com a cápsula, essa pode ser uma das razões da grande diferença de atividade entre esses dois peptídeos.

ToAP2 também foi eficiente em reduzir a viabilidade do biofilme maduro em 50%, no entanto, apenas na mais alta dose testada no ensaio o AMP foi capaz de extinguir 100% do biofilme maduro (400 µM). Novamente, a discrepância dos valores de CMEB₅₀

dos AMPs pode ter relação com a diferença de cargas. Diversos AMPs tiveram sua atividade anti-biofilme avaliadas e apenas os peptídeos mais carregados foram capazes de reduzir em de 50% a atividade metabólica do biofilme (Martinez and Casadevall, 2006a). Dado que GXM é um importante componente da matriz extracelular do biofilme de *C. neoformans* e que esse polissacarídeo é negativamente carregado, é possível que AMPs mais catiônicos tenham uma grande afinidade ao biofilme devido a interações eletrostáticas. Ademais, nesse estudo nenhum peptídeo foi capaz de extinguir completamente o biofilme maduro nas concentrações testadas. Juntamente com nossos dados, fica evidente que apesar das baixas doses de CMEB₅₀, uma parcela das células em biofilmes consegue sobreviver a altíssimas doses dos peptídeos. Essa subpopulação mais persistente e resistente já foi descrita para biofilmes de *C. albicans* e não parece estar relacionada ao surgimento de mutantes resistentes, e sim de uma variação fenotípica que ocorre dentro do biofilme e que pode ser reversível (LaFleur et al., 2006).

4.7 Efeito da presença de sais na atividade antifúngica do peptídeo ToAP2.

Diversos AMPs tem a sua atividade microbida reduzida ou mesmo abolida em meios com concentrações fisiológicas de sais (Goldman et al., 1997; Lee et al., 1997; Rothstein et al., 2001). A possível explicação para esse fenômeno é que os cátions presentes no meio extracelular competem com o peptídeo pela interação com a cabeça polar dos fosfolípidos da membrana, reduzindo a interação do peptídeo com a bicamada lipídica (Kandasamy and Larson, 2006). A própria Hst-5 tem a sua atividade fungicida abolida quando se realiza o teste antifúngico em meio RPMI-1640, que possui diversos sais em sua composição (**Tabela 10**)(Tati et al., 2014).

Tabela 10. Composição de sais dos meios RPMI-1640 e de PBS

RPMI-1640		PBS	
Sal	Concentração	Sal	Concentração
NaCl	103,4 mM	NaCl	137 mM
KCl	5,3 mM	KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	5,6 mM	Na ₂ HPO ₄	10 mM
MgSO ₄	0,4 mM	KH ₂ PO ₄	2 mM
Ca(NO ₃) ₂	0,4 mM		

A composição do meio RPMI-1640 (número do catálogo 31800022) foi obtida na página <https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/media-formulation.119.html>.

Levando-se em conta que os peptídeos apresentam atividade antifúngica no meio RPMI-1640, é seguro afirmar que esses AMPs retêm a sua atividade microbicida na presença de sais. Ainda assim, foi decidido investigar se menores concentrações de sais no meio mudariam a atividade do peptídeo. Para isso as células de *C.neoformans* H99 foram tratadas com a dose fungicida mínima do peptídeo ToAP2 em meio RPMI-1640, em PBS e em um tampão de baixa concentração de sal, o NaPB 10 mM. Além disso, o tampão NaPB 10 mM foi suplementado com diferentes concentrações de NaCl e MgCl₂ para determinar se a atividade do peptídeo é modulada por um cátion específico. Surpreendentemente, houve uma redução drástica na viabilidade das células tratadas por duas horas com 16 µM do peptídeo ToAP2 em todas as condições testadas, exceto no meio RPMI-1640 (**Figura 11A**). Até mesmo as células tratadas em PBS, cuja composição de sais é razoavelmente semelhante em relação ao RPMI-1640, tiveram a sua viabilidade reduzida de forma significativa em relação ao controle (**Tabela 10**). É importante ressaltar que não houve redução de viabilidade nas células não tratadas com o peptídeo incubadas em PBS, NaPB 10 mM e NaPB suplementando com os diferentes sais no período de incubação de duas horas (**Figura Suplementar 3 – Apêndice B**). Além disso, o peptídeo Hst-5 foi usado como controle do ensaio e, como já descrito na literatura, o peptídeo perdeu a sua função antifúngica no tampão suplementado com sal (**Figura Suplementar 3 – Apêndice B**).

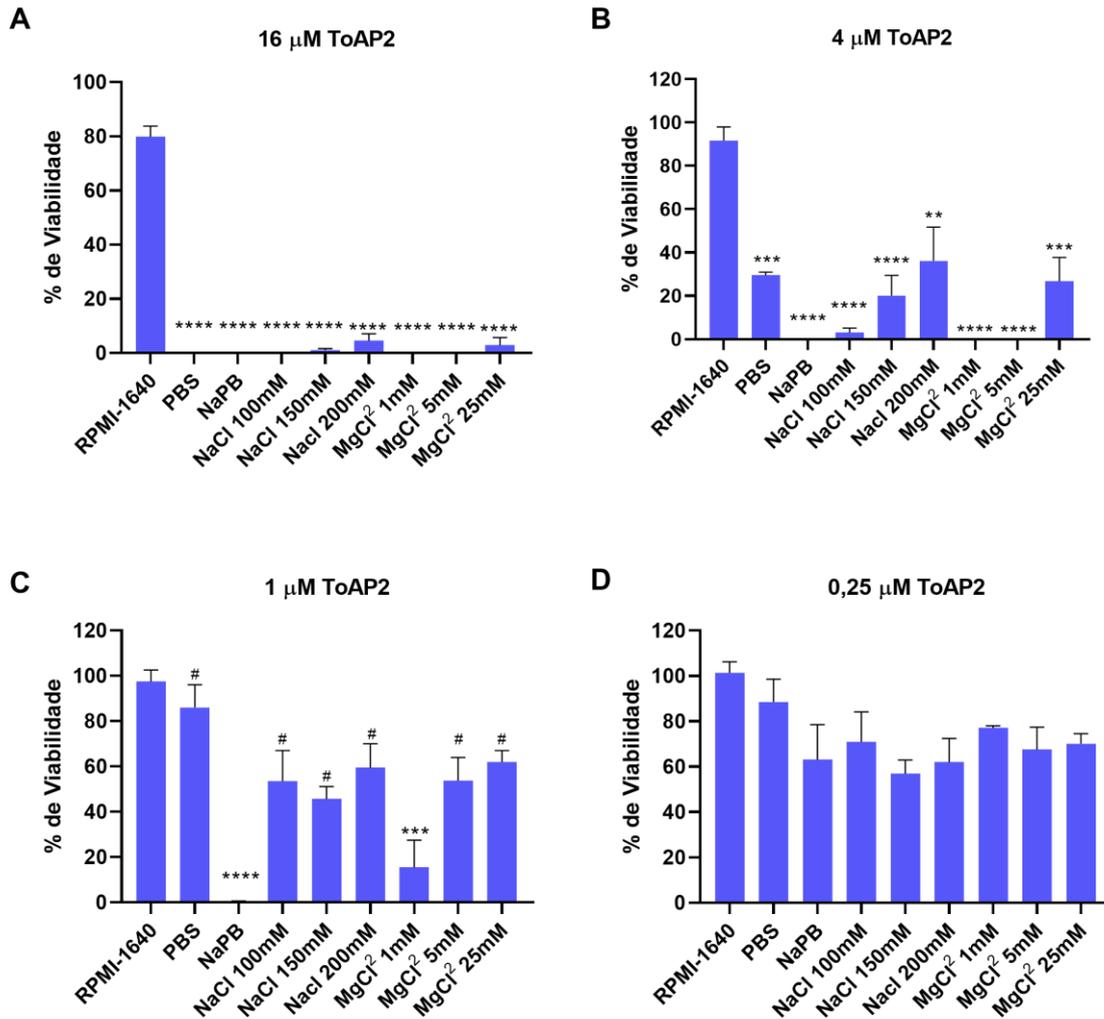


Figura 11. Viabilidade das leveduras de *C.neoformans* H99 tratadas com diferentes doses do peptídeo ToAP2 em diferentes meios. As células do fungo foram tratadas por duas horas a 37° C com 16 μ M, 4 μ M, 1 μ M e 0,25 μ M do peptídeo ToAP2 no meio RPMI-1640 e nas soluções PBS, NaPB 10 mM e NaPB 10 mM suplementado com 100 mM, 150 mM, 200 mM de NaCl e 1 mM, 5 mM e 25 mM de MgCl₂. As barras coloridas representam a média dos valores e as barras pretas o erro padrão da média. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico One-way ANOVA com pós teste de Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. # indica diferença estatística com $p < 0,05$ entre as diferentes condições e o grupo NaPB 10 mM. n = 3.

Mesmo reduzindo a concentração do peptídeo para 4 μ M e 1 μ M, a porcentagem de viabilidade das células tratadas em NaPB 10mM continua semelhante ao tratamento com 16 μ M (**Figura 11B e 11C**). Há um aumento na viabilidade das leveduras tratadas em PBS com 4 μ M do peptídeo em relação ao tratamento com 16 μ M, porém é apenas

em concentrações $\leq 1 \mu\text{M}$ que a viabilidade das células tratadas em PBS se equipara ao grupo tratado em RPMI-1640.

É possível observar que a suplementação do meio com diferentes concentrações dos sais NaCl e MgCl₂ reduz a atividade do peptídeo, especialmente nas maiores concentrações de 150 mM e 200 mM de NaCl e 25 mM de MgCl₂. A interferência de diferentes concentrações dos sais NaCl e MgCl₂ fica mais evidente quando as células são tratadas com 1 μM (**Figura 11 C**). Em comparação com o grupo tratado em NaPB 10 mM, houve aumento significativo da viabilidade das células tratadas em todas as condições, com exceção do tampão suplementado com 1mM de MgCl₂ (**Figura 11C**).

Nesse ensaio não foi avaliada a interferência do cátion Ca²⁺ que está presente na formulação do meio RPMI-1640 (**Tabela 10**). É possível que o cálcio interfira na atividade do peptídeo, o que explicaria a diferença de viabilidade das células tratadas em meio RPMI-1640 e nas demais soluções, porém não se deve descartar a possibilidade que os demais componentes do meio RPMI-1640 estejam, de alguma forma, interferindo na atividade do peptídeo.

4.8 Efeito do peptídeo ToAP2 na morfologia, ultraestrutura e integridade da membrana de *C. neoformans* H99.

Como parte dos esforços para elucidar o mecanismo de ação dos AMPs de escorpião contra *C. neoformans* H99, os efeitos dos peptídeos na morfologia e ultraestrutura foram analisados por microscopia eletrônica. Para esse ensaio, as CIM dos peptídeos foram determinados para a concentração de 10⁶ células/mL, uma vez que esses tipos de experimentos necessitam de uma concentração maior de células para a visualização. Nessa concentração de célula, a CIM do peptídeo ToAP1 é de 55 μM e a CFM é de 90 μM . Já para o peptídeo ToAP2, a CIM é de 30 μM e a CFM é de 60 μM .

É possível observar na microscopia eletrônica de varredura (**Figura 12A**) que as células não tratadas apresentam formato esférico com a estrutura da cápsula bem preservada, sendo possível observar as fibras dos polissacarídeos.

Em um primeiro momento, as leveduras foram tratadas com a CFM do peptídeo ToAP1 para a microscopia, porém não foi possível recuperar as células com esse tratamento. Assim, foram utilizadas apenas as leveduras tratadas com a CIM do ToAP1. As células tratadas com o peptídeo ToAP1 (**Figura 12B**) mantiveram o formato esférico, no entanto, há uma redução significativa da densidade das fibras de polissacarídeo.

Vários relatos na literatura referente a drogas antifúngicas, incluindo um AMP,

que apresentam o efeito de reduzir o tamanho da cápsula (Barbosa et al., 2007; Martinez et al., 2010; Joffe et al., 2017; Jones et al., 2017). Entretanto, o mecanismo pelo qual tais compostos reduzem o tamanho da cápsula ainda não é claro. Sucintamente, a biogênese e montagem da cápsula ocorre da seguinte forma: os polissacarídeos são sintetizados no interior das células e secretados para o exterior da levedura por meio de vesículas. As fibras da cápsula se anexam à parede celular e, uma vez anexadas, começa o seu alongamento apical revisado por O'Meara and Alspaugh, 2012 . A constituição da parede celular é fundamental para a anexação dessas fibras, uma vez que mutantes com defeitos de parede celular não conseguem incorporar as fibras nessa estrutura (Reese et al., 2007). O peptídeo ToAP1 pode estar interferindo em algum desses processos, levando a essa redução das fibras. Pode estar ocorrendo algum tipo de estresse/mudança na parede celular, fragilizando a ligação das fibras, de forma que durante o processamento da amostra elas tenham sido removidas. Outras interferências nas outras etapas da biogênese da cápsula não devem ser descartadas. Mais ensaios são necessários para a averiguação dessa hipótese.

Já as leveduras tratadas com a CFM do peptídeo ToAP2 (CFM – 60 μ M) (**Figura 12C**) também tiveram alteração na estrutura da cápsula, porém de maneira aparentemente inversa. Há um aumento da densidade das fibras, podendo ter sido causado pela deposição do peptídeo na cápsula ou algum tipo de *crosslink* entre as fibras de polissacarídeo. A maioria das células observadas estavam com formato esférico, apenas poucas apresentavam uma aparência colapsada.

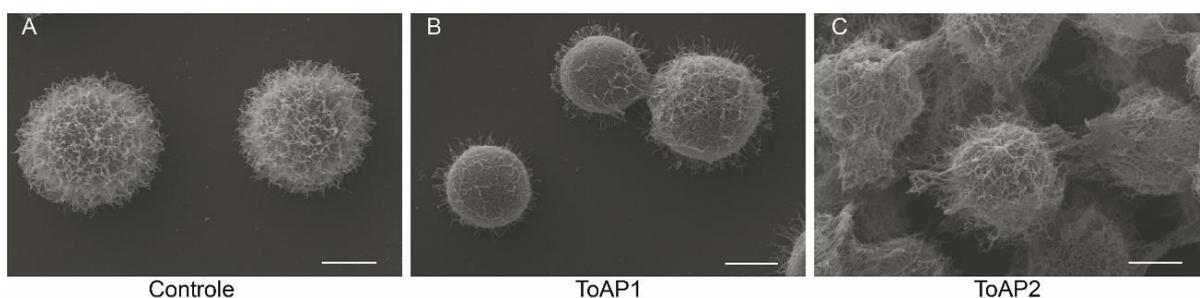


Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura de leveduras de *C. neoformans* H99 tratadas com 55 μ M do ToAP1 e 60 μ M do ToAP2. 10^6 células/mL foram tratadas por 24 horas, a 37°C, 200 rpm, em RPMI-1640. Painel A – células não tratadas; Painel B – células tratadas com ToAP1; Painel C – células tratadas com ToAP2. Barras de escala: 2 μ m.

A diferença entre na organização das fibras de polissacarídeo das células tratadas

e não tratadas pode ser um artefato de preparação para a microscopia. Foi descrito na literatura que a morfologia da cápsula é alterada quando esta está ligada a anticorpos monoclonais (Cleare and Casadevall, 1999). A ligação de um anticorpo na cápsula preserva melhor as fibras que tendem a se perder durante o processamento da amostra. Se for esse o caso, isso indica que o peptídeo ToAP2 está de fato se ligando à cápsula, ou pelo menos interagindo em algum nível com esta estrutura. Outros efeitos do peptídeo na biogênese e arquitetura da cápsula não devem ser descartados, já que além do aumento da densidade das fibras há uma clara mudança na arquitetura dessa estrutura.

Outro aspecto interessante é que enquanto as células do controle e tratadas com ToAP1 estavam dispersas homogeneamente na lâmina, com as leveduras isoladas (exceto os brotamentos), muitas células tratadas com ToAP2 estavam juntas, como uma espécie de grumo, como é possível observar parcialmente na **Figura 12C**. As razões do aparecimento desses agrupamentos ainda precisam ser investigadas e pode ter relação com alteração das propriedades mecânicas da cápsula causadas pela ligação do peptídeo a esta (Cordero et al., 2013b).

O efeito do peptídeo ToAP2 no interior da célula pode ser observado na **Figura 13**. É possível observar que as células tratadas com o peptídeo (painéis B e C), comparadas ao controle, apresentam uma retração citoplasmática severa (setas pretas), com desorganização das organelas e estruturas membranosas.

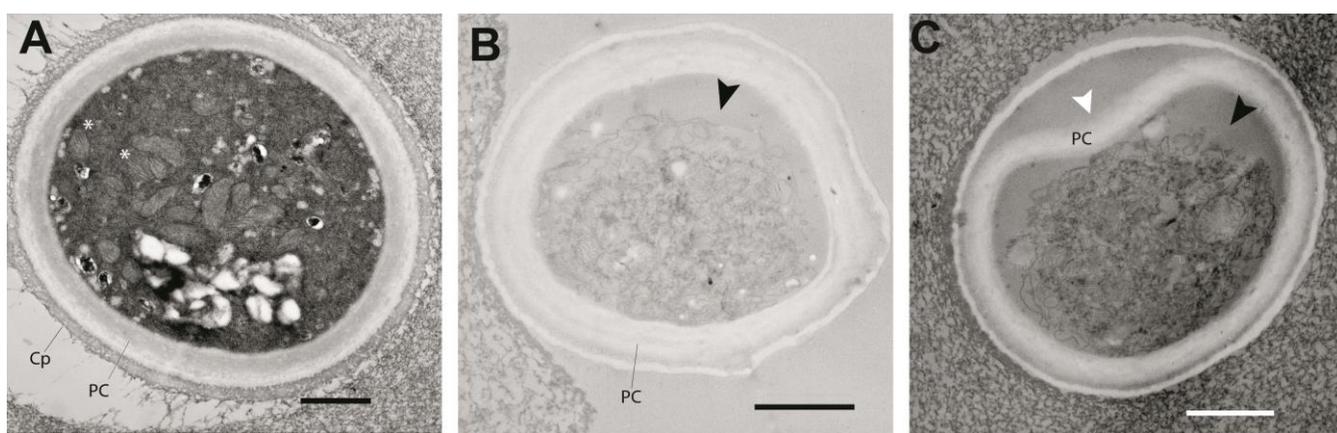


Figura 13. Microscopia Eletrônica de Transmissão de leveduras de *C. neoformans* H99 tratadas com 60 µM do ToAP2. Um inóculo de 10^6 células/mL foi tratado por 2 horas, a 37°C, 200 rpm, em RPMI-1640. Painel A – células não tratadas; Painéis B e C – células tratadas com ToAP2. PC indica a parede celular. Cp indica a cápsula. Os asteriscos brancos mostram a mitocôndria. As barras pretas mostram a retração do citoplasma. Barras de escala: 1 µm.

Além disso, as células observadas no controle mantiveram o seu formato circular, enquanto as células tratadas apresentam pequenos defeitos e formas irregulares. Ainda é possível perceber no painel C que há um defeito na parede celular do fungo (seta branca), causando essa invaginação. Possivelmente esse defeito é decorrente de um artefato de preparação, durante a realização dos cortes ultrafinos. Porém, como esse artefato só é observado nas células tratadas com frequência, o que pode ser um indício que a parede celular do fungo esteja fragilizada.

A avaliação da integridade da membrana das células com cápsula basal após tratamento com o peptídeo ToAP2 foi feita por citometria de fluxo (**Figura 14**). Brevemente, nesse ensaio é avaliado a permeabilidade da célula ao iodeto de propídeo, um corante ligante de DNA que consegue penetrar na célula com membrana plasmática intacta. Apenas após a permeabilização da membrana é que o corante consegue penetrar na célula. Dessa forma, essa metodologia é utilizada para avaliar a integridade da membrana.

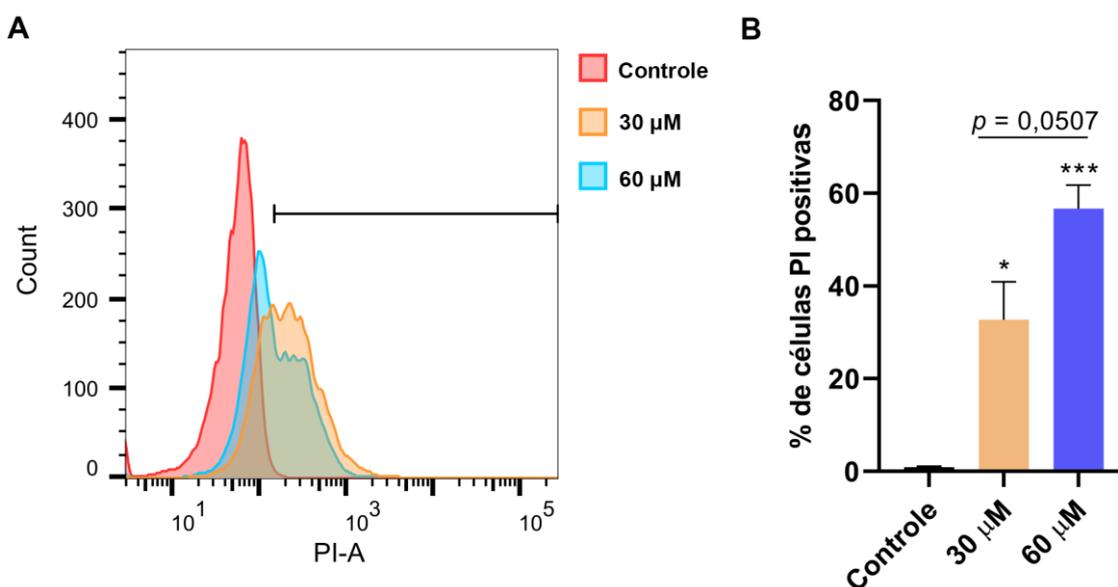


Figura 14. Permeabilização da membrana após tratamento com o peptídeo ToAP2. Um inóculo de 10^6 células/mL foi tratado por 2 horas, a 37°C , 200 RPM, em RPMI-1640. As células não tratadas, tratadas com $30 \mu\text{M}$ e $60 \mu\text{M}$ foram incubadas com iodeto de propídeo ($1 \mu\text{g/mL}$), por 30 minutos para então serem coletadas e analisadas por citometria de fluxo. (A) Nesta figura estão representados os histogramas da amostra controle das amostras tratadas com o peptídeo ToAP2. *Count* indica a quantidade de eventos detectados. A barra no gráfico indica a área que as células PI se encontram. (B) Porcentagem das células com IP internalizado. As barras coloridas representam a média dos valores e as barras pretas o erro padrão da média. Os dados foram

analisados pelo teste paramétrico One-way ANOVA com pós test de Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. $n = 3$

Após tratamento, é possível observar que um pouco menos de 60% das células tratadas com a CFM e cerca de 30% das células tratadas com a CIM do peptídeo ToAP2 foram permeabilizadas (**Figura 14B**). Esses dados mostram que o peptídeo está comprometendo a integridade da membrana das leveduras de *C. neoformans*, corroborando com o que foi visto pela MET (**Figura 13**). Esse efeito parece ser dose dependente. Possivelmente, a membrana é um dos alvos principais do peptídeo ToAP2.

4.9 Perfil transcricional de *C. neoformans* H99 após tratamento com o peptídeo ToAP2, Anfotericina B e a combinação dos dois antifúngicos.

A resposta transcricional de fungos a peptídeos antimicrobianos ainda é muito pouco explorada. Na tentativa de tentar compreender como a levedura *C. neoformans* H99 responde ao peptídeo ToAP2 e que tipo de efeito o peptídeo tem nas células foi realizado o sequenciamento de RNA em larga escala afim de se tentar identificar quais são as vias e processos mais importantes na resposta do fungo ao peptídeo.

As doses escolhidas para esse ensaio levaram em conta os resultados obtidos previamente. Para o peptídeo ToAP2, foram escolhidas as doses em referência à CIM de 10^6 células/mL (30 μ M), enquanto para a AMB a dose foi escolhida por ser a concentração inibitória em combinação com o peptídeo (0,125 μ g/mL). Essas concentrações não reduzem a viabilidade do fungo na condição do experimento (2×10^7 células/mL).

A resposta transcricional de *C. neoformans* H99 após o tratamento com diferentes doses do peptídeo ToAP2, AMB e com a combinação do peptídeo e AMB ainda está em processo de análise. Aqui serão apresentados alguns resultados preliminares já obtidos. É importante afirmar que as *reads* obtidas do sequenciamento passaram nos controles de qualidade estabelecidos pelo grupo do Dr. Alspaugh. Mais de 90% das *reads* obtidas de todas as amostras foram mapeadas no genoma de referência (média de 96,7%). No total, foram mapeados 7630 genes, o que é condizente com o número atual de genes codantes e não codantes do genoma de *C. neoformans* H99 (Janbon et al., 2014).

A quantidade de genes diferencialmente expressos nos tratamentos quando comparados ao controle está mostrada na **Figura 15**.

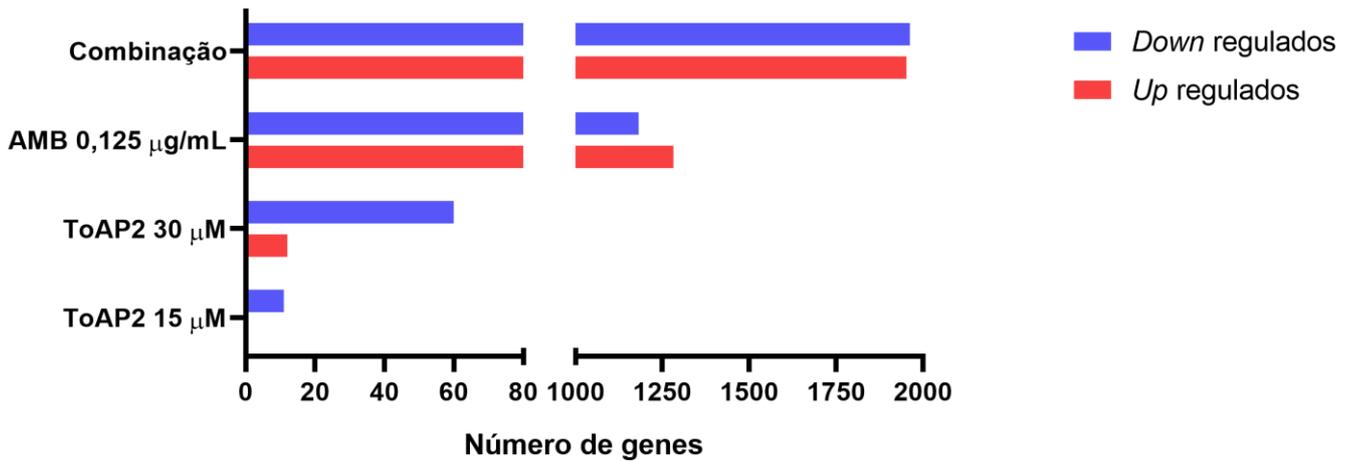


Figura 15. Quantidade de genes diferencialmente expressos após o tratamento com 15 µM e 30µM do peptídeo ToAP2, 0,125 µg/mL de AMB e da Combinação do peptídeo ToAP2 (15 µM) e AMB (0,125 µg/mL).

Em resposta a 15 µM do ToAP2, apenas 11 genes foram diferencialmente expressos, todos regulados negativamente. Quando tratado com o dobro dessa concentração, 60 genes foram regulados negativamente e apenas 12 regulados positivamente. A resposta transcricional ao peptídeo parece envolver majoritariamente a diminuição do acúmulo de transcritos nessa levedura. Quando tratado com AMB (0,125 µg/mL) ou a Combinação ToAP2 15 µM e AMB 0,125 µg/mL a quantidade de genes *up* e *down* regulados é muito similar.

É interessante ressaltar que no grupo ToAP2 + AMB (Combinação) aproximadamente 2000 genes foram diferencialmente expressos, um número bastante significativo quando comparado aos tratamentos com o AMB e o peptídeo sozinhos. Esses dados evidenciam, agora em nível transcricional, o sinergismo já observado na inibição do crescimento do fungo anteriormente. A lista de todos os genes diferencialmente expressos em cada condição bem como uma breve descrição de seus produtos podem ser encontrados nas Tabelas S1 a S6 no apêndice dessa tese (**Apêndice C**).

O número de genes em comum e exclusiva entre os tratamentos pode ser observada na **Figura 16**.

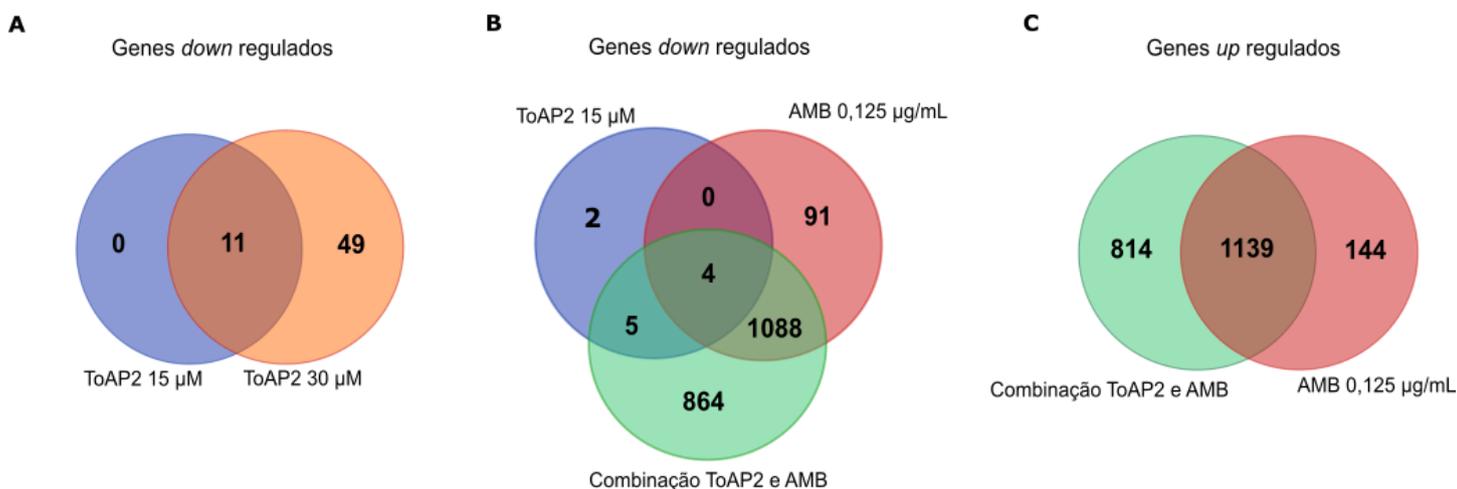


Figura 16. Diagrama de Venn com a sobreposição dos transcritos diferencialmente expressos em cada um dos tratamentos. (A) Sobreposição dos genes *down* regulados entre os grupos tratados com 15 μM e 30μM de ToAP2. **(B)** Sobreposição dos genes *down* regulados entre os grupos tratados com 15 μM do peptídeo, 0,125 μg/mL de AMB e a combinação de 15 μM ToAP2 e 0,125 μg/mL AMB. **(C)** Sobreposição dos genes *up* regulados entre os grupos tratados com 0,125 μg/mL de AMB e a combinação de 15 μM ToAP2 e 0,125 μg/mL AMB.

Todos os transcritos negativamente regulados após a o tratamento com a menor dose do peptídeo também foram *down* regulados quando a levedura foi tratada com 30 μM do peptídeo. Os 11 genes em comum a ambos os tratamentos estão listados na **Tabela 11**. Como observado, não há uma diferença muito acentuada entre o *fold change* entre os tratamentos. É interessante ressaltar que o gene da quitinase *CHI22* é regulada negativamente em ambos os tratamentos, o que pode estar relacionados aos defeitos de parede celular observados na microscopia de transmissão.

Tabela 11. Genes de *C.neoformans* regulados em comum na resposta ao tratamento com 15µM e 30µM do peptídeo ToAP2

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2 FoldChange 15 µM	log2 FoldChange 30 µM
CNAG_06207		hypothetical protein	-2,981221597	-2,901973998
CNAG_02548		cobalamin synthesis protein	-2,946432898	-3,389851145
CNAG_06890		membrane transporter	-2,897789624	-3,24344027
CNAG_00895	ZIP1	zinc transporter	-1,31411302	-1,814940013
CNAG_05358		hypothetical protein	-1,138555264	-1,510651391
CNAG_04245	CHI22	Chitinase, chitinase, variant	-1,138272586	-1,371134494
CNAG_00919		carboxypeptidase D	-0,879273688	-1,067695543
CNAG_12368		unspecified product	-0,858508884	-0,982794444
CNAG_00799		cellulase	-0,851060172	-1,097485149
CNAG_04373		alginate lyase	-0,71854286	-0,74306525
CNAG_02300		hypothetical protein	-0,635689085	-0,850911769

Na tabela estão listados todos os genes diferencialmente expressos em comum na resposta ao tratamento com diferentes doses dos peptídeos.

Quatro transcritos são negativamente regulados em comum em todos os tratamentos e estão listados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Genes de *C.neoformans* regulados em comum na resposta ao tratamento com 15µM do ToAP2, 0,125 µg/mL de AMB e a combinação de ambas as doses.

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2 FoldChange 15 µM	log2 FoldChange AMB	log2 FoldChange Combinação
CNAG_02548		cobalamin synthesis protein	-2,9464329	-1,48098411	-3,07877
CNAG_00895	<i>ZIP1</i>	zinc transporter	-1,314113	-0,9242516	-1,62103
CNAG_05358		hypothetical protein	-1,1385553	-1,02116798	-1,64134
CNAG_12368		unspecified product	-0,8585089	-0,54916192	-0,99824

Como observado na **Figura 15**, aproximadamente 800 transcritos são *up* regulados e *down* regulados exclusivamente quando o peptídeo ToAP2 e AMB são combinadas. Os genes exclusivos desse tratamento podem ser encontrados nas Tabelas S7 e S8. Esse dado reforça o efeito sinérgico dessa combinação, mostrando assim que, a nível transcricional, a combinação de drogas desencadeia uma resposta celular diferente do que a resposta do peptídeo e AMB sozinhos.

Uma análise mais detalhada das alterações transcricionais está em andamento afim de melhor entendermos o seu significado biológico. Esperamos ter uma melhor compreensão do mecanismo de ação do peptídeo por essa análise bem como esclarecer quais as estratégias adotadas pela levedura em resposta ao peptídeo ToAP2.

Breve síntese do Capítulo 1

De forma geral, os peptídeos ToAP1 e ToAP2 inibem o crescimento de diferentes linhagens e isolados clínicos de *C.neoformans*. Apenas o peptídeo ToAP2 é eficiente para inibir a formação do biofilme de *C. neoformans* bem como reduzir a viabilidade do biofilme já maduro. A cápsula não protege a levedura contra a atividade dos peptídeos e a sua indução parece aumentar a suscetibilidade do fungo aos AMPs. Da mesma forma, a melanina também não protege o fungo contra a atividade dos AMPs. Após o tratamento com o peptídeo ToAP2 a arquitetura da cápsula do fungo é alterada e a integridade da membrana citoplasmática é comprometida. O peptídeo ToAP2 combinado com AMB tem efeito sinérgico na inibição do crescimento do fungo. O sinergismo dessa combinação também foi observada na resposta transcricional do fungo após o tratamento com o peptídeo e AMB.

Capítulo 2

Genes envolvidos na tolerância de
C.neoformans ao peptídeo ToAP2

Os dados obtidos até o momento sugerem que o peptídeo ToAP2 interage com a membrana da célula, sendo esse o seu possível alvo primário. As características do peptídeo bem como os seus efeitos na célula levam a crer que o peptídeo ToAP2 permeabiliza a célula, causando danos na sua membrana citoplasmática.

Uma forma bem estabelecida que permite avaliar a mecanística do peptídeo ToAP2, bem como compreender os prováveis processos moleculares envolvidos na resposta do fungo a esse agente, é a varredura de bibliotecas de leveduras mutantes. A busca por mutantes sensíveis ao peptídeo em uma biblioteca de linhagens com deleções em genes não essenciais permite uma análise fenotípica e genotípica direcionada. Neste contexto, fez-se necessário colaborar com grupo bem consolidado em genética molecular de *C. neoformans*. Deste modo, esta parte do estudo foi realizada em colaboração com Dr. Andrew Alspaugh (médico infectologista do Departamento de Doenças Infecciosas e Genética Molecular), no contexto do meu estágio sanduíche (CAPES 2018-2019) realizado na Universidade de Duke, na Carolina do Norte, EUA.

5. MATERIAL E MÉTODOS.

5.1 Linhagens e condições de crescimento.

Nesse estudo foram utilizadas as bibliotecas de *C. neoformans* mutantes com deleções dirigidas geradas pelo grupo do Dr. Hiten Madhani, da Universidade da Califórnia, São Francisco, depositadas em 2015 e 2016, totalizando 42 placas (4032 mutantes). Todos os mutantes presentes nessa coleção possuem a marca de resistência a Nourseotricina e foram construídos a partir da linhagem Kn99 α . Mais informações a respeito da biblioteca podem ser obtidas em <http://www.fgsc.net/crypto/crypto.htm>.

A biblioteca é mantida congelada a -80° C para a preservação da linhagens. Inicialmente, cada uma das placas da biblioteca foi replicada em uma placa nova estéril de 96 poços de fundo chato, contendo 200 μ L de YPD líquido (10% de extrato de levedura, 20% de peptona, 2% de glicose) utilizando um replicador de placas de 96 poços. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 30°C, sem agitação, por 72 horas. Após o crescimento das leveduras, as placas foram mantidas a 4°C, por até no máximo 10 dias. Foi a partir dessa placa que foram feitos os pré-inóculos dos ensaios de varredura.

As demais linhagens que foram utilizadas nesse estudo e estão listadas na **Tabela 13**. A partir do estoque congelado em glicerol (15%), essas linhagens foram semeadas em

placas de YPD (YPD líquido acrescido de 20% de ágar). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 48h e armazenadas posteriormente a 4°C.

Tabela 13. Lista das linhagens de *Cryptococcus* spp. utilizadas no trabalho.

Nome da linhagem	Genótipo
H99	<i>MATα</i>
KN99α	<i>MATα</i>
KS130	<i>MATα vps27Δ::NEO</i>
KS125	<i>MATα vps23Δ::NEO</i>
KS129	<i>MATα vps22Δ::NEO</i>
KS127	<i>MATα vps32Δ::NEO</i>
KS126	<i>MATα vps4Δ::NEO</i>
KS128	<i>MATα bro1Δ::NEO</i>
cap59Δ	<i>MATα cap59Δ::NEO</i>
CBN134	<i>MATα akr1Δ::NEO</i>
CBN198	<i>MATα pfa3Δ::NEO</i>
CBN201	<i>MATα pfa4Δ::NEO</i>
CBN124	<i>MATα pfa5Δ::NEO</i>
DPG1	<i>MATα erf2Δ::NEO</i>
Quad	<i>MATα akr1Δ + pfa3Δ + pfa4Δ + pfa5Δ</i>
KK3	<i>MATα mpk11Δ::NAT</i>
KK1	<i>MATα cna1Δ::NEO</i>
KK2	<i>MATα cnb1Δ::NAT</i>
KMP18	<i>MATα chs3Δ::NEO</i>
KS347	<i>MATα cdc50Δ</i>
KS348	<i>MATα cdc50Δ::NAT + CDC50-NEO</i>
pbl1	<i>MATα pbl1Δ::NEO</i>

NEO – neomicina; NAT – nourseotricina.

5.2 Varredura primária para busca de mutantes sensíveis aos peptídeo ToAP2.

Com o auxílio de uma multicanal, 2 μ L de cada poço das placas da biblioteca foram inoculados em uma nova placa de 96 poços contendo 100 μ L de YPD líquido, com

exceção dos poços G12 e H12. Nesses poços foram adicionados manualmente duas linhagens controle do ensaio, a linhagem selvagem de *C. neoformans* no poço H12 e uma linhagem sensível ao ToAP2 previamente selecionada da coleção de mutantes do laboratório no poço G12. A linhagem mutante escolhida como controle teve o gene *CDC50* deletado do seu genoma. Essa linhagem foi selecionada como controle por ser mais sensível ao peptídeo ToAP2 em comparação à linhagem selvagem. As linhagens que estavam originalmente nesses poços foram inoculadas da mesma forma em uma nova placa de 96 poços manualmente para que a varredura fosse realizada. As placas então foram seladas com parafilme e incubadas a 30° C, sob agitação de 150 rpm, por aproximadamente 20h.

Após o crescimento, 3 µL de cada poço foi inoculado em 250 µL de YPD líquido em uma nova placa de 96 poços. A partir dessa placa, as culturas de cada poço foram diluídas em uma proporção de 1:500 em meio sintético completo (Meio SC - YNB + 1x de solução completa de aminoácidos + 2% de glicose, tamponada a pH 7 com MOPS 0,05M.). A partir dessa diluição, 90 µL de cada poço foram adicionados a duas novas placas de 96 poços, uma placa servindo como controle de crescimento das linhagens no ensaio e a outra placa contendo o peptídeo para o tratamento das linhagens. Na placa controle, 10 µL de meio sintético completo (SC) foram adicionados em cada poço. Na placa tratada com o ToAP2, 10 µL da solução de peptídeo a 15 µM em meio SC foram adicionados a todos os poços. No final, a concentração do peptídeo usada no teste foi de 1,5 µM e o volume final no poço de 100 µL. Essa concentração foi escolhida com base em ensaios previamente realizados. As placas foram então seladas com parafilme e incubadas a 30° C, sem agitação, por 48 a 72 horas a depender do crescimento das linhagens.

Após o período de incubação, o crescimento das linhagens presente nas placas foi avaliado por densitometria óptica no comprimento de onda 600 nm, utilizando um espectrofotômetro de placa (FLUOStar Optima). Com o auxílio de um replicador de placa estéril, as leveduras de cada poço foram semeadas em placa de YPD sólido para avaliar a viabilidade celular de cada linhagem após o tratamento com o peptídeo. As placas foram incubadas a 30°C por 48h.

As linhagens que não cresceram na placa e que não apresentaram colônias no YPD sólido foram selecionadas para a varredura secundária. As linhagens selecionadas nessa etapa foram mantidas em YPD sólido conforme descrito anteriormente.

5.3 Varredura secundária para a seleção das linhagens sensíveis ao peptídeo ToAP2 e definição da CIM.

Cada linhagem foi inoculada em 2 mL de meio YPD líquido e incubadas a 30° C, 150 rpm, por aproximadamente 16 horas. Também foram inoculadas as linhagens usadas como controles no ensaio anterior. Após o crescimento, as células foram diluídas em meio SC a uma OD₆₀₀ de 0,25, para então serem diluídas em uma razão de 1:100 nesse mesmo meio.

Três diferentes concentrações do AMP (30 µM, 15 µM e 7,5 µM) foram preparadas em meio SC e 10 µL de cada solução acrescentadas à uma placa de 96 poços estéril de fundo chato. Nos poços reservados ao controle de crescimento das leveduras foram adicionados 10 µL de meio SC. Então, 90 µL da diluição de células preparadas previamente foram adicionadas aos poços da placa, de forma que o volume final no poço totalizasse 100 µL. Dessa forma, cada linhagem foi tratada com o peptídeo nas concentrações finais de 3 µM, 1,5 µM e 0,75 µM. No poço reservado ao controle de contaminação do meio foram adicionados 100 µL de meio SC sem células. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 30° C, sem agitação, por 48 a 72 horas a depender do crescimento das linhagens.

A avaliação do crescimento das linhagens bem como a seleção das linhagens sensíveis ao peptídeo foi realizada de acordo com o descrito anteriormente para a varredura primária. As linhagens que passaram pelos critérios selecionados foram consideradas sensíveis ao peptídeo e tiveram a CIM definido.

A CIM do peptídeo para cada linhagem considerada sensível foi determinado utilizando o mesmo protocolo acima descrito para a varredura secundária com a diferença que foram testadas as concentrações finais de 12µM, 6 µM, 3 µM, 1,5 µM e 0,75 µM.

Ao final do ensaio, as leveduras dos poços que não apresentaram crescimento visível foram semeadas em placa de YPD sólido para a avaliação da viabilidade das células. Cada ensaio foi realizado pelo menos três vezes em dias diferentes.

Um fluxograma resumindo os principais pontos da metodologia da verredura pode ser visto na **Figura 17**.

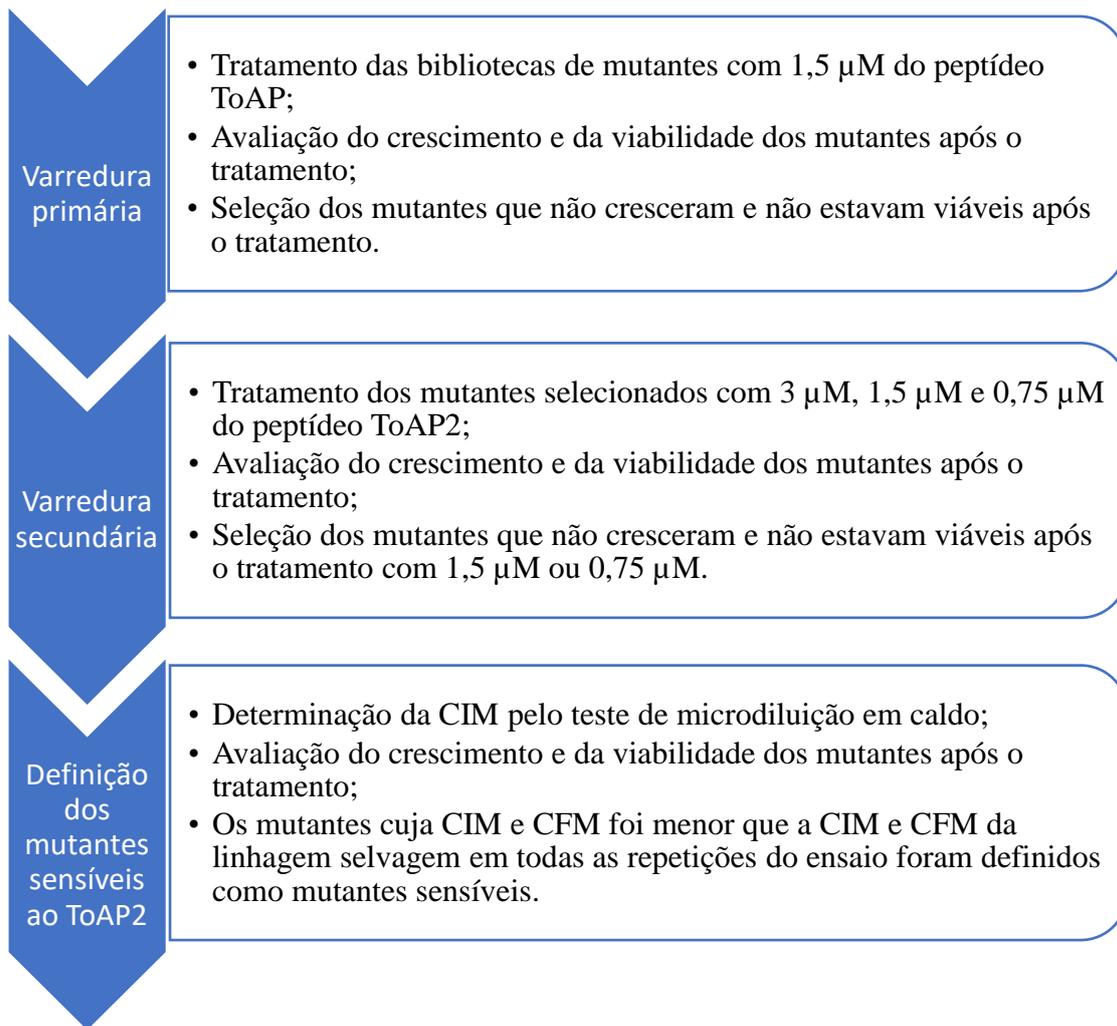


Figura 17. Fluxograma da varredura na busca de mutantes sensíveis ao peptídeo ToAP2.

5.4 Bioinformática

As informações referentes a funções, homologia e caracterização dos genes deletados nas bibliotecas de mutantes, bem como nome e descrição do produtos foram retiradas do banco de dados genômicos para fungos, *FungiDB* (<https://fungidb.org/fungidb/>).

O FungiDB é um banco genômico com depósitos de sequenciamento e transcritomas de diferentes fungos. FungiDB é amplamente utilizado em todo o mundo, devido as suas ferramentas de bioinformática serem acessíveis e por apresentar uma interface completa com informações referente a indicação dos genes ortólogos em diferentes espécies de leveduras. Assim, os genes avaliados neste estudo que não ainda apresentavam caracterização em *C. neoformans* foram nomeados e agrupados de acordo os seus respectivos ortólogos na levedura modelo *Schizosaccharomyces pombe*, com a

finalidade de dar suporte à discussão dos resultados desta tese. Contudo, para alguns genes não foi possível encontrar ortólogos em *S. pombe*, de forma que a homologia norteadora da caracterização foi em *S. cerevisiae*.

As informações a respeito dos genes homólogos em *S. pombe* e *S. cerevisiae* foram obtidas nos bancos PomBase (<https://www.pombase.org>) e *Saccharomyces* Genome Database (<https://www.yeastgenome.org>). A análise de enriquecimento de GO foi feita utilizando a ferramenta do site FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/>), segundo os parâmetros *default* do site. Foi considerado estatisticamente significativo o enriquecimento das categorias cujo valor de *p* ajustado foi menor que 0,05.

5.5 Teste de sensibilidade a SDS e Brefeldina A

Para determinar se os mutantes selecionados apresentavam defeitos na superfície bem como defeitos na via de tráfego de vesículas, foi avaliado a sensibilidade desses mutantes a SDS (dodecil dissulfato de sódio) e Brefeldina A (BFA), optou-se por utilizar o método de semeadura por esgotamento para obtenção de colônias isoladas. O SDS é um detergente iônico utilizado para avaliar a integridade da superfície das células fúngicas. Já a BFA é um composto que inibe o transporte de vesículas entre o Complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Helms and Rothman, 1992), sendo bastante utilizado para o estudo de tráfego de vesículas.

As linhagens sensíveis bem como as linhagens de controle foram semeadas em placas de YPD sólido para controle e em placas suplementadas com 0,03% de SDS ou 30 µg/mL de BFA para a avaliação da sensibilidade. As placas, com exceção da placa suplementada com SDS, foram incubadas por 48 horas a 30° C. Já as placas contendo SDS foram incubadas por 5 dias para permitir o crescimento das colônias.

A sensibilidade dos mutantes foi avaliada comparando-se os seus crescimentos com os das linhagens controle *cdc50Δ* e selvagem. Já é descrito que o mutante *cdc50Δ* possui hipersensibilidade a SDS e BFA (Huang et al., 2016), de forma que as linhagens que apresentaram padrão de crescimento semelhante a esta linhagem foram consideradas hipersensíveis.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do início da varredura completa, ensaios prévios foram realizados com linhagens mutantes a fim de se identificar um possível mutante sensível que pudesse ser utilizado como controle nos experimentos bem como as melhores condições para a realização da varredura.

As linhagens selecionadas já estavam sendo estudadas pelo grupo e foram escolhidas segundo o critério de que estivessem envolvidos em algum processo biológico da membrana plasmática, segundo os dados da literatura e do próprio grupo.

O peptídeo foi testado nas linhagens H99, sua linhagem congênica Kn99 α e nos mutantes *cdc50* Δ , *apt1* Δ , *sre1* Δ , *stp1* Δ , *erg4* Δ . As proteínas Cdc50 e Atp1 formam um complexo que atua como uma translocase de fosfolipídeos na membrana do fungo (Hu and Kronstad, 2010; Huang et al., 2016; Hu et al., 2017a). Já a proteína Sre1 é um fator de transcrição que regula o conteúdo de esteróis da membrana plasmática em resposta a diversos estresses e a sua atividade depende da clivagem realizada pela protease Stp1 (Chang et al., 2007; Chang et al., 2009). A enzima Erg4 cataliza a última reação na via de biossíntese do ergosterol, de forma que as linhagens cujo gene *ERG4* foram deletados não apresentam ergosterol em suas membranas (Toh et al., 2017). A CIM dessas linhagens está apresentado na **Tabela 14**.

Tabela 14. CIM do peptídeo ToAP2 para linhagens selvagens e mutantes de *C. neoformans*

Linhagens	CIM
H99	3 μ M
Kn99 α	3 μ M
<i>cdc50</i> Δ	1,5 μ M
<i>apt1</i> Δ	1,5 μ M
<i>sre1</i> Δ	3 μ M
<i>stp1</i> Δ	3 μ M
<i>erg4</i> Δ	1,5 μ M

Observa-se que não há diferença entre a susceptibilidade da linhagem selvagem H99 e sua congênica Kn99 α , de forma que a linhagem H99 foi utilizada como controle nos ensaios posteriores. É interessante observar, no entanto, que os valores de CIM não correspondem aos valores encontrados nos ensaios previamente descritos nessa tese. A diferença da CIM pode ser explicada pelas condições no qual foram realizados esses testes. Primeiramente, escolheu-se o meio SC para a realização da varredura e determinação da CIM por ser um meio sintético que permite o crescimento do maior número de mutantes possíveis. O meio RPMI-1640 utilizado nos testes antifúngicos limita o crescimento de *C. neoformans* (Zaragoza et al., 2011). Além disso, também optou-se por realizar o ensaio a 30° C e não a 37° C para permitir o crescimento das linhagens termos sensíveis.

Dos cinco mutantes testados, três apresentaram uma leve susceptibilidade ao peptídeo, as linhagens *cdc50* Δ , *apt1* Δ e *erg4* Δ . Dessa forma, escolheu-se o mutante *cdc50* Δ como mutante sensível controle por ser uma linhagem produzida independentemente no grupo e por não ter nenhum representante nas bibliotecas testadas. Também definiu-se a concentração do peptídeo a ser utilizada na primeira varredura de 1,5 μ M. Todos os demais mutantes foram retirados diretamente das bibliotecas geradas pelo grupo do Dr. Hiten Madhani.

Determinada as condições de crescimento do ensaio, prosseguimos para a realização da varredura primária. A sensibilidade ao peptídeo ToAP2 foi avaliada em aproximadamente 4032 linhagens mutantes. Dessa coleção, 101 mutantes não cresceram nas placas de controle. Ao todo, 172 mutantes foram selecionados da varredura primária (Tabela S9). Essas linhagens passaram então pela varredura secundária e dos 172 mutantes testados apenas 49 não cresceram na dose de 1,5 μ M, equivalente a 1/2 da CIM da linhagem selvagem (Tabela S10).

As 49 linhagens selecionadas previamente tiveram então a CIM do peptídeo ToAP2 determinados. Foram consideradas sensíveis apenas as linhagens que em todas as réplicas do ensaio realizadas em dias diferentes apresentaram a CIM de no máximo 1,5 μ M. De acordo com esse critério, apenas 42 linhagens de todos os mutantes testados da biblioteca foram consideradas sensíveis ao peptídeo e estão listados na **Tabela 15**, bem como a CIM obtido.

Tabela 15. Lista dos genes de *C.neoformans* envolvidos na tolerância ao peptídeo ToAP2, seus respectivos CIM dos seus mutantes e fenótipo de sensibilidade a SDS e BFA.

ID do Gene	Nome do gene	Descrição do produto	CIM	SDS	BFA
Biossíntese de lipídeos e esteróis					
CNAG_03834	<i>SUR2*</i>	C4-hidroxilase	1,5 µM	+	-
CNAG_02830	<i>ERG4</i>	delta24(24(1))-sterol reductase	1,5 µM	-	-
CNAG_07873	<i>CSG1</i>	Manosil-inositol-fosforil-ceramida MIP sintase	1,5 µM	-	+
Tráfego e organização de membranas					
CNAG_04738	<i>SAC6</i>	fimbrina	1,5 µM	-	+
CNAG_02029	<i>WSP1</i>	Wiskott-Aldrich syndrome protein	1,5 µM	-	+
CNAG_00383	<i>APT3</i>	Aminofosfolipídeo translocase	1,5 µM	-	-
CNAG_06469	<i>APT1</i>	Aminofosfolipídeo translocase	1,5 µM	-	-
CNAG_04904	<i>CHC1</i>	Cadeia pesada da clatrina	1,5 µM	-	-
CNAG_00565	<i>VPS1</i>	Dinamina GTPase	1,5 µM	-	-
CNAG_07317	<i>INP4#&</i>	Fosfoinosítido 5-fosfatase	1,5 µM	-	+
CNAG_03324	<i>VPS52*#</i>	Proteína associada ao transporte retrógrado ao Golgi	1,5 µM	-	+
CNAG_03550	<i>VPS71*</i>	Proteína com domínio dedo de zinco	1,5 µM	-	+
CNAG_02373	<i>VPS33*</i>	Proteína ligadora de ATP	1,5 µM	-	+
CNAG_02113	<i>APS1*</i>	Proteína adaptadora de clatrina	1,5 µM	-	-
CNAG_02676	<i>VAM7*#</i>	Proteína vacuolar SNARE	1,5 µM	-	+
CNAG_02575	<i>YPT7*</i>	Rab GTPase	1,5 µM	-	-
CNAG_03628	<i>VPS45*#</i>	Vacuolar sorting protein	1,5 µM	-	+
CNAG_03325	<i>BCH1</i>	ChAPs Chs5p-Arf1p-binding proteins	1,5 µM	-	+
Oxidoredução					
CNAG_02052	<i>DHD1*</i>	Dihidrodiol desidrogenase dimérica	1,5 µM	-	+
CNAG_04112		Oxidoreductase	1,5 µM	+	+
CNAG_06806	<i>ETF1alpha</i>	Subunidade alfa da flavoproteína transportadora de elétrons	1,5 µM	+	+
Transporte					
CNAG_07647	<i>CLC-B</i>	Canal de cloreto dependente de voltagem	1,5 µM	-	+
CNAG_02702	<i>CLC-A</i>	Canal de cloreto dependente de voltagem	1,5 µM	-	+
CNAG_04283	<i>FLC1</i>	Flavin carrier protein 1	1,5 µM	-	+
CNAG_04474		Transportador de ácido monocarboxílico	1,5 µM	+	+
CNAG_02361	<i>LIZ1*</i>	Transportador de ácido pantotênico	1,5 µM	+	+
Outros					
CNAG_01223	<i>PRY1#&</i>	Proteína ligadora a esterol	1,5 µM	+	+
CNAG_06637	<i>UBP8*</i>	C-terminal hidrolase de ubiquitina	1,5 µM	+	+
CNAG_03916	<i>PGII*</i>	Glicose-6-fosfato isomerase	1,5 µM	-	+

CNAG_01523	<i>HOG1</i>	MAP quinase	1,5 µM	-	+
CNAG_04316	<i>UTR1</i>	NAD quinase	1,5 µM	+	+
CNAG_00436	<i>AKR1</i>	Palmitoil Transferase	1,5 µM	-	+
CNAG_00770	<i>MHS2</i>	Proteína de reparo de DNA	1,5 µM	+	+
CNAG_07636	<i>CSR2</i>	Regulador da quitina sintase	1,5 µM	-	+
CNAG_04678	<i>YPK1</i>	AGC/AKT quinase	1,5 µM	+	+
Desconhecidas					
CNAG_00137		Proteína hipotética	1,5 µM	-	+
CNAG_04992		Proteína hipotética	1,5 µM	-	+
CNAG_04829		Proteína hipotética	1,5 µM	+	+
CNAG_06653		Proteína hipotética	1,5 µM	+	+
CNAG_05424		Proteína hipotética	1,5 µM	+	+
CNAG_04456		Proteína hipotética	1,5 µM	-	+
CNAG_00467		Proteína hipotética	1,5 µM	-	+

*/^ΔNome dos genes homólogos em *S. pombe* ou *S. cerevisiae*, respectivamente; #Proteínas hipotéticas em Cn, ; + indica crescimento equivalente ao da linhagem selvagem, – indica sensibilidade ao SDS ou BFA equiparável ao controle *cdc50Δ*. SDS – Dodecil sulfato de sódio, BFA – Brefeldina A

Nenhuma linhagem foi considerada hipersensível ao peptídeo. A CIM de todos os mutantes foi equivalente a apenas ½ da CIM da linhagem selvagem. Além disso, a diferença entre os CIMs das linhagens selvagem e mutantes é muito pequena. O fato de nenhuma das linhagens ser hipersensível ao peptídeo pode ter duas explicações. De forma geral os AMPs cujo alvo são as membranas plasmáticas primeiro se depositam na superfície do patógeno e quando as suas concentrações ultrapassam um determinado limiar, os peptídeos desestabilizam a membrana (Bonucci et al., 2013). Dessa forma, é possível especular que a concentração mínima do peptídeo necessário para causar um dano significativo nessa condição de ensaio na célula seja de 1,5 µM.

Outra possível explicação é que a sensibilidade ao peptídeo não está relacionado há um processo biológico específico do fungo. Considerando que a membrana plasmática é uma estrutura fundamental e complexa da célula, diversas vias e proteínas estão envolvidas na biogênese, manutenção e modelamento da membrana e a ausência pontual de apenas uma proteína nessas vias não seria capaz de levar a um fenótipo de hipersensibilidade ao peptídeo.

Os 42 genes foram classificados em seis categorias: tráfego e organização de membranas (15 genes); transporte (5 genes); biossíntese de lipídeos e esteróis (3 genes); oxidoredução (3 genes); outras funções (9 genes) e funções desconhecidas (7 genes). A distribuição dos genes está mostrada na **Figura 18**. A análise de enriquecimento de GO

foi realizada e o resultado se encontra no apêndice dessa tese (**Tabela S11 – Apêndice C**).

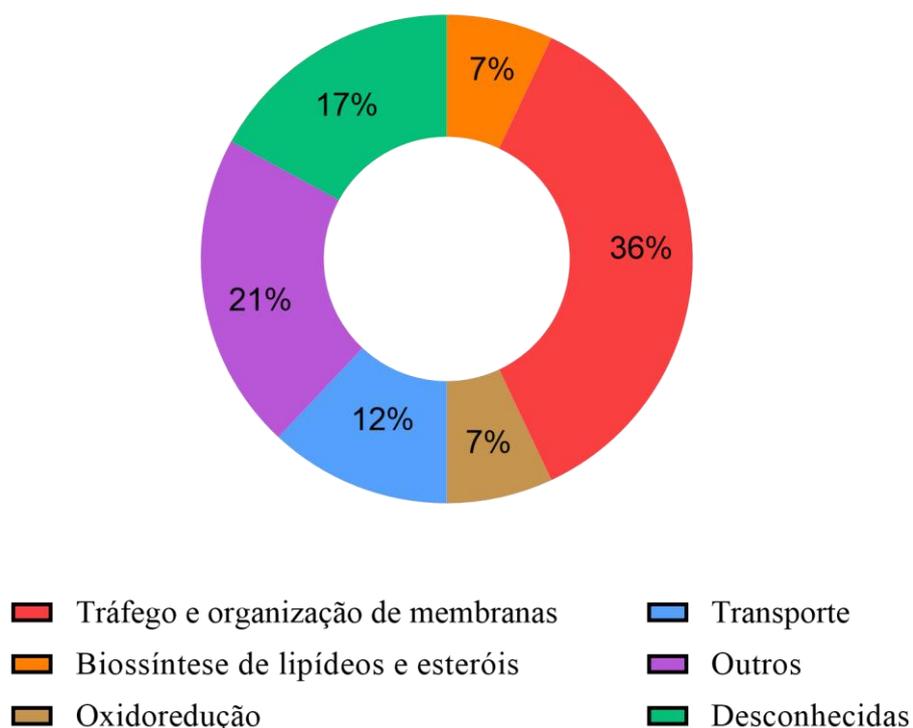


Figura 18. Categorização funcional dos genes identificados na varredura por linhagens sensíveis ao peptídeo.

Biossíntese de lipídeos e esteróis

Três genes envolvidos na biossíntese de ergosterol e MIPC são importantes para a tolerância do fungo ao peptídeo (Tabela 14). São eles o *ERG4*, cuja proteína catalisa a última reação enzimática da via de biossíntese do ergosterol (Zweytick et al., 2000), *SUR2* e *CSG1* (Haak et al., 1997; Wohlschlager et al., 2013) cujas proteínas estão envolvidas na biossíntese de MIPC.

Como já citado antes, o mutante *erg4Δ* não possui ergosterol em sua membrana. Da mesma forma, não há produção de MIPC no mutante *csg1Δ* de *C.neoformans* (Wohlschlager et al., 2013). Assim, o peptídeo ToAP2 não possui como alvo específico essas duas moléculas, como ao contrário de outros peptídeos antifúngicos (De Lucca et al., 1998; Thevissen et al., 2003a; Thevissen et al., 2003b).

Ergosterol é essencial para a arquitetura, integridade e função da membrana plasmática, modulando a fluidez, permeabilidade e espessura da bicamada lipídica (Abe and Hiraki, 2009; Ermakova and Zuev, 2017; Hu et al., 2017b). O aumento da

concentração de ergosterol na membrana aumenta a sua rigidez e espessura, reduz a difusão lateral de lipídeos e a permeabilidade a determinados compostos (Zweytick et al., 2000; Abe and Hiraki, 2009; Ermakova and Zuev, 2017). O aumento do conteúdo de ergosterol também dificulta a inserção do peptídeo antimicrobiano pleurocidina no cerne hidrofóbico de vesículas unilamelares gigantes (Mason et al., 2007).

A ausência de ergosterol torna a membrana mais sensível a ação de detergentes como SDS e aumenta a difusão passiva de fármacos como BFA, ciclohexamida, micafungina e fármacos da classe dos azóis nas leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. neoformans* (Zweytick et al., 2000; Mukhopadhyay et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2004; Abe and Hiraki, 2009; Toh et al., 2017). O mutante *erg4Δ* da biblioteca utilizada neste trabalho é sensível a SDS e BFA (**Tabela 14**), condizente com os dados da literatura.

O aumento da fluidez da membrana na ausência do ergosterol poderia facilitar a inserção e atividade do ToAP2, porém, não há mudança significativa entre a fluidez da bicamada lipídica do mutante *erg4Δ* e a linhagem selvagem em *S. cerevisiae* (Kodedova and Sychrova, 2015). Assim, a maior fluidez da membrana não parece ser a maior responsável pela sensibilidade dos mutantes de *ERG* a diversos fármacos e ao peptídeo ToAP2.

Há evidências que a sensibilidade dos mutantes de ergosterol esteja na verdade relacionada ao comprometimento dos microdomínios ou balsas lipídicas (*rafts* lipídicas). Essas *rafts* são compostas principalmente por ergosterol e esfingolipídeos (Bagnat et al., 2000). Esses microdomínios são fundamentais para diversas funções celulares como endocitose e transdução de sinal (Nakase et al., 2010). As *rafts* lipídicas também são conhecidas por serem mais resistentes a detergentes (Bagnat et al., 2000).

Diversas proteínas são associadas a essas *rafts* lipídicas e sua função depende desse contexto na membrana (Bagnat et al., 2000; Bagnat et al., 2001; Dupre and Haguener-Tsapis, 2003). Mukhopadhyay e colaboradores (2004) demonstraram que a associação de esfingolipídeos e ergosterol é importante para a localização e funcionamento da Cdr1, uma bomba de efluxo de drogas, tornando assim esses mutantes sensíveis a diversos fármacos (Mukhopadhyay et al., 2004).

Em *C. neoformans* a fosfolipase B1, um importante atributo de virulência, se encontra localizada nesses microdomínios (Siafakas et al., 2006). A sensibilidade do mutante *pbl1Δ* foi determinada e constatou-se que essa linhagem é sensível ao peptídeo (CIM 1,5 μM). Assim, o comprometimento desses microdomínios lipídicos nos mutantes *erg4Δ*, *csg1Δ* e *sur2Δ* pode ser uma das razões para a sensibilidade ao AMP, seja por

essas *rafts* serem importantes para manter a integridade da membrana ou por comprometer a atividade de diversas proteínas. É interessante pontuar que a quinase Ypk1 de *C. neoformans* é importante para a homeostase de MIPC na célula, de forma a ausência dessa enzima acarreta na diminuição dos níveis desse esfingolípido (Lee et al., 2012), sendo, portanto, uma das possíveis razões do mutante *ypk1Δ* ser sensível ao peptídeo **(Tabela 15)**.

A ausência de ergosterol e MIPC na membrana também impacta negativamente o processo de endocitose, seja por modificação na fluidez na membrana ou comprometimento dos microdomínios lipídicos que servem como pontos de interação da maquinaria de endocitose, e compromete a integridade da parede celular (Munn et al., 1999; Walther et al., 2006; Nakase et al., 2010; Tanaka and Tani, 2018; Degreif et al., 2019). As razões pelas quais a endocitose e a integridade da membrana podem ser importantes para a tolerância do fungo ao peptídeo serão abordadas nas próximas seções.

Tráfego de vesículas e organização de membranas

Dos 42 genes identificados na varredura como sendo importantes para a tolerância do fungo ao peptídeo ToAP2, 15 estão envolvidos no tráfego de vesículas e organização da membrana plasmática, indicando que esse processo é importante e desempenha um grande papel na defesa do organismo contra o AMP.

A participação do tráfego de vesículas na tolerância de leveduras a fármacos e agentes estressores já foi identificado em estudos anteriores. Em *S. pombe*, deleções nos genes dessa via levam o fungo a ser mais sensível a ácido valpróico (inibidor de histonas deacetilases), 5-Fluorouracil (5-FU - análogo de pirimidina), FK506 (inibidor da via da calcineurina), micafungina (equinocandina), tamoxifen (fármaco anticâncer), clotrimazol, terbinafina entre outros (Ma et al., 2011; Fang et al., 2012; Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2013; Hu et al., 2016; Yang et al., 2018).

O tráfego de membranas também está envolvido na tolerância de *S. cerevisiae* e *C. albicans* ao fluconazol (Bernardo et al., 2008; Demuyser et al., 2019). Esses dados mostram que o transporte de vesícula é importante para a tolerância de diversas leveduras a fármacos com diferentes mecanismos de ação. Nossos dados mostram pela primeira vez a evidência genética da participação do tráfego de membranas na defesa de *C. neoformans* a um peptídeo antimicrobiano.

Em nossa varredura, cinco genes que codificam possíveis proteínas de direcionamento vacuolar (Vps) são importantes para a sobrevivência do fungo ao AMP:

VPS1, *VPS33*, *VPS45*, *VPS52* e *VPS71*. As proteínas “Vps”, de forma geral, estão envolvidas no endereçamento e transporte de vesículas entre a rede trans do complexo de Golgi (CG) e os endossomos/pré-vacuolos (Bonangelino et al., 2002; Feyder et al., 2015).

Em *S. cerevisiae*, Vps1 e Vps45 participam do endereçamento de proteínas entre o CG e o pré-vacuolo, enquanto Vps52 participa do transporte retrógrado dos vacúolos para o CG (Vater et al., 1992; Conibear and Stevens, 2000; Mullins and Bonifacino, 2001). Vps1 também é importante para o processo de excisão da vesícula na endocitose de *S. cerevisiae* (Smaczynska-de et al., 2010).

A Vps71, além de ser um componente do complexo de remodelamento da SWR1 (Wu et al., 2005), participa do tráfico intracelular e sua ausência leva a morfologias aberrantes dos vacúolos (Bonangelino et al., 2002). Já Vps33 é importante para o ancoramento e fusão das vesículas ao vacúolo (Rieder and Emr, 1997). Outras proteínas importantes no processo de fusão e ancoramento de vesículas são a Vam7, uma v-SNARE (Ungermann and Wickner, 1998) e a Ypt7, uma GTPase da família das proteínas Rab (Collins et al., 2005). Os genes *VAM7* e *YPT7* de *C. neoformans* são importantes para tolerância do fungo aos ToAP2 (**Tabela 15**).

Outros dois genes cujas proteínas são envolvidas no transporte de vesículas e que foram identificados em nossa varredura são *CHC1*, que codifica a cadeia pesada da clatrina e *APSI*, uma subunidade da adaptina AP-1 (Tabela 15). A clatrina é uma proteína fundamental na biogênese de vesículas e seus transportes entre a rede trans do CG e os vacúolos/endossomos tardios, além de também de participar na endocitose por meio da formação do endossomo (Robinson, 2015). Essa proteína se organiza numa estrutura denominada “trisqueúlion”, composta por uma cadeia pesada e uma cadeia leve da clatrina. Os trisqueúlions formam uma rede poliédrica semelhante a um cesto que reveste e dá forma à vesícula durante a sua biogênese. A clatrina não se liga diretamente à membrana da vesícula, sendo necessário proteínas adaptadoras que fazem a interface entre a clatrina e a vesícula em si, as adaptinas (Robinson, 2015). As adaptinas também atuam no reconhecimento e endereçamento apropriado das cargas do CG (Feyder et al., 2015; Robinson, 2015). Pelo menos três tipos de adaptinas já foram caracterizadas em leveduras. A AP-1 e AP-3, envolvidas no endereçamento de vesículas do Golgi para os endossomos e para o vacúolo, respectivamente, e a AP-2 que participa do processo de endocitose (Phan et al., 1994; Feyder et al., 2015).

Outras proteínas importantes na endocitose em *S. cerevisiae* são Wsp1 e Sac6 que, respectivamente, participam na polimerização e organização do citoesqueleto de

actina (Li, 1997; Goodman et al., 2003). Essas proteínas são importantes no processo de invaginação da membrana durante a endocitose (Kubler and Riezman, 1993; Madania et al., 1999; Feyder et al., 2015). Ambos os ortólogos dos genes dessas proteínas parecem ser importantes para a tolerância de *C. neoformans* ao AMP (**Tabela 15**).

Em *C. neoformans*, já foi demonstrado que tanto Chc1 quanto Wsp1 e Sac6 participam da endocitose (Shen et al., 2011; Chang et al., 2012; Bairwa et al., 2019). O mutantes *chc1Δ* e *wsp1Δ* são sensíveis a diversos estressores, como a Brefeldina A, e também são hipocapsulares quando cultivados em meio indutor de cápsula, reforçando o papel dessas proteínas na via de transporte de vesículas e secreção (Shen et al., 2011; Bairwa et al., 2019). A ausência de Wsp1 em *C. neoformans* também acarreta em defeitos na via da exocitose. Foi demonstrando que no mutante *wsp1Δ* os exossomos se encontram de forma difusa no citoplasma do fungo, ao invés de se agruparem perto da membrana plasmática, como ocorre na levedura selvagem (Shen et al., 2011).

Um outro componente importante para a regulação do tráfego de vesículas é o fosfolípido fosfatidilinositol. Esse fosfolípido além de servir como mensageiro secundário em vias de sinalização, é importante para o endereçamento de proteínas e vesículas (Odorizzi et al., 2000). Um dos genes sem caracterização achado em nossa varredura é homólogo ao *INP54* de *S. cerevisiae*. A proteína Inp54 é uma fosfatase localizada no lado citosólico da membrana do RE e que hidrolisa os fosfatos da fosfatidilinositol-bifosfato, regulando negativamente o transporte do RE para o complexo de Golgi (Wiradjaja et al., 2001). A ausência dessa proteína em *S. cerevisiae* leva a um aumento da secreção da levedura.

Assim, há uma forte indicação que o transporte de vesículas entre o complexo de Golgi para os vacúolos/endossomos tardios, bem como o processo de endocitose e exocitose são importantes para a manutenção da integridade da membrana, dado que todos os mutantes envolvidos nesses processos indicados são sensíveis a SDS (**Tabela 15**), um agente destabilizador de membranas. A forma em que essa via protege o fungo contra AMPs pode ser explicada com base no modelo de reparação de membranas em células de mamíferos.

O reparo da membrana citoplasmática por meio de proteínas envolvidas no tráfego e endereçamento de vesículas já é bem descrito para células eucarióticas de mamíferos (Cooper and McNeil, 2015). Existem diversas patologias que levam à ruptura da membrana plasmática e um dos exemplos mais notáveis no qual pode-se estabelecer um paralelo à permeabilização de membranas por AMPs é ruptura de membranas causada

por toxinas formadoras de poro bacterianas (Los et al., 2013; Dal Peraro and van der Goot, 2016).

Em linhas gerais, a partir do momento que a membrana é perfurada, ocorre um rápido fluxo de Ca^{2+} extracelular para dentro da célula. Esse influxo de Ca^{2+} desencadeia uma cascata de sinalização que inicia o processo de reparo de membrana (Idone et al., 2008; Babiychuk et al., 2009). O influxo de Ca^{2+} dispara a exocitose de diversas vesículas da célula. A exocitose ajuda no reparo da membrana de duas possíveis formas, a depender do tamanho da injúria. Quando a lesão é de grande tamanho, o influxo de Ca^{2+} leva à fusão de vesículas intracelulares próximas ao local do dano na membrana. Essas vesículas se fundem à membrana na região adjacentes ao dano, criando uma espécie de “remendo” na membrana (McNeil et al., 2000; McNeil and Baker, 2001; McNeil and Steinhardt, 2003). No segundo modelo, o processo de exocitose diminui a tensão da membrana por meio da adição da bicamada lipídica das vesículas à membrana plasmática. A redução da tensão facilita o selamento espontâneo da membrana e esse processo é efetivo apenas para lesões pequenas (Togo et al., 2000; McNeil and Steinhardt, 2003).

A exocitose leva à secreção da esfingomielinase ácida que hidroliza a esfingomielina gerando ceramida (Tam et al., 2010). O enriquecimento de ceramida na membrana desencadeia o processo de endocitose que remove da membrana plasmática os trechos danificados da bicamada lipídica, possíveis proteínas danificadas e também remove as toxinas que causaram os poros (Tam et al., 2010). Paralelamente ocorre também a liberação de microvesículas a partir da membrana plasmática para o meio extracelular, também com a finalidade de remover as toxinas e a membrana danificada (Jimenez et al., 2014). Esse processo é mediado principalmente por proteínas do complexo ESCRT-III e também depende do influxo de cálcio na célula (Jimenez et al., 2014). O influxo de cálcio leva ao direcionamento da proteína sensora de Ca^{2+} ALG-2 no local da lesão que por sua vez recruta o adaptador ALIX (Scheffer et al., 2014). Esse adaptador recruta as subunidades do complexo ESCRT-I, ESCRT-III e a proteína Vps4 para o local do dano e esse sistema remove a injúria da membrana por meio formação e excisão de vesículas extracelulares (Jimenez et al., 2014; Scheffer et al., 2014). Por fim, após o selamento da bicamada lipídica, a célula restaura a composição normal da membrana para que ela volte a desempenhar seu papel corretamente (Cooper and McNeil, 2015).

Dado que o influxo de cálcio é essencial para desencadear a reparação da membrana, é plausível que haja proteínas sensores de cálcio em *C. neoformans*

envolvidas nesse processo. O mutante *cam1Δ* cujo gene deletado codifica a calmodulina, passou pelo crivo das duas primeiras varreduras porém não preencheu todos os requisitos para ser considerada suscetível. A calmodulina é uma proteína sensora de cálcio e quando ocorre o aumento da concentração desse cátion no interior da célula, Cam1 se liga a esses íons e se torna ativa (Juvvadi et al., 2017).

O mutante *cam1Δ* apresenta um retardo no seu crescimento quando tratado com o peptídeo (dados não mostrados). Assim, é possível que exista outro sensor de cálcio em *C.neoformans* e que esse sensor possa trabalhar conjuntamente com a Cam1 para desencadear a reparação da membrana. É interessante pontuar que maior suscetibilidade de *C.neoformans* quando tratado com o peptídeo ToAP2 no tampão NaPB 10mM em comparação ao RPMI-1640 possa ser justamente o fato de não haver Ca^{+2} no tampão, de forma que a célula não conseguiria disparar as vias reparadoras da membrana.

Como o complexo Ca^{+2} / calmodulina é um importante componente da via de sinalização da calcineurina (Juvvadi et al., 2017), foi investigado se outros mutantes independentes dessa via poderiam ser suscetíveis ao peptídeo. Foi avaliado assim a suscetibilidade dos mutantes *cnaΔ* e *cnbΔ* correspondentes a deleções dos genes das subunidades catalítica e regulatórias da calcineurina, respectivamente.

A calcineurina é uma fosfatase e, quando ativada pela Ca^{+2} / calmodulina, desforforila o fator de transcrição Crz1 que é translocado para o núcleo. Crz1 ativa a transcrição de genes envolvidos na regulação da resposta a estresse, resistência a drogas, integridade da parede celular e crescimento (Chen et al., 2011; Zhang et al., 2012; Juvvadi et al., 2017). Apesar dessa via ser importante para a resposta a diferentes estressores em *C. neoformans* (Chow et al., 2017; Fu et al., 2018) nenhum desses mutantes foi sensível ao peptídeo (CIM 3 μ M para ambas as linhagens) ou apresentou qualquer tipo de retardo no seu crescimento quando tratado com ToAP2. Assim, a resposta do fungo ao peptídeo parece não envolver essa via de sinalização.

Uma vez que o complexo ESCRT é importante para o reparo de membranas e que no grupo já existiam mutantes independentes para algumas proteínas desse sistema, decidiu-se avaliar a suscetibilidade de mutantes do complexo ESCRT em específico.

Em nossos ensaios, o mutante *vps28Δ* mostrou ser sensível ao peptídeo na varredura primária e secundária, porém esse mutante também não preencheu todos os critérios para ser considerado uma linhagem sensível ao peptídeo ToAP2. A proteína Vps28 faz parte do complexo ESCRT-I e sua deleção em *C.neoformans* acarreta em um atraso de crescimento quando tratado com 1,5 μ M em relação ao controle sem tratamento

(dados não mostrados). A CIM dos peptídeos para essas linhagens foi determinado (Tabela 16). Nesse ensaio também incluímos linhagens mutantes da biblioteca utilizada na varredura.

Tabela 16. CIM do peptídeo ToAP2 para as linhagens mutantes do complexo ESCRT.

Identificação	ESCRT	Linhagem	CIM
H99		MAT α	3 μ M
KS130	ESCRT-0	<i>vps27</i> Δ	3 μ M
13E3	ESCRT-0	<i>hse1</i> Δ	3 μ M
KS125	ESCRT-I	<i>vps23</i> Δ	3 μ M
3D8	ESCRT-I	<i>vps28</i> Δ	3 μ M
KS129	ESCRT-II	<i>vps22</i> Δ	3 μ M
20 A11	ESCRT-II	<i>vps25</i> Δ	3 μ M
2- H1	ESCRT-II	<i>vps36</i> Δ	3 μ M
KS127	ESCRT-III	<i>snf7</i> Δ	3 μ M
17C5	ESCRT-III	<i>vps60</i> Δ	3 μ M
26E8	ESCRT-III	<i>ist1</i> Δ	3 μ M
KS126	ESCRT-DS	<i>vps4</i> Δ	3 μ M
KS128	ESCRT-DS	<i>bro1</i> Δ	3 μ M
28G1	ESCRT-DS	<i>doa4</i> Δ	3 μ M
36F4	ESCRT-DS	<i>vta1</i> Δ	3 μ M

As linhagens cuja identificação começa com KS são os mutantes gerados independentemente no grupo do Dr. Alspaugh. As demais linhagens estão identificadas pela placa e sua posição que se encontram na biblioteca.

Nenhuma linhagem mutante foi mais sensível ao peptídeo do que a linhagem selvagem, todavia o mutante *vps60* Δ também apresentou um retardo no crescimento semelhante ao mutante *vps28* Δ . Apesar de nenhuma linhagem testada ser suscetível ao peptídeo, não é possível descartar completamente o envolvimento desse complexo na tolerância do fungo ao AMP. Os mutantes *vps2* Δ , *vps20* Δ e *vps24* Δ , que integram o complexo ESCRT-III, não foram testados por não estar disponíveis. Além disso, as linhagens *vps28* Δ e *vps60* Δ demonstraram um significativo atraso no crescimento quando tratado com o peptídeo. É possível que um duplo mutante com deleção nesses dois genes torne a levedura suscetível ao AMP de acordo com nossos critérios.

Estudos prévios já demonstraram que algumas proteínas ESCRT são importante para a tolerância de *S.cerevisiae* aos peptídeos Mucina-17, Histatina 12, lactoferrina e catelicidina KR20 (Lis et al., 2009; Lis et al., 2013). Os autores dos trabalhos pontuaram que as proteínas do sistema ESCRT importantes para a tolerância da levedura são apenas as que estão associadas à via de sinalização RIM101. Os autores demonstraram que os mutantes deficientes nessa via também são sensíveis a esses AMPs (Lis et al., 2009; Lis et al., 2013).

A via RIM101 é crucial para a resposta de fungos a mudanças do pH do ambiente e para a patogenicidade de *C. neoformans* (Penalva et al., 2008; Ost et al., 2015). Dado seu envolvimento com as proteínas ESCRT, a suscetibilidade dos mutantes *rim101Δ* e *rim20Δ* da via de RIM101 ao peptídeo ToAP2 foi avaliada. Ambos os mutantes apresentaram o mesmo valor de CIM que a linhagem selvagem (CIM 3μM).

O envolvimento das vias de secreção na manutenção da integridade da membrana plasmática pode explicar a alteração na estrutura da cápsula causada pelo peptídeo ToAP2 (**Figura 12**). Como já explicado na introdução, a GXM é exportada para a superfície da célula por meio de vesículas (Rodrigues et al., 2007). O aumento das fibras de polissacarídeo após o tratamento pode ser resultado do aumento da secreção dessas vesículas carregadas com GXM com intuito de reparar a membrana.

Outra explicação plausível para o envolvimento do tráfego de vesículas na tolerância do fungo do peptídeo é que essas vias participam do transporte de cargos específicos envolvidos com a integridade da membrana para a superfície da célula. Em nossos ensaios, o mutante *bch1Δ* se mostrou sensível ao peptídeo (Tabela 15). A proteína Bch1 faz parte da família das Chs5p-Arf1p-binding proteins (ChAPs) e é necessária para a exportação de cargos específicos do complexo de Golgi (Trautwein et al., 2006). Em *S. cerevisiae* um desses cargos importantes é a quitina sintase III (Chs3), proteína fundamental na biogênese da parede celular (Trautwein et al., 2006).

Nessa levedura, a Chs3 é mantida em compartimentos chamados quitossomos em condições normais, onde é ciclada entre os endossomos e a rede trans do Complexo de Golgi por meio da clatrina e da adaptina AP-1 (Valdivia et al., 2002). No momento que a célula se depara com um agente estressor, a Chs3 é transportada para a membrana plasmática no intuito de sintetizar quitina para reforçar a parede celular (Valdivia and Schekman, 2003).

Em *C. neoformans*, Bch1 é importante para a filamentação do fungo durante a reprodução sexual (Huang et al., 2015), processo que envolve diretamente o

remodelamento da parede celular. Nesse cenário, Chs3 parece ser uma proteína importante na defesa do fungo contra o AMP. Mais detalhes acerca da sua atividade serão abordados mais adiante na tese.

Ainda no contexto de organização de membranas, nossa varredura também evidenciou que as flipases podem desempenhar um importante na tolerância de *C. neoformans* ao peptídeo ToAP2. Já durante a realização dos ensaios pilotos, as linhagens mutantes *apt1Δ* e *cdc50Δ* se mostraram suscetíveis ao peptídeo. A Apt1 é uma flipase da classe das ATPase do tipo P (Hu and Kronstad, 2010). Esse tipo de flipase transloca o fosfolípido fosfatidilserina (PS) da camada externa da membrana plasmática para a camada interna, mantendo assim a bicamada lipídica assimétrica (Pomorski and Menon, 2006; Zhou and Graham, 2009; Tanaka et al., 2011).

A composição assimétrica da membrana plasmática é importante não só para a arquitetura geral da bicamada lipídica como também é para outros processos, tais como endocitose, exocitose e o transporte de vesículas entre o Complexo de Golgi e os vacúolos (Gall et al., 2002; Hua et al., 2002; Pomorski et al., 2003; Muthusamy et al., 2009; Sebastian et al., 2012). Em *C. neoformans* foram encontrados quatro genes codificando possíveis ATPs (Hu and Kronstad, 2010). Eles foram nomeados *APT1*, *APT2*, *APT3* e *APT4*. Em nosso trabalho, os mutantes *apt1Δ* e *apt3Δ* mostraram-se suscetíveis ao peptídeo. Uma vez que ambos os mutantes foram sensíveis, é possível que essas proteínas não sejam completamente redundantes na célula. Na biblioteca de mutantes utilizada também é possível encontrar a linhagem, *apt4*. A CIM do peptídeo para essa linhagem também foi determinado e esse mutante apresenta o mesmo valor de CIM que a linhagem selvagem (3 μM).

Dentre as APTs de *C. neoformans*, a *APT1* é a mais bem caracterizada. A Apt1 é importante para a endocitose e exocitose nessa levedura e a sua deleção leva ao acúmulo de vesículas no citoplasma da célula (Hu and Kronstad, 2010; Rizzo et al., 2018). O mutante *apt1Δ* também apresenta morfologia anormal do Complexo de Golgi, é sensível a BFA e não é sensível a nenhum tipo de estresse de parede ou membrana (Hu and Kronstad, 2010; Rizzo et al., 2014; Rizzo et al., 2018). O mutante *apt3Δ* também compartilha da maioria dos fenótipos *apt1Δ* (Hu et al., 2017a). Nosso ensaio fenotípico com os mutantes da biblioteca confirmou a suscetibilidade à BFA porém contradiz os dados da literatura a respeito do crescimento em SDS já que nossos mutantes foram sensíveis a esse detergente. Uma repetição desse ensaio deve ser feita para confirmar esses resultados.

A Cdc50 é uma proteína que interage com a ATP1 regulando a sua atividade, sendo importante na manutenção da assimetria da membrana (Saito et al., 2004; Lenoir et al., 2009). Em *C.neoformans*, essa proteína é necessária para tolerância a antifúngicos e para a integridade da membrana plasmática, mas não da parede celular (Huang et al., 2016; Hu et al., 2017a).

Uma vez que os processos de tráfego de vesículas, endocitose e exocitose parecem ser importantes para a tolerância do fungo ao AMP, os mutantes *apt1Δ*, *apt3Δ* e *cdc50Δ* podem ser suscetíveis ao ToAP2 por participarem efetivamente dessas vias. Uma outra hipótese é que o distúrbio na distribuição dos fosfolípidos na membrana pode aumentar a interação do peptídeo com a bicamada lipídica. O mutante *apt1Δ* possui menos PE, um fosfolípido neutro, nas suas membranas que a linhagem selvagem. Já o mutante *cdc50Δ* tem maior concentração de PS, fosfolípido negativo, na camada externa da membrana plasmática do que a linhagem selvagem. Assim, é possível que a superfície da célula nesses mutantes seja mais eletronegativa, atraindo mais o peptídeo para membrana da levedura.

Transportadores

Os dois canais de cloreto encontrados em *C. neoformans* são importantes na resposta do fungo ao peptídeo ToAP2, dado que os mutantes com deleções nesses genes são sensíveis ao AMP (**Tabela 15**). Esses dados indicam que essas proteínas possivelmente não atuam em redundância na célula ou que essa redundância é apenas parcial.

O canal de cloreto Clc-a é essencial para a atividade da enzima lacase e é requerido para a homeostase de Ca^{2+} na célula em *C.neoformans* (Zhu and Williamson, 2003; Li et al., 2012a). A linhagem *clc-aΔ* é sensível a altas temperaturas, a estressores de parede celular (Congo Red) e de membrana plasmática (SDS) (Li et al., 2012a). A suplementação de Ca^{2+} exógeno reverte esses fenótipos, com exceção da sensibilidade a SDS (Li et al., 2012a). É importante ressaltar que esses fenótipos são encontrados no mutante construídos a partir da linhagem selvagem *C. neoformans* JEC21. Nenhum desses fenótipos foi observado quando o mutante foi construído a partir da linhagem H99, de forma que os autores do trabalho concluíram que Clc-a da linhagem H99 não participa na homeostase de Ca^{2+} da levedura (Li et al., 2012a). No entanto, ambos os mutantes *clc-aΔ* e *clc-bΔ* da biblioteca se mostraram suscetíveis a SDS (Tabela 15), contradizendo o estudo prévio.

Em *S. cerevisiae*, o transportador Gef1, homólogo a Clc-a de *C. neoformans*, também é importante para a homeostase de cálcio na célula (Gaxiola et al., 1998). Todavia, um efeito notável da ausência desse transportador na célula é o surgimento de dobras e invaginações na membrana plasmática (Lopez-Rodriguez et al., 2007). Esse resultado indica que o transportador Gef1, de alguma forma, é importante para a manutenção da arquitetura da bicamada lipídica. É possível que as sensibilidades ao peptídeo e a SDS observadas nos nossos ensaios seja resultado de um efeito similar da ausência de desses transportadores na membrana de *C. neoformans*.

Outras três linhagens mutantes com deleções em genes que codificam transportadores também foram mais sensíveis ao peptídeo do que a linhagem selvagem. Uma dessas proteínas é um transportador de ácido pantotênico homóloga a Liz1 e Fen2 de *S.pombe* e *S.cerevisiae*, respectivamente (Marcireau et al., 1996; Stolz et al., 2004).

Ácido pantotênico é um importante precursor de acetil-COA, uma coenzima que participa de diversas vias metabólicas, em especial na síntese de ergosterol e ácidos graxos (Chiu et al., 2019). A síntese do ergosterol se inicia a partir da condensação de duas moléculas de acetil-COA (Hu et al., 2017b). Em *S. cerevisiae*, a deleção de Fen2 acarreta na diminuição do conteúdo de ergosterol nas membranas da levedura (Marcireau et al., 1996).

O acetil-COA também dá início à síntese de ácidos graxos, que são precursores de fosfolipídeos. Em *S. pombe*, o mutante *liz1Δ* compartilha diversos fenótipos com linhagens cujos genes de enzimas importantes na vida da biossíntese de ácidos graxos foram deletados (Stolz et al., 2004). Na reação de síntese de ácidos graxos é necessário o consumo de NADPH. Esse cofator é a forma reduzida de NADP⁺ e sua síntese ocorre pela fosforilação de NAD⁺ por uma NAD quinase. Em nossa varredura também foi identificado um mutante sensível ao ToAP2 cujo gene de uma NAD quinase foi deletada (Tabela 15). Essa enzima é homóloga a Utr1 de *S. cerevisiae* que contribui para o fornecimento de NADP⁺ para a célula (Shi et al., 2005).

O outro transportador necessário para a tolerância do fungo ao peptídeo é predito transportar ácidos monocarboxilados e não possui homólogos em leveduras modelo. Ácidos monocarboxílicos são compostos muito utilizados e produzidos nas vias metabólicas das células, dentre os quais pode-se destacar o piruvato (Halestrap, 2013). O piruvato é transportado para a mitocôndria onde é convertido em acetil-COA (Nelson and Cox), participando, portanto, da síntese de ácidos graxos e ergosterol.

A conversão do piruvato em acetil-COA é realizado pelo complexo de enzimas piruvato desidrogenase. Essas enzimas utilizam FAD (Dinucleótido de flavina e adenina) como cofator. FAD é fundamental para vários processos celulares, especialmente processos envolvendo reações de oxidação-redução e servindo como grupo prostético de diversas proteínas, as flavoproteínas (Mansoorabadi et al., 2007).

O transporte de FAD para o retículo endoplasmático é realizado por proteínas carreadoras de flavina (Protchenko et al., 2006). Nossos resultados mostram que a ausência do gene do transportador Flc1 em *C. neoformans* torna o mutante sensível ao peptídeo (**Tabela 15**). O mutante *flc1Δ* já foi caracterizado em *C. neoformans* JEC21 (Zhang et al., 2019). Nesse estudo, os autores demonstram que esse mutante é hipocapsular, não produz melanina e possui defeitos na sua superfície, sendo sensível a SDS e outros estressores de parede celular. O mutante *flc1Δ* em *C. neoformans* Kn99α também é sensível a SDS (Tabela 15)

Assim, em linhas gerais, os mutantes *liz1Δ*, *utr1Δ*, *flc1Δ* e o mutante cujo gene de um transportador de ácidos monocarboxilados foi deletado podem ser sensíveis aos peptídeos por estarem associados ao metabolismo de acetil-COA, limitando a produção de fosfolípidos e ergosterol, tornando assim a membrana mais frágil. Porém, com exceção de *flc1Δ*, nenhum desses mutantes aparenta ser sensível a SDS (**Tabela 15**), de forma que esses genes podem estar envolvidos em outros processos que não os descritos acima.

A sensibilidade a SDS de *flc1Δ* pode ser causada por defeitos na parede celular. O comprometimento da parede celular em função da deleção dos ortólogos de *FLC1* foi observado nos fungos *S. cerevisiae*, *S. pombe* e *A. fumigatus* (Palmer et al., 2005; Protchenko et al., 2006; de Castro et al., 2017). Além de transportar flavina para o RE, esse transportador participa da homeostase de Ca^{2+} nos fungos *S. cerevisiae* e *A. fumigatus* (Rigamonti et al., 2015; de Castro et al., 2017). Como já mencionando anteriormente, esse cátion é importante para a manutenção da integridade da parede celular e para o reparo de membrana de células de mamíferos. Assim, é possível que a proteína Flc1 de *C. neoformans* também esteja envolvida na homeostase de Ca^{2+} e que essa homeostase seja importante para a tolerância do fungo ao AMP.

Palmitoil transferases

Um dos mutantes sensível ao peptídeo é o mutante *akr1Δ*, cujo gene codifica uma palmitoil transferase (PAT), enzima que catalisa a adição de palmitato a proteínas

transmembrânicas (Santiago-Tirado and Doering, 2016). Essa modificação pós-traducional é fundamental para a estabilidade e localização correta dessas proteínas na célula. As proteínas de membrana sem essa modificação ficam retidas no retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A partir do momento que ocorre a adição do palmitato, essas proteínas são direcionadas para a membrana plasmática da célula (Santiago-Tirado and Doering, 2016). Assim, a suscetibilidade de *akr1Δ* ao peptídeo ToAP2 pode ser devido à localização imprópria de um ou mais alvos dessa PAT, tornando a célula suscetível a estressores de superfície, como o SDS (**Tabela 15**).

Em *C. neoformans* foram identificados sete possíveis PATs, sendo a Akr1 uma delas (Nichols et al., 2015). Dado que no grupo já haviam mutantes independentes para algumas dessas possíveis PATs, a CIM do peptídeo para esses mutantes foi determinado afim de investigar se outras PATs também seriam importantes para a tolerância do fungo ao AMP (**Tabela 17**).

Tabela 17. CIM do peptídeo ToAP2 para as linhagens mutantes PAT.

Identificação	Linhagem	CIM
H99	MAT α	3
CBN134	<i>akr1Δ</i>	1,5 μ M
CBN198	<i>pfa3Δ</i>	3 μ M
CBN201	<i>pfa4Δ</i>	1,5 μ M
CBN124	<i>pfa5Δ</i>	3 μ M
DPG1	<i>erf2Δ</i>	3 μ M
Quad	<i>akr1Δ + pfa3Δ + pfa4Δ + pfa5Δ</i>	1,5 μ M

Os mutantes independentes *akr1Δ* e *pfa4Δ* foram sensíveis ao peptídeo, com valor de CIM equivalente à metade da CIM da linhagem selvagem. O gene *PFA4* de *C. neoformans* já foi caracterizado em publicações anteriores (Nichols et al., 2015; Santiago-Tirado et al., 2015). O mutante *pfa4Δ* é sensível a caspofungina, diversos estressores de

parede celular, de membrana plasmática, osmóticos e também é sensível a altas temperaturas (Nichols et al., 2015; Santiago-Tirado et al., 2015; Pianalto et al., 2019).

Dentre os possíveis alvos dessa PAT pode-se destacar proteínas envolvidas no tráfego de vesículas e quitina sintases, em especial as quitina sintases Chs1 e Chs3 (Santiago-Tirado et al., 2015), o que pode explicar a suscetibilidade aos estressores de superfície e também ao peptídeo ToAP2.

Uma vez que os demais mutantes de PAT testados nessa tese não foram suscetíveis ao peptídeo, possivelmente seus alvos não sejam necessários para a manutenção da integridade da membrana, parede celular ou outros processos envolvidos na tolerância do fungo ao peptídeo.

Um dos mutantes testados é um quádruplo mutante cujos genes *AKR1*, *PFA3*, *PFA4* e *PFA5* foram deletados. Apesar desse mutante não ter os genes das duas PATs envolvidas na suscetibilidade do fungo ao peptídeo, essa linhagem não é mais sensível do que os demais mutantes. Esse dado pode corroborar a hipótese que nas condições testadas a concentração mínima do peptídeo para ter algum efeito biológico é de 1,5 μM uma vez que o mutante quádruplo possui defeitos de crescimento mais pronunciados do que os mutantes únicos (dados do grupo do Dr. Alspaugh).

A sensibilidade dos mutantes *liz1Δ*, *utr1Δ* e do transportador de ácidos monocarbolixados descritos anteriormente pode ter relação indireta com a atividade das PATs. O acetil-COA é necessário para a biossíntese do palmitato (Nelson and Cox), de forma que a deleção desses genes em *C. neoformans* pode impactar de forma indireta o suprimento de palmitato da célula. O baixo suprimento de palmitato pode impactar a adição desse ácido graxo nas proteínas alvo das PATs, contribuindo para a sensibilidade ao peptídeo.

Integridade da parede celular.

Em geral, os dados até agora apresentados mostram que a integridade e estabilidade da membrana plasmática é fundamental para a tolerância do fungo ao peptídeo. No entanto, alguns dos nossos resultados também indicam que a parede celular é um importante componente necessário para a defesa do organismo aos AMPs.

Dentre os genes importantes identificados na varredura, o gene *CSR2* está diretamente envolvido com a síntese e manutenção da parede celular em *C. neoformans* (Banks et al., 2005). A proteína Csr2 atua como uma reguladora da Chs3, a quitina sintase mais importante na biossíntese de quitina (Banks et al., 2005). Os mutantes *csr2Δ* e *ch3Δ*

apresentam fenótipos extremamente similares entre si, dentre os quais pode-se destacar termo sensibilidade, hipersensibilidade a estressores de parede celular e membrana plasmática, sensibilidade a caspofungina entre outros (Banks et al., 2005; Pianalto et al., 2019).

Uma vez que Csr2 atua em conjunto com Chs3, a susceptibilidade do mutante independente *ch3Δ* gerado pelo grupo do Dr. Alspaugh ao peptídeo ToAP2 foi determinada. O mutante *ch3Δ* é sensível ao peptídeo segundo os critérios estabelecidos nesse trabalho, com a CIM de 1,5 μ M. Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que a integridade da parede celular é importante para a sobrevivência do fungo ao tratamento com o peptídeo.

A parede celular é uma estrutura robusta, porém elástica e dinâmica, fundamental para a viabilidade da célula (Gow et al., 2017). Dentre as suas diversas funções, a parede celular dá forma à célula, serve como ancoradouro para proteínas e outras biomoléculas, como a cápsula de *C.neoformans*, e protege o fungo contra choque osmótico, choque de temperatura, estresse mecânico entre outros (Levin, 2011).

Considerando o seu papel na proteção do fungo contra diversos estresses, a parede celular pode servir como uma barreira para o peptídeo e defeitos na sua estrutura poderiam facilitar o acesso do AMP ao seu alvo. Outra possível explicação é que a parede celular, até um certo nível, seria capaz de compensar os danos do peptídeo na membrana e manter a célula viva.

De fato, quando a célula sofre estresse mecânico na membrana plasmática, como por exemplo quando há aumento do turgor celular ou o esticamento excessivo da membrana, é disparada uma cascata de sinalizações que culmina na regulação da expressão gênica de genes envolvidos na biogênese da parede celular, síntese de β -glicanas, organização do citoesqueleto de actina entre outros (Levin, 2011). O mesmo efeito ocorre quando a célula sofre choque hiposmótico, que também eleva o turgor celular. A parede celular é remodelada para impedir que a célula lise em função do aumento do turgor e esticamento da membrana.

A via que responde majoritariamente a esses estresses é a via de manutenção da integridade da parede celular (CWI). Para averiguar se essa sinalização é importante para a tolerância do fungo ao peptídeo, o peptídeo ToAP2 foi testado no mutante independente *mpk1Δ*. A Mpk1 é a última quinase na via da CWI e quando ativada, fosforila diversos fatores de transcrição que vão regular a transcrição de genes envolvidos na resposta a estresse na parede celular (Levin, 2011).

Esse mutante também é suscetível ao peptídeo (CIM de 1,5 μ M), mostrando assim que a tolerância do fungo ao peptídeo ToAP2 é em parte mediada pela via da CWI. A ativação dessa via em resposta a AMPs em fungos já foi demonstrada para *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *Fusarium oxysporum* (Koo, 2004, Dracatos, 2016, Thevissen 2012)(Koo et al., 2004; Thevissen et al., 2012; Dracatos et al., 2016). Em *C. albicans* e *S. cerevisiae*, o peptídeo Pn-AMP1 provoca a despolarização da actina, que é um dos sinais para ativação da via da CWI (Koo et al., 2004). Já a defensina RsAFP2 se liga a ClcCer o que também leva à ativação da CWI (Thevissen et al., 2012). Possivelmente, em *C. neoformans*, a ativação dessa via pelo peptídeo ToAP2 seja em decorrência da perturbação da membrana plasmática.

Oxidoredutases e Outros.

Três possíveis proteínas com atividade de oxidoredutase são importantes para a tolerância do fungo ao peptídeo ToAP2. As oxidoredutases participam de diversos processos celulares, como a glicólise, o ciclo do ácido cítrico, respiração celular, metabolismo de aminoácidos, detoxificação de ROS, entre outros (Nelson and Cox). Há poucas informações a respeito da função dessas proteínas, de forma que não é possível especular a razão da sensibilidade ao AMP. Dos três mutantes, apenas *dhd1* Δ apresenta sensibilidade a SDS, indicando esse gene pode ser importante para a manutenção da integridade da membrana plasmática e parede celular.

O gene *HOG1* codifica a quinase Hog1, uma importante proteína da via de alta osmolaridade do glicerol (HOG). A via de HOG é a principal via de sinalização envolvida na adaptação da levedura ao aumento da osmolaridade do meio em que ela se encontra (Hohmann, 2002). Uma vez que a levedura sofre um choque hiperosmótico, osmosensores na membrana plasmática dão início à cascata de sinalização que culmina na fosforilação de Hog1 e a sua subsequente translocação para o núcleo, regulando a transcrição de diversos genes envolvidos na adaptação da levedura a esse estresse (Hohmann, 2002; O'Rourke and Herskowitz, 2002; Bahn et al., 2005). Em *C. neoformans* a quinase Hog1 é necessária para a resistência a estresses osmótico e oxidativo, regulação da síntese de ergosterol, produção de atributos de virulência, entre outros (Bahn et al., 2005; Bahn and Jung, 2013).

A importância da via de HOG na tolerância a diferentes AMPs já foi relatada para os fungos *C. albicans* e *F. oxysporum* (Vylkova et al., 2007; Argimon et al., 2011; Hayes et al., 2013; Dracatos et al., 2016). Em resposta ao tratamento com Hst-5, a via de HOG

é ativada em *C. albicans*, culminando na regulação da expressão de genes importantes para a resposta ao choque osmótico (Vylkova et al., 2007). A via de HOG também é ativada em *C. albicans* em resposta ao estresse oxidativo causado pelo peptídeo NaD1, diferentemente da Hst-5 cujo mecanismo de ação envolve o desbalanço osmótico da célula (Vylkova et al., 2007; Hayes et al., 2013).

Dessa forma, é possível especular que parte do mecanismo de ação do peptídeo ToAP2 possa ser o desbalanço osmótico e/ou a geração de ROS. É interessante pontuar que a via de HOG também coopera com a via CWI na adaptação a um agente estressor, havendo inclusive o *crossstalk* de proteínas sinalizadoras entre as duas vias (Rodriguez-Pena, 2010, (Rodriguez-Pena et al., 2010; Dunayevich et al., 2018), o que também pode contribuir para a suscetibilidade do mutante *hog1Δ* ao peptídeo.

Dos demais genes importantes para a tolerância ao ToAP2, *PRY1* e *PGI1* podem participar da manutenção da integridade da membrana e parede celular. *Pry1* de *S. cerevisiae* detoxifica a célula de pequenos compostos hidrofóbicos que podem causar danos à bicamada lipídica (Choudhary and Schneiter, 2012). A glicose-6-fosfato isomerase *Pgi1* é uma enzima da via da glicose que converte glicose-6-fosfato em frutose-6-fostato, precursora de quitina, de maneira que a ausência dessa enzima impacta tanto a síntese desse componente da parede celular quanto do piruvato, já que essa proteína faz parte da via glicolítica (Dickinson, 1991).

A enzima *Ubp8* é uma desubiquitinase integrante do complexo SAGA de remodelação da cromatina (Henry et al., 2003). O mutante *upb8Δ* em *S.pombe* é sensível a inibidores da síntese de ergosterol e os autores desse estudo especulam que essa proteína pode estar envolvida na regulação do tráfego de membranas (Fang et al., 2012). Por ser uma proteína envolvida na remodelação da cromatina, outros efeitos, como a alteração da transcrição de genes importantes para a resposta ao estresse, não podem ser descartadas.

Por fim, a *Mhs2* é uma proteína de reparo de DNA em *C.neoformans* (Boyce et al., 2017). A sensibilidade desse mutante ao peptídeo pode indicar que o ToAP2 tem algum efeito genotóxico para célula. Esse efeito pode ser devido à uma atividade primária, o peptídeo danificando o DNA diretamente, ou um efeito secundário da ação do ToAP2 na célula, como geração de ROS. Porém, é importante destacar que a deleção de *MHS2* aumenta a frequência de mutações em *C.neoformans*, gerando assim traços fenotípicos diferentes em relação à linhagem selvagem (Boyce et al., 2017). A sensibilidade ao peptídeo pode ser resultado da mudança desses traços fenotípicos, e não um efeito genotóxico per si.

Genes sem caracterização ou ortólogos conhecidos

Dos setes mutantes cujos genes deletados ainda não foram caracterizados e não possuem ortólogos conhecidos, quatro tem algum defeito de superfície, o que ajuda a explicar a sensibilidade ao peptídeo ToAP2. Nenhum desses mutantes parece ter algum defeito no tráfego de vesículas, uma vez todos toleram BFA da mesma forma que a linhagem selvagem (**Tabela 15**).

Nossos dados mostram que há pelo menos 3 pontos chave para tolerância do fungo ao peptídeo ToAP2; a síntese de ergosterol e MIPC, tráfego de vesículas e síntese e remodelamento da parede celular. O uso combinado de fármacos inibindo pontos dessas vias com o AMP pode ser uma interessante e versátil estratégia para o tratamento da criptococose. O próprio tráfego de vesículas parece ser um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos. A combinação de sortin 2 e fluconazol provou-se ser sinérgica na inibição do crescimento de *C.albicans* e *C.glabrata* (Demuyser et al., 2019).

No momento, novos ensaios estão sendo planejados para avaliar se o uso do peptídeo combinado com inibidores da síntese de ergosterol, parede celular e inibidores do tráfego de membranas reduz sinergicamente o crescimento e viabilidade do fungo.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, propomos que o principal alvo do peptídeo ToAP2 é a membrana plasmática do fungo e que o principal mecanismo de ação seja a desestabilização e permeabilização da bicamada lipídica, interferindo não só na integridade dessa estrutura mas também na atividade de proteínas associadas a ela.

O tráfego de vesículas é importante para a defesa do organismo contra o peptídeo, seja por restaurar o trechos da membrana danificada como localizar proteínas importantes para a resposta a esse tipo de estresse. O peptídeo também causa a desorganização das estruturas membranosas dentro da célula e extravasamento do conteúdo citoplasmático. A parede celular do fungo não parece ser um dos alvos primários do peptídeo, porém essa estrutura é fundamental para a sobrevivência da célula ao tratamento com o AMP.

Os peptídeos ToAP1 e ToAP2 parecem ser candidatos interessantes para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da criptococose. Nenhum isolado clínico foi resistente aos peptídeos. A cápsula e a melanina, que são importantes para a virulência do fungo, não protegem a levedura contra a ação dos peptídeos ToAP1 e ToAP2, podendo inclusive aumentar a suscetibilidade de *C.neoformans* a esses AMPs. Uma vez que *C.neoformans* modula esses dois atributos de virulência no hospedeiro, fármacos que tenham a sua atividade potencializada na presença dessas estruturas são bastante desejáveis.

Apesar do peptídeo ToAP2 não ser eficiente na erradicação completa do biofilme maduro de *C.neoformans*, ele é capaz de reduzir pela metade a sua viabilidade e de interferir na sua formação.

A combinação sinérgica dos peptídeos ToAP1 e ToAP2 com AMB na inibição do crescimento do fungo mostra o potencial da utilização desses peptídeos em combinação no tratamento da doença. O sinergismo do peptídeo ToAP2 e AMB também foi demonstrado em nível transcricional. Dado que o peptídeo ToAP2 é citotóxico para células de mamífero, o seu uso combinado com outros fármacos pode permitir que esse AMP seja usado na clínica.

Combinações com fármacos que inibem a síntese de ergosterol, MIPC e parede celular e que interferem no transporte de vesículas podem ser interessantes candidatos para o uso combinado com peptídeo ToAP2. Os dados aqui obtidos podem servir como parâmetro para o desenho de novos peptídeos, mantendo a mesma atividade

antimicrobiana do peptídeo ToAP2, porém com uma menor citotoxicidade para a célula. O desenho racional usando o ToAP2 como molde já se encontra em execução.

Por fim, nossos dados contribuem para a compreensão dos processos biológicos envolvidos na resposta de *C.neoformans* a peptídeos antimicrobianos, área do conhecimento ainda pouco explorada. Esperamos que esta tese possa contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

8. PERSPECTIVAS

Ainda há algumas perguntas a serem respondidas. Apesar de ter sido demonstrado que o peptídeo permeabiliza a célula, a forma pela qual ocorre essa permeabilização é desconhecida. Outros ensaios precisam ser realizados para investigar se o peptídeo abre poros na membrana ou se a permeabilização ocorre por outros mecanismo.

Nossa varredura genética não deixa claro qual processo de tráfego de membranas é importante para a tolerância do fungo ao peptídeo. Novos ensaios serão realizados para avaliar o papel da endocitose e exocitose separadamente na defesa do organismo contra o peptídeo. Além disso, novos ensaios de sinergismo estão sendo planejados para avaliar se o peptídeo em combinação com inibidores dessas vias também tem a sua atividade antifúngica potencializada.

Nosso trabalho também abre portas para o estudo de novos genes de *C.neoformans* importantes para a tolerância do fungo ao AMP, dado que diversos genes encontrados na nossa varredura ainda não foram caracterizados. Alguns ensaios fenotípicos como resistência a estressores osmóticos e estressores de parede serão realizados para contribuir com a caracterização funcional desses genes.

Por fim, temos a perspectiva de continuar os trabalhos com o peptídeo ToAP2, focando especialmente em formulações e modificações da sequência do peptídeo para reduzir a citotoxicidade do AMP, mantendo a sua atividade antifúngica. Além disso, testes em modelo animais também estão sendo planejados, para avaliar o uso terapêutico do peptídeo sozinho e em combinação com diferentes tipos de fármacos. Esperamos assim contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos e ou novas estratégias terapêuticas para o controle e erradicação da criptococose.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, F., and Hiraki, T. (2009). Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1788(3), 743-752. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.12.002.
- Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B.P., et al. (2011). The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* Induces Apoptosis in *Candida albicans*. *Front Microbiol* 2, 47. doi: 10.3389/fmicb.2011.00047.
- Aerts, A.M., Francois, I.E., Meert, E.M., Li, Q.T., Cammue, B.P., and Thevissen, K. (2007). The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13(4), 243-247. doi: 10.1159/000104753.
- Agrawal, P., Bhalla, S., Chaudhary, K., Kumar, R., Sharma, M., and Raghava, G.P.S. (2018). In Silico Approach for Prediction of Antifungal Peptides. *Front Microbiol* 9, 323. doi: 10.3389/fmicb.2018.00323.
- Alcouloumre, M.S., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Selsted, M.E., and Edwards, J.E. (1993a). Fungicidal properties of defensin NP-1 and activity against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(12), 2628-2632. doi: 10.1128/aac.37.12.2628.
- Alcouloumre, M.S., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Selsted, M.E., and Edwards, J.E., Jr. (1993b). Fungicidal properties of defensin NP-1 and activity against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 37(12), 2628-2632.
- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L.M.T., and Chikindas, M.L. (2017). Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. *Appl Environ Microbiol* 83(3). doi: 10.1128/AEM.02508-16.
- Almaaytah, A., and Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides* 51, 35-45. doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.021.
- Alves, D., and Olivia Pereira, M. (2014). Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling*. doi: 10.1080/08927014.2014.889120.
- Amaral, V.S.G., Fernandes, C.M., Felicio, M.R., Valle, A.S., Quintana, P.G., Almeida, C.C., et al. (2019). Psd2 pea defensin shows a preference for mimetic membrane rafts enriched with glucosylceramide and ergosterol. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1861(4), 713-728. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.12.020.
- Anderson, G.G., and O'Toole, G.A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 85-105. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3_5.
- Andersson, M., Boman, A., and Boman, H.G. (2003). *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell Mol Life Sci* 60(3), 599-606.
- Andrade-Silva, L., Ferreira-Paim, K., Mora, D.J., Da Silva, P.R., Andrade, A.A., Araujo, N.E., et al. (2013). Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 51(6), 635-640. doi: 10.3109/13693786.2012.761737.
- Araujo, G.R., Fontes, G.N., Leao, D., Rocha, G.M., Pontes, B., Sant'Anna, C., et al. (2016). *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides form branched and complex filamentous networks viewed by high-resolution microscopy. *J Struct Biol* 193(1), 75-82. doi: 10.1016/j.jsb.2015.11.010.

- Argimon, S., Fanning, S., Blankenship, J.R., and Mitchell, A.P. (2011). Interaction between the *Candida albicans* high-osmolarity glycerol (HOG) pathway and the response to human beta-defensins 2 and 3. *Eukaryot Cell* 10(2), 272-275. doi: 10.1128/EC.00133-10.
- Armstrong-James, D., Meintjes, G., and Brown, G.D. (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol* 22(3), 120-127. doi: 10.1016/j.tim.2014.01.001.
- Babiychuk, E.B., Monastyrskaya, K., Potez, S., and Draeger, A. (2009). Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death Differ* 16(8), 1126-1134. doi: 10.1038/cdd.2009.30.
- Baev, D., Rivetta, A., Vylkova, S., Sun, J.N., Zeng, G.F., Slayman, C.L., et al. (2004). The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, Histatin 5. *J Biol Chem* 279(53), 55060-55072. doi: 10.1074/jbc.M411031200.
- Bagnat, M., Chang, A., and Simons, K. (2001). Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell* 12(12), 4129-4138. doi: 10.1091/mbc.12.12.4129.
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7), 3254-3259. doi: 10.1073/pnas.060034697.
- Bahn, Y.S., and Jung, K.W. (2013). Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus*. *Eukaryot Cell* 12(12), 1564-1577. doi: 10.1128/EC.00218-13.
- Bahn, Y.S., Kojima, K., Cox, G.M., and Heitman, J. (2005). Specialization of the HOG pathway and its impact on differentiation and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* 16(5), 2285-2300. doi: 10.1091/mbc.e04-11-0987.
- Bairwa, G., Caza, M., Horianopoulos, L., Hu, G., and Kronstad, J. (2019). Role of clathrin-mediated endocytosis in the use of heme and hemoglobin by the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol* 21(3), e12961. doi: 10.1111/cmi.12961.
- Bang, C., Vierbuchen, T., Gutschmann, T., Heine, H., and Schmitz, R.A. (2017). Immunogenic properties of the human gut-associated archaeon *Methanomassiliicoccus luminyensis* and its susceptibility to antimicrobial peptides. *PLoS One* 12(10), e0185919. doi: 10.1371/journal.pone.0185919.
- Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., and Lodge, J.K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4(11), 1902-1912. doi: 10.1128/EC.4.11.1902-1912.2005.
- Barbosa, F.M., Daffre, S., Maldonado, R.A., Miranda, A., Nimrichter, L., and Rodrigues, M.L. (2007). Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. *FEMS Microbiol Lett* 274(2), 279-286. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00850.x.
- Baumann, G., and Mueller, P. (1974). A molecular model of membrane excitability. *J Supramol Struct* 2(5-6), 538-557. doi: 10.1002/jss.400020504.
- Baxter, A.A., Richter, V., Lay, F.T., Poon, I.K., Adda, C.G., Veneer, P.K., et al. (2015). The Tomato Defensin TPP3 Binds Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate via a Conserved Dimeric Cationic Grip Conformation To Mediate Cell Lysis. *Mol Cell Biol* 35(11), 1964-1978. doi: 10.1128/MCB.00282-15.
- Belokoneva, O.S., Satake, H., Mal'tseva, E.L., Pal'mina, N.P., Villegas, E., Nakajima, T., et al. (2004). Pore formation of phospholipid membranes by the action of two hemolytic arachnid peptides of different size. *Biochim Biophys Acta* 1664(2), 182-188. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.05.007.
- Benincasa, M., Scocchi, M., Pacor, S., Tossi, A., Nobili, D., Basaglia, G., et al. (2006). Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J Antimicrob Chemother* 58(5), 950-959. doi: 10.1093/jac/dkl382.

- Benincasa, M., Scocchi, M., Podda, E., Skerlavaj, B., Dolzani, L., and Gennaro, R. (2004). Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides* 25(12), 2055-2061. doi: 10.1016/j.peptides.2004.08.004.
- Bernardo, S.M., Khaliq, Z., Kot, J., Jones, J.K., and Lee, S.A. (2008). *Candida albicans* VPS1 contributes to protease secretion, filamentation, and biofilm formation. *Fungal Genet Biol* 45(6), 861-877. doi: 10.1016/j.fgb.2008.01.001.
- Bertout, S., Drakulovski, P., Kouanfack, C., Krasteva, D., Ngouana, T., Dunyach-Remy, C., et al. (2013). Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients. *Clin Microbiol Infect* 19(8), 763-769. doi: 10.1111/1469-0691.12019.
- Bonangelino, C.J., Chavez, E.M., and Bonifacio, J.S. (2002). Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13(7), 2486-2501. doi: 10.1091/mbc.02-01-0005.
- Bonapace, C.R., Bosso, J.A., Friedrich, L.V., and White, R.L. (2002). Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44(4), 363-366.
- Bonucci, A., Balducci, E., Pistolesi, S., and Pogni, R. (2013). The defensin-lipid interaction: insights on the binding states of the human antimicrobial peptide HNP-1 to model bacterial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1828(2), 758-764. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.11.011.
- Boyce, K.J., Wang, Y., Verma, S., Shakya, V.P.S., Xue, C., and Idnurm, A. (2017). Mismatch Repair of DNA Replication Errors Contributes to Microevolution in the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *MBio* 8(3). doi: 10.1128/mBio.00595-17.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3(3), 238-250. doi: 10.1038/nrmicro1098.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G., and White, T.C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4(165), 165rv113. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.
- Brown, H.E., Ost, K.S., Esher, S.K., Pianalto, K.M., Saelens, J.W., Guan, Z., et al. (2018). Identifying a novel connection between the fungal plasma membrane and pH-sensing. *Mol Microbiol* 109(4), 474-493. doi: 10.1111/mmi.13998.
- Casadevall, A., Rosas, A.L., and Nosanchuk, J.D. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol* 3(4), 354-358.
- Chang, Y.C., Bien, C.M., Lee, H., Espenshade, P.J., and Kwon-Chung, K.J. (2007). Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 64(3), 614-629. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05676.x.
- Chang, Y.C., Ingavale, S.S., Bien, C., Espenshade, P., and Kwon-Chung, K.J. (2009). Conservation of the sterol regulatory element-binding protein pathway and its pathobiological importance in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 8(11), 1770-1779. doi: 10.1128/EC.00207-09.
- Chang, Y.C., Jong, A., Huang, S., Zervas, P., and Kwon-Chung, K.J. (2006). CPS1, a homolog of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 polysaccharide synthase gene, is important for the pathobiology of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 74(7), 3930-3938. doi: 10.1128/IAI.00089-06.
- Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J. (1994). Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* 14(7), 4912-4919. doi: 10.1128/mcb.14.7.4912.
- Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J. (1998). Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 66(5), 2230-2236.
- Chang, Y.C., and Kwon-Chung, K.J. (1999). Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 181(18), 5636-5643.

- Chang, Y.C., Lamichhane, A.K., and Kwon-Chung, K.J. (2012). Role of actin-bundling protein Sac6 in growth of *Cryptococcus neoformans* at low oxygen concentration. *Eukaryot Cell* 11(7), 943-951. doi: 10.1128/EC.00120-12.
- Chang, Y.C., Penoyer, L.A., and Kwon-Chung, K.J. (1996). The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun* 64(6), 1977-1983.
- Chen, Y., Cao, L., Zhong, M., Zhang, Y., Han, C., Li, Q., et al. (2012). Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *PLoS One* 7(4), e34947. doi: 10.1371/journal.pone.0034947.
- Chen, Y.L., Brand, A., Morrison, E.L., Silao, F.G., Bigol, U.G., Malbas, F.F., Jr., et al. (2011). Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*. *Eukaryot Cell* 10(6), 803-819. doi: 10.1128/EC.00310-10.
- Cherniak, R., Valafar, H., Morris, L.C., and Valafar, F. (1998). *Cryptococcus neoformans* chemotyping by quantitative analysis of 1H nuclear magnetic resonance spectra of glucuronoxylomannans with a computer-simulated artificial neural network. *Clin Diagn Lab Immunol* 5(2), 146-159.
- Chiu, J.E., Thekkiniath, J., Mehta, S., Muller, C., Bracher, F., and Ben Mamoun, C. (2019). The yeast pantothenate kinase Cab1 is a master regulator of sterol metabolism and of susceptibility to ergosterol biosynthesis inhibitors. *J Biol Chem* 294(40), 14757-14767. doi: 10.1074/jbc.RA119.009791.
- Chong, H.S., Dagg, R., Malik, R., Chen, S., and Carter, D. (2010). In vitro susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *J Clin Microbiol* 48(11), 4115-4120. doi: 10.1128/JCM.01271-10.
- Chong, P.P., Chin, V.K., Wong, W.F., Madhavan, P., Yong, V.C., and Looi, C.Y. (2018). Transcriptomic and Genomic Approaches for Unravelling *Candida albicans* Biofilm Formation and Drug Resistance-An Update. *Genes (Basel)* 9(11). doi: 10.3390/genes9110540.
- Choudhary, V., and Schneider, R. (2012). Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(42), 16882-16887. doi: 10.1073/pnas.1209086109.
- Chow, E.W., Clancey, S.A., Billmyre, R.B., Averette, A.F., Granek, J.A., Mieczkowski, P., et al. (2017). Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Genet* 13(4), e1006667. doi: 10.1371/journal.pgen.1006667.
- Chrisman, C.J., Albuquerque, P., Guimaraes, A.J., Nieves, E., and Casadevall, A. (2011). Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog* 7(5), e1002047. doi: 10.1371/journal.ppat.1002047.
- Cleare, W., and Casadevall, A. (1999). Scanning electron microscopy of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* and the effect of glucose on capsular polysaccharide release. *Med Mycol* 37(4), 235-243.
- Collins, K.M., Thorngren, N.L., Fratti, R.A., and Wickner, W.T. (2005). Sec17p and HOPS, in distinct SNARE complexes, mediate SNARE complex disruption or assembly for fusion. *EMBO J* 24(10), 1775-1786. doi: 10.1038/sj.emboj.7600658.
- Conibear, E., and Stevens, T.H. (2000). Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. *Mol Biol Cell* 11(1), 305-323. doi: 10.1091/mbc.11.1.305.
- Cooper, S.T., and McNeil, P.L. (2015). Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. *Physiol Rev* 95(4), 1205-1240. doi: 10.1152/physrev.00037.2014.
- Cordero, R.J., Bergman, A., and Casadevall, A. (2013a). Temporal behavior of capsule enlargement by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 12(10), 1383-1388. doi: 10.1128/EC.00163-13.

- Cordero, R.J., Pontes, B., Frases, S., Nakouzi, A.S., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., et al. (2013b). Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. *J Immunol* 190(1), 317-323. doi: 10.4049/jimmunol.1202324.
- Cordoba, S., Afeltra, J., and Vitale, R.G. (2011). Evaluation of the in vitro activity of amphotericin B by time-kill curve methodology against large and small capsulate *C. neoformans* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71(3), 260-262. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.003.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K.J., He, W., Norton, R.S., et al. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 359(Pt 1), 35-45.
- Cowland, J.B., and Borregaard, N. (1999). The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol* 66(6), 989-995. doi: 10.1002/jlb.66.6.989.
- D'Souza, C.A., Alspaugh, J.A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G.M., Perfect, J.R., et al. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol* 21(9), 3179-3191. doi: 10.1128/MCB.21.9.3179-3191.2001.
- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., and Nakajima, T. (2002). Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 293(5), 1514-1522. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00423-0.
- Dal Peraro, M., and van der Goot, F.G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev Microbiol* 14(2), 77-92. doi: 10.1038/nrmicro.2015.3.
- Day, J.N., Chau, T.T., and Laloo, D.G. (2013). Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med* 368(26), 2522-2523. doi: 10.1056/NEJMc1305981.
- de Castro, P.A., Chiaratto, J., Morais, E.R., Dos Reis, T.F., Mitchell, T.K., Brown, N.A., et al. (2017). The putative flavin carrier family FlcA-C is important for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Virulence* 8(6), 797-809. doi: 10.1080/21505594.2016.1239010.
- De Lucca, A.J., Bland, J.M., Jacks, T.J., Grimm, C., and Walsh, T.J. (1998). Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin. *Med Mycol* 36(5), 291-298.
- De Lucca, A.J., and Walsh, T.J. (1999). Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 43(1), 1-11.
- de Medeiros, L.N., Domitrovic, T., de Andrade, P.C., Faria, J., Bergter, E.B., Weissmuller, G., et al. (2014). Psd1 binding affinity toward fungal membrane components as assessed by SPR: The role of glucosylceramide in fungal recognition and entry. *Biopolymers* 102(6), 456-464. doi: 10.1002/bip.22570.
- de Oliveira Junior, N.G., e Silva Cardoso, M.H., and Franco, O.L. (2013). Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. *Cell Mol Life Sci* 70(24), 4645-4658. doi: 10.1007/s00018-013-1345-x.
- DeBin, J.A., Maggio, J.E., and Strichartz, G.R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol* 264(2 Pt 1), C361-369.
- Degreif, D., Cucu, B., Budin, I., Thiel, G., and Bertl, A. (2019). Lipid determinants of endocytosis and exocytosis in budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864(7), 1005-1016. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.03.007.
- Demuyser, L., Van Dyck, K., Timmermans, B., and Van Dijck, P. (2019). Inhibition of Vesicular Transport Influences Fungal Susceptibility to Fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 63(5). doi: 10.1128/AAC.01998-18.
- Denning, D.W. (2002). Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother* 49(6), 889-891. doi: 10.1093/jac/dkf045.

- Dickinson, J.R. (1991). Biochemical and genetic studies on the function of, and relationship between, the PGI1- and CDC30-encoded phosphoglucose isomerases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 137(4), 765-770. doi: 10.1099/00221287-137-4-765.
- Dielbandhoesing, S.K., Zhang, H., Caro, L.H., van der Vaart, J.M., Klis, F.M., Verrips, C.T., et al. (1998). Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. *Appl Environ Microbiol* 64(10), 4047-4052.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29(1), 15-21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Doering, T.L., Nosanchuk, J.D., Roberts, W.K., and Casadevall, A. (1999). Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol* 37(3), 175-181.
- Dracatos, P.M., Payne, J., Di Pietro, A., Anderson, M.A., and Plummer, K.M. (2016). Plant Defensins NaD1 and NaD2 Induce Different Stress Response Pathways in Fungi. *Int J Mol Sci* 17(9). doi: 10.3390/ijms17091473.
- Dunayevich, P., Baltanas, R., Clemente, J.A., Couto, A., Sapochnik, D., Vasen, G., et al. (2018). Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway. *Sci Rep* 8(1), 15168. doi: 10.1038/s41598-018-33203-6.
- Dupre, S., and Haguener-Tsapis, R. (2003). Raft partitioning of the yeast uracil permease during trafficking along the endocytic pathway. *Traffic* 4(2), 83-96.
- Eisenman, H.C., Nosanchuk, J.D., Webber, J.B., Emerson, R.J., Camesano, T.A., and Casadevall, A. (2005). Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry* 44(10), 3683-3693. doi: 10.1021/bi047731m.
- Ejsing, C.S., Sampaio, J.L., Surendranath, V., Duchoslav, E., Ekroos, K., Klemm, R.W., et al. (2009). Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7), 2136-2141. doi: 10.1073/pnas.0811700106.
- Epand, R.M., and Vogel, H.J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1462(1-2), 11-28.
- Ermakova, E., and Zuev, Y. (2017). Effect of ergosterol on the fungal membrane properties. All-atom and coarse-grained molecular dynamics study. *Chem Phys Lipids* 209, 45-53. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2017.11.006.
- Ermishkin, L.N., Kasumov, K.M., and Potzeluyev, V.M. (1976). Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine. *Nature* 262(5570), 698-699. doi: 10.1038/262698a0.
- Etienne, O., Gasnier, C., Taddei, C., Voegel, J.C., Aunis, D., Schaaf, P., et al. (2005). Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials* 26(33), 6704-6712. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.068.
- Fang, Y., Hu, L., Zhou, X., Jaiseng, W., Zhang, B., Takami, T., et al. (2012). A genomewide screen in *Schizosaccharomyces pombe* for genes affecting the sensitivity of antifungal drugs that target ergosterol biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 56(4), 1949-1959. doi: 10.1128/AAC.05126-11.
- Fanos, V., and Cataldi, L. (2000). Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *J Chemother* 12(6), 463-470. doi: 10.1179/joc.2000.12.6.463.
- Feldmesser, M., Kress, Y., and Casadevall, A. (2001). Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* 147(Pt 8), 2355-2365. doi: 10.1099/00221287-147-8-2355.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Mednick, A., and Casadevall, A. (2000). The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis* 182(6), 1791-1795. doi: 10.1086/317614.
- Fernandes, K.E., Brockway, A., Haverkamp, M., Cuomo, C.A., van Ogtrop, F., Perfect, J.R., et al. (2018). Phenotypic Variability Correlates with Clinical Outcome in *Cryptococcus* Isolates Obtained from Botswanan HIV/AIDS Patients. *MBio* 9(5). doi: 10.1128/mBio.02016-18.

- Feyder, S., De Craene, J.O., Bar, S., Bertazzi, D.L., and Friant, S. (2015). Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int J Mol Sci* 16(1), 1509-1525. doi: 10.3390/ijms16011509.
- Firacative, C., Duan, S., and Meyer, W. (2014). *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* 9(8), e105076. doi: 10.1371/journal.pone.0105076.
- Fu, C., Donadio, N., Cardenas, M.E., and Heitman, J. (2018). Dissecting the Roles of the Calcineurin Pathway in Unisexual Reproduction, Stress Responses, and Virulence in *Cryptococcus deoneformans*. *Genetics* 208(2), 639-653. doi: 10.1534/genetics.117.300422.
- Fujimura, M., Ideguchi, M., Minami, Y., Watanabe, K., and Tadera, K. (2004). Purification, characterization, and sequencing of novel antimicrobial peptides, Tu-AMP 1 and Tu-AMP 2, from bulbs of tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *Biosci Biotechnol Biochem* 68(3), 571-577. doi: 10.1271/bbb.68.571.
- Fujimura, M., Ideguchi, M., Minami, Y., Watanabe, K., and Tadera, K. (2005). Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, Pp-AMP 1 and Pp-AMP 2, from Japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*). *Biosci Biotechnol Biochem* 69(3), 642-645. doi: 10.1271/bbb.69.642.
- Gall, W.E., Geething, N.C., Hua, Z., Ingram, M.F., Liu, K., Chen, S.I., et al. (2002). Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles in vivo. *Curr Biol* 12(18), 1623-1627. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01148-x.
- Gao, B., Xu, J., Rodriguez Mdel, C., Lanz-Mendoza, H., Hernandez-Rivas, R., Du, W., et al. (2010). Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie* 92(4), 350-359. doi: 10.1016/j.biochi.2010.01.011.
- Gati, C.D., Mortari, M.R., and Schwartz, E.F. (2012). Towards therapeutic applications of arthropod venom k(+) channel blockers in CNS neurologic diseases involving memory acquisition and storage. *J Toxicol* 2012, 756358. doi: 10.1155/2012/756358.
- Gaxiola, R.A., Yuan, D.S., Klausner, R.D., and Fink, G.R. (1998). The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7), 4046-4050. doi: 10.1073/pnas.95.7.4046.
- Gennaro, R., Scocchi, M., Merluzzi, L., and Zanetti, M. (1998). Biological characterization of a novel mammalian antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta* 1425(2), 361-368.
- Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88(4), 553-560. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81895-4.
- Goncalves, S., Silva, P.M., Felicio, M.R., de Medeiros, L.N., Kurtenbach, E., and Santos, N.C. (2017). Psd1 Effects on *Candida albicans* Planktonic Cells and Biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 249. doi: 10.3389/fcimb.2017.00249.
- Goodman, A., Goode, B.L., Matsudaira, P., and Fink, G.R. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 14(7), 2617-2629. doi: 10.1091/mbc.e03-01-0028.
- Gow, N.A.R., Latge, J.P., and Munro, C.A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr* 5(3). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.
- Greber, K.E., and Dawgul, M. (2017). Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials. *Curr Top Med Chem* 17(5), 620-628. doi: 10.2174/1568026616666160713143331.
- Grossman, N.T., and Casadevall, A. (2017). Physiological Differences in *Cryptococcus neoformans* Strains In Vitro versus In Vivo and Their Effects on Antifungal Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 61(3). doi: 10.1128/AAC.02108-16.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski Lda, S., Silva-Pereira, I., and Kyaw, C.M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of

- antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* 4, 353. doi: 10.3389/fmicb.2013.00353.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Smidt, K.S., de Oliveira, M.A., da Cunha Moraes Alvares, A., Rigonato, M.C., et al. (2016). Activity of Scorpion Venom-Derived Antifungal Peptides against Planktonic Cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* Biofilms. *Front Microbiol* 7, 1844. doi: 10.3389/fmicb.2016.01844.
- Guo, X., Ma, C., Du, Q., Wei, R., Wang, L., Zhou, M., et al. (2013). Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie* 95(9), 1784-1794. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.003.
- Haak, D., Gable, K., Beeler, T., and Dunn, T. (1997). Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J Biol Chem* 272(47), 29704-29710. doi: 10.1074/jbc.272.47.29704.
- Hagen, F., Hare Jensen, R., Meis, J.F., and Arendrup, M.C. (2016). Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato* isolates from Denmark. *Mycoses* 59(9), 576-584. doi: 10.1111/myc.12507.
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., et al. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* 78, 16-48. doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.009.
- Halestrap, A.P. (2013). Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol* 3(4), 1611-1643. doi: 10.1002/cphy.c130008.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J.M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276(8), 5707-5713. doi: 10.1074/jbc.M008557200.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., and Schroder, J.M. (2004). Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 123(3), 522-529. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23234.x.
- Harrison, P.L., Abdel-Rahman, M.A., Miller, K., and Strong, P.N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon* 88, 115-137. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.06.006.
- Hayes, B.M., Bleackley, M.R., Wiltshire, J.L., Anderson, M.A., Traven, A., and van der Weerden, N.L. (2013). Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD1 as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 57(8), 3667-3675. doi: 10.1128/AAC.00365-13.
- Helmerhorst, E.J., Van't Hof, W., Veerman, E.C., Simoons-Smit, I., and Nieuw Amerongen, A.V. (1997). Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem J* 326 (Pt 1), 39-45. doi: 10.1042/bj3260039.
- Helms, J.B., and Rothman, J.E. (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 360(6402), 352-354. doi: 10.1038/360352a0.
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., et al. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17(21), 2648-2663. doi: 10.1101/gad.1144003.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(2), 300-372. doi: 10.1128/mmlbr.66.2.300-372.2002.
- Hu, G., Caza, M., Bakkeren, E., Kretschmer, M., Bairwa, G., Reiner, E., et al. (2017a). A P4-ATPase subunit of the Cdc50 family plays a role in iron acquisition and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol* 19(6). doi: 10.1111/cmi.12718.
- Hu, G., and Kronstad, J.W. (2010). A putative P-type ATPase, Apt1, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 9(1), 74-83. doi: 10.1128/EC.00289-09.

- Hu, L., Yao, F., Ma, Y., Liu, Q., Chen, S., Hayafuji, T., et al. (2016). Genetic evidence for involvement of membrane trafficking in the action of 5-fluorouracil. *Fungal Genet Biol* 93, 17-24. doi: 10.1016/j.fgb.2016.05.007.
- Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., and Zeng, B. (2017b). Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian J Microbiol* 57(3), 270-277. doi: 10.1007/s12088-017-0657-1.
- Hua, Z., Fatheddin, P., and Graham, T.R. (2002). An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol Biol Cell* 13(9), 3162-3177. doi: 10.1091/mbc.e02-03-0172.
- Huang, M., Hebert, A.S., Coon, J.J., and Hull, C.M. (2015). Protein Composition of Infectious Spores Reveals Novel Sexual Development and Germination Factors in *Cryptococcus*. *PLoS Genet* 11(8), e1005490. doi: 10.1371/journal.pgen.1005490.
- Huang, W., Liao, G., Baker, G.M., Wang, Y., Lau, R., Paderu, P., et al. (2016). Lipid Flippase Subunit Cdc50 Mediates Drug Resistance and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio* 7(3). doi: 10.1128/mBio.00478-16.
- Idnurm, A., Bahn, Y.S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J.A., and Heitman, J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 3(10), 753-764. doi: 10.1038/nrmicro1245.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N.W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 180(5), 905-914. doi: 10.1083/jcb.200708010.
- Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E.S., and Shinoda, T. (2003). Effects of Melanin upon Susceptibility of *Cryptococcus* to Antifungals. *Microbiology and Immunology* 47(4), 271-277. doi: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x.
- Itoh, T., and Kaneko, H. (1977). The in vivo incorporation of [32P]-labeled orthophosphate into pyrophosphatidic acid and other phospholipids of *Cryptococcus neoformans* through cell growth. *Lipids* 12(10), 809-813. doi: 10.1007/bf02533269.
- Janbon, G., Himmelreich, U., Moyrand, F., Improvisi, L., and Dromer, F. (2001). Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* 42(2), 453-467. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02651.x.
- Janbon, G., Ormerod, K.L., Paulet, D., Byrnes, E.J., 3rd, Yadav, V., Chatterjee, G., et al. (2014). Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. *PLoS Genet* 10(4), e1004261. doi: 10.1371/journal.pgen.1004261.
- Jang, W.S., Bajwa, J.S., Sun, J.N., and Edgerton, M. (2010). Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 77(2), 354-370. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07210.x.
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19(3), 491-511. doi: 10.1128/CMR.00056-05.
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvone, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* 343(6174), 1247136. doi: 10.1126/science.1247136.
- Joffe, L.S., Schneider, R., Lopes, W., Azevedo, R., Staats, C.C., Kmetzsch, L., et al. (2017). The Anti-helminthic Compound Mebendazole Has Multiple Antifungal Effects against *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol* 8, 535. doi: 10.3389/fmicb.2017.00535.
- Jones, T.H., McClelland, E.E., McFeeters, H., and McFeeters, R.L. (2017). Novel Antifungal Activity for the Lectin Scytovirin: Inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Front Microbiol* 8, 755. doi: 10.3389/fmicb.2017.00755.
- Jong, A., Wu, C.H., Chen, H.M., Luo, F., Kwon-Chung, K.J., Chang, Y.C., et al. (2007). Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the

- pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. *Eukaryot Cell* 6(8), 1486-1496. doi: 10.1128/EC.00120-07.
- Juvvadi, P.R., Lee, S.C., Heitman, J., and Steinbach, W.J. (2017). Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence* 8(2), 186-197. doi: 10.1080/21505594.2016.1201250.
- Kandasamy, S.K., and Larson, R.G. (2006). Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1758(9), 1274-1284. doi: 10.1016/j.bbame.2006.02.030.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., and Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica* 56(2), 211-224.
- Kim, S., and Lee, D.G. (2019). Role of calcium in reactive oxygen species-induced apoptosis in *Candida albicans*: an antifungal mechanism of antimicrobial peptide, PMAP-23. *Free Radic Res* 53(1), 8-17. doi: 10.1080/10715762.2018.1511052.
- Kodedova, M., and Sychrova, H. (2015). Changes in the Sterol Composition of the Plasma Membrane Affect Membrane Potential, Salt Tolerance and the Activity of Multidrug Resistance Pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 10(9), e0139306. doi: 10.1371/journal.pone.0139306.
- Koo, J.C., Lee, B., Young, M.E., Koo, S.C., Cooper, J.A., Baek, D., et al. (2004). Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant Cell Physiol* 45(11), 1669-1680. doi: 10.1093/pcp/pch189.
- Koshlukova, S.E., Lloyd, T.L., Araujo, M.W., and Edgerton, M. (1999). Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J Biol Chem* 274(27), 18872-18879.
- Krysan, D.J. (2015). Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. *Fungal Genet Biol* 78, 93-98. doi: 10.1016/j.fgb.2014.12.001.
- Kubler, E., and Riezman, H. (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J* 12(7), 2855-2862.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E., Wickes, B.L., Meyer, W., Cuomo, C.A., Wollenburg, K.R., et al. (2017). The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* 2(1). doi: 10.1128/mSphere.00357-16.
- LaFleur, M.D., Kumamoto, C.A., and Lewis, K. (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50(11), 3839-3846. doi: 10.1128/AAC.00684-06.
- Lai, Y., and Gallo, R.L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30(3), 131-141. doi: 10.1016/j.it.2008.12.003.
- Lee, H., Hwang, J.S., and Lee, D.G. (2017). Scolopendin, an antimicrobial peptide from centipede, attenuates mitochondrial functions and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochem J* 474(5), 635-645. doi: 10.1042/BCJ20161039.
- Lee, H., Khanal Lamichhane, A., Garraffo, H.M., Kwon-Chung, K.J., and Chang, Y.C. (2012). Involvement of PDK1, PKC and TOR signalling pathways in basal fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 84(1), 130-146. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08016.x.
- Lee, I.H., Cho, Y., and Lehrer, R.I. (1997). Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect Immun* 65(7), 2898-2903.
- Leidl, K., Liebisch, G., Richter, D., and Schmitz, G. (2008). Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. *Biochim Biophys Acta* 1781(10), 655-664. doi: 10.1016/j.bbalip.2008.07.008.
- Lenoir, G., Williamson, P., Puts, C.F., and Holthuis, J.C. (2009). Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. *J Biol Chem* 284(27), 17956-17967. doi: 10.1074/jbc.M109.013722.

- Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189(4), 1145-1175. doi: 10.1534/genetics.111.128264.
- Levitz, S.M., Selsted, M.E., Ganz, T., Lehrer, R.I., and Diamond, R.D. (1986). In vitro killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *J Infect Dis* 154(3), 483-489.
- Lewis, J.H., Zimmerman, H.J., Benson, G.D., and Ishak, K.G. (1984). Hepatic injury associated with ketoconazole therapy. Analysis of 33 cases. *Gastroenterology* 86(3), 503-513.
- Li, D., Zhang, X., Li, Z., Yang, J., Pan, J., and Zhu, X. (2012a). *Cryptococcus neoformans* Ca(2+) homeostasis requires a chloride channel/antiporter Clc1 in JEC21, but not in H99. *FEMS Yeast Res* 12(1), 69-77. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00763.x.
- Li, M., Liao, Y., Chen, M., Pan, W.H., and Weng, L.X. (2012b). Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16(2), 175-179.
- Li, R. (1997). Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 136(3), 649-658. doi: 10.1083/jcb.136.3.649.
- Li, R., Kumar, R., Tati, S., Puri, S., and Edgerton, M. (2013). *Candida albicans* flu1-mediated efflux of salivary histatin 5 reduces its cytosolic concentration and fungicidal activity. *Antimicrob Agents Chemother* 57(4), 1832-1839. doi: 10.1128/AAC.02295-12.
- Liaw, S.J., Wu, H.C., and Hsueh, P.R. (2010). Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. *Clin Microbiol Infect* 16(6), 696-703. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02930.x.
- Limper, A.H., Adenis, A., Le, T., and Harrison, T.S. (2017). Fungal infections in HIV/AIDS. *Lancet Infect Dis* 17(11), e334-e343. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30303-1.
- Lin, X. (2009). *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* 9(4), 401-416. doi: 10.1016/j.meegid.2009.01.013.
- Lin, X., and Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 60, 69-105. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142102.
- Lis, M., Bhatt, S., Schoenly, N.E., Lee, A.Y., Nislow, C., and Bobek, L.A. (2013). Chemical genomic screening of a *Saccharomyces cerevisiae* genomewide mutant collection reveals genes required for defense against four antimicrobial peptides derived from proteins found in human saliva. *Antimicrob Agents Chemother* 57(2), 840-847. doi: 10.1128/AAC.01439-12.
- Lis, M., Fuss, J.R., and Bobek, L.A. (2009). Exploring the mode of action of antimicrobial peptide MUC7 12-mer by fitness profiling of *Saccharomyces cerevisiae* genomewide mutant collection. *Antimicrob Agents Chemother* 53(9), 3762-3769. doi: 10.1128/AAC.00668-09.
- Lopez-Rodriguez, A., Trejo, A.C., Coyne, L., Halliwell, R.F., Miledi, R., and Martinez-Torres, A. (2007). The product of the gene GEF1 of *Saccharomyces cerevisiae* transports Cl⁻ across the plasma membrane. *FEMS Yeast Res* 7(8), 1218-1229. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00279.x.
- Los, F.C., Randis, T.M., Aroian, R.V., and Ratner, A.J. (2013). Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 77(2), 173-207. doi: 10.1128/MMBR.00052-12.
- Love, M.I., Anders, S., Kim, V., and Huber, W. (2015). RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Res* 4, 1070. doi: 10.12688/f1000research.7035.1.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15(12), 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

- Ma, Y., Jiang, W., Liu, Q., Ryuko, S., and Kuno, T. (2011). Genome-wide screening for genes associated with FK506 sensitivity in fission yeast. *PLoS One* 6(8), e23422. doi: 10.1371/journal.pone.0023422.
- Macura, N., Zhang, T., and Casadevall, A. (2007). Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration. *Infect Immun* 75(4), 1904-1915. doi: 10.1128/IAI.01258-06.
- Madania, A., Dumoulin, P., Grava, S., Kitamoto, H., Scharer-Brodbeck, C., Soulard, A., et al. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex. *Mol Biol Cell* 10(10), 3521-3538. doi: 10.1091/mbc.10.10.3521.
- Mansoorabadi, S.O., Thibodeaux, C.J., and Liu, H.W. (2007). The diverse roles of flavin coenzymes--nature's most versatile thespians. *J Org Chem* 72(17), 6329-6342. doi: 10.1021/jo0703092.
- Marcireau, C., Joets, J., Pousset, D., Guilloton, M., and Karst, F. (1996). FEN2: a gene implicated in the catabolite repression-mediated regulation of ergosterol biosynthesis in yeast. *Yeast* 12(6), 531-539. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199605)12:6%3C531::AID-YEA934%3E3.O.CO;2-E.
- Marques-Neto, L.M., Trentini, M.M., das Neves, R.C., Resende, D.P., Procopio, V.O., da Costa, A.C., et al. (2018). Antimicrobial and Chemotactic Activity of Scorpion-Derived Peptide, ToAP2, against *Mycobacterium massiliensis*. *Toxins (Basel)* 10(6). doi: 10.3390/toxins10060219.
- Martinez, L.R., and Casadevall, A. (2005). Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect Immun* 73(10), 6350-6362. doi: 10.1128/IAI.73.10.6350-6362.2005.
- Martinez, L.R., and Casadevall, A. (2006a). *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect Immun* 74(11), 6118-6123. doi: 10.1128/IAI.00995-06.
- Martinez, L.R., and Casadevall, A. (2006b). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 50(3), 1021-1033. doi: 10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006.
- Martinez, L.R., and Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl Environ Microbiol* 73(14), 4592-4601. doi: 10.1128/AEM.02506-06.
- Martinez, L.R., Christaki, E., and Casadevall, A. (2006). Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronylmannan antagonizes antifungal drug action against cryptococcal biofilms in vitro. *J Infect Dis* 194(2), 261-266. doi: 10.1086/504722.
- Martinez, L.R., Mihu, M.R., Han, G., Frases, S., Cordero, R.J., Casadevall, A., et al. (2010). The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials* 31(4), 669-679. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.087.
- Martinez, L.R., Moussai, D., and Casadevall, A. (2004). Antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronylmannan inhibits the release of capsular antigen. *Infect Immun* 72(6), 3674-3679. doi: 10.1128/IAI.72.6.3674-3679.2004.
- Mason, A.J., Marquette, A., and Bechinger, B. (2007). Zwitterionic phospholipids and sterols modulate antimicrobial peptide-induced membrane destabilization. *Biophys J* 93(12), 4289-4299. doi: 10.1529/biophysj.107.116681.
- Maxson, M.E., Cook, E., Casadevall, A., and Zaragoza, O. (2007a). The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genet Biol* 44(3), 180-186. doi: 10.1016/j.fgb.2006.07.010.
- Maxson, M.E., Dadachova, E., Casadevall, A., and Zaragoza, O. (2007b). Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Eukaryot Cell* 6(1), 95-109. doi: 10.1128/EC.00306-06.

- McCarthy, P.J., Troke, P.F., and Gull, K. (1985). Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 131(4), 775-780. doi: 10.1099/00221287-131-4-775.
- McNeil, P.L., and Baker, M.M. (2001). Cell surface events during resealing visualized by scanning-electron microscopy. *Cell Tissue Res* 304(1), 141-146. doi: 10.1007/s004410000286.
- McNeil, P.L., and Steinhardt, R.A. (2003). Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 697-731. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.140101.
- McNeil, P.L., Vogel, S.S., Miyake, K., and Terasaki, M. (2000). Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1891-1902.
- Meiller, T.F., Hube, B., Schild, L., Shirliff, M.E., Scheper, M.A., Winkler, R., et al. (2009). A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One* 4(4), e5039. doi: 10.1371/journal.pone.0005039.
- Meletiadis, J., Pournaras, S., Roilides, E., and Walsh, T.J. (2010). Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54(2), 602-609. doi: 10.1128/AAC.00999-09.
- Mello, E.O., Ribeiro, S.F., Carvalho, A.O., Santos, I.S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., et al. (2011). Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Curr Microbiol* 62(4), 1209-1217. doi: 10.1007/s00284-010-9847-3.
- Menard, S., Forster, V., Lotz, M., Gutle, D., Duerr, C.U., Gallo, R.L., et al. (2008). Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *J Exp Med* 205(1), 183-193. doi: 10.1084/jem.20071022.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., et al. (2002). Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur J Biochem* 269(19), 4799-4810.
- Moerman, L., Verdonck, F., Willems, J., Tytgat, J., and Bosteels, S. (2003). Antimicrobial peptides from scorpion venom induce Ca(2+) signaling in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 311(1), 90-97.
- Moyrand, F., Chang, Y.C., Himmelreich, U., Kwon-Chung, K.J., and Janbon, G. (2004). Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. *Eukaryot Cell* 3(6), 1513-1524. doi: 10.1128/EC.3.6.1513-1524.2004.
- Mukhopadhyay, K., Kohli, A., and Prasad, R. (2002). Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob Agents Chemother* 46(12), 3695-3705. doi: 10.1128/aac.46.12.3695-3705.2002.
- Mukhopadhyay, K., Prasad, T., Saini, P., Pucadyil, T.J., Chattopadhyay, A., and Prasad, R. (2004). Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5), 1778-1787. doi: 10.1128/aac.48.5.1778-1787.2004.
- Mullins, C., and Bonifacino, J.S. (2001). Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, alpha-factor maturation, and interactions with clathrin. *Mol Cell Biol* 21(23), 7981-7994. doi: 10.1128/MCB.21.23.7981-7994.2001.
- Munn, A.L., Heese-Peck, A., Stevenson, B.J., Pichler, H., and Riezman, H. (1999). Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Mol Biol Cell* 10(11), 3943-3957. doi: 10.1091/mbc.10.11.3943.
- Muthusamy, B.P., Natarajan, P., Zhou, X., and Graham, T.R. (2009). Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1791(7), 612-619. doi: 10.1016/j.bbaliip.2009.03.004.

- Mylonakis, E., Ausubel, F.M., Perfect, J.R., Heitman, J., and Calderwood, S.B. (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24), 15675-15680. doi: 10.1073/pnas.232568599.
- Nakase, M., Tani, M., Morita, T., Kitamoto, H.K., Kashiwazaki, J., Nakamura, T., et al. (2010). Mannosylinositol phosphorylceramide is a major sphingolipid component and is required for proper localization of plasma-membrane proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 123(Pt 9), 1578-1587. doi: 10.1242/jcs.059139.
- Nakatsuji, T., and Gallo, R.L. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol* 132(3 Pt 2), 887-895. doi: 10.1038/jid.2011.387.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger - 6ED*.
- Nichols, C.B., Ost, K.S., Grogan, D.P., Pianalto, K., Hasan, S., and Alspaugh, J.A. (2015). Impact of Protein Palmitoylation on the Virulence Potential of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 14(7), 626-635. doi: 10.1128/EC.00010-15.
- Nicola, A.M., Albuquerque, P., Paes, H.C., Fernandes, L., Costa, F.F., Kioshima, E.S., et al. (2019). Antifungal drugs: New insights in research & development. *Pharmacol Ther* 195, 21-38. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.008.
- Nikawa, H., Fukushima, H., Makihira, S., Hamada, T., and Samaranayake, L.P. (2004). Fungicidal effect of three new synthetic cationic peptides against *Candida albicans*. *Oral Dis* 10(4), 221-228. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01010.x.
- Nosanchuk, J.D., and Casadevall, A. (1997). Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infect Immun* 65(5), 1836-1841.
- Nosanchuk, J.D., and Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 5(4), 203-223.
- Nosanchuk, J.D., Rosas, A.L., Lee, S.C., and Casadevall, A. (2000). Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet* 355(9220), 2049-2050. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02356-4.
- O'Meara, T.R., and Alspaugh, J.A. (2012). The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin Microbiol Rev* 25(3), 387-408. doi: 10.1128/CMR.00001-12.
- O'Rourke, S.M., and Herskowitz, I. (2002). A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol* 22(13), 4739-4749. doi: 10.1128/mcb.22.13.4739-4749.2002.
- Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S.D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* 25(5), 229-235. doi: 10.1016/s0968-0004(00)01543-7.
- Okuda, D., Yomogida, S., Kuwahara-Arai, K., Hitamatsu, K., Tamura, H., and Nagaoka, I. (2009). Augmentation of the antimicrobial activities of guinea pig cathelicidin CAP11-derived peptides by amino acid substitutions. *Int J Mol Med* 23(4), 501-508. doi: 10.3892/ijmm_00000157.
- Ortiz, E., Gurrola, G.B., Schwartz, E.F., and Possani, L.D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon* 93, 125-135. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.11.233.
- Ost, K.S., O'Meara, T.R., Huda, N., Esher, S.K., and Alspaugh, J.A. (2015). The *Cryptococcus neoformans* alkaline response pathway: identification of a novel rim pathway activator. *PLoS Genet* 11(4), e1005159. doi: 10.1371/journal.pgen.1005159.
- Palmer, C.P., Aydar, E., and Djamgoz, M.B. (2005). A microbial TRP-like polycystic-kidney-disease-related ion channel gene. *Biochem J* 387(Pt 1), 211-219. doi: 10.1042/BJ20041710.
- Pan, W., Khayhan, K., Hagen, F., Wahyuningsih, R., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., et al. (2012). Resistance of Asian *Cryptococcus neoformans* serotype A is confined to few microsatellite genotypes. *PLoS One* 7(3), e32868. doi: 10.1371/journal.pone.0032868.

- Park, B.J., Wannemuehler, K.A., Marston, B.J., Govender, N., Pappas, P.G., and Chiller, T.M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23(4), 525-530. doi: 10.1097/QAD.0b013e328322ffac.
- Park, C.B., Yi, K.S., Matsuzaki, K., Kim, M.S., and Kim, S.C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15), 8245-8250. doi: 10.1073/pnas.150518097.
- Payne, J.A., Bleackley, M.R., Lee, T.H., Shafee, T.M., Poon, I.K., Hulett, M.D., et al. (2016). The plant defensin NaD1 introduces membrane disorder through a specific interaction with the lipid, phosphatidylinositol 4,5 biphosphate. *Biochim Biophys Acta* 1858(6), 1099-1109. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.02.016.
- Penalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst, H.N., Jr. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* 16(6), 291-300. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.006.
- Perfect, J.R. (2017). The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*. doi: 10.1038/nrd.2017.46.
- Perlin, D.S., Rautemaa-Richardson, R., and Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* 17(12), e383-e392. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X.
- Pfaller, M.A., Castanheira, M., Diekema, D.J., Messer, S.A., and Jones, R.N. (2011). Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71(3), 252-259. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.07.007.
- Phan, H.L., Finlay, J.A., Chu, D.S., Tan, P.K., Kirchhausen, T., and Payne, G.S. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* APS1 gene encodes a homolog of the small subunit of the mammalian clathrin AP-1 complex: evidence for functional interaction with clathrin at the Golgi complex. *EMBO J* 13(7), 1706-1717.
- Pianalto, K.M., Billmyre, R.B., Telzrow, C.L., and Alspaugh, J.A. (2019). Roles for Stress Response and Cell Wall Biosynthesis Pathways in Caspofungin Tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 213(1), 213-227. doi: 10.1534/genetics.119.302290.
- Pierini, L.M., and Doering, T.L. (2001). Spatial and temporal sequence of capsule construction in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 41(1), 105-115. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02504.x.
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P.F., van Meer, G., and Holthuis, J.C. (2003). Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell* 14(3), 1240-1254. doi: 10.1091/mbc.e02-08-0501.
- Pomorski, T., and Menon, A.K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci* 63(24), 2908-2921. doi: 10.1007/s00018-006-6167-7.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., and Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem* 264(2), 287-300.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., and Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31(49), 12416-12423.
- Price, L.B., and Shand, R.F. (2000). Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol* 182(17), 4951-4958. doi: 10.1128/jb.182.17.4951-4958.2000.
- Primon-Barros, M., and Jose Macedo, A. (2017). Animal Venom Peptides: Potential for New Antimicrobial Agents. *Curr Top Med Chem* 17(10), 1119-1156. doi: 10.2174/1568026616666160930151242.

- Protchenko, O., Rodriguez-Suarez, R., Androphy, R., Bussey, H., and Philpott, C.C. (2006). A screen for genes of heme uptake identifies the FLC family required for import of FAD into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 281(30), 21445-21457. doi: 10.1074/jbc.M512812200.
- Puri, S., and Edgerton, M. (2014). How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. *Eukaryot Cell* 13(8), 958-964. doi: 10.1128/EC.00095-14.
- Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., et al. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* 17(8), 873-881. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30243-8.
- Rautenbach, M., Troskie, A.M., and Vosloo, J.A. (2016). Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. *Biochimie* 130, 132-145. doi: 10.1016/j.biochi.2016.05.013.
- Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1863(12), 2977-2992. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
- Reese, A.J., Yoneda, A., Breger, J.A., Beauvais, A., Liu, H., Griffith, C.L., et al. (2007). Loss of cell wall alpha(1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol Microbiol* 63(5), 1385-1398. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05551.x.
- Rieder, S.E., and Emr, S.D. (1997). A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol Biol Cell* 8(11), 2307-2327. doi: 10.1091/mbc.8.11.2307.
- Rigamonti, M., Groppi, S., Belotti, F., Ambrosini, R., Filippi, G., Martegani, E., et al. (2015). Hypotonic stress-induced calcium signaling in *Saccharomyces cerevisiae* involves TRP-like transporters on the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Calcium* 57(2), 57-68. doi: 10.1016/j.ceca.2014.12.003.
- Rivera, J., Feldmesser, M., Cammer, M., and Casadevall, A. (1998). Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. *Infect Immun* 66(10), 5027-5030.
- Rizzo, J., Colombo, A.C., Zamith-Miranda, D., Silva, V.K.A., Allegood, J.C., Casadevall, A., et al. (2018). The putative flippase Apt1 is required for intracellular membrane architecture and biosynthesis of polysaccharide and lipids in *Cryptococcus neoformans*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865(3), 532-541. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.12.007.
- Rizzo, J., Oliveira, D.L., Joffe, L.S., Hu, G., Gazos-Lopes, F., Fonseca, F.L., et al. (2014). Role of the Apt1 protein in polysaccharide secretion by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 13(6), 715-726. doi: 10.1128/EC.00273-13.
- Robbins, N., Caplan, T., and Cowen, L.E. (2017). Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu Rev Microbiol* 71, 753-775. doi: 10.1146/annurev-micro-030117-020345.
- Robertson, E.J., Najjuka, G., Rolfes, M.A., Akampurira, A., Jain, N., Anantharanjit, J., et al. (2014). *Cryptococcus neoformans* ex vivo capsule size is associated with intracranial pressure and host immune response in HIV-associated cryptococcal meningitis. *J Infect Dis* 209(1), 74-82. doi: 10.1093/infdis/jit435.
- Robinson, M.S. (2015). Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* 16(12), 1210-1238. doi: 10.1111/tra.12335.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., et al. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7(1), 58-67. doi: 10.1128/EC.00370-07.
- Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., et al. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 6(1), 48-59. doi: 10.1128/EC.00318-06.

- Rodriguez-Pena, J.M., Garcia, R., Nombela, C., and Arroyo, J. (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* 27(8), 495-502. doi: 10.1002/yea.1792.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 11(4), 275-288. doi: 10.1038/nri2939.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., and Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* 68(6), 3696-3703. doi: 10.1128/iai.68.6.3696-3703.2000.
- Rossato, L., Loreto, E.S., Venturini, T.P., Azevedo, M.I., Weiblen, C., Botton, S.A., et al. (2015). In vitro interaction of antifungal and antibacterial drugs against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* before and after capsular induction. *Med Mycol* 53(8), 885-889. doi: 10.1093/mmy/myv059.
- Rothstein, D.M., Spacciopoli, P., Tran, L.T., Xu, T., Roberts, F.D., Dalla Serra, M., et al. (2001). Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* 45(5), 1367-1373. doi: 10.1128/AAC.45.5.1367-1373.2001.
- Sagaram, U.S., El-Mounadi, K., Buchko, G.W., Berg, H.R., Kaur, J., Pandurangi, R.S., et al. (2013). Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin MtDef4: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. *PLoS One* 8(12), e82485. doi: 10.1371/journal.pone.0082485.
- Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M., and Tanaka, K. (2004). Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15(7), 3418-3432. doi: 10.1091/mbc.e03-11-0829.
- Sangalli-Leite, F., Scorzoni, L., Mesa-Arango, A.C., Casas, C., Herrero, E., Gianinni, M.J., et al. (2011). Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect* 13(5), 457-467. doi: 10.1016/j.micinf.2011.01.015.
- Santiago-Tirado, F.H., and Doering, T.L. (2016). All about that fat: Lipid modification of proteins in *Cryptococcus neoformans*. *J Microbiol* 54(3), 212-222. doi: 10.1007/s12275-016-5626-6.
- Santiago-Tirado, F.H., Peng, T., Yang, M., Hang, H.C., and Doering, T.L. (2015). A Single Protein S-acyl Transferase Acts through Diverse Substrates to Determine Cryptococcal Morphology, Stress Tolerance, and Pathogenic Outcome. *PLoS Pathog* 11(5), e1004908. doi: 10.1371/journal.ppat.1004908.
- Scheffer, L.L., Sreetama, S.C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K.J., Defour, A., et al. (2014). Mechanism of Ca(2+)-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat Commun* 5, 5646. doi: 10.1038/ncomms6646.
- Schwartz, E.F., Bartok, A., Schwartz, C.A., Papp, F., Gomez-Lagunas, F., Panyi, G., et al. (2013). OcyKTx2, a new K(+)-channel toxin characterized from the venom of the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* 46, 40-46. doi: 10.1016/j.peptides.2013.04.021.
- Scorzoni, L., de Paula, E.S.A.C., Marcos, C.M., Assato, P.A., de Melo, W.C., de Oliveira, H.C., et al. (2017). Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front Microbiol* 8, 36. doi: 10.3389/fmicb.2017.00036.
- Sebastian, T.T., Baldridge, R.D., Xu, P., and Graham, T.R. (2012). Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1821(8), 1068-1077. doi: 10.1016/j.bbali.2011.12.007.
- Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6(6), 551-557. doi: 10.1038/ni1206.
- Shapiro, R.S., Robbins, N., and Cowen, L.E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(2), 213-267. doi: 10.1128/MMBR.00045-10.

- Shen, G., Whittington, A., and Wang, P. (2011). Wsp1, a GBD/CRIB domain-containing WASP homolog, is required for growth, morphogenesis, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 10(4), 521-529. doi: 10.1128/EC.00274-10.
- Shi, F., Kawai, S., Mori, S., Kono, E., and Murata, K. (2005). Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* 272(13), 3337-3349. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04749.x.
- Siafakas, A.R., Wright, L.C., Sorrell, T.C., and Djordjevic, J.T. (2006). Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. *Eukaryot Cell* 5(3), 488-498. doi: 10.1128/EC.5.3.488-498.2006.
- Singh, A., MacKenzie, A., Girnun, G., and Del Poeta, M. (2017). Analysis of sphingolipids, sterols, and phospholipids in human pathogenic *Cryptococcus* strains. *J Lipid Res* 58(10), 2017-2036. doi: 10.1194/jlr.M078600.
- Singh, A., and Prasad, R. (2011). Comparative lipidomics of azole sensitive and resistant clinical isolates of *Candida albicans* reveals unexpected diversity in molecular lipid imprints. *PLoS One* 6(4), e19266. doi: 10.1371/journal.pone.0019266.
- Skerlavaj, B., Benincasa, M., Risso, A., Zanetti, M., and Gennaro, R. (1999). SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett* 463(1-2), 58-62.
- Skerlavaj, B., Scocchi, M., Gennaro, R., Risso, A., and Zanetti, M. (2001). Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3), 715-722. doi: 10.1128/AAC.45.3.715-722.2001.
- Smaczynska-de, R., Il, Allwood, E.G., Aghamohammadzadeh, S., Hettema, E.H., Goldberg, M.W., and Ayscough, K.R. (2010). A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *J Cell Sci* 123(Pt 20), 3496-3506. doi: 10.1242/jcs.070508.
- Stamm, A.M., Diasio, R.B., Dismukes, W.E., Shadomy, S., Cloud, G.A., Bowles, C.A., et al. (1987). Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *Am J Med* 83(2), 236-242. doi: 10.1016/0002-9343(87)90691-7.
- Steenbergen, J.N., Shuman, H.A., and Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26), 15245-15250. doi: 10.1073/pnas.261418798.
- Stolz, J., Caspari, T., Carr, A.M., and Sauer, N. (2004). Cell division defects of *Schizosaccharomyces pombe* liz1- mutants are caused by defects in pantothenate uptake. *Eukaryot Cell* 3(2), 406-412. doi: 10.1128/ec.3.2.406-412.2004.
- Swidergall, M., Ernst, A.M., and Ernst, J.F. (2013). *Candida albicans* mucin Msb2 is a broad-range protectant against antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 57(8), 3917-3922. doi: 10.1128/AAC.00862-13.
- Swidergall, M., and Ernst, J.F. (2014). Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryot Cell* 13(8), 950-957. doi: 10.1128/EC.00093-14.
- Szafranski-Schneider, E., Swidergall, M., Cottier, F., Tielker, D., Roman, E., Pla, J., et al. (2012). Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* 8(2), e1002501. doi: 10.1371/journal.ppat.1002501.
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., et al. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J Cell Biol* 189(6), 1027-1038. doi: 10.1083/jcb.201003053.
- Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K., and Yamamoto, T. (2011). Functions of phospholipid flippases. *J Biochem* 149(2), 131-143. doi: 10.1093/jb/mvq140.
- Tanaka, S., and Tani, M. (2018). Mannosylinositol phosphorylceramides and ergosterol coordinately maintain cell wall integrity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* 285(13), 2405-2427. doi: 10.1111/febs.14509.
- Tati, S., Li, R., Puri, S., Kumar, R., Davidow, P., and Edgerton, M. (2014). Histatin 5-spermidine conjugates have enhanced fungicidal activity and efficacy as a topical therapeutic for

- oral candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 58(2), 756-766. doi: 10.1128/AAC.01851-13.
- Theis, T., and Stahl, U. (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol Life Sci* 61(4), 437-455. doi: 10.1007/s00018-003-3231-4.
- Thevissen, K., Cammue, B.P., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R.C., Lester, R.L., et al. (2000). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17), 9531-9536. doi: 10.1073/pnas.160077797.
- Thevissen, K., de Mello Tavares, P., Xu, D., Blankenship, J., Vandenbosch, D., Idkowiak-Baldys, J., et al. (2012). The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 84(1), 166-180. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08017.x.
- Thevissen, K., Ferket, K.K., Francois, I.E., and Cammue, B.P. (2003a). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* 24(11), 1705-1712. doi: 10.1016/j.peptides.2003.09.014.
- Thevissen, K., Francois, I.E., Takemoto, J.Y., Ferket, K.K., Meert, E.M., and Cammue, B.P. (2003b). DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 226(1), 169-173. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00590-1.
- Thevissen, K., Warnecke, D.C., Francois, I.E., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., et al. (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J Biol Chem* 279(6), 3900-3905. doi: 10.1074/jbc.M311165200.
- Togo, T., Krasieva, T.B., and Steinhardt, R.A. (2000). A decrease in membrane tension precedes successful cell-membrane repair. *Mol Biol Cell* 11(12), 4339-4346. doi: 10.1091/mbc.11.12.4339.
- Toh, E.A., Ohkusu, M., Shimizu, K., Yamaguchi, M., Ishiwada, N., Watanabe, A., et al. (2017). Creation, characterization and utilization of *Cryptococcus neoformans* mutants sensitive to micafungin. *Curr Genet* 63(6), 1093-1104. doi: 10.1007/s00294-017-0713-8.
- Torres-Rodriguez, J.M., Alvarado-Ramirez, E., Murciano, F., and Sellart, M. (2008). MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother* 62(1), 205-206. doi: 10.1093/jac/dkn132.
- Tossi, A., Scocchi, M., Skerlavaj, B., and Gennaro, R. (1994). Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett* 339(1-2), 108-112.
- Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E., and Spang, A. (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J* 25(5), 943-954. doi: 10.1038/sj.emboj.7601007.
- Trilles, L., Meyer, W., Wanke, B., Guarro, J., and Lazera, M. (2012). Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol* 50(3), 328-332. doi: 10.3109/13693786.2011.602126.
- Troskie, A.M., Rautenbach, M., Delattin, N., Vosloo, J.A., Dathe, M., Cammue, B.P., et al. (2014). Synergistic activity of the tyrocidines, antimicrobial cyclodecapeptides from *Bacillus aneurinolyticus*, with amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 58(7), 3697-3707. doi: 10.1128/AAC.02381-14.
- Ungermann, C., and Wickner, W. (1998). Vam7p, a vacuolar SNAP-25 homolog, is required for SNARE complex integrity and vacuole docking and fusion. *EMBO J* 17(12), 3269-3276. doi: 10.1093/emboj/17.12.3269.
- Uzair, B., Bint, E.I.S., Khan, B.A., Azad, B., Mahmood, T., Rehman, M.U., et al. (2018). Scorpion Venom Peptides as a Potential Source for Human Drug Candidates. *Protein Pept Lett* 25(7), 702-708. doi: 10.2174/0929866525666180614114307.

- Vaishnav, V.V., Bacon, B.E., O'Neill, M., and Cherniak, R. (1998). Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. *Carbohydr Res* 306(1-2), 315-330. doi: 10.1016/s0008-6215(97)10058-1.
- Valdivia, R.H., Baggott, D., Chuang, J.S., and Schekman, R.W. (2002). The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell* 2(3), 283-294.
- Valdivia, R.H., and Schekman, R. (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18), 10287-10292. doi: 10.1073/pnas.1834246100.
- van der Weerden, N.L., Hancock, R.E., and Anderson, M.A. (2010). Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *J Biol Chem* 285(48), 37513-37520. doi: 10.1074/jbc.M110.134882.
- van Duin, D., Casadevall, A., and Nosanchuk, J.D. (2002). Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 46(11), 3394-3400.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., and Coste, A.T. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol* 2012, 713687. doi: 10.1155/2012/713687.
- Vartivarian, S.E., Anaissie, E.J., Cowart, R.E., Sprigg, H.A., Tingler, M.J., and Jacobson, E.S. (1993). Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis* 167(1), 186-190.
- Vater, C.A., Raymond, C.K., Ekena, K., Howald-Stevenson, I., and Stevens, T.H. (1992). The VPS1 protein, a homolog of dynamin required for vacuolar protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*, is a GTPase with two functionally separable domains. *J Cell Biol* 119(4), 773-786. doi: 10.1083/jcb.119.4.773.
- Vecchiarelli, A., Pericolini, E., Gabrielli, E., Chow, S.K., Bistoni, F., Cenci, E., et al. (2011). *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. *Immunotherapy* 3(8), 997-1005. doi: 10.2217/imt.11.86.
- Veloso Junior, P.H.H., Simon, K.S., de Castro, R.J.A., Coelho, L.C., Erazo, F.A.H., de Souza, A.C.B., et al. (2019). Peptides ToAP3 and ToAP4 decrease release of inflammatory cytokines through TLR-4 blocking. *Biomed Pharmacother* 118, 109152. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109152.
- Venkatesan, P., Perfect, J.R., and Myers, S.A. (2005). Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. *Dermatol Ther* 18(1), 44-57. doi: 10.1111/j.1529-8019.2005.05001.x.
- Vitale, R.G., Pascuccelli, V., and Afeltra, J. (2012). Influence of capsule size on the in vitro activity of antifungal agents against clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strains. *J Med Microbiol* 61(Pt 3), 384-388. doi: 10.1099/jmm.0.036152-0.
- Vylkova, S., Jang, W.S., Li, W., Nayyar, N., and Edgerton, M. (2007). Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eukaryot Cell* 6(10), 1876-1888. doi: 10.1128/EC.00039-07.
- Waldorf, A.R., and Polak, A. (1983). Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 23(1), 79-85. doi: 10.1128/aac.23.1.79.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernaldes, S., Pantoja, C., and Walter, P. (2006). Eosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439(7079), 998-1003. doi: 10.1038/nature04472.
- Wang, G. (2008). Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J Biol Chem* 283(47), 32637-32643. doi: 10.1074/jbc.M805533200.
- Wang, Y., and Casadevall, A. (1994). Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 38(11), 2648-2650.

- Wang, Z.A., Li, L.X., and Doering, T.L. (2018). Unraveling synthesis of the cryptococcal cell wall and capsule. *Glycobiology* 28(10), 719-730. doi: 10.1093/glycob/cwy030.
- Willems, J., Noppe, W., Moerman, L., van der Walt, J., and Verdonck, F. (2002). Cationic peptides from scorpion venom can stimulate and inhibit polymorphonuclear granulocytes. *Toxicon* 40(12), 1679-1683. doi: 10.1016/s0041-0101(02)00183-6.
- Wiradjaja, F., Ooms, L.M., Whisstock, J.C., McColl, B., Helfenbaum, L., Sambrook, J.F., et al. (2001). The yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase Inp54p localizes to the endoplasmic reticulum via a C-terminal hydrophobic anchoring tail: regulation of secretion from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276(10), 7643-7653. doi: 10.1074/jbc.M010471200.
- Wohlschlager, T., Buser, R., Skowrya, M.L., Haynes, B.C., Henrissat, B., Doering, T.L., et al. (2013). Identification of the galactosyltransferase of *Cryptococcus neoformans* involved in the biosynthesis of basidiomycete-type glycosylinositolphosphoceramide. *Glycobiology* 23(11), 1210-1219. doi: 10.1093/glycob/cwt057.
- Wu, W.H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.H., Sen, S., Mizuguchi, G., et al. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 12(12), 1064-1071. doi: 10.1038/nsmb1023.
- Xu, Y., Ambudkar, I., Yamagishi, H., Swaim, W., Walsh, T.J., and O'Connell, B.C. (1999). Histatin 3-mediated killing of *Candida albicans*: effect of extracellular salt concentration on binding and internalization. *Antimicrob Agents Chemother* 43(9), 2256-2262.
- Yang, D.H., Jung, K.W., Bang, S., Lee, J.W., Song, M.H., Floyd-Averette, A., et al. (2017). Rewiring of Signaling Networks Modulating Thermotolerance in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 205(1), 201-219. doi: 10.1534/genetics.116.190595.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., and Huang, H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81(3), 1475-1485. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75802-X.
- Yang, Y., Liu, Q., Jiang, G., Chen, S., Zhou, L., Sakamoto, N., et al. (2018). Genome-wide screen reveals important roles for ESCRT proteins in drug/ion resistance of fission yeast. *PLoS One* 13(6), e0198516. doi: 10.1371/journal.pone.0198516.
- Yeaman, M.R., Buttner, S., and Thevissen, K. (2018). Regulated Cell Death as a Therapeutic Target for Novel Antifungal Peptides and Biologics. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 5473817. doi: 10.1155/2018/5473817.
- Yoneda, A., and Doering, T.L. (2006). A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Mol Biol Cell* 17(12), 5131-5140. doi: 10.1091/mbc.e06-08-0701.
- Zaragoza, O., and Casadevall, A. (2004). Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online* 6, 10-15. doi: 10.1251/bpo68.
- Zaragoza, O., Chrisman, C.J., Castelli, M.V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L., et al. (2008). Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* 10(10), 2043-2057. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x.
- Zaragoza, O., Fries, B.C., and Casadevall, A. (2003). Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect Immun* 71(11), 6155-6164.
- Zaragoza, O., Mesa-Arango, A.C., Gomez-Lopez, A., Bernal-Martinez, L., Rodriguez-Tudela, J.L., and Cuenca-Estrella, M. (2011). Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 55(4), 1563-1570. doi: 10.1128/AAC.01631-10.
- Zaragoza, O., Telzak, A., Bryan, R.A., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2006). The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Mol Microbiol* 59(1), 67-83. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04928.x.

- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15), 5449-5453. doi: 10.1073/pnas.84.15.5449.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6870), 389-395. doi: 10.1038/415389a.
- Zeng, X.C., Corzo, G., and Hahin, R. (2005). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life* 57(1), 13-21. doi: 10.1080/15216540500058899.
- Zeng, X.C., Wang, S.X., Zhu, Y., Zhu, S.Y., and Li, W.X. (2004). Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 25(2), 143-150. doi: 10.1016/j.peptides.2003.12.003.
- Zhai, B., and Lin, X. (2013). Evaluation of the anticryptococcal activity of the antibiotic polymyxin B in vitro and in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 41(3), 250-254. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.11.006.
- Zhang, J., Silao, F.G., Bigol, U.G., Bungay, A.A., Nicolas, M.G., Heitman, J., et al. (2012). Calcineurin is required for pseudohyphal growth, virulence, and drug resistance in *Candida lusitanae*. *PLoS One* 7(8), e44192. doi: 10.1371/journal.pone.0044192.
- Zhang, L., Ma, N., Liu, Q., and Ma, Y. (2013). Genome-wide screening for genes associated with valproic acid sensitivity in fission yeast. *PLoS One* 8(7), e68738. doi: 10.1371/journal.pone.0068738.
- Zhang, P., Li, C., Huo, L., Xiang, B., Rahim, K., Hao, X., et al. (2019). Role of the fungus-specific flavin carrier Flc1 in antifungal resistance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 57(4), 468-477. doi: 10.1093/mmy/myy050.
- Zhou, X., and Graham, T.R. (2009). Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(39), 16586-16591. doi: 10.1073/pnas.0904293106.
- Zhou, X., Ma, Y., Fang, Y., Gerile, W., Jaiseng, W., Yamada, Y., et al. (2013). A genome-wide screening of potential target genes to enhance the antifungal activity of micafungin in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 8(5), e65904. doi: 10.1371/journal.pone.0065904.
- Zhu, S., and Tytgat, J. (2004). The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell Mol Life Sci* 61(14), 1751-1763. doi: 10.1007/s00018-004-4149-1.
- Zhu, X., and Williamson, P.R. (2003). A CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 50(4), 1271-1281. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03752.x.
- Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein, S.D., and Daum, G. (2000). Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 470(1), 83-87. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01290-4.

APÊNDICE A – ARTIGOS E PATENTE PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Artigos e patente Relacionados à Tese

1 - DE-SOUZA-SILVA, CALLIANDRA MARIA ; **GUILHELMELLI, FERNANDA** ; ZAMITH-MIRANDA, DANIEL ; DE OLIVEIRA, MARCO ANTÔNIO ; NOSANCHUK, JOSHUA DANIEL ; SILVA-PEREIRA, ILDINETE ; ALBUQUERQUE, PATRÍCIA . Broth Microdilution In Vitro Screening: An Easy and Fast Method to Detect New Antifungal Compounds. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, v. 1, p. e57127, 2018.

2 - **GUILHELMELLI, FERNANDA**; VILELA, NATHÁLIA ; SMIDT, KARINA S. ; DE OLIVEIRA, MARCO A. ; DA CUNHA MORALES ÁLVARES, ALICE ; RIGONATTO, MARIA C. L. ; DA SILVA COSTA, PEDRO H. ; TAVARES, ALDO H. ; FREITAS, SÔNIA M. DE ; NICOLA, ANDRÉ M. ; FRANCO, OCTÁVIO L. ; DERENGOWSKI, LORENA DA SILVEIRA ; SCHWARTZ, ELISABETH F. ; MORTARI, MÁRCIA R. ; BOCCA, ANAMÉLIA L. ; ALBUQUERQUE, PATRÍCIA ; SILVA-PEREIRA, ILDINETE . Activity of Scorpion Venom-Derived Antifungal Peptides against Planktonic Cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* Biofilms. *Frontiers in Microbiology* (Online), v. 7, p. 1844, 2016.

Patente

GUILHELMELLI, FERNANDA; VILELA, N. ; DE OLIVEIRA, MARCO A. ; FREITAS, SÔNIA M. DE ; DA CUNHA MORALES ÁLVARES, ALICE ; NICOLA, ANDRÉ M. ; SCHWARTZ, ELISABETH F. ; FRANCO, OCTÁVIO L. ; MORTARI, MÁRCIA R. ; BOCCA, ANAMELIA L. ; ANDRADE, P. A. ; SILVA-PEREIRA, I. . PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO. 2017, Brasil.

Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR1020170247287, título: "PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/11/2017

Não Relacionados à Tese

1 - ALBUQUERQUE, PATRÍCIA ; Nicola, André Moraes ; MAGNABOSCO, DIOGO ALMEIDA GOMES ; DERENGOWSKI, LORENA DA SILVEIRA ; CRISÓSTOMO, LUANA SOARES ; XAVIER, LUCIANO COSTA GOMES ; FRAZÃO, STEFÂNIA DE OLIVEIRA ; **GUILHELMELLI, FERNANDA** ; DE OLIVEIRA, MARCO ANTÔNIO ; DIAS, JHONES DO NASCIMENTO ; HURTADO, FABIÁN ANDRÉS ; TEIXEIRA, MARCUS DE MELO ; GUIMARÃES, ALLAN JEFFERSON ; Paes, Hugo Costa ; BAGAGLI, EDUARDO ; Felipe, Maria Sueli Soares ; Casadevall, Arturo ; Silva-Pereira, Ildinete . A hidden battle in the dirt: Soil amoebae interactions with *Paracoccidioides* spp. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, p. e0007742, 2019.

2 - NOGUEIRA, SILVANIA SIQUEIRA ; DE ARAUJO-NOBRE, ALYNE R. ; MAFUD, ANA CAROLINA ; GUIMARÃES, MARIA ADELAIDE ; ALVES, MICHEL MUÁLEM MORAES ; PLÁCIDO, ALEXANDRA ; CARVALHO, FERNANDO AÉCIO AMORIM ; ARCANJO, DANIEL DIAS RUFINO ; MASCARENHAS, YVONNE ; **COSTA, FERNANDA GUILHELMELLI** ; ALBUQUERQUE, PATRÍCIA ; EATON, PETER ; DE SOUZA DE ALMEIDA LEITE, JOSÉ ROBERTO ; DA SILVA, DURCILENE ALVES ; CARDOSO, VINICIUS SAURA . Silver nanoparticle stabilized of hydrolyzed collagen/natural polymers based: Synthesis, characterization and antibacterial-antifungal evaluation. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v. 135, p. 808-814, 201

3 - SILVA, JULIANA C. ; NETO, LÁZARO M. ; NEVES, ROGÉRIO C. ; GONÇALVES, JAQUELINE C. ; TRENTINI, MONALISA M. ; MUCURY-FILHO, RICARDO ; SMIDT, KARINA S. ; FENSTERSEIFER, ISABEL C. ; SILVA, OSMAR N. ; LIMA, LILIAN D. ; CLISSA, PATRICIA B. ; Vilela, Nathália ; **GUILHELMELLI, F.** ; SILVA, LUCIANO P. ; RANGEL, MARISA ; Kipnis, André ; SILVA-PEREIRA, I. ; FRANCO, OCTAVIO L. ; JUNQUEIRA-KIPNIS, ANA P. ; BOCCA, ANAMELIA L. ; MORTARI, MÁRCIA R. . Evaluation of the antimicrobial activity of the mastoparan Polybia-MPII isolated from venom of the social wasp *Pseudopolybia vespiceps testacea* (Vespidae, Hymenoptera). International Journal of Antimicrobial Agents (Print), v. xx, p. xx, 2017.

4 - AGUSTINHO, DANIEL PAIVA ; DE OLIVEIRA, MARCO ANTÔNIO ; TAVARES, ALDO HENRIQUE ; DERENGOWSKI, LORENA ; STOLZ, VALENTINA ; **GUILHELMELLI, FERNANDA** ; MORTARI, MÁRCIA RENATA ; KUCHLER, KARL ; SILVA-PEREIRA, ILDINETE . Dectin-1 is required for miR155 upregulation in murine macrophages in response to *Candida albicans*. Virulence, v. 7, p. 00-00, 2016.

APÊNDICE B – FIGURAS SUPLEMENTARES

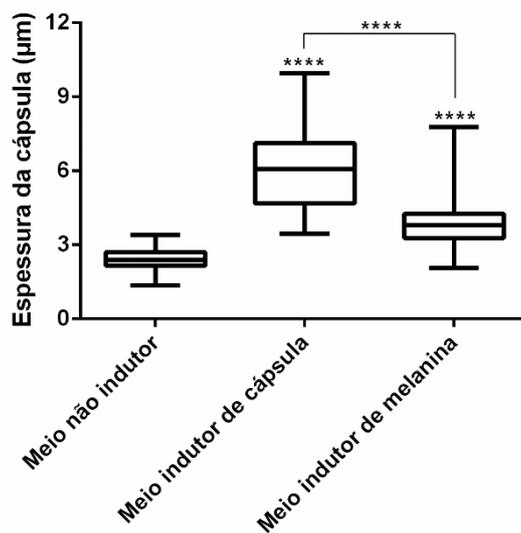


Figura Suplementar 1. Espessura da cápsula de *C. neoformans* H99 crescidas em meio não indutor, meio indutor de cápsula e meio indutor de melanina. As caixas representam 75 % da distribuição da população e as linhas horizontais representam as medianas. Barras indicam os valores máximos e mínimos. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* com pós teste de Dunn. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, considerando a linhagem H99 como grupo controle. Os resultados mostrados são representativos de 2 ensaios independentes.

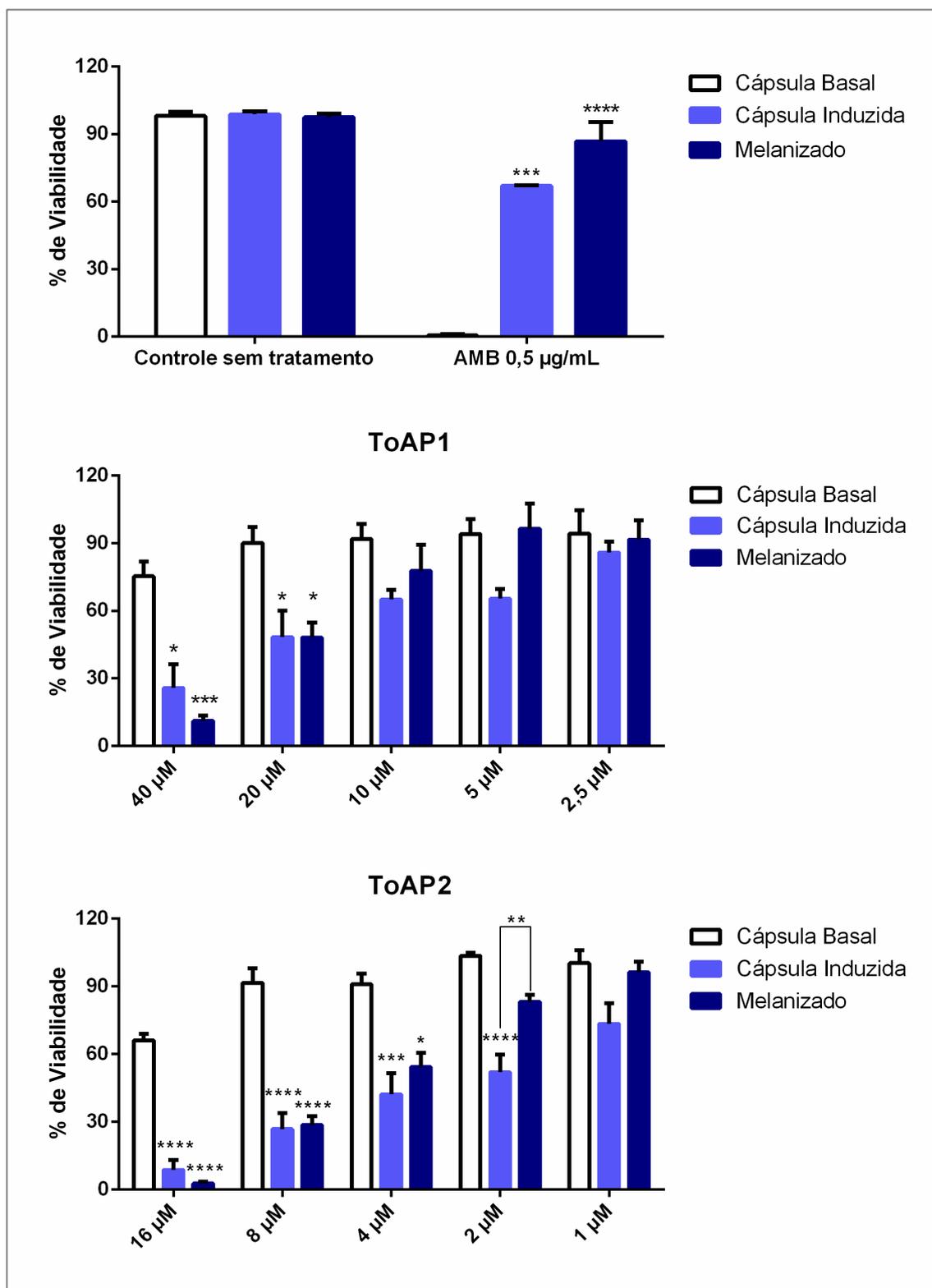


Figura Suplementar 2. Viabilidade das células de H99 crescidas em meio Sabouraud (Cápsula Basal), Meio Mínimo (Cápsula Induzida) e Meio Mínimo com 1mM de L-DOPA (Melanizado), após tratamento de 4 horas com AMB (A) e diferentes doses de ToAP1 (B) e ToAP2 (C). As barras coloridas representam a média dos valores e as barras pretas o erro padrão da média. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico One-way ANOVA com pós test de Tukey. *P < 0,05, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, sendo que para cada dose testada, o controle escolhido foi o grupo nomeado Cápsula Basal do tratamento em análise. n = 3

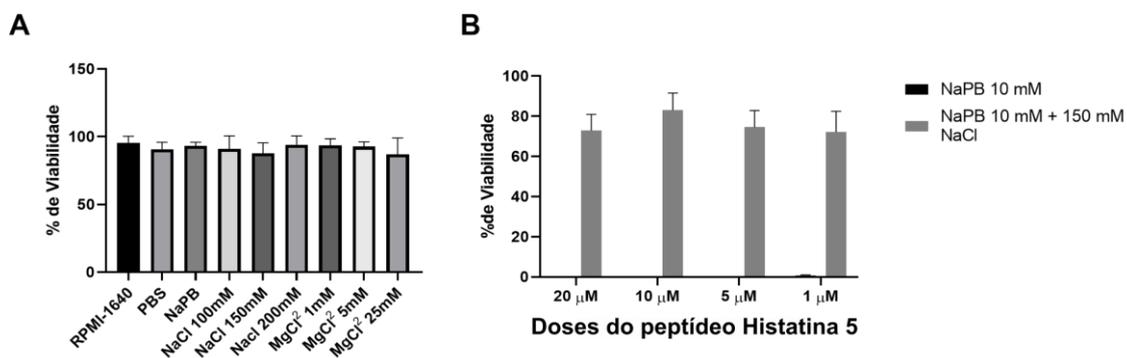


Figura Suplementar 3 – (A) Viabilidade das leveduras de *C. neoformans* H99 incubadas nos diferentes meios e soluções. As células do fungo foram incubadas por duas horas a 37° C em meio RPMI-1640 e nas soluções PBS, NaPB 10 mM e NaPB 10 mM suplementado com 100 mM, 150 mM, 200 mM de NaCl e 1 mM, 5 mM e 25 mM de MgCl₂. As barras representam a média dos valores e as barras pretas o erro padrão da média. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico One-way ANOVA com pós teste de Tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. # indica diferença estatística com $p < 0,05$ entre as diferentes condições e o grupo NaPB 10 mM. $n = 3$. **(B)** Viabilidade das leveduras de *C. neoformans* H99 tratadas com diferentes doses de Histatina 5 nos tampões NaPB 10 mM e NaPB 10 mM suplementado com 150 mM de NaCl. As barras representam a média dos valores e as barras pretas o erro padrão da média. $n=2$.

APÊNDICE C – TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Genes de *C.neoformans* regulados em resposta ao tratamento com 15 µM do peptídeo ToAP2.

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2FoldChange
CNAG_06207		hypothetical protein	-2,981221597
CNAG_02548		cobalamin synthesis protein	-2,946432898
CNAG_06890		membrane transporter	-2,897789624
CNAG_00895	<i>ZIP1</i>	zinc transporter	-1,31411302
CNAG_05358		hypothetical protein	-1,138555264
CNAG_04245	<i>CHI22</i>	Chitinase, chitinase, variant	-1,138272586
CNAG_00919		carboxypeptidase D	-0,879273688
CNAG_12368		unspecified product	-0,858508884
CNAG_00799		cellulase	-0,851060172
CNAG_04373		alginate lyase	-0,71854286
CNAG_02300		hypothetical protein	-0,635689085

TabelaS2 . Genes de *C.neoformans* regulados em resposta ao tratamento com 30 μ M do peptídeo ToAP2

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2FoldChange
CNAG_02344		Uracil phosphoribosyltransferase	-3,477487257
CNAG_02548		cobalamin synthesis protein	-3,389851145
CNAG_01567		hypothetical protein	-3,336352811
CNAG_06298		hypothetical protein	-3,307565481
CNAG_03011		glycerate-and formate-dehydrogenase	-3,296676951
CNAG_06890		membrane transporter	-3,24344027
CNAG_02005		hypothetical protein	-3,122762152
CNAG_06388		hypothetical protein	-2,912307013
CNAG_06207		hypothetical protein	-2,901973998
CNAG_00735		aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	-2,867175791
CNAG_06374		malate dehydrogenase	-2,210904088
CNAG_02225	<i>EXG104</i>	glucan 1,3-beta-glucosidase	-2,112664806
CNAG_02675	<i>HSL101</i>	CAMK/CAMKL/GIN4 protein kinase	-2,099815698
CNAG_05115		sarcosine oxidase	-1,952247255
CNAG_00895	<i>ZIP1</i>	zinc transporter	-1,814940013
CNAG_05655		EF-hand calcium-binding protein	-1,742578047
CNAG_02800		hypothetical protein	-1,698870124
CNAG_03326	<i>CHS2</i>	Chitin synthase	-1,680511947
CNAG_05908		hypothetical protein	-1,658525351
CNAG_04861		transglycosylase SLT domain-containing protein	-1,642732243
CNAG_04261		hypothetical protein	-1,629335058
CNAG_07449		amino acid transporter	-1,609186032
CNAG_07566		hypothetical protein	-1,530912932
CNAG_05358		hypothetical protein	-1,510651391
CNAG_03480		NAD epimerase domain-containing protein	-1,446135248
CNAG_04245	<i>CHI22</i>	Chitinase, chitinase, variant	-1,371134494
CNAG_07635		kinetochore protein NDC80	-1,334105459
CNAG_02048	<i>PUT5</i>	Proline dehydrogenase	-1,333844862
CNAG_07334	<i>FRE4</i>	ferric-chelate reductase	-1,330512226
CNAG_04474		monocarboxylic acid transporter	-1,323562379
CNAG_03487		DnaJ domain-containing protein	-1,296411049
CNAG_05602	<i>PUT2</i>	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-1,274095695
CNAG_02090	<i>GPA3</i>	guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	-1,26501378
CNAG_01277		hypothetical protein	-1,248914697
CNAG_06608		hypothetical protein	-1,216494471
CNAG_01993		hypothetical protein	-1,140341147
CNAG_00879		Glutamate dehydrogenase	-1,115471886
CNAG_00799		cellulase	-1,097485149
CNAG_03385	<i>PCL103</i>	g1/s-specific cyclin pcl1	-1,076006821
CNAG_00919		carboxypeptidase D	-1,067695543
CNAG_03167	<i>CHK1</i>	CAMK/CAMKL/CHK1 protein kinase	-1,041201282
CNAG_01081		hypothetical protein	-1,017332917

CNAG_00163		general transcription factor 3C polypeptide 4	-1,012974386
CNAG_03923		crossover junction endonuclease mus81	-1,009496199
CNAG_12368		unspecified product	-0,982794444
CNAG_00597	<i>DIP5</i>	amino acid transporter	-0,948568464
CNAG_07361		hypothetical protein	-0,937884476
CNAG_00359		hypothetical protein	-0,871265227
CNAG_02300		hypothetical protein	-0,850911769
CNAG_02592		thioredoxin reductase GliT	-0,850242718
CNAG_02208		ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	-0,828628842
CNAG_03993	<i>BIM1</i>	RP/EB family microtubule-associated protein	-0,807999145
CNAG_04018		hypothetical protein	-0,803910052
CNAG_06829	<i>ERG1</i>	Squalene monooxygenase	-0,75673192
CNAG_04373		alginate lyase	-0,74306525
CNAG_03735	<i>CAP4</i>	beta-1,2-xylosyltransferase	-0,742787192
CNAG_05109		CBS and PB1 domain-containing protein	-0,707638736
CNAG_04652		enoyl reductase	-0,661419235
CNAG_04183		hypothetical protein	-0,660649135
CNAG_02708		prenylcysteine oxidase/farnesylcysteine lyase	-0,419112095
CNAG_03388	<i>RCO1</i>	nuclear protein	0,36236348
CNAG_12994		unspecified product	0,692498265
CNAG_00070		hypothetical protein	0,794852915
CNAG_00126		2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	0,81453999
CNAG_12615		unspecified product	0,825739501
CNAG_06348	<i>PDR5-3</i>	ABC transporter PMR5	0,868573831
CNAG_01701		RTA1 domain-containing protein	0,942933935
CNAG_06921	<i>HOB4</i>	hypothetical protein	1,003808118
CNAG_03894	<i>PDR802</i>	Putative Zn ² -Cys ⁶ zinc-finger transcription factor	1,13499413
CNAG_07519		hypothetical protein	1,190686757
CNAG_07876		hypothetical protein	1,280435332
CNAG_07877		hypothetical protein	1,289496549

Tabela S3 . Genes de *C.neoformans* regulados negativamente com fold change ≤ -2 em resposta ao tratamento com 0,125 $\mu\text{g/ml}$ de Anfotericina B

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2FoldChange
CNAG_00085		histone chaperone ASF1	-2,05855816
CNAG_00098		palmitoyl-protein thioesterase	-2,153235425
CNAG_00099		minichromosome maintenance protein 3	-2,782124974
CNAG_00100		stress-induced-phosphoprotein 1	-2,365723449
CNAG_00133		hypothetical protein	-2,956428516
CNAG_00145		actin-2	-4,082121076
CNAG_00287		cytoplasmic protein	-2,640967577
CNAG_00327		DASH complex subunit DAD2	-2,476783835
CNAG_00384		RAD51-like protein 2	-3,17120285
CNAG_00423		kinetochore protein Spc24, fungi type	-2,158653433
CNAG_00498		cell division cycle protein 14	-2,208485044
CNAG_00681		condensin complex subunit 3	-3,600134309
CNAG_00687		hypothetical protein	-2,171724684
CNAG_00709		uracil-DNA glycosylase	-2,906182283
CNAG_00736		exocyst protein	-2,19489319
CNAG_00973		hypothetical protein	-2,069797198
CNAG_01026		gamma-glutamyltransferase	-2,151837451
CNAG_01051	<i>NIP100</i>	dynactin 1	-2,120464964
CNAG_01075		methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	-2,008176572
CNAG_01076		4-aminobutyrate aminotransferase	-2,605840853
CNAG_01118		AAT family amino acid transporter	-3,544723564
CNAG_01133		mitochondrial protein	-3,805016531
CNAG_01144	<i>RPA70</i>	replication factor A1	-2,596725577
CNAG_01149		hypothetical protein	-2,08853774
CNAG_01183	<i>LSB1</i>	hypothetical protein	-2,267392586
CNAG_01272		hypothetical protein	-2,244128226
CNAG_01316	<i>RPA32</i>	replication factor A2	-3,78791652
CNAG_01324		hypothetical protein	-2,961478914
CNAG_01335		hypothetical protein	-3,646203429
CNAG_01438	<i>SWI6</i>	Cell-cycle box factor subunit SWI6, putative	-2,109375778
CNAG_01468		hypothetical protein	-2,264774646
CNAG_01566		gamma-tubulin complex component 3	-2,439767251
CNAG_01567		hypothetical protein	-2,655749498
CNAG_01573	<i>RIF2</i>	hypothetical protein	-2,08649093
CNAG_01656		hypothetical protein	-2,96094632
CNAG_01664		CMGC/CDK/CDC2 protein kinase	-2,866808599
CNAG_01710		hypothetical protein	-2,090919808
CNAG_01730	<i>STE7</i>	STE/STE7/MEK1 protein kinase	-2,115326888
CNAG_01740	<i>CDC12</i>	septin	-2,294630128
CNAG_02048	<i>PUT5</i>	Proline dehydrogenase	-2,27789971

CNAG_02137		hypothetical protein	-2,660450085
CNAG_02138		DNA replication ATP-dependent helicase dna2	-2,406175315
CNAG_02186		myosin regulatory light chain	-2,838292374
CNAG_02196	<i>CDC11</i>	septin	-2,469188418
CNAG_02208		ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	-2,952869249
CNAG_02309		FK506-binding protein 2	-2,505446195
CNAG_02373		ATP-binding protein	-2,176773351
CNAG_02384		hypothetical protein	-3,438325877
CNAG_02385		DNA primase small subunit	-4,328954239
CNAG_02406		cell division control protein 45	-2,529856653
CNAG_02440		cation-transporting ATPase	-3,601922503
CNAG_02469		cytoplasmic protein	-2,129308222
CNAG_02490		DNA repair protein MRE11	-2,208650798
CNAG_02491		nuclear protein	-2,963291722
CNAG_02517		hypothetical protein	-2,392269461
CNAG_02574		cofactor D	-3,562087884
CNAG_02829		protein arginine N-methyltransferase 5	-2,489873616
CNAG_02847		thymidylate kinase	-3,243189719
CNAG_02854		peroxiredoxin Q/BCP	-3,352160778
CNAG_02884		DNA replication complex GINS protein PSF2	-4,919617041
CNAG_03068		hypothetical protein	-3,069372761
CNAG_03308		hypothetical protein	-3,359255511
CNAG_03316	<i>RDII</i>	rho gdp-dissociation inhibitor	-2,563274986
CNAG_03323		hypothetical protein	-2,043498825
CNAG_03325	<i>BCHI</i>	ChAPs family protein	-2,010992685
CNAG_03329		PHD-finger protein	-3,095956654
CNAG_03341		minichromosome maintenance protein 2	-2,476758468
CNAG_03452		AFG1 family mitochondrial ATPase	-2,242157575
CNAG_03542		Arginase	-2,102737716
CNAG_03658		hypothetical protein	-2,764789955
CNAG_03671		hypothetical protein	-3,636123846
CNAG_03753		dolichol-phosphate mannosyltransferase	-2,176572963
CNAG_03767		cohesin complex subunit Psm1	-2,773828561
CNAG_03907		LIM domain containing protein	-2,041715875
CNAG_03923		crossover junction endonuclease mus81	-2,364641245
CNAG_03993	<i>BIMI</i>	RP/EB family microtubule-associated protein	-2,361484125
CNAG_04187		GPI-anchored wall transfer protein 1	-2,090157036
CNAG_04213		signal transducer	-2,190661203
CNAG_04261		hypothetical protein	-3,549726887
CNAG_04278		DNA ligase 1	-2,101932905
CNAG_04319		hypothetical protein	-2,499233365
CNAG_04470		Haloacid dehalogenase, type II	-3,107295947
CNAG_04471		FAD dependent oxidoreductase	-2,343355062
CNAG_04472		membrane protein	-2,4312562

CNAG_04603		replication fork protection complex subunit Csm3/Swi3	-2,556299481
CNAG_04648		sister chromatid cohesion protein pds5	-3,460493636
CNAG_04662	<i>CTF4</i>	chromosome transmission fidelity protein 4	-3,414070588
CNAG_04681	<i>LPI14</i>	transmembrane protein, putative	-2,782817278
CNAG_04682		DNA replication complex GINS protein psf3	-2,38039029
CNAG_04692		thymidylate synthase	-3,211357116
CNAG_04742		DNA primase large subunit	-2,558283323
CNAG_04743		oligosaccharyltransferase complex subunit beta	-2,39624698
CNAG_04962		hypothetical protein	-2,63879412
CNAG_05153	<i>GAT5</i>	hypothetical protein	-2,548631155
CNAG_05252		chaperone regulator	-2,168038001
CNAG_05394		cation:cation antiporter	-2,258496194
CNAG_05541		kinase regulator	-2,47658851
CNAG_05551		hypothetical protein	-2,488910472
CNAG_05602	<i>PUT2</i>	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-3,026108738
CNAG_05655		EF-hand calcium-binding protein	-4,87830302
CNAG_05825		minichromosome maintenance protein 7	-3,429743594
CNAG_05863		hypothetical protein	-2,183692477
CNAG_05890	<i>GPG2</i>	guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	-2,246481493
CNAG_05925	<i>CDC3</i>	septin ring protein	-3,26774888
CNAG_05998	<i>RAC2</i>	rho family protein	-2,432405032
CNAG_06032		ADP-ribosylation factor-like 2	-2,600358333
CNAG_06129		cytoplasmic protein	-2,334258689
CNAG_06142		DNA polymerase alpha subunit B	-4,082107013
CNAG_06162		hypothetical protein	-2,0721698
CNAG_06182		minichromosome maintenance protein 4	-3,202373266
CNAG_06374		malate dehydrogenase	-2,375575585
CNAG_06384		DNA repair protein RAD50	-2,422298511
CNAG_06408		sister chromatid cohesion protein Dcc1	-3,897374017
CNAG_06443	<i>SSA1</i>	glucose-regulated protein	-2,298585446
CNAG_06608		hypothetical protein	-3,345879416
CNAG_06634		DNA polymerase epsilon subunit B	-2,024685518
CNAG_06708		dCMP deaminase	-2,11562111
CNAG_06724		DNA repair and recombination protein RAD52	-2,400591343
CNAG_06728		kinesin	-3,444442902
CNAG_06832	<i>KRE62</i>	glucosidase	-2,184302122
CNAG_06834	<i>PMT1</i>	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase	-2,448606998
CNAG_06923	<i>XFP2</i>	xylulose 5-phosphate/fructose 6-phosphate phosphoketolase	-2,158013494
CNAG_07330		hypothetical protein	-2,56937292
CNAG_07464	<i>MBS1</i>	Mbp1 and Swi4-like APSES protein 1	-2,028856647
CNAG_07566		hypothetical protein	-3,175011609
CNAG_07635		kinetochore protein NDC80	-3,161800389
CNAG_07661		hypothetical protein	-2,959066872

CNAG_07844	hypothetical protein	-2,706377407
CNAG_07938	hypothetical protein	-2,306982034
CNAG_12442	unspecified product	-2,532134431
CNAG_12622	unspecified product	-2,029292999

Tabela S4. Genes de *C.neoformans* regulados positivamente com fold change ≥ 2 em resposta ao tratamento com 0,125 $\mu\text{g/ml}$ de Anfotericina B.

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2FoldChange
CNAG_00192		hypothetical protein	2,107174011
CNAG_07869		hypothetical protein	7,240710197
CNAG_03772	<i>HXS1</i>	high-affinity glucose transporter	5,45690099
CNAG_04837	<i>MLN1</i>	bHLH family transcription factor	5,292441821
CNAG_05662	<i>PTP1</i>	Polyol transporter protein 1	5,212074796
CNAG_05229		Stomatin family protein	4,327887262
CNAG_00827		ribose 5-phosphate isomerase	4,009698103
CNAG_06932		Sugar transporter	4,006398893
CNAG_02417		lipase/esterase	3,890769301
CNAG_02733		Monosaccharide transporter	3,872196006
CNAG_02045		acetoacetate-CoA ligase	3,83648112
CNAG_02044		hypothetical protein	3,792261879
CNAG_05303	<i>ICL1</i>	isocitrate lyase	3,755570132
CNAG_05785	<i>STB4</i>	putative transcription factor	3,70446207
CNAG_12544		unspecified product	3,514298003
CNAG_05867		L-fucose transporter	3,460599584
CNAG_00598		nicotinamide mononucleotide permease	3,426345585
CNAG_05324		Sugar transporter	3,41755661
CNAG_01047		hypothetical protein	3,273800522
CNAG_07862		fumarate reductase	3,23263684
CNAG_07874		Sugar transporter	3,218204633
CNAG_12512		unspecified product	3,206704084
CNAG_12032		unspecified product	3,185974481
CNAG_07912		hypothetical protein	3,182164859
CNAG_04178		hypothetical protein	3,13996543
CNAG_05676		tyrosine aminotransferase	3,079254293
CNAG_12035		unspecified product	3,004266228
CNAG_07643		hypothetical protein	2,96013161
CNAG_06551		Carnitine O-acetyltransferase	2,774628518
CNAG_00864	<i>ITR2</i>	myo-inositol transporter, putative	2,757465099
CNAG_04704		MFS transporter, SHS family, lactate transporter	2,70077476
CNAG_05683		hypothetical protein	2,698627328
CNAG_00247	<i>LYS9</i>	alpha-aminoadipic semialdehyde synthase	2,609110611
CNAG_12204		unspecified product	2,597039861
CNAG_12097		unspecified product	2,588999086
CNAG_12100		unspecified product	2,558892952
CNAG_05310		nipsnap family protein	2,52286349
CNAG_13126		unspecified product	2,519329734
CNAG_04623		hypothetical protein	2,472394477
CNAG_12020		unspecified product	2,436074408

CNAG_05914		MFS transporter	2,426900149
CNAG_07742		hypothetical protein	2,426141671
CNAG_05381	<i>ITR3C</i>	myo-inositol transporter, putative	2,393476786
CNAG_12423		unspecified product	2,371008201
CNAG_00844		hypothetical protein	2,365081745
CNAG_12740		unspecified product	2,364937637
CNAG_12934		unspecified product	2,363212932
CNAG_02562		acyl-CoA dehydrogenase	2,340478755
CNAG_04280		hypothetical protein	2,336159904
CNAG_06517		cytoplasmic protein	2,329948608
CNAG_12380		unspecified product	2,316442453
CNAG_06433		AMP-binding protein	2,3106007
CNAG_12149		unspecified product	2,304304679
CNAG_03061		multiple drug resistance protein	2,298584955
CNAG_03666		acyl-CoA dehydrogenase	2,286437218
CNAG_12679		unspecified product	2,225231243
CNAG_03346	<i>BZP4</i>	bZip transcription factor, putative	2,212522394
CNAG_06628		aldehyde dehydrogenase (NAD)	2,205198551
CNAG_03910	<i>ITR6</i>	myo-inositol transporter, putative	2,196936141
CNAG_13036		unspecified product	2,193829631
CNAG_12660		unspecified product	2,185168525
CNAG_07386		hypothetical protein	2,17845791
CNAG_03465	<i>LAC1</i>	laccase	2,17468278
CNAG_12509		unspecified product	2,153817931
CNAG_03243		2-Nitropropane dioxygenase	2,147296342
CNAG_12666		unspecified product	2,145548581
CNAG_02288		mitochondrial citrate transporter	2,140811622
CNAG_12988		unspecified product	2,136108238
CNAG_03161		hypothetical protein	2,130065843
CNAG_04142		tartrate transporter	2,126200578
CNAG_07708		hypothetical protein	2,117368268
CNAG_01936		Sugar transporter	2,114181377
CNAG_12317		unspecified product	2,111343153
CNAG_03051		polyamine transporter	2,110886209
CNAG_12347		unspecified product	2,092790341
CNAG_12210		unspecified product	2,092514807
CNAG_12349		unspecified product	2,091263497
CNAG_03713		efflux protein EncT	2,089129003
CNAG_12054		unspecified product	2,063905037
CNAG_02295		phosphotransferase enzyme family protein	2,058901065
CNAG_02147		cytochrome c peroxidase	2,05591277
CNAG_01551	<i>GAT201</i>	GATA family transcription factor	2,047897634
CNAG_07542		hypothetical protein	2,044862668
CNAG_12525		unspecified product	2,043473469

CNAG_12444	unspecified product	2,040320039
CNAG_13119	unspecified product	2,037647198
CNAG_12065	unspecified product	2,033018701
CNAG_04100	hypothetical protein	2,028327419
CNAG_13168	unspecified product	2,025797432
CNAG_00889	hypothetical protein	2,02318204
CNAG_13172	unspecified product	2,015151285
CNAG_07962	hypothetical protein	2,01327838
CNAG_12351	unspecified product	2,010881082
CNAG_05326	hypothetical protein	2,009221116
CNAG_13123	unspecified product	2,006968086

Tabela S5. Genes de *C.neoformans* regulados negativamente com fold change ≤ -2 em resposta ao tratamento com a combinação de 15 μ M e 0,125 μ g/ml de Anfotericina B

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2FoldChange
CNAG_02884		DNA replication complex GINS protein PSF2	-6,428383229
CNAG_05655		EF-hand calcium-binding protein	-6,120277519
CNAG_02574		cofator D	-5,869539361
CNAG_04662	<i>CTF4</i>	chromosome transmission fidelity protein 4	-5,820963958
CNAG_06142		DNA polymerase alpha subunit B	-5,813398187
CNAG_01335		hypothetical protein	-5,66073312
CNAG_06388		hypothetical protein	-5,650829593
CNAG_03308		hypothetical protein	-5,619591827
CNAG_01316	<i>RPA32</i>	replication factor A2	-5,540868686
CNAG_06728		kinesin	-5,536927425
CNAG_06298		hypothetical protein	-5,377962563
CNAG_04692		thymidylate synthase	-5,339324215
CNAG_03671		hypothetical protein	-5,273636072
CNAG_02440		cation-transporting ATPase	-5,217242621
CNAG_00125	<i>CRG1</i>	Putative regulator of G-protein signaling protein	-5,177035947
CNAG_02384		hypothetical protein	-5,066005731
CNAG_05825		minichromosome maintenance protein 7	-5,055511773
CNAG_06408		sister chromatid cohesion protein Dcc1	-5,002305818
CNAG_01027		succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP)	-4,975943376
CNAG_04648		sister chromatid cohesion protein pds5	-4,840231712
CNAG_01133		mitochondrial protein	-4,812912626
CNAG_03759		conidiation-specific protein 6	-4,793660767
CNAG_00145		actin-2	-4,726720131
CNAG_02385		DNA primase small subunit	-4,654870789
CNAG_03068		hypothetical protein	-4,609918011
CNAG_05925	<i>CDC3</i>	septin ring protein	-4,602603596
CNAG_07566		hypothetical protein	-4,596229473
CNAG_01324		hypothetical protein	-4,576438107
CNAG_00498		cell division cycle protein 14	-4,522636707
CNAG_04470		Haloacid dehalogenase, type II	-4,518277112
CNAG_03658		hypothetical protein	-4,499933486
CNAG_06608		hypothetical protein	-4,413452966
CNAG_02847		thymidylate kinase	-4,411856215
CNAG_00709		uracil-DNA glycosylase	-4,399559162
CNAG_06162		hypothetical protein	-4,330838579
CNAG_07661		hypothetical protein	-4,329034466
CNAG_00133		hypothetical protein	-4,311790408
CNAG_03767		cohesin complex subunit Psm1	-4,296957164
CNAG_01664		CMGC/CDK/CDC2 protein kinase	-4,284730784
CNAG_12998		unspecified product	-4,279442832

CNAG_02517		hypothetical protein	-4,259606159
CNAG_05252		chaperone regulator	-4,184134362
CNAG_06182		minichromosome maintenance protein 4	-4,160444801
CNAG_02768		hypothetical protein	-4,127741739
CNAG_02137		hypothetical protein	-4,119094034
CNAG_12442		unspecified product	-4,111300022
CNAG_03542		Arginase	-4,103416023
CNAG_05602	<i>PUT2</i>	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-4,088349439
CNAG_05551		hypothetical protein	-4,086179614
CNAG_04743		oligosaccharyltransferase complex subunit beta	-4,064135075
CNAG_12590		unspecified product	-4,02159772
CNAG_03329		PHD-finger protein	-4,016624059
CNAG_04261		hypothetical protein	-3,982874115
CNAG_02854		peroxiredoxin Q/BCP	-3,979240298
CNAG_03323		hypothetical protein	-3,978993667
CNAG_04603		replication fork protection complex subunit Csm3/Swi3	-3,96547332
CNAG_01710		hypothetical protein	-3,932394371
CNAG_05251		hypothetical protein	-3,924349964
CNAG_07635		kinetochore protein NDC80	-3,922137937
CNAG_01118		AAT family amino acid transporter	-3,843357377
CNAG_00384		RAD51-like protein 2	-3,840893674
CNAG_03452		AFG1 family mitochondrial ATPase	-3,780301667
CNAG_02208		ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	-3,770275302
CNAG_02491		nuclear protein	-3,765294754
CNAG_06923	<i>XFP2</i>	xylulose 5-phosphate/fructose 6-phosphate phosphoketolase	-3,763062264
CNAG_01051	<i>NIP100</i>	dynactin 1	-3,735770722
CNAG_05924		hypothetical protein	-3,707213716
CNAG_06834	<i>PMT1</i>	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase	-3,689989269
CNAG_00932		hypothetical protein	-3,656032599
CNAG_00681		condensin complex subunit 3	-3,645162977
CNAG_01656		hypothetical protein	-3,638027972
CNAG_06443	<i>SSA1</i>	glucose-regulated protein	-3,630934675
CNAG_07844		hypothetical protein	-3,619917231
CNAG_03166		hypothetical protein	-3,614012161
CNAG_04681	<i>LPI14</i>	transmembrane protein, putative	-3,586169738
CNAG_04962		hypothetical protein	-3,583219507
CNAG_02373		ATP-binding protein	-3,564034293
CNAG_03844		nonselective cation channel protein	-3,563393193
CNAG_02073		DNA mismatch repair protein MLH1	-3,557503396
CNAG_06384		DNA repair protein RAD50	-3,553952765
CNAG_01149		hypothetical protein	-3,546263699
CNAG_04471		FAD dependent oxidoreductase	-3,534410749
CNAG_05541		kinase regulator	-3,534017206
CNAG_01183	<i>LSBI</i>	hypothetical protein	-3,532281107

CNAG_04213		signal transducer	-3,529812586
CNAG_07745	<i>MPD1</i>	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	-3,526743249
CNAG_06139		hypothetical protein	-3,520745187
CNAG_04748		protein OS-9	-3,512742726
CNAG_04472		membrane protein	-3,504852828
CNAG_07330		hypothetical protein	-3,503736749
CNAG_06152		hypothetical protein	-3,490825162
CNAG_02309		FK506-binding protein 2	-3,465698449
CNAG_01274		coatamer subunit gamma	-3,465599102
CNAG_04682		DNA replication complex GINS protein psf3	-3,463363639
CNAG_05890	<i>GPG2</i>	guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	-3,456500784
CNAG_00098		palmitoyl-protein thioesterase	-3,445402181
CNAG_02186		myosin regulatory light chain	-3,438714383
CNAG_01076		4-aminobutyrate aminotransferase	-3,438078232
CNAG_06832	<i>KRE62</i>	glucosidase	-3,431688918
CNAG_03622	<i>TAO3</i>	cell polarity protein mor2	-3,419340796
CNAG_06129		cytoplasmic protein	-3,397936935
CNAG_02048	<i>PUT5</i>	Proline dehydrogenase	-3,387640544
CNAG_01026		gamma-glutamyltransferase	-3,376475208
CNAG_01144	<i>RPA70</i>	replication factor A1	-3,368201851
CNAG_00736		exocyst protein	-3,364743275
CNAG_05394		cation:cation antiporter	-3,331804824
CNAG_00287		cytoplasmic protein	-3,330028062
CNAG_07559		glucose-6-phosphate 1-epimerase	-3,329221189
CNAG_03983		oxidoreductase	-3,313220689
CNAG_02434	<i>ATX1</i>	Copper transport protein ATX1	-3,312285033
CNAG_05998	<i>RAC2</i>	rho family protein	-3,300606344
CNAG_02969		thioesterase	-3,276447312
CNAG_07938		hypothetical protein	-3,276330191
CNAG_02469		cytoplasmic protein	-3,263299263
CNAG_07554	<i>CAP10</i>	capsular associated protein	-3,249453811
CNAG_01566		gamma-tubulin complex component 3	-3,233376461
CNAG_02722		aldose reductase	-3,228811
CNAG_12946		unspecified product	-3,227688408
CNAG_06032		ADP-ribosylation factor-like 2	-3,213698845
CNAG_02829		protein arginine N-methyltransferase 5	-3,212323487
CNAG_03637	<i>YKU80</i>	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	-3,210393439
CNAG_07108		tip120-family protein	-3,20966863
CNAG_02138		DNA replication ATP-dependent helicase dna2	-3,208910655
CNAG_04187		GPI-anchored wall transfer protein 1	-3,208516196
CNAG_04351		methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	-3,201049297
CNAG_03923		crossover junction endonuclease mus81	-3,196321514
CNAG_05153	<i>GAT5</i>	hypothetical protein	-3,180378382
CNAG_01272		hypothetical protein	-3,177637802

CNAG_01740	<i>CDC12</i>	septin	-3,159595572
CNAG_03325	<i>BCH1</i>	ChAPs family protein	-3,153474511
CNAG_05874		hypothetical protein	-3,149253837
CNAG_03316	<i>RD11</i>	rho gdp-dissociation inhibitor	-3,137744766
CNAG_00100		stress-induced-phosphoprotein 1	-3,137703351
CNAG_05863		hypothetical protein	-3,124343533
CNAG_02490		DNA repair protein MRE11	-3,119278241
CNAG_01464	<i>FHB1</i>	Flavo-hemoglobin	-3,09244165
CNAG_05841		hypothetical protein	-3,087565646
CNAG_02196	<i>CDC11</i>	septin	-3,086126508
CNAG_02864		hypothetical protein	-3,08426415
CNAG_02548		cobalamin synthesis protein	-3,078773336
CNAG_01438	<i>SWI6</i>	Cell-cycle box factor subunit SWI6, putative	-3,071219775
CNAG_00973		hypothetical protein	-3,051016632
CNAG_06724		DNA repair and recombination protein RAD52	-3,046215341
CNAG_04297		ribonuclease HIII	-3,041610357
CNAG_05891		TDG/mug DNA glycosylase	-3,040582249
CNAG_04742		DNA primase large subunit	-3,038744164
CNAG_05288		HUS1 checkpoint protein	-3,036614313
CNAG_07426		proteasome maturation protein	-3,006794071
CNAG_05615		syntaxin 1B/2/3	-2,997354095
CNAG_00076		A/G-specific adenine glycosylase	-2,977363527
CNAG_12560		unspecified product	-2,973136516
CNAG_03341		minichromosome maintenance protein 2	-2,973038561
CNAG_05772		hypothetical protein	-2,962359098
CNAG_06594		oxysterol binding protein	-2,960530945
CNAG_00662		carboxymethyl-enebutenolidase	-2,940450541
CNAG_06428	<i>OTU1</i>	ubiquitin thioesterase OTU1	-2,936314985
CNAG_12521		unspecified product	-2,909194151
CNAG_00099		minichromosome maintenance protein 3	-2,905871632
CNAG_02097		hypothetical protein	-2,899734774
CNAG_01276		hypothetical protein	-2,898924605
CNAG_02100	<i>FAS2</i>	fatty acid synthase subunit alpha, fungi type	-2,891970733
CNAG_03907		LIM domain containing protein	-2,887182607
CNAG_00687		hypothetical protein	-2,884130734
CNAG_04319		hypothetical protein	-2,875912888
CNAG_04278		DNA ligase 1	-2,872643357
CNAG_04321		hypothetical protein	-2,864961337
CNAG_06207		hypothetical protein	-2,843707123
CNAG_03375		Succinyl-CoA synthetase alpha subunit	-2,842376055
CNAG_01285		AUR protein kinase	-2,838889914
CNAG_04691		hypothetical protein	-2,827036514
CNAG_06440		DNA dependent ATPase	-2,824004535
CNAG_06240		protein disulfide-isomerase	-2,799475313

CNAG_01126		guanine nucleotide exchange protein for ADP-robosylation factor	-2,799428991
CNAG_03167	<i>CHK1</i>	CAMK/CAMKL/CHK1 protein kinase	-2,79614469
CNAG_02543		hypothetical protein	-2,790957545
CNAG_04948	<i>TUB2</i>	tubulin beta	-2,789230005
CNAG_04688		acyl-CoA dehydrogenase	-2,786128504
CNAG_05614		YbgI/family dinuclear metal center protein	-2,779749501
CNAG_02406		cell division control protein 45	-2,756773909
CNAG_05393		ATPase	-2,755597544
CNAG_01468		hypothetical protein	-2,751190408
CNAG_05137		ER lumen protein retaining receptor	-2,747842689
CNAG_01959		condensin complex subunit 1	-2,730980829
CNAG_02992		actin cross-linking protein	-2,721510302
CNAG_02889		hypothetical protein	-2,720333092
CNAG_02365		Amidase	-2,718490804
CNAG_03935	<i>NEP1</i>	endothelin-converting enzyme	-2,706403599
CNAG_06634		DNA polymerase epsilon subunit B	-2,697113077
CNAG_06708		dCMP deaminase	-2,696612481
CNAG_06910		beta-lactamase	-2,693868488
CNAG_03442		phosphatidylinositol glycan, class T	-2,690358025
CNAG_00500		Protein phosphatase	-2,680607082
CNAG_00327		DASH complex subunit DAD2	-2,678998628
CNAG_01707	<i>CRG3</i>	Putative regulator of G-protein signaling protein	-2,663439452
CNAG_06374		malate dehydrogenase	-2,657453014
CNAG_07605		hypothetical protein	-2,646900351
CNAG_05510		hypothetical protein	-2,638603593
CNAG_03324		hypothetical protein	-2,63778423
CNAG_07093		hypothetical protein	-2,627702144
CNAG_03426	<i>GMT2</i>	GDP-mannose transporter 2	-2,591333162
CNAG_00085		histone chaperone ASF1	-2,584582403
CNAG_02968	<i>PLC2</i>	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, putative	-2,582121548
CNAG_04640	<i>ACL1</i>	ATP-citrate synthase subunit 1	-2,579444402
CNAG_05544		hypothetical protein	-2,577398475
CNAG_01075		methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	-2,574649636
CNAG_12629		unspecified product	-2,574187938
CNAG_05216	<i>RAD53</i>	CAMK protein kinase	-2,57186742
CNAG_04467		succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP)	-2,567293212
CNAG_02005		hypothetical protein	-2,552359376
CNAG_02576		hypothetical protein	-2,549320879
CNAG_05792		20S proteasome subunit alpha 3	-2,539229586
CNAG_03993	<i>BIM1</i>	RP/EB family microtubule-associated protein	-2,533257181
CNAG_01730	<i>STE7</i>	STE/STE7/MEK1 protein kinase	-2,52819824
CNAG_03962		minichromosome maintenance protein 6	-2,528078594
CNAG_03824		mitochondrial phosphate transporter	-2,521649767

CNAG_04552	<i>ITR1A</i>	putative myo-inositol transporter	-2,516484978
CNAG_01567		hypothetical protein	-2,5063781
CNAG_03534		hypothetical protein	-2,504665386
CNAG_03381		hypothetical protein	-2,502150211
CNAG_01167	<i>URE2</i>	chromosome associated protein	-2,499526155
CNAG_02675	<i>HSL101</i>	CAMK/CAMKL/GIN4 protein kinase	-2,487169639
CNAG_02009		extensin	-2,485454451
CNAG_08004		hypothetical protein	-2,484455146
CNAG_04247		hypothetical protein	-2,478842609
CNAG_01348		cyanate hydratase	-2,475799993
CNAG_06352	<i>CGP1</i>	CAP-Gly protein 1	-2,455520212
CNAG_04821	<i>PAN3</i>	PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit PAN3	-2,455392853
CNAG_09006		NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 5	-2,452394414
CNAG_12675		unspecified product	-2,450435769
CNAG_07988		telomerase reverse transcriptase	-2,427225495
CNAG_06342		SUMO activating enzyme	-2,419565624
CNAG_02355		UDP-xylose/UDP-N- acetylglucosamine transporter	-2,415610556
CNAG_04112		oxidoreductase	-2,410106647
CNAG_07558		hypothetical protein	-2,409539597
CNAG_03148		nuclear condensin complex protein	-2,407149022
CNAG_04262		E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1	-2,404485247
CNAG_01840	<i>TUB1</i>	tubulin beta chain	-2,400659005
CNAG_01573	<i>RIF2</i>	hypothetical protein	-2,400161537
CNAG_02892		phosphatidylinositol glycan, class B	-2,397316539
CNAG_00966		aromatic-L-amino-acid decarboxylase	-2,395185673
CNAG_00812	<i>IRR1</i>	cohesin complex subunit SA-1/2	-2,394984765
CNAG_07961		hypothetical protein	-2,390395987
CNAG_05659		hypothetical protein	-2,38934678
CNAG_04904	<i>CHC1</i>	clathrin heavy chain	-2,383021038
CNAG_06434		regulatory subunit for Cdc7 protein kinase	-2,38281992
CNAG_13138		unspecified product	-2,373831201
CNAG_01803		hypothetical protein	-2,367810249
CNAG_01915		ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	-2,36632412
CNAG_05853		hypothetical protein	-2,361300899
CNAG_07686		topoisomerase 1-associated factor 1	-2,347048085
CNAG_04763	<i>PMT2</i>	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase	-2,329430719
CNAG_03322	<i>UXS1</i>	UDP-glucuronate decarboxylase	-2,326148233
CNAG_02834		sterol 3-beta-glucosyltransferase	-2,313774149
CNAG_00020		hypothetical protein	-2,312700313
CNAG_00780		hypothetical protein	-2,307539837
CNAG_03265		hypothetical protein	-2,306039683
CNAG_00294		splicing factor 45	-2,30575357
CNAG_00902		hypothetical protein	-2,304671282
CNAG_04364		dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	-2,286650222

CNAG_07534	<i>TRSI30</i>	Trafficking protein particle complex II-specific subunit 130	-2,28278228
CNAG_01519		endonuclease/exonuclease/phosphatase	-2,28260946
CNAG_07464	<i>MBS1</i>	Mbp1 and Swi4-like APSES protein 1	-2,277226677
CNAG_04499		clathrin light chain	-2,276183982
CNAG_03405		hypothetical protein	-2,271863687
CNAG_01052		hypothetical protein	-2,270123415
CNAG_03084		endoribonuclease L-PSP	-2,259131761
CNAG_06714		endoplasmic reticulum vesicle protein 25	-2,259083664
CNAG_01541		hypothetical protein	-2,25857741
CNAG_05878		hypothetical protein	-2,255550676
CNAG_13099		unspecified product	-2,255420786
CNAG_12622		unspecified product	-2,252779135
CNAG_02179		Hemolysin	-2,2464015
CNAG_02563		DNA polymerase delta subunit 1	-2,240543608
CNAG_05097	<i>CKY1</i>	YjeF family protein	-2,239868723
CNAG_07041		hypothetical protein	-2,234331362
CNAG_00453		mitochondrial protein	-2,232656901
CNAG_04744		mannose-6-phosphate isomerase, class I	-2,224610813
CNAG_04170		wd-repeat protein	-2,221249274
CNAG_00385		20S proteasome subunit beta 3	-2,217609943
CNAG_02902		hypothetical protein	-2,214571466
CNAG_04696		DNA clamp loader	-2,213386798
CNAG_07627		hypothetical protein	-2,207443656
CNAG_06324		zinc finger protein	-2,20646181
CNAG_07987		hypothetical protein	-2,204768634
CNAG_03744		hypothetical protein	-2,191504073
CNAG_04052		minichromosome maintenance protein 5	-2,180295322
CNAG_04449		alpha-1,6-mannosyltransferase	-2,180084582
CNAG_02751		Short-chain dehydrogenase	-2,17904786
CNAG_01536		myosin heavy chain	-2,177953841
CNAG_00063		Histone H3	-2,172602527
CNAG_06150		hsp90-like protein	-2,172483445
CNAG_03539		hypothetical protein	-2,171443356
CNAG_00054		hypothetical protein	-2,171411853
CNAG_06079		Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	-2,170756421
CNAG_03396		NAD diphosphatase	-2,166274236
CNAG_01572		tyrosine phosphatase	-2,15836116
CNAG_05475		proteasome subunit alpha type-5	-2,156827164
CNAG_01031		hypothetical protein	-2,153423171
CNAG_04857		hypothetical protein	-2,152647674
CNAG_07681		hypothetical protein	-2,145378757
CNAG_00605		cytoplasmic protein	-2,143859628
CNAG_01521		metallo-beta-lactamase	-2,140615768
CNAG_04562		hypothetical protein	-2,13728895

CNAG_05422	<i>LIV11</i>	virulence related protein of unknown function	-2,136072314
CNAG_05469	<i>HRD1</i>	E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin	-2,1339634
CNAG_04901		hypothetical protein	-2,133851273
CNAG_03023		hypothetical protein	-2,131059187
CNAG_07333		ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25/28	-2,127361097
CNAG_07771		peptidase	-2,124571164
CNAG_03853	<i>SARI</i>	small copII coat GTPase	-2,121741259
CNAG_05562	<i>PBX2</i>	parallel beta-helix repeat protein	-2,116611384
CNAG_02351	<i>CHI4</i>	endochitinase	-2,115958863
CNAG_07822		FMN adenylyltransferase	-2,114403478
CNAG_03753		dolichol-phosphate mannosyltransferase	-2,112526811
CNAG_07894		hypothetical protein	-2,111453761
CNAG_02061		hypothetical protein	-2,110673238
CNAG_01706		hypothetical protein	-2,110173755
CNAG_03916		glucose-6-phosphate isomerase	-2,110048363
CNAG_07946		hypothetical protein	-2,105755758
CNAG_05513		septum-promoting GTP-binding protein 1	-2,101054481
CNAG_07553	<i>EZH2</i>	polycomb protein e(z)	-2,100145336
CNAG_04199		hypothetical protein	-2,09886923
CNAG_06141		dUTP pyrophosphatase	-2,091170677
CNAG_02178		hypothetical protein	-2,084906787
CNAG_01726		FACT complex subunit spt16	-2,08119618
CNAG_06238		Glutathione S-transferase	-2,080451878
CNAG_00423		kinetochore protein Spc24, fungi type	-2,078239113
CNAG_01637		COPII-coated vesicle component Erv46	-2,077066022
CNAG_00592		dolichol-phosphate mannosyltransferase	-2,076656989
CNAG_01063		WD-repeat protein mip1	-2,072544102
CNAG_02060		hypothetical protein	-2,061874678
CNAG_00064		COPII-coated vesicle protein	-2,059193869
CNAG_05748		NuA3 HAT complex component NTO1	-2,05730615
CNAG_05894		dynein heavy chain 1, cytosolic	-2,055744844
CNAG_06873		5-oxoprolinase	-2,05448412
CNAG_02393		hypothetical protein	-2,047077123
CNAG_02997		protein STU1	-2,042390662
CNAG_07969		hypothetical protein	-2,040025554
CNAG_07687		hypothetical protein	-2,039171123
CNAG_00920		YjeF family protein	-2,038134865
CNAG_06548		endoplasmic reticulum protein	-2,03747916
CNAG_02183		anaphase-promoting complex subunit 1	-2,036850712
CNAG_07782		oxidoreductase	-2,033175017
CNAG_05738		hypothetical protein	-2,026791288
CNAG_13206		unspecified product	-2,025828057
CNAG_07525		hypothetical protein	-2,024886238
CNAG_04835		dihydrodipicolinate synthase	-2,024334811

CNAG_03026		N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol deacetylase	-2,018531785
CNAG_02531	<i>CPK2</i>	Calcium-dependent protein kinase 2	-2,016733344
CNAG_00176		glutamate carboxypeptidase	-2,016290458
CNAG_04792		Phosphatidylserine decarboxylase	-2,008542131
CNAG_01147		arp2/3 complex 20 kDa subunit	-2,008073223
CNAG_03587		hypothetical protein	-2,004263597
CNAG_06370	<i>BAT2</i>	Branched-chain amino acid aminotransferase	-2,003356904
CNAG_02717		aryl-alcohol dehydrogenase	-2,002081066

Tabela S6. Genes de *C.neoformans* regulados positivamente com fold change $\geq 1,5$ em resposta ao tratamento com a combinação de 15 μ M e 0,125 μ g/ml de Anfotericina B

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2FoldChange
CNAG_07869		hypothetical protein	6,812546501
CNAG_03772	<i>HXS1</i>	high-affinity glucose transporter	5,867355038
CNAG_04837	<i>MLN1</i>	bHLH family transcription factor	5,800028432
CNAG_05662	<i>PTP1</i>	Polyol transporter protein 1	5,564046181
CNAG_05229		Stomatin family protein	5,009617327
CNAG_06932		Sugar transporter	4,925655302
CNAG_02733		Monosaccharide transporter	4,316105896
CNAG_05676		tyrosine aminotransferase	4,246018285
CNAG_00827		ribose 5-phosphate isomerase	4,18427755
CNAG_02044		hypothetical protein	4,014225012
CNAG_05785	<i>STB4</i>	putative transcription factor	3,991211406
CNAG_05324		Sugar transporter	3,974513199
CNAG_12544		unspecified product	3,96632298
CNAG_04178		hypothetical protein	3,966109522
CNAG_12512		unspecified product	3,739013667
CNAG_02045		acetoacetate-CoA ligase	3,667035586
CNAG_07874		Sugar transporter	3,621779608
CNAG_07388		hypothetical protein	3,54861143
CNAG_12032		unspecified product	3,521684483
CNAG_05867		L-fucose transporter	3,387154417
CNAG_07912		hypothetical protein	3,362804118
CNAG_01047		hypothetical protein	3,346633135
CNAG_12097		unspecified product	3,321192229
CNAG_00598		nicotinamide mononucleotide permease	3,318788215
CNAG_00864	<i>ITR2</i>	myo-inositol transporter, putative	3,304160226
CNAG_01542		taurine catabolism dioxygenase TauD	3,280696581
CNAG_05303	<i>ICL1</i>	isocitrate lyase	3,229310485
CNAG_07708		hypothetical protein	3,175646918
CNAG_07386		hypothetical protein	3,079982257
CNAG_00247	<i>LYS9</i>	alpha-aminoadipic semialdehyde synthase	3,022921644
CNAG_12210		unspecified product	3,016822634
CNAG_05683		hypothetical protein	2,992085563
CNAG_00869	<i>PDR5</i>	ATP-binding cassette transporter	2,99028329
CNAG_03061		multiple drug resistance protein	2,962200195
CNAG_13036		unspecified product	2,919902241
CNAG_06583		hypothetical protein	2,907354276
CNAG_03346	<i>BZP4</i>	bZip transcription factor, putative	2,879903916
CNAG_05310		nipsnap family protein	2,852994065
CNAG_04142		tartrate transporter	2,836237284
CNAG_12988		unspecified product	2,824372517
CNAG_12010		unspecified product	2,806692944
CNAG_00442		cyclin	2,792713214
CNAG_12423		unspecified product	2,792399018
CNAG_05381	<i>ITR3C</i>	myo-inositol transporter, putative	2,78097829
CNAG_07643		hypothetical protein	2,774001015
CNAG_07862		fumarate reductase	2,75556589
CNAG_03051		polyamine transporter	2,749652744
CNAG_03910	<i>ITR6</i>	myo-inositol transporter, putative	2,748153627
CNAG_07542		hypothetical protein	2,731965995

CNAG_03223		hypothetical protein	2,72285661
CNAG_01746		E3 ubiquitin-protein ligase RNF14	2,71775851
CNAG_12660		unspecified product	2,714189691
CNAG_06551		Carnitine O-acetyltransferase	2,706454905
CNAG_12306		unspecified product	2,701064011
CNAG_01936		Sugar transporter	2,693418075
CNAG_00844		hypothetical protein	2,682514874
CNAG_04263	<i>BZP2</i>	hypothetical protein	2,637836027
CNAG_07742		hypothetical protein	2,637825593
CNAG_07583		hypothetical protein	2,636498777
CNAG_12035		unspecified product	2,622698847
CNAG_06517		cytoplasmic protein	2,600738365
CNAG_13126		unspecified product	2,599687303
CNAG_12679		unspecified product	2,599686289
CNAG_05914		MFS transporter, SP family, general alpha glucoside:H symporter	2,594908199
CNAG_01365		hypothetical protein	2,570162482
CNAG_03713		efflux protein EncT	2,5373965
CNAG_06294		hypothetical protein	2,529961808
CNAG_12100		unspecified product	2,499090226
CNAG_12525		unspecified product	2,494619356
CNAG_04704		MFS transporter, SHS family, lactate transporter	2,494033353
CNAG_04280		hypothetical protein	2,468372283
CNAG_04631	<i>RIK1</i>	ribitol kinase	2,466206261
CNAG_12633		unspecified product	2,461548782
CNAG_12149		unspecified product	2,457030261
CNAG_12054		unspecified product	2,455814241
CNAG_12347		unspecified product	2,450937068
CNAG_01551	<i>GAT201</i>	GATA family transcription factor	2,435390317
CNAG_06926		hypothetical protein	2,431675116
CNAG_02533		hypothetical protein	2,419726272
CNAG_04623		hypothetical protein	2,419479482
CNAG_06433		AMP-binding protein	2,412792786
CNAG_02777	<i>PHO84</i>	phosphate:H symporter	2,406514839
CNAG_05003		hypothetical protein	2,405617656
CNAG_05889		hypothetical protein	2,40373878
CNAG_01925		hypothetical protein	2,395603979
CNAG_12110		unspecified product	2,388212542
CNAG_02254	<i>LPI12</i>	quinate permease	2,385079375
CNAG_03161		hypothetical protein	2,384190517
CNAG_13168		unspecified product	2,374984781
CNAG_12934		unspecified product	2,370317176
CNAG_12540		unspecified product	2,352493331
CNAG_05803		exo-beta-1,3-glucanase	2,329374492
CNAG_00192		hypothetical protein	2,323394261
CNAG_07766		DNA polymerase lambda subunit	2,322753643
CNAG_04807	<i>FZC8</i>	hypothetical protein	2,322211301
CNAG_12265		unspecified product	2,321079522
CNAG_03913		hypothetical protein	2,31073319
CNAG_00336		hypothetical protein	2,303654429
CNAG_06252	<i>CCD6</i>	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain protein	2,300571358
CNAG_12740		unspecified product	2,290878728
CNAG_06916		hypothetical protein	2,282138132
CNAG_03902	<i>RDS2</i>	Regulator of drug sensitivity 2, putative	2,274375862
CNAG_04100		hypothetical protein	2,265230091

CNAG_00306	<i>MTN2</i>	Copper-detoxifying metallothionein 2	2,263939006
CNAG_05436		hypothetical protein	2,263697599
CNAG_02758		NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	2,252886856
CNAG_05431	<i>RIM101</i>	pH-response transcription factor pacC/RIM101	2,233465113
CNAG_02147		cytochrome c peroxidase	2,229581842
CNAG_03465	<i>LAC1</i>	laccase	2,218814369
CNAG_05835	<i>LIV3</i>	wor1/pac2 family transcription factor	2,215095343
CNAG_03474		efflux protein EncT	2,213861646
CNAG_02156		hypothetical protein	2,196574514
CNAG_05599		hypothetical protein	2,191292065
CNAG_12756		unspecified product	2,188668789
CNAG_01552		blocked early in transport 1	2,174150107
CNAG_07641		Monosaccharide transporter	2,173632234
CNAG_03447		hypothetical protein	2,159470186
CNAG_01386		phosphatidylinositol glycan, class P	2,157335334
CNAG_02554		Sugar transporter	2,154960241
CNAG_01796		hypothetical protein	2,150417656
CNAG_00546	<i>CHS4</i>	Chitin synthase	2,146786082
CNAG_01844		tetracycline efflux protein	2,142775997
CNAG_02122		cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1	2,140953959
CNAG_03764		Integral membrane protein	2,136709634
CNAG_13123		unspecified product	2,119482117
CNAG_06097		hypothetical protein	2,10281178
CNAG_07698		hypothetical protein	2,100773583
CNAG_12415		unspecified product	2,098592455
CNAG_02562		acyl-CoA dehydrogenase	2,097871241
CNAG_06836		oxidoreductase	2,096359723
CNAG_04093	<i>YRM103</i>	putative transcription factor	2,092654249
CNAG_03122		hypothetical protein	2,090139531
CNAG_04869	<i>PNB1</i>	para-nitrobenzyl esterase	2,08937322
CNAG_06493		hypothetical protein	2,088791065
CNAG_12349		unspecified product	2,088477539
CNAG_12965		unspecified product	2,078425557
CNAG_04130		hypothetical protein	2,073542731
CNAG_13119		unspecified product	2,065361655
CNAG_07873		MIPC synthase	2,062839289
CNAG_12737		unspecified product	2,062243737
CNAG_03006		hypothetical protein	2,061309887
CNAG_12552		unspecified product	2,053691728
CNAG_06777		fructosyl amino acid oxidase	2,050209305
CNAG_02288		mitochondrial citrate transporter	2,046626937
CNAG_12672		unspecified product	2,044556819
CNAG_04588	<i>ERT1</i>	hypothetical protein	2,040127891
CNAG_00018	<i>FZC6</i>	hypothetical protein	2,038763027
CNAG_12065		unspecified product	2,036425809
CNAG_05420	<i>USV101</i>	Nutrient and stress factor 1, putative	2,03551489
CNAG_06081		Glucose oxidase	2,035417853
CNAG_07491		glutaredoxin	2,028191363
CNAG_01608		nuclear GTP-binding protein	2,022674969
CNAG_00762	<i>DPH1</i>	diphthamide biosynthesis protein 1	2,016960248
CNAG_07908		aconitate hydratase, mitochondrial	2,014090883
CNAG_03101		efflux protein EncT	2,013107599
CNAG_13172		unspecified product	2,007778837
CNAG_04793		hypothetical protein	2,002198118

Tabela S7. Genes de *C.neoformans* regulados positivamente com fold change ≥ 2 em resposta apenas ao tratamento com a combinação de 15 μ M e 0,125 μ g/ml de Anfotericina B

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2FoldChange
CNAG_07388		ATP-dependent RNA helicase DBP8	3,54861143
CNAG_01542	CDC2801	CMGC/CDK protein kinase	3,280696581
CNAG_06583	LIV1	virulence related protein of unknown function	2,907354276
CNAG_12010		hypothetical protein	2,806692944
CNAG_12306		Cystathionine beta-synthase	2,701064011
CNAG_06294		hypothetical protein	2,529961808
CNAG_12540	FZC34	transcription factor	2,352493331
CNAG_03913	DAL1	Allantoinase	2,31073319
CNAG_12965	RAD54	DNA repair and recombination protein RAD54-like protein	2,078425557
CNAG_06777	MP98	chitin deacetylase 2	2,050209305

Tabela S8. Genes de *C.neoformans* regulados negativamente com fold change ≤ -2 em resposta apenas ao tratamento com a combinação de 15 μ M e 0,125 μ g/ml de Anfotericina B

Gene ID	Nome do gene	Descrição do produto	log2FoldChange
CNAG_06388		hypothetical protein	-5,650829593
CNAG_06298		hypothetical protein	-5,377962563
CNAG_00125	<i>CRG1</i>	Putative regulator of G-protein signaling protein	-5,177035947
CNAG_01027		succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP)	-4,975943376
CNAG_12998		unspecified product	-4,279442832
CNAG_02768		hypothetical protein	-4,127741739
CNAG_12590		unspecified product	-4,02159772
CNAG_00932		hypothetical protein	-3,656032599
CNAG_03166		hypothetical protein	-3,614012161
CNAG_06139		hypothetical protein	-3,520745187
CNAG_07559		glucose-6-phosphate 1-epimerase	-3,329221189
CNAG_03983		oxidoreductase	-3,313220689
CNAG_02864		hypothetical protein	-3,08426415
CNAG_05891		TDG/mug DNA glycosylase	-3,040582249
CNAG_12560		unspecified product	-2,973136516
CNAG_06594		oxysterol binding protein	-2,960530945
CNAG_06428	<i>OTU1</i>	ubiquitin thioesterase OTU1	-2,936314985
CNAG_02100	<i>FAS2</i>	fatty acid synthase subunit alpha, fungi type	-2,891970733
CNAG_02543		hypothetical protein	-2,790957545
CNAG_02992		actin cross-linking protein	-2,721510302
CNAG_05544		hypothetical protein	-2,577398475
CNAG_03824		mitochondrial phosphate transporter	-2,521649767
CNAG_03381		hypothetical protein	-2,502150211
CNAG_01348		cyanate hydratase	-2,475799993
CNAG_09006		NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 5	-2,452394414
CNAG_02355		UDP-xylose/UDP-N- acetylglucosamine transporter	-2,415610556
CNAG_04112		oxidoreductase	-2,410106647
CNAG_02892		phosphatidylinositol glycan, class B	-2,397316539
CNAG_02834		sterol 3-beta-glucosyltransferase	-2,313774149
CNAG_01052		hypothetical protein	-2,270123415
CNAG_03084		endoribonuclease L-PSP	-2,259131761
CNAG_05878		hypothetical protein	-2,255550676
CNAG_13099		unspecified product	-2,255420786
CNAG_05097	<i>CKY1</i>	YjeF family protein	-2,239868723
CNAG_00453		mitochondrial protein	-2,232656901
CNAG_04744		mannose-6-phosphate isomerase, class I	-2,224610813
CNAG_03744		hypothetical protein	-2,191504073
CNAG_02751		Short-chain dehydrogenase	-2,17904786
CNAG_01536		myosin heavy chain	-2,177953841
CNAG_03539		hypothetical protein	-2,171443356
CNAG_00054		hypothetical protein	-2,171411853

CNAG_01572		tyrosine phosphatase	-2,15836116
CNAG_01031		hypothetical protein	-2,153423171
CNAG_04857		hypothetical protein	-2,152647674
CNAG_00605		cytoplasmic protein	-2,143859628
CNAG_04562		hypothetical protein	-2,13728895
CNAG_02351	<i>CHI4</i>	endochitinase	-2,115958863
CNAG_07894		hypothetical protein	-2,111453761
CNAG_07553	<i>EZH2</i>	polycomb protein e(z)	-2,100145336
CNAG_06238		Glutathione S-transferase	-2,080451878
CNAG_07969		hypothetical protein	-2,040025554
CNAG_00920		YjeF family protein	-2,038134865
CNAG_05738		hypothetical protein	-2,026791288
CNAG_04835		dihydrodipicolinate synthase	-2,024334811

Tabela S9. Lista de mutantes do suscetíveis ao peptídeo ToAP2 da varredura primária..

N° da placa	Poço	ID do Gene	N° da placa	Poço	ID do Gene	N° da placa	Poço	ID do Gene	N° da placa	Poço	ID do Gene
P0	A11	CNAG_05638	P5	A11	CNAG_04992	P13	A6	CNAG_01180	P17	D2	CNAG_07636
P0	D9	CNAG_02814	P5	B9	CNAG_03572	P13	C2	CNAG_03322	P17	D6	CNAG_06687
P0	H11	CNAG_02371	P5	B10	CNAG_00798	P13	D3	CNAG_06573	P17	G6	CNAG_04237
P0	H12	CNAG_07633	P5	C9	CNAG_03101	P13	D5	CNAG_00293	P19	B12	CNAG_06469
P1	A1	CNAG_01069	P5	F6	CNAG_02830	P13	E9	CNAG_04456	P20	F11	CNAG_00171
P1	A4	CNAG_03669	P5	F11	CNAG_04982	P13	F12	CNAG_04306	P21	D7	CNAG_00436
P1	A10	CNAG_00841	P6	D2	CNAG_07647	P13	H1	CNAG_01501	P21	E5	CNAG_00467
P1	B5	CNAG_03121	P6	G2	CNAG_00565	P13	D10	CNAG_07589	P21	G5	CNAG_00734
P1	C5	CNAG_03431	P7	A2	CNAG_00827	P13	E3	CNAG_05882	P22	B6	CNAG_00971
P1	E5	CNAG_01883	P7	H1	CNAG_07317	P13	E5	CNAG_02789	P22	B9	CNAG_00977
P1	E9	CNAG_01708	P8	D5	CNAG_04283	P13	E10	CNAG_00383	P22	C1	CNAG_00991
P1	G4	CNAG_00039	P8	H9	CNAG_06568	P14	A2	CNAG_04112	P22	E5	CNAG_01115
P1	G9	CNAG_03788	P9	D3	CNAG_02029	P14	H3	CNAG_02969	P22	G4	CNAG_01211
P2	A3	CNAG_01109	P9	E6	CNAG_05345	P14	G7	CNAG_06806	P23	G2	CNAG_01557
P2	B7	CNAG_02801	P10	G1	CNAG_03882	P14	H5	CNAG_04474	P23	C4	CNAG_01381
P2	C9	CNAG_02083	P11	D9	CNAG_04321	P15	E6	CNAG_02361	P23	E8	CNAG_01504
P2	H2	CNAG_04059	P11	E11	CNAG_04829	P15	G7	CNAG_02503	P23	E9	CNAG_01510
P2	G8	CNAG_01081	P11	F3	CNAG_07702	P16	A10	CNAG_00770	P25	A4	CNAG_02052
P2	G9	CNAG_00462	P11	F4	CNAG_06653	P16	B8	CNAG_01538	P25	B10	CNAG_02113
P3	C8	CNAG_04373	P11	G11	CNAG_07582	P16	C6	CNAG_03822	P25	C6	CNAG_02137
P3	D3	CNAG_00676	P11	H3	CNAG_05009	P16	D1	CNAG_02676	P25	D6	CNAG_02171
P3	E1	CNAG_00106	P11	H7	CNAG_05081	P16	G2	CNAG_01223	P26	A3	CNAG_02373
P3	H11	CNAG_00393	P12	C1	CNAG_00029	P16	G7	CNAG_01651	P26	F3	CNAG_02575
P4	C6	CNAG_07701	P12	C2	CNAG_05424	P16	H3	CNAG_06637	P26	G6	CNAG_02605
P4	E2	CNAG_04631	P12	C3	CNAG_05423	P16	H10	CNAG_04678	P28	E10	CNAG_03297
P4	F5	CNAG_03328	P12	C7	CNAG_03324	P17	B8	CNAG_03916	P28	E11	CNAG_03298
P4	G3	CNAG_00137	P12	C8	CNAG_03325	P17	B12	CNAG_01652	P28	B12	CNAG_03153
P4	G11	CNAG_01523	P12	E1	CNAG_02702	P17	C2	CNAG_07766	P29	C5	CNAG_03550
P4	H3	CNAG_07313	P12	G7	CNAG_04197	P17	C7	CNAG_04904	P29	E7	CNAG_03628
P4	H12	CNAG_07347	P12	H1	CNAG_05842	P17	C12	CNAG_03452	P30	A11	CNAG_03821

Continuação

N° da placa	Poço	Gene deletado	N° da placa	Poço	Gene deletado
P30	B5	CNAG_03834	P36	G9	CNAG_05807
P30	G6	CNAG_04045	P36	G10	CNAG_05816
P31	D5	CNAG_04293	P36	H3	CNAG_05837
P31	E5	CNAG_04341	P36	H9	CNAG_05859
P32	A6	CNAG_04654	P37	A12	CNAG_05899
P32	B3	CNAG_04710	P37	C11	CNAG_06027
P32	C1	CNAG_04738	P37	D12	CNAG_06129
P33	A3	CNAG_05237	P37	F3	CNAG_06164
P33	E9	CNAG_01647	P37	F5	CNAG_06169
P34	A4	CNAG_07873	P37	G11	CNAG_06224
P34	B11	CNAG_05381	P38	C3	CNAG_06365
P34	C5	CNAG_05411	P38	E3	CNAG_06473
P34	E2	CNAG_00589	P38	F7	CNAG_06543
P34	E9	CNAG_00608	P38	F10	CNAG_06553
P34	E10	CNAG_00609	P38	G3	CNAG_06569
P34	F8	CNAG_00640	P39	A4	CNAG_06675
P35	A2	CNAG_00781	P39	C6	CNAG_06792
P35	B7	CNAG_04277	P39	D10	CNAG_06834
P35	C2	CNAG_04316	P39	G3	CNAG_06997
P35	C7	CNAG_05019	P40	D7	CNAG_07544
P35	D6	CNAG_05040			
P35	G10	CNAG_05395			
P36	B5	CNAG_05560			
P36	B11	CNAG_05577			
P36	D6	CNAG_05659			
P36	D8	CNAG_05671			
P36	D9	CNAG_05672			
P36	D10	CNAG_05673			
P36	D11	CNAG_05682			
P36	E3	CNAG_05703			
P36	F8	CNAG_05756			

Tabela S10. Lista de mutantes do suscetíveis ao peptídeo ToAP2 da varredura secundária.

Nº da placa	Poço	Gene deletado	Nº da placa	Poço	Gene deletado
P3	D3	CNAG_00676	P16	G2	CNAG_01223
P4	G3	CNAG_00137	P16	H3	CNAG_06637
P4	G11	CNAG_01523	P16	H10	CNAG_04678
P5	A11	CNAG_04992	P17	B8	CNAG_03916
P5	F6	CNAG_02830	P17	C7	CNAG_04904
P6	D2	CNAG_07647	P17	D2	CNAG_07636
P6	G2	CNAG_00565	P19	B12	CNAG_06469
P7	H1	CNAG_07317	P21	D7	CNAG_00436
P8	D5	CNAG_04283	P21	E5	CNAG_00467
P9	D3	CNAG_02029	P23	G2	CNAG_01557
P11	E11	CNAG_04829	P25	A4	CNAG_02052
P11	F4	CNAG_06653	P25	B10	CNAG_02113
P12	C2	CNAG_05424	P26	A3	CNAG_02373
P12	C7	CNAG_03324	P26	F3	CNAG_02575
P12	C8	CNAG_03325	P29	C5	CNAG_03550
P12	E1	CNAG_02702	P29	E7	CNAG_03628
P13	C2	CNAG_03322	P30	B5	CNAG_03834
P13	E9	CNAG_04456	P30	G6	CNAG_04045
P13	E10	CNAG_00383	P32	A6	CNAG_04654
P14	A2	CNAG_04112	P32	C1	CNAG_04738
P14	G7	CNAG_06806	P33	A3	CNAG_05237
P14	H5	CNAG_04474	P34	A4	CNAG_07873
P15	E6	CNAG_02361	P35	C2	CNAG_04316
P16	A10	CNAG_00770	P40	D7	CNAG_07544
P16	D1	CNAG_02676			

Tabela S11. Enriquecimento de GO

GO ID	Nome	Nº de genes do genoma	Nº de genes da busca	%	Enriquecimento de fold	Valor de p	FDR	Valor de p ajustado
GO:0014070	response to organic cyclic compound	42	<u>6</u>	14.3	18.00	6.45e-7	2.56e-4	2.56e-4
GO:0031001	response to brefeldin A	14	<u>4</u>	28.6	35.99	3.08e-6	6.10e-4	1.22e-3
GO:0006820	anion transport	17	<u>4</u>	23.5	29.64	7.20e-6	8.83e-4	2.85e-3
GO:0006897	endocytosis	6	<u>3</u>	50.0	62.98	8.92e-6	8.83e-4	3.53e-3
GO:0098657	import into cell	7	<u>3</u>	42.9	53.99	1.55e-5	1.23e-3	6.15e-3
GO:0051181	cofactor transport	2	<u>2</u>	100.0	125.97	6.10e-5	2.42e-3	2.42e-2
GO:0015886	heme transport	2	<u>2</u>	100.0	125.97	6.10e-5	2.42e-3	2.42e-2
GO:0020028	endocytic hemoglobin import	2	<u>2</u>	100.0	125.97	6.10e-5	2.42e-3	2.42e-2
GO:0006821	chloride transport	2	<u>2</u>	100.0	125.97	6.10e-5	2.42e-3	2.42e-2
GO:1901678	iron coordination entity transport	2	<u>2</u>	100.0	125.97	6.10e-5	2.42e-3	2.42e-2
GO:0071238	cellular response to brefeldin A	11	<u>3</u>	27.3	34.35	7.16e-5	2.58e-3	2.84e-2
GO:0033036	macromolecule localization	96	<u>6</u>	6.3	7.87	8.45e-5	2.79e-3	3.35e-2
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	12	<u>3</u>	25.0	31.49	9.50e-5	2.89e-3	3.76e-2