

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA - ÊNFASE EM BIOINFORMÁTICA

Igor Paim

**Mineração de genes potencialmente regulados pela disponibilidade  
de zinco em *Cryptococcus gattii***

Porto Alegre

2021

Igor Paim

**Mineração de genes potencialmente regulados pela disponibilidade  
de zinco em *Cryptococcus gattii***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia na Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Charley Staats

Co-orientador: BSc. Rodrigo Streit

Porto Alegre

2021

Igor Paim

**Mineração de genes potencialmente regulados pela disponibilidade de zinco em *Cryptococcus gattii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Charley Staats - Instituto de Biociências

---

Prof. Dr. Diego Bonatto - Instituto de Biociências

---

Prof. Dr. Felipe Klein Ricachenevsky - Instituto de Biociências

Ao meu avô, que faleceu durante o período de desenvolvimento deste trabalho. Que no pós-vida encontre o descanso que um guerreiro como o senhor nunca teve. E que encontre muita canastra também.

## AGRADECIMENTOS

Só a ideia de preencher essa página já pesa mais do que a escrita de todo esse Trabalho de Conclusão. Hoje, com os olhos mais treinados, consigo reconhecer as faces dos gigantes sobre os quais me apoio para enxergar as estrelas. Sou profundamente grato, primeiramente, à minha família, que nunca hesitou em fornecer amparo em dias de amargura ou celebrar as pequenas vitórias diárias. Uma menção mais que honrosa à minha mãe, Regina, que sempre tão nobre “guerreira da luz”, como diria Paulo Coelho, despertou em mim desde cedo o cultivo da leitura, do aprendizado, da sensibilidade e da incansável busca da realização pessoal em um mundo tão caótico. Pelo visto sempre dá certo no final mesmo. Também, agradeço ao meu pai, Fernando, que batalhou arduamente contra a COVID-19 contraída no ano passado e que hoje se encontra recuperado e pronto para adentrar a tão sonhada vida de pacato aposentado. Obrigado pelo apoio durante a graduação e pelo estímulo para a construção de um caráter e reputação inquebráveis. Aos meus irmãos Vitor e Erick, agradeço pelo companheirismo sem fim e por me mostrarem que ainda consigo segurar uma chama de ágape na mão.

A vida acadêmica também foi repleta de pessoas fundamentais para o meu desenvolvimento científico e pessoal. Lentamente os colegas de graduação foram ganhando espaço no meu cotidiano e a presença constante nos desafios compartilhados formou amizades que vão se prolongar para o resto da vida. Todos eles me ensinaram lições preciosas, mesmo que indiretamente, a respeito de companheirismo, amor e resistência. Junto a isso, um agradecimento muito especial aos membros do LGPP, laboratório no qual trabalhei como estudante de Iniciação Científica durante quase toda a graduação, e onde encontrei companheiros como o professor Rogério Margis e os alunos de pós-graduação Nureyev, Natália e Frank, com os quais aprendi o que sei hoje de bioinformática e que me abriram muitas portas. Não há dia que eu não sinta falta da nossa antiga rotina de trabalho, interrompida por longas pausas para tomar café juntos. De outro lado, um agradecimento ao grupo de microbiologia de fungos do CBiot, onde tive o prazer de fazer novas colaborações e desenvolver este Trabalho de Conclusão ao lado de pesquisadores muito empáticos e extremamente competentes, como o professor Charley Staats e o doutorando Rodrigo.

*“Beware; for I am fearless,  
and therefore powerful.”*

Mary Shelley - Frankenstein

## RESUMO

Fungos do gênero *Cryptococcus* são os agentes etiológicos da criptococose, uma doença responsável por mais de 180.000 óbitos por ano. A maioria desses casos são de indivíduos imunocomprometidos, como portadores de HIV e transplantados, principalmente de países subdesenvolvidos, onde o acesso e disponibilidade de terapias antirretrovirais e antifúngicas é reduzida. Para combater a infecção protagonizada por esses patógenos, as células do sistema imune desenvolveram uma estratégia chamada imunidade nutricional, em que as concentrações de nutrientes como metais e carboidratos são ativamente reduzidas do meio onde podem ser encontradas as células invasoras, de modo a restringir seu desenvolvimento e replicação. Portanto, patógenos como *Cryptococcus gattii*, que é capaz de infectar até mesmo indivíduos imunocompetentes, necessitam de um complexo sistema de regulação de captura de metais do meio onde se encontram para garantir sua sobrevivência. Assim, o presente trabalho busca delimitar e inferir a função de um conjunto de genes regulados pelo fator de transcrição Zap1, um importante membro do sistema de regulação do metabolismo de zinco em *C. gattii*. Empregando a combinação de dois experimentos de RNA-seq e correções estatísticas necessárias para a minimização de erro, foi possível estipular o *regulon* de Zap1 como sendo composto por 49 genes. A análise das regiões regulatórias *upstream* desses genes revelou a sequência CAGTTACA como sendo o provável motivo de ligação de Zap1 ao DNA, presente em 42 dos genes identificados. Além disso, um processo mais detalhado de anotação e enriquecimento funcional foi realizado com os genes regulados por Zap1, e apontou uma participação destes em diversos processos biológicos relevantes para a infecção, como a regulação da homeostase de íons metálicos, da resposta ao estresse oxidativo, da absorção e degradação de carboidratos, etc. Dessa forma, pudemos determinar com mais confiança o *regulon* de Zap1 em *C. gattii*, expandindo seu papel para além de um regulador da absorção de zinco e fornecendo importantes direcionamentos para futuras pesquisas que busquem validar os achados inferidos por este trabalho, visando caracterizar o processo de imunidade nutricional e desenvolver novas estratégias terapêuticas baseadas nesse mecanismo.

**Palavras-chave:** imunidade nutricional; zap1; deficiência de zinco;

## ABSTRACT

Species of the *Cryptococcus* genera are the etiological agents of cryptococcosis, a disease responsible for over 180,000 deaths per year. Most of these cases are from immunocompromised individuals, such as HIV carriers and transplanted patients, occurring mainly in underdeveloped countries, where the access and availability of antiretroviral and antifungal treatments are limited. To fight off the infection, immune cells developed a strategy called nutritional immunity, in which the concentration of nutrients, mostly metals and carbohydrates, are actively reduced from the pathogen habitat, leading to arrested fungal growth. Therefore, pathogens such as *Cryptococcus gattii*, which is capable of infecting even immunocompetent individuals, require a complex regulation system of metal uptake from their growth medium to ensure their survival. The present work aims to delimit and characterize the set of genes regulated by Zap1, an important member from the zinc metabolism regulation machinery in *C. gattii*. Using two RNA-seq experiments and statistical corrections needed for error minimization, we were able to propose Zap1's regulon as being composed by 49 genes. The analysis of the upstream regulatory regions of these genes revealed the sequence CAGTTACA, identified in 42 genes, as the putative Zap1 DNA binding site. Furthermore, a more thorough annotation process and a functional enrichment analysis of the Zap1 targets revealed their association with several important biological processes connected to the infection, such as the regulation of metallic ions homeostasis, the oxidative damage response and carbohydrate uptake and degradation. In conclusion, we were able to determine *C. gattii* Zap1 regulon more accurately, expanding its role from a simple zinc absorption regulator and also providing directions for future researches that seek to validate the data inferred in this work, allowing a broader understanding of nutritional immunity process and the development of therapeutic strategies based in this mechanism.

**Keywords:** nutritional immunity; zap1; zinc deficiency;



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo gerais .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
<b>3. METODOLOGIA E RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Obtenção e limpeza das bibliotecas .....	24
3.2 Mapeamento e contagem dos <i>reads</i> .....	26
3.3 Cálculo e análise da expressão diferencial .....	27
3.4 Análise de enriquecimento funcional .....	28
3.5 Identificação do potencial motivo de ligação de Zap1 .....	32
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Cryptococcus*, em especial *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, são os agentes etiológicos da criptococose, uma doença fúngica que atinge principalmente indivíduos imunocomprometidos, responsável por mais de 220.000 casos de infecções e 180.000 óbitos de portadores de HIV anualmente, o que corresponde a 15% das mortes associadas à AIDS (RAJASINGHAM *et al.*, 2017). A principal forma de apresentação da criptococose é pulmonar, embora ela possua caráter sistêmico, de forma que a disseminação da infecção pode ocorrer para diversos órgãos e sistemas do hospedeiro (MAY *et al.*, 2016). Dentre esses, a disseminação para o sistema nervoso central, observada principalmente na espécie *C. neoformans*, mas não ausente em infecções causadas por *C. gattii*, pode gerar um quadro de meningoencefalite com maior taxa de mortalidade. A criptococose é um grave problema de saúde principalmente em países subdesenvolvidos, como nas regiões da África subsaariana e sudeste asiático, onde a associação entre o grande número de pacientes HIV-positivos com a baixa disponibilidade de tratamentos antirretrovirais e antifúngicos propicia o desfecho fatal da doença (LOYSE *et al.*, 2013).

Apesar de *C. neoformans* ter uma frequência maior em isolados de amostras clínicas, *C. gattii* também apresenta relevância no contexto epidemiológico da doença (AGUIAR *et al.*, 2017; MEYER *et al.*, 2011). Esta espécie ganhou destaque recentemente por protagonizar um surto do Noroeste do Pacífico, em que vários indivíduos, majoritariamente da ilha de Vancouver, no Canadá, e dos estados de Washington e Oregon, nos Estados Unidos da América, apresentaram casos clínicos de criptococose (ENGELTHALER; CASADEVALL, 2019). O surto chamou atenção pela ocorrência em regiões de clima temperado, contrária à esperada distribuição tropical e subtropical, e também pela infecção de indivíduos aparentemente saudáveis e imunocompetentes, atingindo até mesmo outras espécies de mamíferos (BYRNES *et al.*, 2009). Mais tarde, a expansão de estudos filogenéticos, alavancada por informações genômicas e tipagens moleculares mais avançadas, permitiram redefinir o complexo de espécies *Cryptococcus*, sugerindo a separação as linhagens de *C. neoformans* em duas espécies diferentes e dividindo o complexo de *C. gattii* em outras cinco espécies (HAGEN *et al.*, 2015). Essas cinco espécies podem ser discernidas em quatro principais tipos moleculares (VGI-VGIV), que apresentam algumas

variações fenotípicas e geográficas entre si, sendo VGI (*C. gattii*) o mais frequente em casos clínicos. A linhagem R265 (subtipo VGIIa, *C. deuterogattii*), isolada de pacientes durante o surto da ilha de Vancouver, como já descrito, apresenta um perfil hipervirulento capaz de infectar indivíduos imunocompetentes, e imunocomprometidos em menor extensão, podendo causar graves infecções pulmonares e eventos de pneumonia, embora sua disseminação para o resto do organismo seja infrequente, com a progressão da doença geralmente não levando a quadros fatais, dada a intervenção médica adequada (AGUIAR *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2012).

O tratamento da criptococose consiste no uso integrado de três classes de antifúngicos, e embora seja eficiente em boa parte dos casos, alguns desafios surgem devido ao estado imunológico geralmente fragilizado do paciente e à ameaça do desenvolvimento de resistência por parte do patógeno (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020). No estágio inicial de indução, o tratamento envolve o uso combinado de anfotericina B, um ligante de esterol, e flucitosina, um análogo de uracila. Também é utilizado fluconazol, um antagonista do metabolismo de ergosterol, de forma mais tardia no tratamento, durante o estágio de consolidação e manutenção. Novas estratégias terapêuticas têm sido avaliadas para combater os recentes eventos de resistência a antibióticos observados em alguns isolados, além de fornecer alternativas mais acessíveis e seguras a países com recursos deficitários (MOURAD; PERFECT, 2018). Muitas dessas alternativas se baseiam no desenvolvimento de moléculas que possuem como alvo importantes determinantes de virulência, como o uso de ciclosporina na inibição da via de calcineurina, enquanto outras iniciativas visam o desenvolvimento de vacinas, terapias imunológicas ou o reposicionamento de fármacos, como o uso combinado de fluconazol e do antidepressivo sertralina (KONTOYIANNIS *et al.*, 2008; TREVIÑO-RANGEL *et al.*, 2016).

O processo infeccioso da criptococose se inicia através da inalação de propágulos infecciosos pelo hospedeiro, geralmente na forma de leveduras dissecadas ou basidiósporos (MAY *et al.*, 2016). A distribuição ambiental de *Cryptococcus* é ubíqua, abrangendo solos, cascas de árvores, como no eucalipto, excretas de pássaros, como dos abundantes pombos em centros urbanos, e até mesmo sendo capaz de sobreviver no interior de amebas e nematódeos (CHOWDHARY *et al.*, 2012). Ainda existe debate sobre uma maior ocorrência da doença na forma de reativação de infecção latente, ao invés de uma infecção primária,

onde o organismo já exposto às células do fungo com capacidade de latência estendida tem seu sistema imune comprometido e permite a reativação da doença (SAHA *et al.*, 2007). Uma vez dentro do sistema respiratório, os fungos atingem o ambiente pulmonar e começam o processo de colonização. A primeira linha de defesa celular contra essa invasão são os fagócitos, como os macrófagos e células dendríticas, que vão atuar no engolfamento e destruição do patógeno invasor, empregando diferentes métodos de inativação (VOELZ; MAY, 2010).

O processo de fagocitose inicia no reconhecimento das células invasoras através de padrões moleculares altamente conservados ativados por patógenos, que são detectados por receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores do tipo Toll e de lectina do tipo C, presentes nas membranas de células fagocíticas. Membros da família do tipo Toll, por exemplo, são capazes de reconhecer carboidratos da cápsula de *Cryptococcus*, como glucuronoxilomanana, ou componentes da parede celular, como quitina e beta-glucano (CAMPUZANO; WORMLEY, 2018). A interação com esses receptores inicia rotas de sinalização que levam a respostas inflamatórias, e fomenta o processo de formação do fagossomo, em que o citoesqueleto de fagócitos passa a ser redesenhado para dar origem a pseudópodes, além de recrutamento de muitos agentes moleculares que vão atuar na remodelagem da membrana plasmática, propiciando um ancoramento e engolfamento adequado das leveduras nas proximidades (AUSTERMEIER *et al.*, 2020). Concomitante à formação da estrutura do fagossomo, é iniciado seu processo de maturação, onde as subseqüentes fusões a endossomos e lisossomos munem a organela das ferramentas necessárias para eliminação dos patógenos capturados. Assim, tanto o conteúdo do lúmen do fagolisossomo quanto a sua membrana são alterados significativamente para fornecer um ambiente metabólico pobre, marcado pela presença de moléculas antimicrobianas e uma crescente acidificação, no qual o patógeno tem dificuldade de proliferar e eventualmente morre (GILBERT; WHEELER; MAY, 2014).

Somado a isso, a própria temperatura corporal de mamíferos se configura como um grande desafio para a disseminação do fungo, já que a maioria dos patógenos ambientais não possui os meios necessários para a sobrevivência em temperaturas mais elevadas, embora *Cryptococcus spp.* tenha apresentado mecanismos de resistência térmica para manter sua taxa de reprodução, como uma resposta antioxidante diversa e rotas de manutenção do enovelamento correto de proteínas (BALLOU; JOHNSTON, 2017).

Nessa disputa pela infecção do hospedeiro, espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* desenvolveram uma série de ferramentas para subverter os mecanismos de resistência imunológica do hospedeiro. Fatores de virulência já bem caracterizados em outros patógenos permitem ao fungo evadir células fagocíticas, resistir no ambiente extremamente adverso de fagolisossomos e suprimir diferentes aspectos da resposta imunológica, contribuindo para um período de infecção ou latência estendido (ZARAGOZA, 2019).

Vários desses fatores contribuem para manter uma baixa resposta pró-inflamatória gerada pelo sistema imune em resposta a *C. gattii*; menor inclusive que a de outros patógenos fúngicos respiratórios (SCHOFFELEN *et al.*, 2013). Essa modulação, se dá, por exemplo, pelo desprendimento dos componentes da espessa cápsula polissacarídica que reveste a levedura, constituída principalmente de glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (galGXM), que inativam a rota pró-inflamatória do fator nuclear  $\kappa$ B e eventualmente suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias (VECCHIARELLI *et al.*, 2013). Da mesma forma, a quitina, principal componente proteico da parede celular fúngica, também é capaz de reduzir a produção de interleucinas importantes para a maturação de células dendríticas, diminuindo a taxa de fagocitose do patógeno (WIESNER *et al.*, 2015).

Como uma das primeiras e mais importantes ferramentas de combate do sistema imune, células criptococócicas precisam lidar constantemente com a fagocitose por macrófagos e células dendríticas. Provavelmente pelo seu histórico evolutivo de disputa com amebas fagocitárias, essa levedura desenvolveu importantes mecanismos para evitar esse processo e permitir sua evasão e replicação mesmo dentro de fagossomos (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). A própria cápsula polissacarídica, além de blindar a célula contra desidratação e radicais livres, consegue reduzir a taxa de fagocitose, provavelmente por afetar a ligação de receptores e anticorpos à vários antígenos da parede celular, que ficam mais encobertos pelos carboidratos e suas ramificações (ZARAGOZA, 2019). Somado a isso, a diferenciação de *C. neoformans* em células com tamanhos bem maiores do que o normal, chamadas células titãs, também foi associada com uma significativa evasão da fagocitose (HOMMEL *et al.*, 2018). Embora esse morfotipo seja regulado por diversos fatores genéticos e ambientais, foi observado que as células titãs podem apresentar de 10 até 100  $\mu$ m de diâmetro, e que conseguem não só evitar serem engolfadas por macrófagos, mas também evitar que as células de tamanho normal

sejam fagocitadas, promovendo uma sobrevivência prolongada da população durante o estágio inicial de estabelecimento da colonização pulmonar (OKAGAKI; NIELSEN, 2012).

Ainda que sejam fagocitadas, as células de *Cryptococcus* são capazes de se replicar e evadir as defesas do hospedeiro para garantir sua sobrevivência. Através de um processo de exocitose não-lítica, também chamado de vomocitose, as células invasoras conseguem reverter a fusão do fagossomo à membrana plasmática e retornar ao meio extracelular, sem afetar a viabilidade da célula hospedeira (ALVAREZ; CASADEVALL, 2007). Ainda, também pode ocorrer uma transferência lateral entre as células fagocíticas e um compartilhamento da carga patogênica. Por outro lado, o processo lítico envolve a replicação massiva do patógeno no meio intracelular, levando a um rompimento e destruição da célula hospedeira (MAY *et al.*, 2016).

Para enfrentar o ambiente inóspito que o hospedeiro impõe, vários fatores de virulência contrapõem os efeitos tóxicos advindos do pH baixo, da alta concentração de radicais livres e da restrição nutricional. A secreção de urease por *Cryptococcus neoformans*, por exemplo, contribui para impedir a acidificação do fagolisossomo, através da degradação de ureia em gás carbônico e amônia, além de promover uma maior taxa de sequestro do fungo para dentro de vasos microcapilares, o que está associado com uma disseminação mais frequente para o sistema nervoso central (FU *et al.*, 2018; OLSZEWSKI *et al.*, 2004). A produção de melanina também é outro fator de virulência clássico, e está associada com a mitigação de efeitos nocivos que alguns estressores como radiação ionizante, calor e espécies reativas de oxigênio podem ter (ZARAGOZA, 2019). Linhagens com deficiência na produção desse pigmento possuem uma virulência significativamente reduzida, além de apresentarem alterações na produção de citocinas pelo hospedeiro e uma disseminação reduzida para o cérebro (MEDNICK; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2005).

Os mecanismos através dos quais *Cryptococcus* possivelmente manipula a acidificação do fagossomo e altera sua maturação ainda não são bem estabelecidos. Evidências já mostraram que o pH baixo desse ambiente pode ser até favorável e parece não restringir o crescimento e replicação dessa levedura (LEVITZ *et al.*, 1999). Além disso, fagossomos com células criptocócicas engolfadas tem problemas em manter sua acidificação ao longo da maturação, impedindo a manutenção de um pH ótimo para a atividade de enzimas lisossomais com atividade antimicrobiana, como as

catepsinas. Uma das possíveis causas desse aumento do pH é o vazamento do conteúdo interno do fagossomo através da permeabilização de sua membrana, induzida pela levedura por mecanismos ainda desconhecidos (DELEON-RODRIGUEZ; CASADEVALL, 2016).

Somado a isso, a produção de radicais livres por células do sistema imune, principalmente na forma de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, é uma importante forma de sinalização celular e ferramenta antimicrobiana, embora essa relação não seja tão bem determinada especificamente durante a infecção por *Cryptococcus* (YANG *et al.*, 2013). Sabe-se que células criptococócicas enfrentam uma condição de estresse oxidativo após o processo de fagocitose devido ao recrutamento da maquinaria de detoxificação celular do patógeno, envolvendo catalases, superóxido dismutases e tiol peroxidases, muitas das quais têm impactos significativos na virulência em modelo murino (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). A atuação de ROS como moléculas sinalizadoras, por exemplo, ocorre durante a formação do inflamassoma NLRP3 pelo hospedeiro, e complementa a ativação causada pelo biofilme produzido por *C. neoformans* durante a colonização do tecido cerebral (LEI *et al.*, 2013).

Outro mecanismo importante de resistência mais recentemente descrito é a chamada imunidade nutricional, caracterizada pela atuação do hospedeiro na manutenção da disponibilidade de determinados nutrientes essenciais para o crescimento pleno do patógeno. Durante a infecção por *Candida albicans*, por exemplo, neutrófilos liberam uma rede de fibras de cromatina conjugadas a proteínas antimicrobianas conhecida como NETs (Neutrophil Extracellular Traps), que também permitem a liberação de calprotectina, uma importante proteína capaz de se ligar a zinco e cobre, limitando a concentração lábil desses metais e atrasando a replicação desse patógeno (BESOLD *et al.*, 2018; URBAN *et al.*, 2009). Estudos transcriptômicos de células de *C. gattii* obtidas de lavados broncoalveolares também indicam uma condição de restrição nutricional, em que rotas de captação e síntese de carboidratos e aminoácidos são readequadas para contrapor a escassez do lúmen fagossomal, embora seu perfil metabólico ainda não seja bem conhecido (FERRAREZE *et al.*, 2017).

A maioria dos estudos que descrevem o processo de imunidade nutricional focam na restrição imposta por células do sistema imune na concentração de metais de transição, como ferro, zinco e manganês, embora a hiperacumulação de metais

como ferramenta antimicrobiana também seja observada. Durante a infecção por *Histoplasma capsulatum*, por exemplo, foi observado um comportamento dual que controla a concentração de cobre no interior dos fagossomos de macrófagos. Em um primeiro momento, a elevada concentração fagossomal de cobre em macrófagos inativados é utilizada como ferramenta de imunidade inata, que se mostra mais efetiva no controle de algumas espécies de bactérias (ROWLAND; NIEDERWEIS, 2012), mas que não é capaz de deter a proliferação intracelular de *Histoplasma*. Mais tarde entra em ação um mecanismo adaptativo, em que macrófagos ativados por interferon-gama passam a alterar o ambiente fagossomal para estabelecer uma condição de limitação nutricional metálica, que consegue restringir a reprodução do patógeno (BRECHTING; RAPPLEYE, 2019). Assim, a imunidade nutricional e sua versatilidade constituem uma importante estratégia do sistema imune para imposição de obstáculos a patógenos intracelulares, de forma que esses necessitam de um repertório diverso de ferramentas moleculares para que possam garantir a obtenção desses nutrientes e desenvolver a infecção.

*Cryptococcus* também precisa constantemente readequar o abastecimento de macro e micronutrientes essenciais e lidar com flutuações ambientais dos níveis de metais como o cobre, por exemplo. Durante a colonização pulmonar ou a fagocitose por células alveolares, a presença de um ambiente rico em cobre exige o emprego de metalotioneínas, pequenas proteínas ricas em cisteína e capazes de se ligar ao cobre em excesso, que poderia levar a efeitos citotóxicos (DING *et al.*, 2013). Entretanto, durante a colonização do tecido cerebral, onde a concentração de cobre é inferior, é necessária a presença de transportadores de alta afinidade, como CTR4 (SUN *et al.*, 2014).

A absorção de ferro durante a infecção também é essencial, já que além de ser componente importante de diversas enzimas, os níveis intracelulares do metal afetam fatores de virulência como a produção de melanina e da cápsula (JUNG *et al.*, 2006). Estudos com *C. neoformans* indicam que o basidiomiceto possui pelo menos dois sistemas de obtenção de ferro: um dependente de sideróforos e outro sistema chamado redutivo. Embora não existam evidências que células criptocócicas sejam capazes de sintetizar e secretar sideróforos, moléculas produzidas pelo hospedeiro ou outros organismos, como ferritina, lactoferrina, transferrina e o grupamento prostético heme, podem servir como fonte de ferro mediante captação por transportadores como SIT1 (TANGEN *et al.*, 2007). Por outro lado, o sistema redutivo



se baseia na conversão do íon férrico para íon ferroso por meio de redutases associadas à membrana ou outros agentes, seguido da consequente absorção por meio de permeases, que têm impacto na virulência plena do patógeno e cuja regulação é mais conhecida (JUNG *et al.*, 2008).

Depois do ferro, zinco é o metal de transição mais abundante em seres humanos e é de extrema importância para sistemas biológicos, já que grande parte do proteoma eucarioto depende desse metal como componente estrutural e cofator enzimático (WANG, Y. *et al.*, 2018). A presença desse íon é essencial para o enovelamento de diversas proteínas e domínios estruturais, como a grande e diversa família de motivos de dedos de zinco, intimamente associada com a atividade de diversos fatores de transcrição (LI; LIU, 2020). Além disso, sua participação na constituição de centros catalíticos de enzimas, atuando na coordenação de resíduos proteicos ou de outros metais, é fundamental para muitas atividades e processos celulares, como reações de detoxificação, divisão celular, ligação a DNA/RNA, homeostase de íons, interações proteicas, etc. (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001).

Zinco também é usado como ferramenta de imunidade nutricional durante a infecção por *Cryptococcus* (BESOLD *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017). Macrófagos ativamente diminuem a concentração de zinco lábil que poderia ser utilizado por células criptocócicas fagocitadas, embora sempre mantendo um nível basal necessário para suas atividades fisiológicas. O modelo proposto de restrição metálica intracelular envolve a produção de metalotioneínas, que diferentemente de suas ortólogas em *C. neoformans*, são capazes de quelar zinco e diminuem ainda mais a quantidade do metal livre no citoplasma. De maneira sinérgica, transportadores da família ZnT armazenam zinco citoplasmático para dentro de organelas, como endossomos e o complexo de Golgi, além de haver uma diminuição da atividade de alguns transportadores da família ZIP, que importam zinco do meio extracelular para o interior da célula.

Dessa forma, o controle da obtenção desse metal por parte do patógeno é de extrema importância para a consolidação da infecção. Vários genes e processos fisiológicos envolvidos na manutenção da homeostase de zinco têm sido caracterizados em *Cryptococcus spp.*, como o fator de transcrição Zap1, e as proteínas reguladas por ele, principalmente da família Zip. Assim como na levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae* (ZHAO; EIDE, 1996a, 1996b), os transportadores Zip já foram caracterizados em *C. gattii* e associados intimamente com o transporte

de metais e a manutenção da virulência plena do fungo. A família possui quatro membros (Zip1-4) que contém domínios transmembrana e uma localização celular predita na membrana plasmática, além de importantes papéis na regulação da homeostase de diferentes íons metálicos (SCHNEIDER *et al.*, 2015).

Zip1 é o maior responsável pelo transporte de zinco para o meio intracelular, enquanto Zip2 apresenta um papel bem menor, com uma possível redundância entre a função das duas proteínas. A deleção independente de ZIP1 induz um crescimento reduzido das células na presença de quelante de zinco, aumenta a taxa de fagocitose por macrófagos e também leva a menores níveis intracelulares de zinco na levedura, o que ocasiona em um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, a deleção independente de ZIP2 revela apenas um papel minoritário do transportador na homeostase de zinco e um efeito negativo na sobrevivência dentro de macrófagos por um período mais longo, além de sugerir uma possível atuação no transporte de outros metais que ainda precisa ser avaliada. A deleção conjunta dos transportadores novamente confirma a importância da homeostase de zinco e do efeito negativo do estresse oxidativo para a virulência de *C. gatti* (SCHNEIDER *et al.*, 2015).

Adicionalmente, ZIP3 também foi recentemente caracterizado como um ortólogo de ATX2, um gene de *S. cerevisiae* que codifica um transportador de manganês localizado no complexo de Golgi, que está associado com uma variedade de fatores de virulência clássicos, como melanização, produção de GXM, virulência em modelo invertebrado e produção de espécies reativas de oxigênio (GARCIA *et al.*, 2020). Por último, Zip4 aparece mais distante dos outros membros da família e foi proposto como ortólogo de Yke4, um transportador bidirecional de zinco localizado no retículo endoplasmático em *S. cerevisiae*, mas que ainda não foi caracterizado em *C. gattii* (SCHNEIDER *et al.*, 2015).

Em *S. cerevisiae*, o fator de transcrição Zap1 já foi caracterizado como uma peça central na homeostase de zinco pela regulação da expressão da família de transportadores ZIP (BIRD *et al.*, 2004, 2006). A proteína possui 880 aminoácidos e apresenta cinco domínios de dedos de zinco, cuja função proposta é de ligação ao DNA, e dois domínios de ativação, responsáveis pela detecção dos níveis intracelulares de zinco através da ligação ao metal e consequente inativação. O fator de transcrição tem papel positivo na regulação dos genes alvos ao se ligar à sequência consenso 5'-ACCTTNAAGGT-3' com certo grau de degeneração, mas também pode

atuar como repressor mediante ocupação de sítios próximos a regiões regulatórias, como TATA *box*, ou, ainda, levar a produção de transcritos intergênicos que deslocam a maquinaria de transcrição de genes próximos.

Várias iniciativas buscaram determinar o grupo de genes regulados por Zap1, porém a delimitação desse conjunto de genes apresenta uma sensibilidade considerável às técnicas utilizadas para identificação dos alvos e aos meios empregados para simular a condição de estresse, revelando alguns obstáculos a serem superados como consequência de uma variação biológica intrínseca ao fator de transcrição, visualizada pelo condicionamento da sua expressão e regulação por diferentes fatores bióticos e abióticos. Assim, elementos como a extensão da gravidade da limitação de zinco, controlada pela concentração ou pelo tempo de exposição a um agente limitante, e a forma como esse estresse é gerado, seja pelo uso de quelantes ou pelo cultivo das células em resinas de ligação a metais, podem fornecer resultados contrastantes no conjunto final de genes alvos. Portanto, através da combinação de diferentes estratégias de identificação em linhagens pouco funcionais ou deletadas para o gene e crescidas em condições de estresse pela limitação ou ausência de zinco, o *regulon* de Zap1 em *S. cerevisiae* pode ser determinado com maior confiança como sendo composto por cerca de 80 diferentes genes (WU *et al.*, 2008).

Entre esses genes estão três importantes transportadores de metais da família ZIP (ZRT1-3), cuja caracterização já demonstrou o papel dessas proteínas no transporte de zinco para o meio intracelular e na sua mobilização de organelas de armazenamento (ZHAO; EIDE, 1996a, 1996b). O mecanismo proposto de resposta primária diz respeito ao início da detecção de privação de zinco pela célula, que vai buscar uma homeostase na nova condição de estresse, enquanto a resposta secundária se estende para proporcionar à levedura um mecanismo adaptativo, em que o metabolismo energético e rotas de síntese de diversas biomoléculas e estruturas celulares vão se reorganizar para contrapor a ausência de zinco, além de proporcionar a mitigação de possíveis efeitos citotóxicos da deficiência do metal (WANG, Y. *et al.*, 2018).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a resposta primária descrita envolve principalmente um aumento dos níveis citosólicos de zinco através da sua mobilização para fora do vacúolo pela proteína ZRT3 e, também, pela entrada do metal do meio extracelular por transportadores associados à membrana, como ZRT1, ZRT2 e FET4

(um transportador de metais majoritariamente associado com deslocamento de ferro e cobre) (WU *et al.*, 2008). A resposta secundária envolve uma exposição por um período mais longo ou de forma mais grave à deficiência de zinco, onde ocorre uma remodelação das rotas de biossíntese da célula visando minimizar o uso do metal e aliviar os efeitos negativos da sua deficiência, fortalecendo uma resposta adaptativa. Um mecanismo secundário já melhor caracterizado envolve a reorganização da produção proteica visando a economia de zinco, onde ocorre, por exemplo, a promoção da transcrição de isoformas que utilizam menos átomos do metal ou são independentes dele. Esse sistema pode ser ilustrado pela regulação negativa que Zap1 exerce nos genes de álcool desidrogenases, onde ADH1 e ADH3 são isoformas muito abundantes cuja atividade catalítica depende de zinco, enquanto ADH4, que utiliza átomos de ferro, tem sua transcrição aumentada (BIRD *et al.*, 2006).

Além disso, outro aspecto dessa resposta mais prolongada recai sobre o alívio dos danos causados pelos níveis reduzidos de zinco, que é garantido pela ação de proteínas com função de detoxificação de espécies reativas de oxigênio, enovelamento correto de proteínas e estabilidade genômica de minissatélites. A detoxificação é executada por enzimas induzidas por Zap1, como TSA1, uma importante peroxirredoxina citosólica, UTH1, uma proteína mitocondrial não caracterizada mas importante para a resistência a superóxido, e CTT1, uma forma citosólica da catalase (WU *et al.*, 2008).

No fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, o ortólogo de Zap1, chamado ZafA, também já teve seu *regulon* determinado. Aproximadamente 153 genes foram propostos como sendo regulados pelo fator de transcrição em condições de privação de zinco, sendo que 35 seriam negativamente regulados e 118 positivamente regulados pelo fator de transcrição. Desses, 49 foram experimentalmente validados como alvos diretos de ZafA através de EMSA e RT-qPCR (VICENTEFRANQUEIRA *et al.*, 2018). Análises *in silico* e *in vivo* revelaram que o fator de transcrição é capaz de se ligar à sequência 5' - DYYVY**CARGGT**VYYY - 3' nas regiões promotoras de seus alvos, embora com um suposto grau de degeneração maior que o motivo proposto para ScZap1. A análise da função molecular desses genes demonstrou uma associação significativa a vias de resposta a estresse oxidativo, metabolismo de fatores de virulência, vias de biossíntese de ergosterol e metabólitos secundários, além da regulação da homeostase de diferentes íons.

Também, foi proposta uma associação de balanceamento entre a entrada e armazenamento de zinco e ferro mediante ausência de um desses elementos, onde essa homeostase cruzada regula, por exemplo, o armazenamento de zinco para dentro de organelas durante um contexto de deficiência de ferro, com o possível intuito de reduzir um “choque” de zinco proveniente da entrada súbita desse metal e sua consequente toxicidade (VICENTEFRANQUEIRA *et al.*, 2019). De outro lado, em uma situação de deficiência de zinco, podemos propor que o aumento da concentração citosólica desse metal ou sua mobilização de locais de armazenamento evita uma toxicidade do ferro em meios repletos ou não limitantes, o que, da mesma forma, poderia trazer efeitos citotóxicos. Esse balanço de zinco, ferro e outros metais permite uma homeostase finamente regulada com intuito de evitar uma entrada descontrolada desses elementos em um contexto adverso de deficiência nutricional.

Os primeiros esforços de caracterização de Zap1 (Csr1) em *Candida albicans* indicaram um importante papel do transporte de zinco na promoção da transição morfológica de levedura para hifa e o consequente crescimento durante a fase filamentosa (KIM, M.-J. *et al.*, 2008). Mais tarde, o emprego de ChIP-Seq permitiu um delineamento do regulon de Csr1, e, combinado a abordagens *in silico* de sobre-representação de sequências nucleotídicas, revelou enriquecimento dos motivos 5'-TAATGGTG-3' e 5'-ATGGTGGT-3' nas regiões promotoras dos genes, indicando possíveis motivos de ligação ao DNA (NOBILE *et al.*, 2009). Ao contrário do que foi encontrado em *S. cerevisiae*, a maioria dos genes envolvidos na biossíntese de ergosterol foram negativamente regulados de maneira indireta por CaZap1. O mesmo padrão foi encontrado em *A. fumigatus*, embora de maneira bem mais sutil.

Adicionalmente, o papel de Zap1 em *Candida albicans* se estende como um regulador negativo na biogênese e maturação da matriz de biofilme através da manutenção da produção de beta-1-3-glicano e de outros genes com impacto no metabolismo da matriz polissacarídica, como glicoamilases e álcool desidrogenases (NOBILE *et al.*, 2009). Além disso, o fenótipo dos mutantes de deleção para o fator de transcrição indica uma virulência reduzida em modelo murino de infecção e defeitos na taxa de crescimento.

De maneira geral, Zap1 apresenta um papel muitas vezes conservado entre diferentes patógenos fúngicos como um regulador chave da transcrição de diversos genes envolvidos principalmente na homeostase de zinco, mas também associados ao controle de diferentes aspectos morfológicos e fisiológicos que impactam na

virulência desses organismos. O presente trabalho, tem, portanto, o objetivo de caracterizar mais extensivamente o *regulon* desse importante fator de transcrição, buscando compreender o processo de captação e distribuição de zinco pela levedura patogênica *Cryptococcus gattii*. O delineamento desse grupo de genes é capaz de prover as bases para futuros estudos de genômica funcional que visem a caracterização de novos fatores de virulência, além de fornecer informações pertinentes para o direcionamento de estratégias terapêuticas de combate à criptococose que possam ter como alvo o metabolismo desse metal ou o processo de imunidade nutricional como um todo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar o regulon de Zap1 em *C. gattii* durante a privação de zinco.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar os genes diferencialmente expressos em *Cryptococcus gattii* sob influência de Zap1 e da disponibilidade de zinco;
- Avaliar o conjunto de genes que se apresentam na intersecção entre as condições de ausência de Zap1 e privação de zinco;
- Avaliar a presença de elementos canônicos comuns na potencial região regulatória destes genes;
- Predizer os processos biológicos nos quais se encontram os produtos destes genes, associando seu papel funcional reanotado ao processo de infecção.

### 3. METODOLOGIA E RESULTADOS

#### 3.1 Obtenção e limpeza das bibliotecas

Foram obtidos os dados brutos de dois experimentos de sequenciamento de RNA (RNA-seq) realizados com células de *Cryptococcus gattii* linhagem R265. No primeiro, as leveduras selvagens e mutantes nulas para o gene codificador do fator de transcrição Zap1 foram cultivadas em meio YNB suplementado com o quelante de íons divalentes TPEN (N,N,N',N'-Tetraquiss(2-piridilmetil)etilenodiamina), simulando uma condição de privação de zinco encontrada no interior do fagolisossomo de macrófagos (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Ambas as amostras foram sequenciadas com a metodologia *single-end* com uma replicata biológica e estão disponíveis no banco de dados Sequence Read Archive do National Center for Biotechnology Information sob os números de acesso SRX2523180 e SRX2522699. No segundo experimento, células selvagens de *C. gattii* foram cultivadas em meio YNB suplementado ou não com o quelante de zinco TPEN, em um estudo de amplo espectro do efeito da proteína Zrg1 no desenvolvimento do fungo na deficiência desse metal e sua associação com processos autofágicos. As amostras foram sequenciadas em triplicatas biológicas com a metodologia *paired-end* (DIEHL *et al.*, 2021).

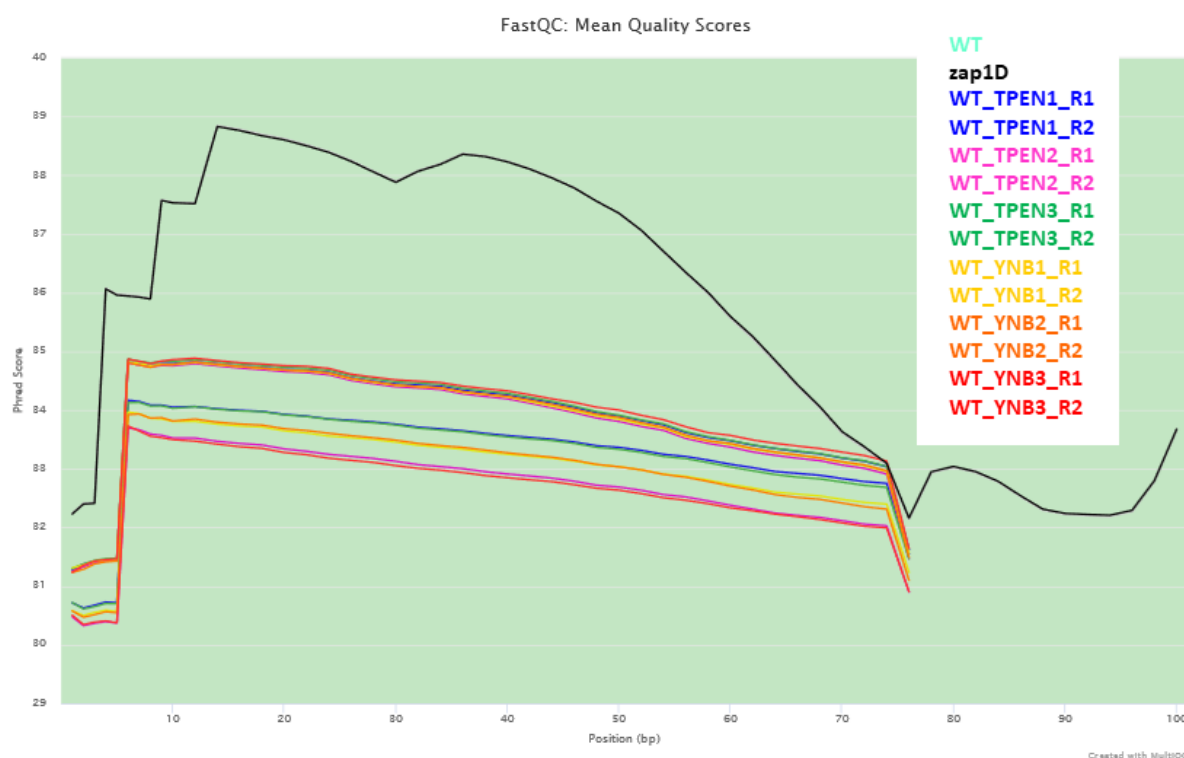
Embora o desenho experimental do primeiro experimento já fosse capaz de estabelecer uma base satisfatória para delimitar os genes que são regulados por Zap1, a limitação técnica da existência de apenas uma replicata enfraquece a base estatística necessária para estimar a dispersão da expressão dos genes durante os cálculos da expressão diferencial. Como já estabelecido, a condição de privação de zinco está intimamente associada à expressão de Zap1, portanto, podemos deduzir que o conjunto de genes regulados pelo fator de transcrição (experimento 1) está contido dentro do conjunto de genes regulados pela deficiência de zinco (experimento 2). A abordagem utilizada vem de encontro com o que já foi realizado na caracterização de Zap1 em outros organismos, onde a intersecção de diferentes estratégias garante um conjunto final de genes mais confiável (VICENTEFRANQUEIRA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2008).

Sendo assim, foi feita a identificação dos genes diferencialmente expressos na comparação *C. gattii* WT X WT + TPEN, seguida da identificação dos genes diferencialmente expressos na comparação *C. gattii* WT + TPEN X *C. gattii*  $\Delta$ zap1 +

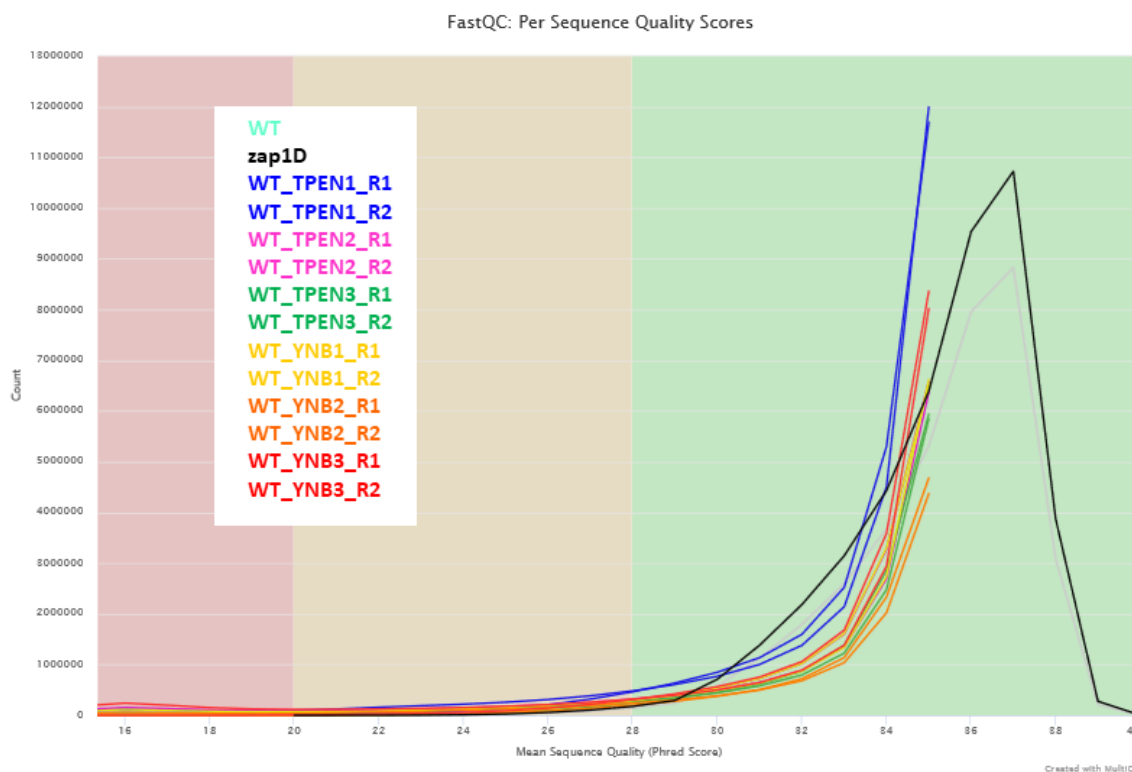


TPEN, obtendo, por fim, a intersecção entre esses dois conjuntos de genes diferencialmente expressos. Vale ressaltar que os genes encontrados no conjunto final, não são necessariamente diretamente regulados por Zap1, já que podem ser advindos de um processo de regulação secundária.

Todas as bibliotecas passaram por um controle de qualidade utilizando o *software Trim Galore!* (KRUEGER, 2015), onde foram removidas as sequências de adaptadores da porção 3' dos *reads* (*trimming*), assim como sequências com score Phred inferior a 30, tamanho inferior a 20 e conteúdo de bases não determinadas (número de N's) maior que 10. A qualidade de todas as bibliotecas foi avaliada com o programa MultiQC (EWELS *et al.*, 2016) para garantir a ausência de sequências adaptadoras, contaminantes, repetitivas ou de baixa qualidade. Diferentes parâmetros de qualidade das sequências de cada amostra podem ser avaliados nas Figuras 1 e 2.



**Figura 1:** Valores médios de score Phred de acordo com a posição no *read* em cada uma das bibliotecas. Para bibliotecas *paired-end*, os pares foram representados da mesma cor.

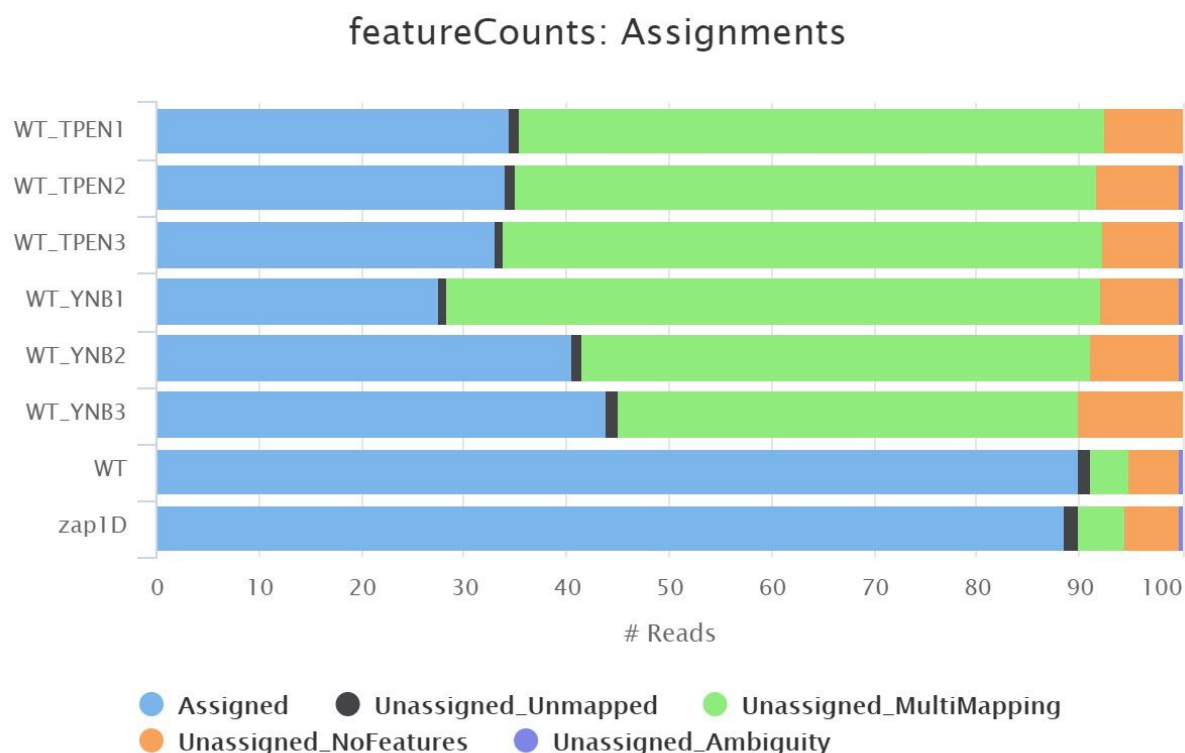


**Figura 2:** Frequência do número de *reads* para cada um dos valores de qualidade média em cada uma das bibliotecas.

### 3.2 Mapeamento e contagem dos *reads*

Os *reads* de cada uma das bibliotecas foram alinhadas à versão mais recente do genoma de *C. gattii* genótipo VGII linhagem R265 (depositado no NCBI sob o código de acesso GCA\_002954075) utilizando o *software* HISAT2 (KIM, D. *et al.*, 2019). Os parâmetros de alinhamento foram ajustados de acordo com o tipo de biblioteca (*paired-end*, *single-end*) e com as propriedades do genoma, como tamanho mínimo de íntron de 20 e tamanho máximo de 3000 nucleotídeos.

Em seguida, o método de preparo de biblioteca foi determinado utilizando o módulo *infer\_experiment* do programa RSeqC (WANG, L.; WANG; LI, 2012); todas as bibliotecas de ambos experimentos foram estipuladas como *reversely-stranded*. A contagem de *reads* alinhados foi feita com o *software* FeatureCounts (LIAO; SMYTH; SHI, 2013) com a versão mais recente e curada da anotação do genoma de *C. gattii* (GRÖHS FERRAREZE *et al.*, 2021). As estatísticas de alinhamento para cada uma das amostras podem ser avaliadas na Figura 3.



**Figura 3:** Distribuição percentual do mapeamento de cada uma das bibliotecas no genoma de *C. gattii*. Nota-se que para as bibliotecas *paired-end* a taxa de de *reads* atribuídos unicamente à *features* gênicas está entre 27% e 44%, enquanto nas bibliotecas *single-end* está entre 87%-90%

### 3.3 Cálculo e análise da expressão diferencial

As tabelas de contagens para cada um dos genes nas diferentes condições foram processadas usando o fluxo de análise do pacote edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Para as amostras do experimento 2 (WT YNB X WT YNB + TPEN), os valores de contagem foram normalizados de acordo com os fatores calculados a partir do tamanho das bibliotecas, e, em seguida, modelados utilizando uma distribuição binomial negativa. A partir do valor de dispersão comum ( $\Phi$ ) dessa distribuição, é possível calcular o coeficiente de variação biológica ( $CVB = \sqrt{\Phi}$ ) associado à expressão dos genes nesse experimento. Assim, de acordo com a estratégia descrita na primeira seção, foi possível utilizar a dispersão calculada para simular o CVB do experimento que apresenta ausência de replicatas, assumindo que a variância biológica entre as condições é igual e diminuindo consideravelmente o erro associado à análise.

Para ambos experimentos, a análise de significância estatística se deu por um teste exato para distribuição binomial negativa, com correção do valor de P utilizando

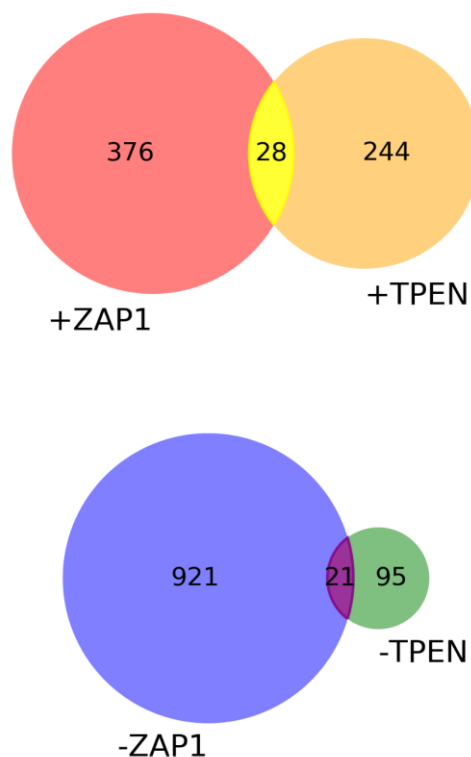
a abordagem de *False Discovery Rate* (FDR) com o método de Benjamini e Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Foram realizadas simulações com diferentes valores de corte para FDR (0.05, 0.01 e 0.001) e valor absoluto do logaritmo do *fold-change* (1, 2 e 3), de modo a buscar uma redução do número de falsos positivos presentes nos genes diferencialmente expressos, mas ainda mantendo um número considerável de genes na interseção dos dois grupos, que correspondem aos genes regulados por Zap1. Como esperado, o uso de valores de corte mais restritivos reduz grandemente a quantidade de genes considerados diferencialmente expressos, mas também reduz o número de genes que seriam regulados por Zap1, o que afeta as análises subsequentes. Por fim, foram utilizados valores padrões de  $FDR < 0.05$  e  $|\log FC| > 1$ , seguindo uma abordagem onde mantém-se um número maior de genes diferencialmente expressos no início do fluxo de trabalho, mas que vai sendo “afunilado” e filtrado à medida que mais análises são realizadas e agregam confiança a um conjunto final menor de genes selecionados.

Na comparação proveniente do experimento 2, foram encontrados 388 genes diferencialmente expressos, sendo que 272 foram sobre-expressos (induzidos) e 116 foram subexpressos (reprimidos) durante a privação de zinco. Na comparação do experimento 1, foram encontrados 942 genes com expressão aumentada e, portanto, negativamente regulados na presença de Zap1, e 404 genes com expressão diminuída, ou seja, positivamente regulados por Zap1. Assim, ao combinarmos os diferentes resultados de modo a diminuir o erro associado à análise, podemos determinar que o *regulon* de Zap1 em condições de limitação de zinco consiste de 49 genes, sendo que 21 são negativamente regulados e 28 são positivamente regulados (Figura 4).

### 3.4 Análise de enriquecimento funcional

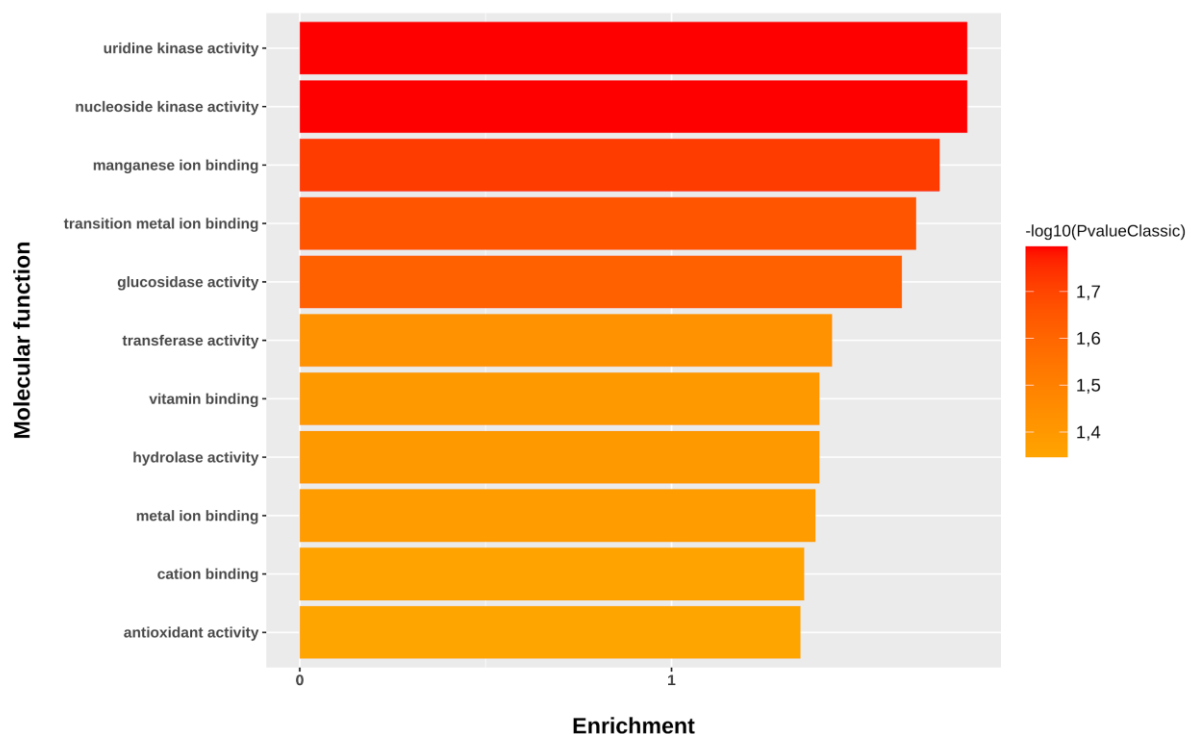
Para obtenção de um perfil funcional dos genes regulados por Zap1 e uma busca por associações significativas com diferentes papéis biológicos, foi realizada uma análise de enriquecimento funcional com o pacote topGO em ambiente R (ALEXA; RAHNENFUHRER, 2010). A anotação de *Cryptococcus gattii* VGII R265 foi associada aos termos de ontologia gênica no banco de dados EggNOG versão *web* (HUERTA-CEPAS *et al.*, 2017). Os termos de função molecular dos 49 genes regulados por Zap1 foram analisados para enriquecimento com teste de Fisher para

significância estatística. Foram considerados como enriquecidos os termos com valor de P corrigido pela abordagem de FDR inferior a 0.05.



**Figura 4:** Diagramas de Venn representando a combinação entre os diferentes experimentos utilizados para a análise de expressão diferencial. Na porção superior da imagem, o símbolo +ZAP1 representa genes positivamente regulados por Zap1, enquanto +TPEN simboliza genes induzidos na presença do quelante TPEN. A interseção representa 28 genes positivamente regulados por Zap1 durante a privação de zinco. O mesmo padrão pode ser observado na porção inferior da imagem, onde observamos, na intersecção, um conjunto de 21 genes negativamente regulados por Zap1 durante a deficiência de zinco.

Os termos de ontologia de função molecular identificados envolvem principalmente a atuação das proteínas como quinases, transferases, hidrolases e ligantes de íons (Figura 5). Este último grupo reúne ligantes de metais e íons no geral, demonstrando a importância de Zap1 no controle de genes associados a homeostase metálica e iônica durante eventos de limitação nutricional de zinco, com impactos em moléculas com funções diversas.



**Figura 5:** Gráfico de barras do enriquecimento funcional de termos de função molecular associados aos genes regulados por Zap1. No eixo Y podem ser observados os nomes das ontologias, enquanto o eixo X ilustra o p-valor corrigido da significância desses termos, representado logaritmicamente.

Para caracterizar mais detalhadamente esse grupo de genes e estipular seu possível papel na resposta à privação de zinco, um processo de anotação mais minucioso foi realizado. Informações de bancos de dados como FungiDB e NCBI foram integradas a ferramentas de análise de sequências, como InterProScan e BLAST, que, em conjunto com uma extensa busca bibliográfica, serviram para propor funções moleculares e estabelecer uma anotação curada para cada um dos genes, possibilitando um estudo mais aprofundado da sua atuação no processo de infecção por *C. gattii*. Pelo menos 36 dos 49 genes tiveram alguma informação relevante ou grau de identidade satisfatório para que fosse possível determinar seu papel através de homologia com base em famílias de domínios proteicos e estudos de caracterização em outros organismos. Os nomes propostos dos genes e detalhes da anotação podem ser visualizados na tabela abaixo.

**Tabela 1:** Informação da anotação funcional realizada com os genes regulados por Zap1. São demonstrados os números de motivos de ligação de Zap1 que as sequências regulatórias desses genes, bem como sua descrição funcional e valores de *fold-change* nas comparações realizadas. Cada grupo funcional foi representado com uma cor diferente. Genes positivamente regulados por Zap1 durante privação de zinco tiveram seu valor de  $\log_2FC$  coloridos em verde, enquanto genes

negativamente regulados por Zap1 durante a deficiência de zinco estão com esses valores representados em vermelho.

Grupo	Nº de motivos	Código padrão	Nome	Descrição	log2FC (WT/WT+TPEN)	log2FC (delZap1+TPEN/WT+TPEN)
	1	CNBG_4460	ZAP1	Zinc-deficiency responsive transcription factor	-5.55	4.84
	2	CNBG_6066	ZIP1	Zinc transporter, ZIP family	-5.67	6.33
	4	CNBG_2209	ZIP2	Zinc transporter, ZIP family	-3.94	6.87
	1	CNBG_2706	ATM1	Mitochondrial iron-sulfur cluster transporter, ABC superfamily	-1.44	1.02
	3	CNBG_0645	-	Uncharacterized amino acid transporter	-1.64	3.16
	1	CNBG_0523	-	Putative D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	1.13	-2.54
	1	CNBG_5383	IDH3	Inositol-2-desidrogenase	1.07	-1.82
	5	CNBG_2996	-	L-arabinitol 4-dehydrogenase	1.04	-1.11
	2	CNBG_3733	INV1	Invertase, converts sucrose into glucose and fructose	-1.01	1.04
	2	CNBG_3409	-	Putative dehydrogenase with NADP-binding domain	-2.34	3.12
	0	CNBG_2690	-	Putative glicosyl hidrolase	-1.16	1.16
	0	CNBG_0066	-	Putative FMN-dependent dehydrogenase	-3.09	4.86
	1	CNBG_4409	MT1	Metallothionein, chelates copper	6.35	-5.47
	3	CNBG_4172	-	Oxidoreductase domain containing protein	1.07	-1.25
	2	CNBG_2661	SOD2	Mitochondrial Mn-dependent superoxide dismutase	-3.05	1.45
	1	CNBG_3193	-	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	-3.76	5.46
	2	CNBG_4561	-	Major Facilitator Superfamily	1.53	-2.28
	2	CNBG_3933	-	Major Facilitator Superfamily	1.19	-1.87
	2	CNBG_6063	-	Major Facilitator Superfamily	2.35	-2.23
	2	CNBG_2170	HXT	Major Facilitator Superfamily, hexose transport	1.26	-2.55
	1	CNBG_0170	HXS1	Major Facilitator Superfamily, high-affinity glucose transport	-1.50	1.26
	0	CNBG_3294	PGU1	Polygalacturonase, degrades pectin	1.22	-1.58
	3	CNBG_4981	CHS6	Chitin synthase	-1.20	3.41
	0	CNBG_0047	CAS3	O-acetylation of GXM residues, CAS64 family	-1.08	1.71
	2	CNBG_4048	FUR1	Uracil phosphoribosyltransferase	-1.82	1.34
	4	CNBG_0115	-	Myosin-kinesin motor domain ATPase superfamily	-1.18	1.55
	1	CNBG_3934	-	Arylsulfatase domain containing protein	1.08	-1.55
	4	CNBG_5140	-	Protein tyrosine kinase	-1.06	1.32

4	CNBG_5294	-	Fasciclin domain containing protein	-6.01	8.81
1	CNBG_4241	-	Putative cobalamin synthesis protein	-7.31	6.94
3	CNBG_2054	-	Bacteriorhodopsin-like protein	-2.02	2.15
1	CNBG_5291	-	Unknown protein	1.24	-2.57
4	CNBG_4913	-	Unknown protein	1.56	-2.03
0	CNBG_5290	-	Unknown protein	1.08	-1.26
1	CNBG_10112	-	Unknown protein	2.22	-2.96
2	CNBG_10248	-	Unknown protein	1.25	-3.37
4	CNBG_9618	-	Unknown protein	2.01	-2.10
2	CNBG_0982	-	Unknown protein	1.01	-1.44
4	CNBG_6112	-	Unknown protein	1.44	-1.24
1	CNBG_9171	-	Unknown protein	3.72	-1.16
1	CNBG_9012	-	Unknown protein	4.01	-1.82
5	CNBG_1436	-	Unknown protein	-1.24	2.35
5	CNBG_2210	-	Unknown protein	-1.27	1.02
2	CNBG_2949	-	Unknown protein	-8.56	6.30
1	CNBG_1018	-	Unknown protein	-1.17	1.23
0	CNBG_5805	-	Unknown protein	-6.48	8.00
1	CNBG_5067	-	Unknown protein	-1.10	1.09
0	CNBG_4307	-	Unknown protein	-1.06	2.92
1	CNBG_3498	-	Unknown protein	-2.88	3.54

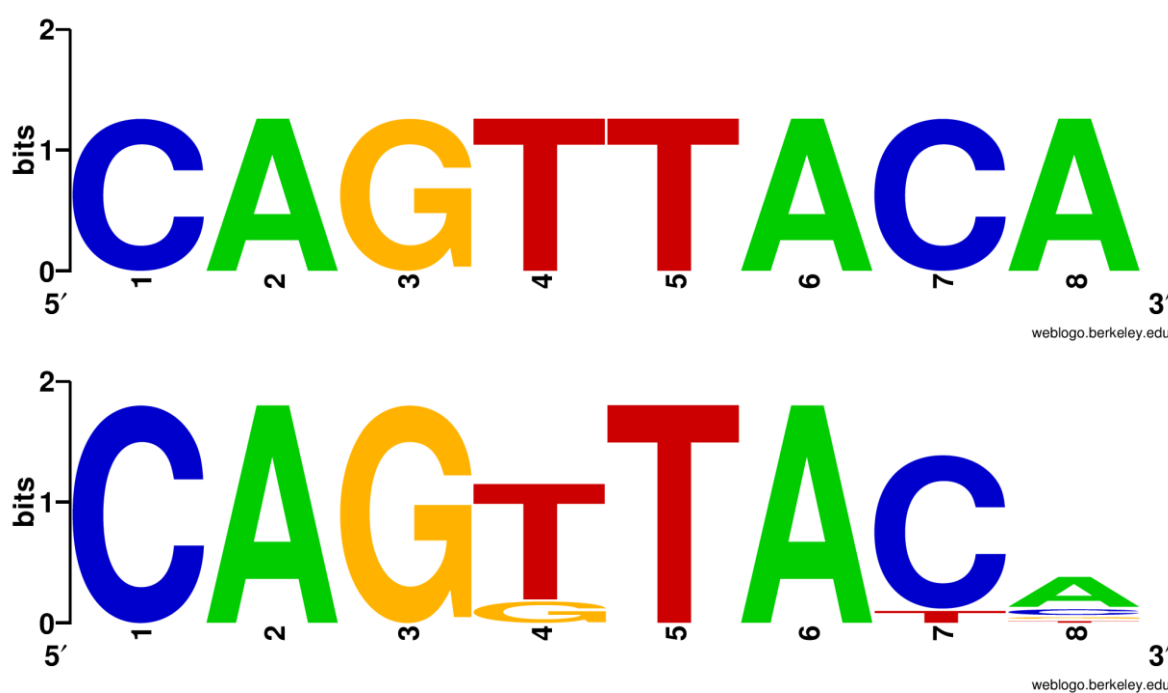
### 3.5 Identificação do potencial motivo de ligação de Zap1

As sequências nucleotídicas localizadas entre o sítio de início de tradução e 1000 pares de bases à montante do sítio de início de tradução foram obtidas para todos os genes identificados como regulados por Zap1, visando determinar a sequência de ligação de Zap1 ao DNA. Para isso, foram utilizados os *software* MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) e RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tool) de maneira conjunta na procura de motivos sobrerrepresentados (BAILEY *et al.*, 2009; VAN HELDEN; ANDRÉ; COLLADO-VIDES, 1998).



Inicialmente, a identificação dos motivos foi realizada apenas nas sequências *upstream* de três genes cuja evidência *in vitro* já descrita aponta fortemente para uma regulação por Zap1: *ZIP1* (CNBG\_6066), *ZIP2* (CNBG\_2209) e o próprio *ZAP1* (CNBG\_4460) (SCHNEIDER *et al.*, 2012). A análise combinada dos dois métodos independentes revelou o motivo consenso CAGTTACA (Figura 6, superior), como presente pelo menos uma vez em cada uma das sequências.

Em seguida, a matriz de frequência de caracteres desse motivo foi utilizada para identificar sua ocorrência nas demais sequências dos outros genes regulados por Zap1. A busca foi realizada utilizando a ferramenta *matrix-scan* do RSAT versão *web* e encontrou 95 ocorrências do motivo com valor de P inferior a 0.05, denotando um conjunto putativo de 42 genes que seriam diretamente regulados por Zap1 (Tabela 1). O acréscimo dessas novas ocorrências do motivo também afetou a composição da matriz de frequência do motivo consenso, concedendo maior variabilidade à sua sequência (Figura 6, inferior).



**Figura 6:** Em cima, matriz de frequência do motivo de ligação identificado nos três genes conhecidos regulados por Zap1. Embaixo, a matriz resultante da busca do motivo anterior nas demais sequências de genes identificados como regulados por Zap1. Nota-se a maior diversidade de conteúdo do motivo quando avaliadas todas as sequências em conjunto.

## 4. DISCUSSÃO

O gênero de fungos basidiomicetos *Cryptococcus* constitui uma importante ameaça para pacientes imunocomprometidos, como portadores de HIV e transplantados, principalmente em países subdesenvolvidos, onde o acesso a terapias antirretrovirais e a disponibilidade de medicamentos antifúngicos é deficitária (LOYSE *et al.*, 2013; MAY *et al.*, 2016). *Cryptococcus gattii* é um patógeno oportunista capaz de protagonizar casos de infecções respiratórias mesmo em indivíduos imunocompetentes (CHEN *et al.*, 2012). Essa levedura emprega diferentes fatores de virulência, como produção de melanina, síntese de urease, presença de cápsula polissacarídica e termotolerância, com o intuito de enfraquecer a resposta imune do hospedeiro e evadir estratégias de combate de células fagocitórias, exemplificadas pela produção de metabólitos antimicrobianos, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e a acidificação do pH no interior de fagolisossomos (MEDNICK; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2005; ZARAGOZA, 2019).

Além disso, outra estratégia utilizada por células do sistema imune é a imunidade nutricional, que consiste na restrição da disponibilidade de nutrientes no meio extra e intracelular, visando reduzir o crescimento e replicação do patógeno (BRECHTING; RAPPLEYE, 2019). Assim, através de diferentes mecanismos, a concentração de macronutrientes metálicos essenciais, como ferro, zinco e manganês, é ativamente reduzida em tecidos infectados, como nos pulmões, ou no interior de fagossomos (KEHL-FIE; SKAAR, 2010). A liberação de calprotectina, por exemplo, durante o extravasamento de NETs por neutrófilos, promove a quelação de zinco e cobre extracelular durante a infecção por *Candida albicans* (BESOLD *et al.*, 2018). Também, macrófagos infectados por *Cryptococcus neoformans* reduzem a concentração de zinco lábil no citoplasma e no interior das vesículas que contém as células criptocócicas, reduzindo sua taxa de crescimento (SANTOS *et al.*, 2017).

Dessa forma, a compreensão do mecanismo de obtenção de nutrientes é essencial para o combate do processo infeccioso, já que esses patógenos vão ativamente buscar a restauração das concentrações de metais essenciais para seu crescimento pleno, contrapondo a imunidade nutricional. Em *C. gattii*, um dos principais agentes associados à obtenção de zinco é o fator de transcrição Zap1, que regula a expressão de Zip1 e Zip2, dois importantes transportadores de zinco

associados à membrana plasmática (SCHNEIDER *et al.*, 2015). Uma caracterização anterior de Zap1 revelou sua importância na regulação da absorção de zinco, além de propor que a inativação de seu gene codificante leva a níveis maiores de ROS intracelulares e a uma taxa de mortalidade atenuada em modelo murino, embora sem afetar fatores de virulência clássicos, como a formação de cápsula, a produção de melanina e a termotolerância (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

O presente trabalho propõe uma delimitação e caracterização do conjunto de genes regulados por Zap1 em *C. gattii*. Através da combinação de dois experimentos de RNA-seq de linhagens selvagens e mutantes nulas para ZAP1 cultivadas em condições de privação de zinco pela exposição ao quelante de íons TPEN, podemos delimitar os genes que são diferencialmente expressos, e que seriam, portanto, regulados por esse fator de transcrição (DIEHL *et al.*, 2021; SCHNEIDER *et al.*, 2012). O tratamento estatístico aplicado nas bibliotecas que não apresentam replicatas, baseado na extrapolação dos coeficientes de variação biológica das bibliotecas em triplicata, permite estimar as dispersões de expressão para realizar com mais confiança os cálculos necessários, fornecendo um conjunto de genes mais reduzido e confiável. Dessa forma, a seleção final de genes com p-valor superior a 0,05 e  $|\logFC| > 1$  informa um conjunto de 49 genes regulados por Zap1, e, a partir de seus valores de FC, podemos determinar se são reprimidos ou ativados pelo fator de transcrição (Tabela 1).

Comparando diferentes espécies de fungos que já tiveram homólogos de Zap1 caracterizados, nota-se uma diversidade grande na composição funcional e na quantidade de genes que integram seu *regulon*, com o número de alvos diretos variando de 50 a 150 genes (KIM, M.-J. *et al.*, 2008; VICENTEFranqueira *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2008). Seu papel fisiológico entre as espécies também é amplo, e envolve, por exemplo, a regulação da formação e maturação de biofilme, produção de álcoois, captação de metais, resposta a estresse oxidativo, metabolismo de carboidratos e proteínas, etc. O que de fato parece ser conservado entre esses diferentes fungos é a ativação de Zap1 em condições de baixa disponibilidade de zinco, onde vai controlar a expressão de importantes transportadores da família ZIP para permitir o restabelecimento de uma concentração adequada do metal (EIDE, 2020). Entretanto, essas comparações interespecie devem ser conduzidas com cuidado, já que as iniciativas de caracterização desse fator de transcrição apresentam níveis de suporte variáveis, e empregam diferentes técnicas de validação, sendo que

muitos dos resultados obtidos estão intimamente associados com as condições nas quais foram realizados os experimentos de privação de zinco ou silenciamento do gene, com o conjunto final de alvos sendo a consequência da junção de diferentes abordagens.

Para identificar o motivo de ligação de Zap1 ao DNA, as sequências correspondentes aos 1000 nucleotídeos *upstream* dos sítios de início de tradução desses genes foram analisadas para identificar sequências sobrerrepresentadas. Os software MEME (BAILEY *et al.*, 2009) e RSAT (VAN HELDEN; ANDRÉ; COLLADO-VIDES, 1998) identificaram o motivo consenso CAGTTACA (Figura 6), presente na sequência de 42 genes, que seriam, portanto, potencialmente diretamente regulados pelo fator de transcrição. A sequência do motivo diverge em conteúdo e parece ser mais curta do que o encontrado em outras espécies de fungos patogênicos, o que é esperado visto a diferença considerável entre as sequências dos outros homólogos de Zap1 e da variação de número de domínios de ligação ao DNA que possuem (KIM, M.-J. *et al.*, 2008; VICENTEFRANQUEIRA *et al.*, 2018). Outras análises *in vitro*, como CHIP-seq e ensaios de mobilidade eletroforética, poderão futuramente validar a interação entre Zap1 e o motivo identificado, fornecendo *insights* a respeito do mecanismo de reconhecimento do fator de transcrição e a regulação que este exerce sobre outros genes.

Como observado em outros fungos patogênicos, CgZap1 também é potencialmente capaz de autorregulação positiva, conforme caracterizado previamente em *Saccharomyces cerevisiae* (EIDE, 2020). A região regulatória de *ZAP1* apresenta pelo menos um motivo de ligação ao próprio fator de transcrição, além deste ser mais expresso na ausência de zinco, evidenciando um mecanismo conservado de autopromoção de sua transcrição, possivelmente como forma de garantir uma maior efetividade e versatilidade de controle sobre seus genes alvos. Em *A. fumigatus*, por exemplo, *zafA* possui duas unidades transcricionais cuja expressão é influenciada pela atividade de um outro fator de transcrição chamado HapX e do próprio ZafA, que atuam de forma conjunta para promover a expressão de uma isoforma mais longa e não-funcional, ou mais curta e funcional, influenciados pela razão de ferro e zinco presente no meio de cultura (VICENTEFRANQUEIRA *et al.*, 2019). Futuros estudos acerca da presença de transcritos alternativos de *ZAP1* em *C. gatti* ainda poderão ser realizados, de modo a caracterizar os possíveis efeitos dessas variantes transcricionais, como o impacto que possuem nos níveis proteicos de Zap1

e se atuam de forma diferente sobre seus alvos durante a privação de zinco e outros metais.

Outro mecanismo conservado identificado nas análises combinadas foi a regulação que Zap1 exerce sobre transportadores membros da família ZIP (SCHNEIDER *et al.*, 2012, 2015). Zip1 e Zip2 são importantes transportadores de alta e baixa afinidade, respectivamente, localizados na membrana plasmática e atuando na absorção de zinco do meio extracelular. Ambos os genes foram identificados como alvos diretos do fator de transcrição, com 2 (*ZIP1*) e 4 (*ZIP2*) motivos de ligação presentes. Os dois genes também são positivamente regulados durante a deficiência de zinco e são capazes de aumentar os níveis intracelulares de zinco nessas condições, garantindo um crescimento celular maior e estabelecendo Zap1 como um agente essencial para a obtenção desse metal durante eventos de privação nutricional (SCHNEIDER *et al.*, 2012). A forma pela qual Zap1 controla a expressão desses dois genes em *C. gattii*, entretanto, é desconhecida. Em *S. cerevisiae*, o homólogo de *ZIP1*, chamado *ZRT1*, tem sua expressão induzida durante a deficiência de zinco devido a ocupação dos sítios de ligação por Zap1 na região promotora do gene (ZHAO; EIDE, 1996a). Por outro lado, a regulação de *ZRT2*, homólogo de *ZIP2*, é mais complexa e envolve a presença de 3 sítios de ligação, 2 dos quais são ocupados por Zap1 durante uma deficiência de zinco mais branda, e que resultam na indução da expressão desse transportador (BIRD *et al.*, 2004). Entretanto, em meios onde a privação de zinco é mais grave, o acúmulo de Zap1 devido a sua autorregulação permite sua ligação a um terceiro sítio localizado a jusante da TATA box de *ZRT2*, que está associado com uma repressão da expressão do gene. Portanto, resta a conjugação de experimentos *in vitro* e *in vivo* adicionais que esclareçam o mecanismo pelo qual Zap1 exerce sua influência sobre os níveis transcricionais dos transportadores ZIP em *C. gattii*, e como essa influência se traduz na manutenção dos níveis de zinco e afeta a virulência da levedura em modelos animais.

Outros genes codificantes de transportadores que também estão sob a regulação direta de Zap1 são *ATM1* (CNBG\_2706) e CNBG\_0645, que codifica um putativo transportador de aminoácidos neutros, levemente ativado durante a privação de zinco. O gene *ATM1* também tem sua transcrição promovida e codifica para um transportador do tipo ABC (ATP Binding Cassette), que utiliza a energia da hidrólise de ATP para promover o transporte ativo de clusters de ferro-enxofre para fora da mitocôndria, os quais são utilizados por enzimas essenciais como DNA polimerases e

primases (DO *et al.*, 2018). Atm1 também está associado com esse importante papel de abastecimento de clusters de Fe-S durante eventos de sobrecarregamento de cobre, onde tem sua transcrição promovida pelo fator de transcrição Cuf1, responsivo a altos níveis do metal, e também está ligado com a promoção de transcrição de metalotioneínas (GARCIA-SANTAMARINA *et al.*, 2017). Uma das formas que a toxicidade cobre se apresenta é o efeito negativo que tem sobre a biogênese de clusters de Fe-S, ao impedir a maturação de proteínas mitocondriais necessárias para a produção plena dessas moléculas (BRANCACCIO *et al.*, 2017). É necessário ainda o esclarecimento a respeito do comportamento da concentração de outros metais, como o cobre, durante eventos de deficiência de zinco, afim de estipular como a homeostase metálica se reconfigura para recompor o metabolismo do fungo, ou ainda, se parte dos eventos observados nos experimentos são na verdade reflexos da quelação não-específica exercida por TPEN.

Ganha destaque também um outro grupo de 5 genes potencialmente regulados por Zap1 codificantes de proteínas que possuem domínios do tipo MFS (Major Facilitator Superfamily). Essa ampla família é caracterizada pela presença de transportadores secundários que se valem de gradientes quimiosmóticos para propiciar o transporte de pequenas moléculas (REDDY *et al.*, 2012). Embora os primeiros transportadores MFS tenham sido caracterizados pelo seu papel na absorção de açúcares, o crescimento de estudos genômicos e moleculares permitiu a inclusão de novos membros responsáveis pelo transporte de toxinas endógenas, metabólitos do ciclo de Krebs e outros translocadores relacionados a sistemas de efluxo de medicamentos, que possuem impactos marcantes no desenvolvimento de resistência de patógenos a tratamentos terapêuticos baseados em antibióticos.

Dois desses 5 genes MFS regulados por Zap1 parecem estar associados com a detecção e transporte de carboidratos. O gene *HXT1* (CNBG\_2170) de *C. neoformans* codifica um transportador de hexoses, mais especificamente de glicose, galactose e manose, que é induzido na presença de glicose e está associado negativamente com a espessura da cápsula, possivelmente por um mecanismo que envolve a rota de sinalização PKA-cAMP (CHIKAMORI; FUKUSHIMA, 2005). Também ligado à captação de carboidratos, o gene *HXS1* (CNBG\_0170) codifica um homólogo de Snf3 e de Rgt2 de *S. cerevisiae*, duas proteínas associadas com a detecção dos níveis extracelulares de glicose, embora em *C. neoformans* a caracterização desse homólogo tenha mostrado que ela não atua como sensor, mas

sim como um importante transportador de alta afinidade de glicose ativado pela deficiência desse açúcar, e cuja inativação de seu gene leva a impactos significativos na virulência e na resposta a estresse oxidativo mediado por  $H_2O_2$  (LIU *et al.*, 2013). Ambos os transportadores seriam alvos diretos de Zap1, embora *HXT1* seja reprimido pelo fator de transcrição, enquanto *HXS1* é induzido. Esse mesmo padrão de regulação também é observado no fator de transcrição Pdr802, que promove a repressão de *HXT1* e a indução de *HXS1*, além de estar associado com a produção de diversos fatores de virulência, incluindo a formação de células titãs e melanização (REUWSAAT *et al.*, 2020). De forma contrária, em *Candida albicans*, o homólogo de *HXS1*, chamado *HGT12*, e mais outro transportador de hexoses são negativamente regulados por Zap1/Csr1 (KIM, M.-J. *et al.*, 2008). Portanto, várias evidências indicam a atuação de Zap1 em um mecanismo conservado de obtenção de glicose durante eventos de privação de zinco, possivelmente como forma de obtenção de carboidratos para manutenção do metabolismo energético em um ambiente nutricionalmente restrito, como é o caso dos tecidos pulmonares e do interior de fagossomos (DERENGOWSKI *et al.*, 2013).

Por outro lado, também foi observada a associação da atuação de alguns genes regulados por Zap1 ao metabolismo de detoxificação celular. Embora não haja diferença no crescimento das linhagens  $\Delta zap1$  e selvagem na presença de diferentes agentes geradores de espécies reativas de oxigênio, observa-se uma concentração intracelular elevada de ROS nessas células, o que poderia explicar a menor virulência exibida durante ensaios de infecção intranasal em modelo murino, além de indicar um recrutamento da maquinaria de detoxificação celular (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Schneider *et al.* propõe que os genes de catalases e a isoforma da superóxido dismutase (SOD) Fe-Mn dependente não foram diferencialmente expressos *in vitro*, enquanto a isoforma Cu-Zn dependente da SOD é mais expressa em mutantes de *ZAP1*, sendo, portanto, negativamente regulada pelo fator de transcrição. Diferentemente, as análises *in silico* aqui combinadas apontam que não houve expressão diferencial da isoforma Cu-Zn (CNBG\_0599, SOD1), mas sim, uma promoção da transcrição da isoforma que é dependente de Mn (CNBG\_2661, SOD2), que apresenta dois putativos motivos de ligação ao fator de transcrição (Tabela 1).

Assim como para muitos eucariotos, as duas formas de SOD compartilham papéis, mas possuem diferenças importantes, com a Cu/Zn-Sod1 localizada principalmente no citoplasma e uma fração menor no espaço intermembranas da

mitocôndria, enquanto a Mn-Sod2 é importada para o interior da matriz mitocondrial (SMITH *et al.*, 2021). O mesmo perfil de regulação exercido por Zap1 também pode ser observado em *A. fumigatus*, onde Zap1/ZafA reprime a transcrição de *SOD1* mas induz grandemente a expressão de *SOD3*, uma isoforma dependente de manganês (VICENTEFRANQUEIRA *et al.*, 2018). Dessa maneira, a sobrerregulação da forma independente de zinco pode ser pensada como uma estratégia de mitigação dos superóxidos produzidos pela cadeia respiratória durante a deficiência de zinco no interior das mitocôndrias, e também é apoiada pela teoria da economia de zinco, em que o organismo prioriza a produção de sistemas alternativos que são independentes ou utilizam menos íons do metal cuja concentração no meio é reduzida (WANG, Y. *et al.*, 2018). Futuros experimentos *in vitro* ainda serão realizados para avaliar a interação entre os dois genes de superóxidos dismutases no contexto da privação de zinco, solucionando a contradição encontrada e estabelecendo a economia de metais como um importante mecanismo de reorganização e racionamento de nutrientes.

Ainda, o gene *CMT1* (CNBG\_4409) é negativamente regulado por Zap1 e codifica para uma importante metalotioneína, cuja homóloga em *C. neoformans* está associada com a redução dos níveis de ROS (DING *et al.*, 2013). São duas as metalotioneínas presentes em *C. neoformans*, e ambas são pequenas proteínas ricas em resíduos de cisteína, que são capazes de se ligar quase que exclusivamente a íons de cobre, evitando a geração de espécies reativas de oxigênio durante eventos de sobrecarregamento desse metal, que está intimamente associado com o funcionamento adequado de várias enzimas da cadeia respiratória (PALACIOS *et al.*, 2014). Como dito anteriormente, parece haver uma relação forte de balanceamento entre zinco e cobre durante a quelação por TPEN, e mais informações a respeito do comportamento da concentração desses metais durante eventos de privação nutricional são necessárias para propor mecanismos de atuação e homeostase.

Zap1 parece também ter um impacto sutil na expressão de um grupo de genes associados com hidrolases e desidrogenases, sendo que muitos apresentam domínios preditos de ligação a NAD/NADP como acceptor de elétrons da reação de hidrólise (Tabela 1). Entre os genes positivamente regulados estão um que codifica uma invertase/beta-frutofuranosidase (CNBG\_3733), importante enzima responsável pela conversão de sacarose em frutose e glicose, e dois que codificam enzimas desidrogenases, uma com domínio de ligação a mononucleotídeo de flavina (CNBG\_0066) e outra dependente de NADP (CNBG\_3409).



Além disso, dois genes associados com a formação de estruturas extracelulares são regulados por Zap1. Um deles é um homólogo de *CHS6* (CNBG\_4981) de *C. neoformans*, relacionado à síntese de quitina na parede celular, e outro é *CAS3* (CNBG\_0047), um membro de uma grande família de proteínas associadas com a produção da cápsula, que, apesar de não ser essencial para a biogênese dessa estrutura, atua na transferência de resíduos O-acetil para estruturas de GXM presentes na cápsula (BANKS *et al.*, 2005; MOYRAND *et al.*, 2004). Esses dados indicam uma possível associação de Zap1 e da deficiência de zinco com a fluidez da composição da parede celular e da cápsula polissacarídica, talvez como um mecanismo de proteção e readequação durante a ausência desse metal.

É notável que 16 dos genes identificados como regulados por Zap1 não possuem anotação pela ausência da identificação de homólogos caracterizados em outras espécies, devido à falta de critérios de identidade satisfatórios, ou que também não tiveram seus papéis funcionais abstraídos pela inexistência de domínios proteicos conhecidos. Apesar disso, a caracterização dessas proteínas seria importante para o estudo e compreensão geral do processo de resposta à privação de zinco mediado por Zap1, já que as regiões promotoras de vários desses alvos apresentam um número grande de motivos de ligação, além de diversos genes apresentarem níveis de expressão elevados nas condições estudadas, o que pode ser avaliado pelas mudanças significativas de fold-change.

Para validar a expressão diferencial *in vitro* de boa parte dos genes regulados por Zap1, foi proposta a realização de experimentos de RT-qPCR, que infelizmente não puderam ser executados a tempo da conclusão deste trabalho. A pandemia de COVID-19, que vem sobrecarregando o sistema de saúde e ceifando a vida de milhares de brasileiros diariamente também teve grandes impactos na pesquisa e educação brasileira, reduzindo o acesso aos laboratórios e a meios de transporte seguros, o que restringiu a execução de experimentos que seriam muito valiosos a este trabalho. Entretanto, o desenho e encomenda dos *primers* para amplificação desses genes já foram realizadas e a execução dos experimentos e posteriores análises serão postas em prática à medida que as restrições ao deslocamento na universidade forem aliviadas, em resposta a uma melhora no quadro sanitário da cidade.

As perspectivas futuras deste trabalho envolvem a execução dos experimentos de RT-qPCR para validação dos genes identificados como regulados por Zap1 nas

condições de ausência/presença de TPEN e ausência/presença de Zap1. Essas informações fornecerão um suporte maior para validar as análises prévias de identificação do regulon de Zap1, e são capazes de confirmar a expressão desses genes, expandindo a atual compreensão do sistema de resposta a privação de zinco mediado por esse fator de transcrição. Após isso, está prevista a redação de um artigo científico a ser publicado contendo as análises realizadas neste trabalho e os mecanismos de regulação propostos, visando a divulgação dos dados encontrados. Futuros experimentos ainda poderão ser realizados para confirmar a sequência de ligação de Zap1 ao DNA e a relação que essa proteína possui com a ocorrência de eventos de transcrição alternativa, estabelecendo estudos mais aprofundados acerca do mecanismo de atuação desse regulador na expressão de seus alvos.

Por fim, o presente trabalho buscou restringir e caracterizar o regulon de Zap1 em *C. gattii*, baseando-se em dados de sequenciamento de nova geração e no uso de estratégias de minimização de erro, propondo seu papel como um importante regulador da expressão de genes associados ao transporte de nutrientes, à resposta ao estresse oxidativo e ao metabolismo de metais. Assim, os dados aqui fornecidos poderão fundamentar futuras pesquisas pautadas na elucidação do mecanismo de resposta à privação de zinco em fungos ou direcionar iniciativas que se baseiem na imunidade nutricional como ferramenta terapêutica para o combate da criptococose.

## 5. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Paula Augusta Dias Fogaça de *et al.* The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 59, p. e13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759013>
- ALEXA, Adrian; RAHNENFUHRER, Jorg. topGO: enrichment analysis for gene ontology. **R package version**, [s. l.], v. 2, n. 0, p. 2010, 2010.
- ALVAREZ, Mauricio; CASADEVALL, Arturo. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC immunology**, [s. l.], v. 8, p. 16, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-16>
- AUSTERMEIER, Sophie *et al.* I want to break free - macrophage strategies to recognize and kill *Candida albicans*, and fungal counter-strategies to escape. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 58, p. 15–23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.007>
- BAILEY, Timothy L. *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 37, n. Web Server issue, p. W202–W208, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- BALLOU, Elizabeth R.; JOHNSTON, Simon A. The cause and effect of *Cryptococcus* interactions with the host. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 40, p. 88–94, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.012>
- BANKS, Isaac R. *et al.* A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1902–1912, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1902-1912.2005>
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, [s. l.], 1995. Disponível em: <https://rss.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- BERMAS, Arianne; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, [s. l.], v. 114, n. 5, p. 721–734, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.14565>
- BESOLD, Angelique N. *et al.* Role of Calprotectin in Withholding Zinc and Copper from *Candida albicans*. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 86, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00779-17>
- BIRD, Amanda J. *et al.* Repression of ADH1 and ADH3 during zinc deficiency by Zap1-induced intergenic RNA transcripts. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 25, n. 24, p. 5726–5734, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601453>
- BIRD, Amanda J. *et al.* The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in ZRT2. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 1123–1132, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600122>
- BRANCACCIO, Diego *et al.* [4Fe-4S] Cluster Assembly in Mitochondria and Its Impairment by Copper. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 719–730, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jacs.6b09567>

BRECHTING, Peter J.; RAPPLEYE, Chad A. Histoplasma Responses to Nutritional Immunity Imposed by Macrophage Activation. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof5020045>

BYRNES, Edmond J., 3rd *et al.* Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 199, n. 7, p. 1081–1086, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/597306>

CAMPUZANO, Althea; WORMLEY, Floyd L. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof4010033>

CHEN, Sharon C-A *et al.* Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 789–798, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/cis529>

CHIKAMORI, Minoru; FUKUSHIMA, Kazutaka. A new hexose transporter from *Cryptococcus neoformans*: molecular cloning and structural and functional characterization. **Fungal genetics and biology: FG & B**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 646–655, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.04.004>

CHOWDHARY, Anuradha *et al.* Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Critical reviews in microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 1–16, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.606426>

COELHO, Carolina; BOCCA, Anamelia Lorenzetti; CASADEVALL, Arturo. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, [s. l.], v. 87, p. 1–41, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800261-2.00001-3>

DELEON-RODRIGUEZ, Carlos M.; CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans*: Tripping on Acid in the Phagolysosome. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 7, p. 164, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00164>

DERENGOWSKI, Lorena da S. *et al.* The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 761–774, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00073-13>

DIEHL, Camila *et al.* Zrg1, a cryptococcal protein associated with regulation of growth in nutrient deprivation conditions. **Genomics**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 805–814, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.023>

DING, Chen *et al.* *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. **Cell host & microbe**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 265–276, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.002>

DO, Eunsoo *et al.* The mitochondrial ABC transporter Atm1 plays a role in iron metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 458–468, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myx073>

EIDE, David J. Transcription factors and transporters in zinc homeostasis: lessons learned from fungi. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 88–110, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1742092>

ENGELTHALER, David M.; CASADEVALL, Arturo. On the Emergence of *Cryptococcus gattii* in the Pacific Northwest: Ballast Tanks, Tsunamis, and Black Swans. **mBio**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02193-19>

EWELS, Philip *et al.* MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 32, n. 19, p. 3047–3048, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

FERRAREZE, Patrícia Aline Gröhs *et al.* Transcriptional Analysis Allows Genome Reannotation and Reveals that *Cryptococcus gattii* VGII Undergoes Nutrient Restriction during Infection. **Microorganisms**, [s. l.], v. 5, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030049>

FU, Man Shun *et al.* *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144>. Acesso em: 28 jan. 2021.

GARCIA, Ane Wichine Acosta *et al.* Participation of Zip3, a ZIP domain-containing protein, in stress response and virulence in *Cryptococcus gattii*. **Fungal genetics and biology: FG & B**, [s. l.], v. 144, p. 103438, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103438>

GARCIA-SANTAMARINA, Sarela *et al.* *Cryptococcus neoformans* Iron-Sulfur Protein Biogenesis Machinery Is a Novel Layer of Protection against Cu Stress. **mBio**, [s. l.], v. 8, n. 5, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.01742-17>

GILBERT, Andrew S.; WHEELER, Robert T.; MAY, Robin C. Fungal Pathogens: Survival and Replication within Macrophages. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. a019661, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019661>

GRÖHS FERRAREZE, Patrícia Aline *et al.* Application of an optimized annotation pipeline to the *Cryptococcus deuteroformans* genome reveals dynamic primary metabolic gene clusters and genomic impact of RNAi loss. **G3**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaa070>

HAGEN, Ferry *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal genetics and biology: FG & B**, [s. l.], v. 78, p. 16–48, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>

HOMMEL, Benjamin *et al.* Titan cells formation in *Cryptococcus neoformans* is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative genetic regulators. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. e1006982, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006982>

HUERTA-CEPAS, Jaime *et al.* Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. **Molecular biology and evolution**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 2115–2122, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>

JUNG, Won Hee *et al.* Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS biology**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. e410, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040410>

JUNG, Won Hee *et al.* Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. e45, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040045>

KEHL-FIE, Thomas E.; SKAAR, Eric P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese

and zinc. **Current opinion in chemical biology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 218–224, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.008>

KIM, Daehwan *et al.* Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. **Nature biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 907–915, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

KIM, Min-Jeong *et al.* Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. **Journal of microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 242–247, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18309267>

KONTOYIANNIS, Dimitrios P. *et al.* Calcineurin inhibitor agents interact synergistically with antifungal agents in vitro against *Cryptococcus neoformans* isolates: correlation with outcome in solid organ transplant recipients with cryptococcosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 735–738, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00990-07>

KRUEGER, Felix. **Trim galore: a wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files**. [S. l.], 2015. Disponível em: [https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Acesso em: 8 de novembro, 2020.

LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current opinion in structural biology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 39–46, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00167-6](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00167-6)

LEI, Guowei *et al.* Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. **Cell research**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 965–968, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cr.2013.49>

LEVITZ, S. M. *et al.* *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 885–890, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.67.2.885-890.1999>

LIAO, Yang; SMYTH, Gordon K.; SHI, Wei. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 41, n. 10, p. e108, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt214>

LI, Yuan-Hong; LIU, Tong-Bao. Zinc Finger Proteins in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21041361>

LIU, Tong-Bao *et al.* The glucose sensor-like protein Hxs1 is a high-affinity glucose transporter and required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS one**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. e64239, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064239>

LOYSE, Angela *et al.* Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **The Lancet infectious diseases**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 629–637, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70078-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70078-1)

MAY, Robin C. *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 106–117, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>

MEDNICK, Aron J.; NOSANCHUK, Joshua D.; CASADEVALL, Arturo. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection.

**Infection and immunity**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 2012–2019, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2012-2019.2005>

MEYER, Wieland *et al.* Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* Species Complex. *In: CRYPTOCOCCUS*. [S. l.]: American Society of Microbiology, 2011. p. 327–357. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/9781555816858.ch24>

MOURAD, Ahmad; PERFECT, John R. Present and Future Therapy of *Cryptococcus* Infections. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 4, n. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof4030079>

MOYRAND, Frédérique *et al.* Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 1513–1524, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1513-1524.2004>

NOBILE, Clarissa J. *et al.* Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. **PLoS biology**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. e1000133, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000133>

OKAGAKI, Laura H.; NIELSEN, Kirsten. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 820–826, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00121-12>

OLSZEWSKI, Michal A. *et al.* Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63734-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63734-0)

PALACIOS, Óscar *et al.* Full characterization of the Cu-, Zn-, and Cd-binding properties of CnMT1 and CnMT2, two metallothioneins of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* acting as virulence factors. **Metallomics: integrated biometal science**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 279–291, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3mt00266g>

RAJASINGHAM, Radha *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)

REDDY, Vamsee S. *et al.* The major facilitator superfamily (MFS) revisited. **The FEBS journal**, [s. l.], v. 279, n. 11, p. 2022–2035, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08588.x>

REUWSAAT, Julia C. V. *et al.* **The transcription factor Pdr802 regulates Titan cell formation, quorum sensing, and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans***. 8 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.179242>. Acesso em: 12 abr. 2021.

ROBINSON, Mark D.; MCCARTHY, Davis J.; SMYTH, Gordon K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

ROWLAND, Jennifer L.; NIEDERWEIS, Michael. Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 202–210, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.12.006>

SAHA, D. C. *et al.* Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1550–1554, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CVI.00242-07>

SANTOS, Francine Melise Dos *et al.* **Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line.** [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0160>

SCHNEIDER, Rafael de Oliveira *et al.* Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. **Scientific reports**, [s. l.], v. 5, p. 10104, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep10104>

SCHNEIDER, Rafael de Oliveira *et al.* Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PloS one**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. e43773, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043773>

SCHOFFELEN, Teske *et al.* *Cryptococcus gattii* induces a cytokine pattern that is distinct from other cryptococcal species. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. e55579, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055579>

SMITH, Aaron D. *et al.* Transcription factor-driven alternative localization of *Cryptococcus neoformans* superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], p. 100391, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100391>

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.261418798>

SUN, Tian-Shu *et al.* Reciprocal functions of *Cryptococcus neoformans* copper homeostasis machinery during pulmonary infection and meningoencephalitis. **Nature communications**, [s. l.], v. 5, p. 5550, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms6550>

TANGEN, Kristin L. *et al.* The iron- and cAMP-regulated gene SIT1 influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, [s. l.], v. 153, n. Pt 1, p. 29–41, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/000927-0>

TREVIÑO-RANGEL, Rogelio de J. *et al.* Activity of sertraline against *Cryptococcus neoformans*: in vitro and in vivo assays. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 280–286, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myv109>

URBAN, Constantin F. *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. e1000639, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>

VAN HELDEN, J.; ANDRÉ, B.; COLLADO-VIDES, J. Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. **Journal of molecular biology**, [s. l.], v. 281, n. 5, p. 827–842, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1947>

VECCHIARELLI, Anna *et al.* Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1107–1116, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.84>

VICENTEFRANQUEIRA, Rocío *et al.* The interplay between zinc and iron homeostasis in *Aspergillus fumigatus* under zinc-replete conditions relies on the iron-mediated regulation of alternative transcription units of *zafA* and the basal amount of the *ZafA* zinc-responsiveness



transcription factor. **Environmental microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 2787–2808, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14618>

VICENTEFRANQUEIRA, Rocío *et al.* The Transcription Factor ZafA Regulates the Homeostatic and Adaptive Response to Zinc Starvation in *Aspergillus fumigatus*. **Genes**, [s. l.], v. 9, n. 7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes9070318>

VOELZ, Kerstin; MAY, Robin C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 835–846, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00039-10>

WANG, Liguo; WANG, Shengqin; LI, Wei. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 16, p. 2184–2185, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts356>

WANG, Yirong *et al.* The cellular economy of the *Saccharomyces cerevisiae* zinc proteome. **Metalomics: integrated biometal science**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1755–1776, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8mt00269j>

WIESNER, Darin L. *et al.* Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type-2 helper T cell responses to cryptococcal infection. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e1004701, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004701>

WU, Chang-Yi *et al.* Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC genomics**, [s. l.], v. 9, p. 370, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-370>

YANG, Yuhui *et al.* Reactive oxygen species in the immune system. **International reviews of immunology**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 249–270, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>

ZARAGOZA, Oscar. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383>

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 2454–2458, 1996a. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2454>

ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 271, n. 38, p. 23203–23210, 1996b. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23203>