

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANÁLISE DE microRNAs-*LIKE* EM *Cryptococcus gattii*

Francine Melise dos Santos

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

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Outubro de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para seu desenvolvimento, este trabalho contou com fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Dr. Charley C. Staats, por todo apoio, incentivo, paciência e acessibilidade, que foram essenciais para criar um ambiente confortável para pesquisa e, além disso, por acreditar na minha capacidade ao longo do projeto desenvolvido e por me incluir em um projeto inovador como este;
- À professora Marilene H. Vainstein, por ter me acolhido no grupo logo após minha graduação e permitir que usufrísse de toda a estrutura e conhecimento do grupo em uma área de atuação completamente diferente, o que foi essencial para meu crescimento pessoal e profissional;
- Ao professor Augusto Schrank que, assim como a professora Marilene, me recebeu no grupo e possibilitou meu crescimento profissional e pessoal dentro de um grupo qualificado;
- À Lívia, que sempre se mostrou envolvida com os trabalhos do grupo e disponível para solucionar problemas e dúvidas no decorrer do trabalho em laboratório, assim como sua preocupação com nosso bem-estar e, além disso, pela amizade;
- Aos professores, Dr. Arnaldo Zaha e Dr. Márcio Rodrigues, membros da comissão de acompanhamento;
- Ao professor Dr. Rogério Margis e seus alunos, pela disponibilidade e auxílio no projeto;
- Ao pessoal da secretaria do PPGBCM, principalmente Luciano e Silvinha, pela disponibilidade e auxílio nas dúvidas que surgiam;
- Aos meus pais, que me ensinaram a sempre buscar mais e me deram apoio confiando em minhas escolhas, inclusive em mudar de cidade e tentar algo novo, sem os quais nenhuma das minhas conquistas seria possível;

- À Amanda, colega e amiga desde a faculdade, que é exemplo de humildade e amizade e foi quem me apresentou o laboratório como uma oportunidade de mudança e aprendizado;
- À Karine, amiga desde a faculdade que sempre esteve presente me ajudando a encarar as mudanças da minha vida pessoal e profissional, que me ensinou o verdadeiro significado de amizade e companheirismo; uma pessoa que admiro pela força de vontade e determinação, um verdadeiro exemplo para mim;
- À Letícia, que sempre está disposta a ajudar, que dividiu comigo alguns dos momentos mais importantes do mestrado e que se mostrou uma amiga verdadeira e preocupada;
- Ao Rafa, por sempre ter me apoiado, estar disposto a ajudar e ensinar, desde o meu primeiro dia no laboratório até então; pela amizade, companheirismo e parceria sempre, características que fortaleceram a nossa amizade, que se tornou uma das mais importantes para mim;
- À Patrícia, que me ajudou a crescer profissionalmente, pelo exemplo de determinação e por sempre estar disposta a ajudar;
- À Rana e à Ângela, pelo incentivo e apoio em várias etapas do meu mestrado, pela amizade e por me ensinarem a ter pensamento crítico e autonomia;
- Ao Éder, pela amizade, companheirismo e disposição a ajudar os outros no que está ao seu alcance;
- À Glaci, pela amizade e exemplo de força e determinação;
- Ao Matheus, por todo auxílio, disposição e curiosidade, que foram essenciais durante o desenvolvimento do projeto;
- Aos demais colegas dos laboratórios 220 e 217, pela companhia, convivência diária e ajuda no que foi necessário.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. O Gênero <i>Cryptococcus</i>	15
1.2. Fatores de virulência	20
1.2.1. Cápsula polissacarídica	21
1.2.2. Melanina	22
1.2.3. Capacidade de proliferação a 37°C	23
1.2.4. Produção de enzimas	24
1.2.5. Outros fatores	25
1.2.6. Diferenças nos fatores de virulência do genótipo hipervirulento de <i>C. gattii</i>	26
1.3. Criptococose	27
1.4. Importância da homeostase de metais para os organismos.....	31
1.4.1. Ferro	32
1.4.2. Zinco	35
1.5. Mecanismos de regulação de processos biológicos por pequenos RNAs.....	39
1.6. RNAi em fungos.....	46
2. OBJETIVOS	52
2.1. Objetivo Geral	52
2.2. Objetivos Específicos.....	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1. Linhagens utilizadas e condições de cultivo	53
3.2. Cultivo de <i>C. gattii</i> para extração de RNA	53
3.3. Extração de RNA e RNA-Seq	54
3.4. Análises <i>in silico</i> do RNA-Seq	55
3.5. Predição de genes-alvo dos miRNAs de <i>C. gattii</i>	57
3.6. Análise por inferência funcional dos alvos dos miRNAs de <i>C. gattii</i>	57

4.	RESULTADOS	58
4.1.	Geração das bibliotecas de sRNAs a partir do RNA-Seq	58
4.2.	Identificação de miRNAs-like em <i>C. gattii</i>.....	61
4.3.	Avaliação da presença dos milRNAs de <i>C. gattii</i> R265 em cada condição e predição de alvos.....	72
4.4.	Identificação e classificação funcional dos alvos dos milRNAs detectados nos genomas de <i>C. gattii</i> R265, <i>Homo sapiens</i> e <i>Mus musculus</i>	75
5.	DISCUSSÃO	82
6.	CONCLUSÕES.....	94
7.	PERSPECTIVAS.....	95
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9.	APÊNDICE	128

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
3-HAA	Ácido 3-hidroxi-antranílico
A	Adenina
AFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado
Ago	Proteína argonauta
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BPDS	Ácido bisulfônico de batofenantrolina
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
DCL	<i>Dicer-like</i>
dsRNA	RNA dupla fita
Exp-5	Exportina-5
ex-siRNAs	siRNAs de origem exônica
Fe^{+2}	Ferro ferroso
Fe^{+3}	Ferro férrico
<i>g</i>	Giro
G	Guanosina
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
H	Hora
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IsomiRNAs	Isoformas de microRNAs-like
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-Dopa	Levodopa

LRV	<i>Leishmania RNA virus</i>
MFE	Energia mínima livre
miRNAs	MicroRNAs-like
miRISC	Complexo de silenciamento induzido por miRNA
miRNA*	MicroRNA <i>star</i>
miRNAs	MicroRNAs
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MSUD	<i>Meiotic silencing of unpaired DNA</i>
MV	Microvesículas
Myr	Milhões de anos
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
nt	Nucleotídeos
°C	Graus Celsius
OD	Densidade óptica
PBS	Tampão fosfato- salina
PCR	Reação em cadeia da DNA-polimerase
pH	Potencial de hidrogênio iônico
piRNAs	RNAs que interagem com Piwi
pre-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	MicroRNA primário
qi-RNAs	Pequenos RNAs que interagem com QDE-2
RdRPs	RNA-polimerase dependente de RNA
RIP	Mutação pontual induzida por repetição
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido desoxiribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RPKM	<i>Reads per kilobase per million</i>

Rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SCAR-MLST	<i>sequence characterized amplified region – multi locus sequence typing</i>
siRNAs	Pequenos RNAs de interferência
SIS	<i>Sex-induced silencing</i>
SNC	Sistema nervoso central
snoRNAs	Pequenos RNAs nucleolares
snRNAs	Pequenos RNAs nucleares
ssRNA	Pequeno RNA
ssRNA	RNA simples fita
T	Timina
Th1	T- helper1
TNF	Fator de necrose tumoral
TPEN	N, N, N', N' – Tetraquis-2-pirimidil-etil-etiledodiamino
tRNA	RNA transportador
UEA	<i>University of East Anglia</i>
USCC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UTR	Região não traduzida, <i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
Var.	Variedade
VG	Variedade <i>gattii</i>
VN	Variedade <i>neoformans</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
ZIP	<i>Zrt, Irt-like Protein</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de referência de linhagens de <i>Cryptococcus neoformans</i>	19
Tabela 2: Presença dos genes codificadores dos componentes da via de RNAi nos filós <i>Basidiomycota</i> , <i>Zygomycota</i> e <i>Ascomycota</i> de fungos.....	47
Tabela 3: Número total de sequências entre 16-28 nt e número de sequências únicas entre 16-28nt em cada condição de cultivo de <i>C. gattii</i> R265.....	59
Tabela 4: Lista dos 31 milRNAs identificados em <i>C. gattii</i> R265 utilizando algoritmo ‘MIREAP’ e informação sobre a localização dos precursores dos milRNAs.....	62
Tabela 5: Lista dos 26 milRNAs identificados em <i>C. gattii</i> WM276 utilizando algoritmo ‘MIREAP’ e informação sobre a localização dos precursores dos milRNAs.	63
Tabela 6: Informação sobre comprimento, contagem e MFE dos precursors dos milRNAs identificados em <i>C. gattii</i> R265 pelo algoritmo ‘MIREAP’.	64
Tabela 7: Informação sobre tamanho, contagem e MFE dos precursors dos milRNAs identificados em <i>C. gattii</i> WM276 pelo algoritmo ‘MIREAP’.	65
Tabela 8: milRNAs preditos presentes em ambas as linhagens <i>C. gattii</i> R265 e <i>C. gattii</i> WM276.	66
Tabela 10: Valor do RPKM obtido para cada pre-milRNAs dos grupos 1 e 2 de <i>C. gattii</i> R265, em cada uma das condições, e valor da expressão diferencial.....	74
Tabela 11: Genes alvo em <i>C. gattii</i> R265 de miR-4.	128
Tabela 12: Genes alvo em <i>Mus musculus</i> de miR-4.	128
Tabela 13: Genes alvo em <i>Homo sapiens</i> de miR-4.	129
Tabela 14: Genes alvo em <i>C. gattii</i> R265 de miR-37.	131
Tabela 15: Genes alvo no genoma de <i>Mus musculus</i> de miR-37.....	132
Tabela 16: Genes alvo de miR-37 no genoma de <i>Homo sapiens</i>	133
Tabela 17: Genes alvo de miR-15 no genoma de <i>C. gattii</i> R265.....	136
Tabela 18: Genes alvo de miR-15 no genoma de <i>Mus musculus</i>	137
Tabela 19: Genes alvo de miR-15 no genoma de <i>Homo sapiens</i>	138
Tabela 20: Genes alvo no genoma de <i>C. gattii</i> R265 de miR-46.....	139
Tabela 21: Genes alvo no genoma de <i>Mus musculus</i> de miR-46.....	139
Tabela 22: Genes alvo de miR-46 no genoma de <i>Homo sapiens</i>	140

RESUMO

O complexo *Cryptococcus* possui 37 espécies descritas, das quais se destacam *C. neoformans* e *C. gattii* devido a sua capacidade de causar doença tanto em humanos como animais. A fim de se prevenir de organismos patogênicos, o hospedeiro pode reduzir a disponibilidade de nutrientes em um processo conhecido como imunidade nutricional. Além disso, é bem descrito o papel central de metais essenciais em relação à expressão dos fatores de virulência nas espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*. MicroRNAs (miRNAs) são importantes mediadores da expressão gênica em resposta a estresses, incluindo privação de metais ou toxicidade causada pelos mesmos. Entretanto, pouco é conhecido sobre expressão de miRNAs ou miRNAs-like em *C. gattii*. Portanto, o objetivo desde trabalho foi determinar o perfil miRNAs ou miRNAs-like produzidos por *C. gattii* durante privação de ferro e privação de zinco. Células de *C. gattii* R265 foram cultivadas em três condições: privação de zinco, privação de ferro e condição controle. As sequências dos pequenos RNAs foram obtidas por RNA-Seq. A fim de identificar miRNAs em *C. gattii*, as sequências não redundantes foram alinhadas às sequências dos genomas das linhagens de *C. gattii* R265 e WM276. Foi realizada a predição de miRNAs ou microRNA-like com ferramentas de bioinformática que resultou em 31 possíveis miRNAs na linhagem R265 e 26 na linhagem WM276, respectivamente. Análises *in silico* da expressão diferencial dos miRNAs mostraram que a maioria está presente nas três condições, ao passo que apenas dois estão presentes apenas nas condições de privação de metais. Desta forma, estes miRNAs-like podem estar exercendo algum papel importante na homeostase de metais em resposta a condições que mimetizam o ambiente de infecção. Visto que a linhagem R265 de *C. gattii* não possui um gene codificador da proteína Argonauta, a qual desempenha um papel central na via de RNA de interferência (RNAi), esta via possivelmente não seria responsável pelo silenciamento de outros genes. Levanta-se a hipótese que estes miRNAs-like poderiam ser exportados da célula e, então, modular a expressão gênica no hospedeiro. Esta análise foi iniciada pela avaliação de possíveis alvos expressos pelos genomas de camundongo e humano. Alguns destes alvos mostraram relação com a resposta imune nos hospedeiros. Esta identificação deve esclarecer o papel desenvolvido por miRNAs na regulação da expressão gênica na interação patógeno-hospedeiro.

ABSTRACT

The *Cryptococcus* complex has 37 species described, from which *C. neoformans* and *C. gattii* stand out for their ability to cause disease in humans and animals. To prevent infection with pathogenic microorganisms, host may reduce the availability of nutrients in a process known as nutritional immunity. Furthermore, it is well described that essential metals have central roles related to the regulation of expression of virulence factors in pathogenic *Cryptococcus* species. MicroRNAs (miRNAs) are important mediators of gene expression in response to several stresses, including metal deprivation or toxicity. However, little is known about microRNAs or miRNAs-like expression in *C. gattii*. Therefore, the aim of this work was to profile miRNAs produced by *C. gattii* during iron and zinc deprivation. *C. gattii* R265 cells were incubated in three conditions: zinc deprivation, iron deprivation and control condition. The sequences of small RNAs were obtained by RNA-Seq. To identify miRNAs or miRNAs-like in *C. gattii*, non-redundant reads were aligned to sequences of *C. gattii* R265 and WM276 strains genomes. MiRNAs prediction was and resulted in 31 possible miRNAs in R265 strain and 26 in WM276 strain, respectively. *In silico* analysis of miRNAs differential expression showed that the majority of them are present in the three conditions, while two are present only in metal deprivation. Thereby, these miRNAs-like may be exerting some important role at metal homeostasis in response to infection environment mimicry conditions. As the *C. gattii* R265 strain does not have an Argonaut encoding gene, the protein that plays a central role in the RNA interference (RNAi) pathway, we assumed that probably this pathway would not be responsible for silencing of others genes. We hypothesized that these miRNAs-like could be exported and modulate the gene expression in host cells. This analysis was initialized by evaluating the potential targets expressed by human and mouse genome. Some of these targets were related to immune response in the host. This identification should clarify the role played by miRNAs in the regulation of gene expression in the host-pathogen interaction.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Infecções fúngicas estão se tornando mais comuns no mundo todo e, de particular preocupação pública, se destacam os fungos basidiomicetos do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Byrnes *et al.*, 2011). A levedura *C. gattii* vêm se tornando um importante foco de estudo, uma vez que foi responsável pelo surto de criptococose nas ilhas de Vancouver, no Canadá, causado predominantemente pelo subgenótipo VGIIa (Kidd *et al.*, 2004), cujo um dos representantes é a linhagem R265. Esta linhagem possui perfil hipervirulento em comparação ao restante das linhagens deste complexo de leveduras (Dixit *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2005; Ngamskulrunroj *et al.*, 2011a).

Vários estudos vêm sendo conduzidos a fim de identificar mecanismos específicos que tornam este subgenótipo mais virulento que as leveduras do subgenótipo VGIIb ou de outras linhagens de *C. gattii* (Ngamskulrunroj *et al.*, 2011a). Inclusive, foi demonstrado que a linhagem R265 não possui alguns genes essenciais para existência de uma via de RNAi funcional (D'souza *et al.*, 2011) e alguns autores abordam a perda desta via clássica como uma vantagem evolutiva em diversos microrganismos, incluindo outros fungos e parasitas (Nicolás *et al.*, 2013).

Esta via é responsável por diversas funções regulatórias (Li *et al.*, 2010), inclusive homeostase de metais (Gielen *et al.*, 2012), através da ação de pequenos RNAs, ou sRNAs (*small RNAs*), incluindo o tipo mais abundante, os miRNAs (Farazi *et al.*, 2008; Grosshans e Filipowicz, 2008). A disponibilidade de íons metálicos, como ferro e zinco, é um importante fator durante interação patógeno-hospedeiro, de forma que ambos os organismos desenvolvem estratégias de captação destes metais (Schaible e Kaufmann,

2004), sendo que a privação dos mesmos pode alterar importantes características envolvidas na virulência das leveduras do complexo *Cryptococcus* (Barluzzi *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011; Liu e Nizet, 2009; Mambula *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2011; Vartivarian *et al.*, 1993). Além disso, já é consolidado que durante a interação com o hospedeiro, patógenos podem entregar diferentes tipos de moléculas efetoras, como proteínas e, até mesmo, sRNAs, capazes de modular a resposta imune do hospedeiro (Ashida *et al.*, 2012; Ashida *et al.*, 2011; Bozkurt *et al.*, 2012; Rafiqi *et al.*, 2012; Weiberg *et al.*, 2013).

Em *C. gattii* não há descrição na literatura da presença de miRNAs ou qualquer outra classe de sRNAs e, de forma mais restrita, não existem relatos sobre a influência da privação de metais na resposta e função da via de RNAi, associação esta que, inclusive, ainda não é descrita em outros fungos. Neste contexto, o presente trabalho visa mostrar a possível existência de um novo mecanismo molecular, relacionado à produção de miRNAs- *like*, que pode contribuir potencialmente para o perfil hipervirulento da linhagem de *C. gattii* R265 quando em condições de privação de metais que mimetizam o ambiente durante a interação com seu hospedeiro. Demonstramos através de RNA-Seq e análises de bioinformática, que *C. gattii* R265 se mostrou capaz de produzir miRNAs-*like* que, aparentemente, podem estar regulando diversos genes dos hospedeiros envolvidos na resposta imune.

1.1. O Gênero *Cryptococcus*

Fungos fazem parte de uma das maiores classes de patógenos causadores de doenças infecciosas a nível mundial. Possuem representantes que causam doença em animais, inclusive seres humanos, com morbidade e mortalidade sérias em indivíduos com sistema imune comprometido ou não. *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, por exemplo, causam infecções em humanos cujo sistema imune está comprometido; *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides posadasii* causam patologia em hospedeiros saudáveis, e outros, como espécies do complexo *Cryptococcus*, afetam ambos os tipos de indivíduos (Byrnes *et al.*, 2011). Enquanto a maioria das 37 espécies identificadas do gênero *Cryptococcus* não é geralmente nociva, destacam-se *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* como principais patógenos para humanos e animais (Li e Mody, 2010).

A levedura *C. neoformans* foi isolada inicialmente, em 1894, em amostras de suco de pêssego por Francesco Sanfelice. Esta espécie é considerada saprófita, tendo como principal fonte ambiental as excretas de pombos e acomete, principalmente, indivíduos imunocomprometidos, como transplantados, com câncer, pacientes sob tratamento com imunossuppressores ou com AIDS (Dixit *et al.*, 2009; Irokanulo *et al.*, 1997; Li e Mody, 2010; Moosbrugger *et al.*, 2008; Pagano *et al.*, 2006).

É estimado, pelo Centro de Controle de Doenças (CDC), que, anualmente, cerca de um milhão de indivíduos com AIDS são acometidos por espécies patogênicas de *Cryptococcus spp.*, com mortalidade atribuída a mais de 650 mil delas. Corresponde a 1/3 dos óbitos em pacientes com quadro de HIV/AIDS associado à criptococose, superando a mortalidade causada por tuberculose na África (Del Poeta e Casadevall, 2012; Park *et al.*, 2009a).

Por sua vez, *C. gattii* foi primeiramente isolado de um paciente leucêmico em 1970 e descrito como uma variante de *C. neoformans* (Dixit *et al.*, 2009; Vanbreuseghem e Takashio, 1970). Sua distribuição mostrou-se, inicialmente, restrita a regiões de clima subtropical, tropical e temperado (Kidd *et al.*, 2004; Sorrell, 2001). As leveduras classificadas como *C. gattii* são responsáveis por menos de 1% dos casos de criptococose no mundo e mostram, como principais reservatórios, as árvores de eucalipto e cavidades (em decomposição) de árvores (Li e Mody, 2010). Apesar da baixa incidência, estas leveduras possuem grande importância, pois são consideradas patógenos primários, acometendo indivíduos imunocompetentes (Kwon-Chung e Bennett, 1984; Kwon-Chung e Varma, 2006). *C. gattii* foi responsável pelo surto de criptococose na Ilha de Vancouver, Canadá (Kidd *et al.*, 2004) e nos Estados Unidos (Byrnes *et al.*, 2010; Byrnes *et al.*, 2009), sendo um fungo emergente de grande importância clínica.

O complexo de espécies *C. neoformans* foi primeiramente classificado, em 1950, de acordo com as variações estruturais nos polissacarídeos da cápsula, diferenciados por reações de aglutinação (Evans, 1950). A análise resultou em quatro sorotipos (A, B, C e D), além do híbrido AD, porém, com base em análises moleculares posteriores, os sorotipos B e C foram classificados como uma nova espécie, denominada *C. gattii* (Kwon-Chung e Varma, 2006). Já *C. neoformans* foi classificado em duas variedades (var.), *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D). Por sua vez, as duas espécies de *C. neoformans* são subdivididas em quatro tipos moleculares, de acordo com padrões obtidos por técnicas como PCR *fingerprinting* e análise por Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP) (Figura 1): *C. neoformans* VNI, VNII, VNIII e VNIV, além do tipo molecular VNB, e *C. gattii* em VGI, VGII, VGIII e VGIV (Boekhout *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 1999; Ngamskulrungronj *et*

al., 2009). Esta divisão é de grande importância epidemiológica e clínica, já que tipos VGI e VGII têm sido associados com a maioria dos casos de surtos da doença em pessoas saudáveis na América do Norte, enquanto os tipos VGIII e VGIV produzem doença, geralmente, em pacientes imunocomprometidos (como os que possuem HIV/AIDS), sendo similares aos perfis epidemiológicos observados em *C. neoformans* (Byrnes et al., 2011).

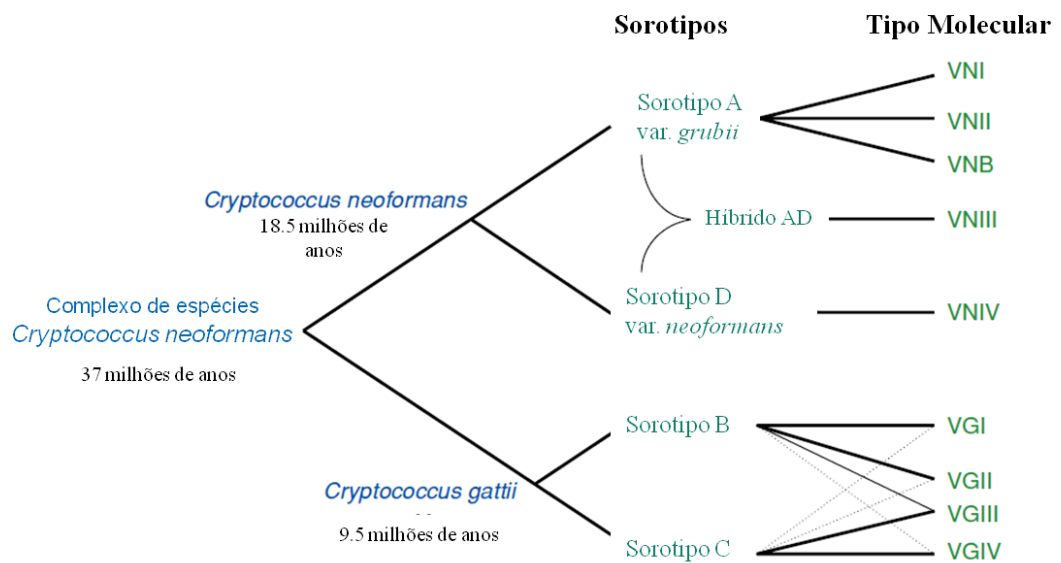


Figura 1: Evolução do Complexo de espécies de *C. neoformans*. O complexo de espécies de *Cryptococcus* possui, no mínimo, duas subespécies, *C. neoformans* e *C. gattii*. A primeira subespécie divergiu de um ancestral comum em cerca de 37 milhões de anos e, a segunda, em cerca de 18.5 milhões de anos. Estas duas subespécies são divididas em, basicamente, quatro sorotipos. *C. neoformans* em A, D (além do híbrido AD) e *C. gattii* em B e C, consistindo em, pelo menos, nove tipos moleculares. As linhas tracejadas significam que pode haver reação cruzada, ou seja, os limites entre sorotipos e tipos moleculares, principalmente na espécie *C. gattii*, não são bem delimitados. Adaptado de Lin e Heitman (2006).

Estudos demonstraram diferenças ecológicas e geográficas entre os tipos moleculares de *C. gattii*. Na Austrália, esta levedura é endêmica e o genótipo VGI é o isolado mais comum tanto no aspecto clínico como ambiental, enquanto VGII é

infrequente (Sorrell, 2001); especificamente na região norte da Austrália, a maioria dos casos de criptococose foi associada ao genótipo VGII (Campbell *et al.*, 2005; Jenney *et al.*, 2004), assim como na América do Sul, no Brasil e Colômbia, por exemplo, e na Ilha de Vancouver, no Canadá, no qual 95% das amostras clínicas e ambientais pertenciam ao genótipo VGII. Porém, a Ilha de Vancouver mostra limitada diversidade deste genótipo já que 90% deste grupo era composto por exemplares do genótipo VGIIa (Dixit *et al.*, 2009; Kidd *et al.*, 2007). O genótipo VGII é dividido em três principais subgenótipos: VGIIa, o principal, VGIIb, o menor, e VGIIc, emergente no Noroeste do Pacífico, sendo que VGIIa possui virulência maior que VGIIb, enquanto VGIIc tem perfil de virulência similar ao do genótipo VGIIa do surto em Vancouver (Byrnes *et al.*, 2010). Em estudo com modelo de infecção murina, utilizando diferentes tipos moleculares de *C. gattii* isolados da Ilha de Vancouver, mostrou que o principal genótipo (VGIIa) mostrou maior virulência do que o genótipo VGIIb, que foi avirulento (100% de sobrevivência após 55 dias decorrentes do início da infecção em modelos de criptococose murino), enquanto VGIIc mostrou virulência similar a de VGIIa (Dixit *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2005; Ngamskulrunroj *et al.*, 2011a). Inclusive, estudos apontavam a hipótese de que os isolados do surto em Vancouver seriam originados da América do Sul, pois, entre outros motivos, o genótipo VGII está presente no Brasil a mais tempo do que no Canadá (Trilles *et al.*, 2008) e que a população de *C. gattii*, na América do Sul, possui a maior diversidade genética em comparação às outras regiões (Ngamskulrunroj *et al.*, 2009; Ngamskulrunroj *et al.*, 2011b).

Em estudo recente, de Hagen e colaboradores (2013), foi demonstrado, através de análises por SCAR-MLST, microssatélite e AFLP-fingerprinting, que o modelo mais plausível de origem da população VGII de *C. gattii* é, realmente, a América do Sul, a qual se mostrou como principal doador deste genótipo para outras regiões, como Europa,

África, América do Norte e Austrália. Também demonstraram que as linhagens do Noroeste do Pacífico não são geneticamente próximas das do surto em Vancouver, mas que ambas pertencem ao mesmo cluster, juntamente com as linhagens da América do Sul. Este fato indica que a América do Sul possui maior probabilidade de ter sido a origem do surto do genótipo, no Noroeste do Pacífico e que, nesta região, esta linhagem emergiu de eventos de recombinação. Desta forma, foi mostrado que a linhagem do Noroeste do Pacífico foi introduzida na América do Norte a partir da América do Sul, independente das linhagens do surto em Vancouver (Hagen *et al.*, 2013). A Tabela 1 mostra as espécies do complexo *Cryptococcus*, sorotipos e tipos moleculares correspondentes, bem como exemplos de linhagens representantes.

Tabela 1: Lista de referência de linhagens de *Cryptococcus neoformans*. Adaptada de Lin e Heitman, 2006.

Variedade/ espécies	Sorotipo	Tipo molecular	Linhagem MAT _o	Linhagem MAT _a
<i>grubii</i>	A	VNI	<u>H99</u>	125.1
<i>grubii</i>	A	VNII	8-1	ND
	A	VNB	Bt148	Bt63
<i>grubii</i>	AD	VNIII	KW5 α AD α	
	AD	VNIII	CDC228 α AD α	
<i>neoformans</i>	D	VNIV	<u>JEC21</u> <u>B3501</u>	<u>JEC20</u>
<i>gattii</i>	B	VGI	<u>WM276</u>	<u>E566</u>
<i>gattii</i>	B	VGII	<u>R265</u> <u>R272</u>	CBSI1930
<i>gattii</i>	C	VGIII	NIH312	CDC4546
<i>gattii</i>	C	VGIV	Bt26	ND

*As linhagens sublinhadas representam aquelas em que o seu genoma está sequenciado. ND: linhagem ainda não determinada.

Uma linhagem representante do tipo molecular mais abundante globalmente (VGI) é WM276, enquanto outra do tipo molecular VGIIa, de grande importância clínica, é R265.

É estimado que a divergência entre estas duas linhagens seja de 12.4 milhões de anos (myr). Já foi demonstrado que a maioria dos cromossomos, no genoma de WM276, são colineares com os de R265, porém, alguns rearranjos e regiões de inversão existem entre os dois. Existem 154 genes únicos para WM276 e 108 específicos para R265, sendo que a maioria corresponde a genes que codificam proteínas hipotéticas (D'souza *et al.*, 2011). Neste sentido, é possível que a perda seletiva de alguns genes possa contribuir para a alta virulência de R265 em relação a WM276 (Cheng *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2005). Ainda foi demonstrado que as duas linhagens de *C. gattii* mostraram muitos rearranjos em relação ao genoma de *C. neoformans*, o que sugere que as diferenças no rearranjo de cromossomos entre as duas espécies pode significar diferença em relação à virulência (D'souza *et al.*, 2011).

1.2. Fatores de virulência

Ambas as espécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, possuem características que aumentam sua capacidade de evadir e sobreviver no organismo hospedeiro, os chamados fatores de virulência. Entre eles, se destacam a produção de cápsula polissacarídica, a formação do pigmento melanina na parede celular, a capacidade de proliferação a 37°C e a secreção de enzimas, como fosfolipase B e urease, além da capacidade de proliferação intrafagossômica (He *et al.*, 2003; Ma e May, 2009; Perfect *et al.*, 1998). Recentemente, foi descrito que a entrega de fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, lacase, fosfolipase B e urease, ocorre, em parte, por vesículas extracelulares (Kronstad *et al.*, 2011).

1.2.1. Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica e os constituintes solúveis extracelulares (produtos criptococócicos) são, provavelmente, os fatores de virulência dominantes (Buchanan e Murphy, 1998). Sua importância foi mostrada pela observação que variantes acapsulares de *C. neoformans* raramente causavam doença em humanos (Alspaugh *et al.*, 1998).

A cápsula é formada, em sua maior parte, por polissacarídeos de alta massa molecular, como a glucuronoxilomanana (GXM), correspondendo a 90-95%, e galactoxilomanana (GalXM), correspondendo aos 5-10% restantes (Rakesh *et al.*, 2008). A cápsula possui atividade antifagocítica, interferindo na captura do fungo, além de reduzir a apresentação de antígenos às células fagocíticas (Bose *et al.*, 2003; Collins e Bancroft, 1991; Del Poeta, 2004). Ainda, células de *C. neoformans* ou *C. gattii* possuem a capacidade de modular o tamanho da cápsula de acordo com as condições ambientais em que se encontram. Durante o processo de infecção e interação com macrófagos (Bahn *et al.*, 2005; Granger *et al.*, 1985), na presença de soro (Zaragoza *et al.*, 2003) ou em privação de ferro (Jung *et al.*, 2006; Lian *et al.*, 2005; Vartivarian *et al.*, 1993), ocorre um aumento da cápsula. Desta forma, o aumento da cápsula pode auxiliar na sobrevivência do patógeno, por gerar maior resistência a radicais livres e peptídeos antimicrobianos e por conter propriedades antioxidantes (Zaragoza *et al.*, 2008).

Além disso, a cápsula também influencia outras atividades das células fagocíticas. Quando internalizada por macrófagos, a levedura pode liberar polissacarídeos da cápsula, em vesículas, no citoplasma dos macrófagos alterando sua função ou causando lise; pode inibir a liberação de citocinas e a migração de leucócitos para os sítios de inflamação (Bose

et al., 2003; Vecchiarelli *et al.*, 1995) e, ainda, o seu polissacarídeo GXM é capaz de induzir apoptose das células T do hospedeiro (Pericolini *et al.*, 2006; Yauch *et al.*, 2006).

Um estudo comparativo entre o polissacarídeo GXM de *C. neoformans* e de *C. gattii* revelou que existem diferenças nesta molécula entre as espécies e sorotipos. O polissacarídeo produzido por *C. gattii* sorotipo B mostrou menor diâmetro e particular reatividade sorológica, além de possuir diferenças na capacidade de imunomodulação em sistemas *in vitro* (Fonseca *et al.*, 2010). Desta forma, as alterações estruturais presentes na cápsula de diferentes sorotipos são importantes para a suas distintas atividades biológicas.

1.2.2. Melanina

A produção de melanina também se mostra como um fator importante para infecção causada por leveduras patogênicas do complexo *Cryptococcus* e foi descoberta por volta de 1960 (Ma e May, 2009). Se trata de um pigmento escuro, com carga negativa e hidrofóbico, sintetizado pela enzima lacase na presença de compostos fenólicos (Casadevall *et al.*, 2000), como L-Dopa ou catecolaminas presentes no sistema nervoso central, fato que pode contribuir para o neurotropismo da levedura (Williamson *et al.*, 1998).

Dois produtos gênicos são essenciais para sua síntese, *LAC1* e *LAC2* (Zhu e Williamson, 2004), enquanto outros se mostraram importantes para o processo de biogênese do pigmento, mas não possuem papéis bem estabelecidos ainda, como *VPH1*, *CC2*, *CLC1*, *ATX1* e *MFBI* (Erickson *et al.*, 2001; Walton *et al.*, 2005; Zhu e Williamson, 2003).

No ambiente, a melanina é responsável por proteger a levedura de raios UV (Wang e Casadevall, 1994a), altas temperaturas e congelamento (Rosas e Casadevall, 1997; Wang e Casadevall, 1994b). Além disso, células melanizadas mostraram-se menos suscetíveis a radicais livres e oxidantes (Emery *et al.*, 1994), a drogas antifúngicas como caspofungina e anfotericina B (Van Duin *et al.*, 2002) e à fagocitose (Huffnagle *et al.*, 1995).

1.2.3. Capacidade de proliferação a 37°C

A capacidade de crescimento na temperatura fisiológica de hospedeiros mamíferos é essencial para a virulência e persistência de *C. neoformans* e *C. gattii* no hospedeiro (Perfect, 2005; Sorrell, 2001). *C. neoformans* é encontrado, principalmente, em excretas de pombos, mas os mesmos não são infectados pela levedura, provavelmente porque o fungo não consegue se desenvolver apropriadamente na temperatura corporal de aves, que é de cerca de 40-42°C (Mitchell e Perfect, 1995).

Estudos desenvolvidos em *C. neoformans* mostraram que o produto do gene *CNA1*, a proteína Calcineurina A, está envolvida na capacidade de desenvolvimento em altas temperaturas, já que, quando o gene foi inativado na linhagem H99, as linhagens mutantes se mostraram avirulentas e com capacidade de crescimento apenas até 24°C (Odom *et al.*, 1997). A partir deste estudo, foi proposto um papel na capacidade de desenvolvimento à temperatura corporal do hospedeiro por diversas vias de sinalização. Desta forma, produtos de genes como *CTS1*, *MPK1*, *RAS1*, *RAS2* e *CNBI*, envolvidos em vias de sinalização, mostraram envolvimento no desenvolvimento da levedura em altas temperaturas (Alspaugh *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2003; Kraus *et al.*, 2003; Odom *et al.*, 1997; Waugh *et*

al., 2002). Outros produtos gênicos, como de *AOX1* e *COX1*, envolvidos na regulação transcricional da resposta à alteração de temperatura (Akhter *et al.*, 2003; Toffaletti *et al.*, 2003) e de *VPH1*, *CCN1*, *MGA2*, *SPE3/LYS9*, entre outros, foram descritos como importantes para o desenvolvimento da levedura em alta temperatura (Perfect, 2005).

1.2.4. Produção de enzimas

Enzimas degradativas, como proteinases, fosfolipases e ureases auxiliam na virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* em relação ao hospedeiro. As proteinases são capazes de degradar proteínas como fatores do complemento, imunoglobulinas, colágeno, elastina e fibrinogênio do hospedeiro (Chen *et al.*, 1996).

As fosfolipases degradam o tecido hospedeiro, resultando em desestabilização de membranas (Ghannoum, 2000; Santangelo *et al.*, 1999) e permitem a invasão tecidual e proliferação da levedura, sendo que *C. neoformans* secreta fosfolipase B1 (PLB1), lisofosfolipase (LPL) e lisofosfolipase-transacetilase (LPTA), enquanto *C. gattii* secreta uma fosfolipase que contém atividade de LPL e LPTA (Steenbergen e Casadevall, 2003; Wright *et al.*, 2004). Quando o gene codificador da fosfolipase B foi inativado em *C. neoformans*, a linhagem mutante apresentou reduzida virulência e desenvolvimento inibido em uma linhagem de macrófago (Cox *et al.*, 2001). Somado a isso, as fosfolipases auxiliam na adesão da levedura no epitélio pulmonar e promovem a disseminação do patógeno (Ganendren *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2004). Alguns estudos sugerem que tanto as proteinases como as fosfolipases são produzidas durante a replicação de *C. neoformans* no interior de macrófagos, fornecendo nutrientes para a levedura e gerando danos na defesa do hospedeiro (Chen *et al.*, 1996; Tucker e Casadevall, 2002).

As ureases hidrolisam ureia à amônia e carbamato e, em *C. neoformans* e *C. gattii*, essa enzima é codificada pelo gene *URE1*. Foi demonstrado que a levedura pode atravessar a barreira hematoencefálica em um processo urease-dependente, sem envolver células do sistema imune como no mecanismo “cavalo de Tróia” (Charlier *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010). Adicionalmente, alguns estudos mostram que a atividade da urease em *C. neoformans* é maior do que em *C. gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 1987; Torres-Rodríguez *et al.*, 2008). Embora a urease não seja essencial para o desenvolvimento no cérebro, possui influência direta na disseminação da doença para o SNC pelo sequestro da levedura para microcapilares durante disseminação hematogênica, facilitando a transmissão para o cérebro (Olszewski *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010).

1.2.5. Outros fatores

Além desses fatores, as leveduras patogênicas de *Cryptococcus spp.* apresentam tolerância a baixo pH e elevadas concentrações de sal, os quais auxiliam na sobrevivência e persistência no ambiente hospedeiro (Kidd *et al.*, 2007). Ainda, há relatos de que alterações fenotípicas na colônia também estão associadas à virulência, de modo que a variante mucóide se apresenta mais virulenta em modelos murinos de criptococose. Entretanto, há evidências de que a variante lisa pode atravessar a barreira hematoencefálica (Jain *et al.*, 2006).

1.2.6. Diferenças nos fatores de virulência do genótipo hipervirulento de *C. gattii*

Desde o surto de criptococose nas ilhas de Vancouver, vem se mostrando de grande importância estudos sobre mecanismos presentes no genótipo hipervirulento de *C. gattii*. Em um estudo transcricional comparativo entre a linhagem hipervirulenta *C. gattii* R265 com uma linhagem hipovirulenta, R272, alguns genes potencialmente envolvidos na virulência foram caracterizados. Em R265, genes relacionados aos principais fatores de virulência como melanina (*LAC1*, *LAC2* e *ATX1*), cápsula polissacarídica (*CAS3*) e capacidade de crescimento a 37°C (*MPK1*) apresentaram expressão maior do que na linhagem R272. Entretanto, quando utilizaram mutantes para esses genes, apenas *LAC1* e *MPK1* afetaram a virulência de *C. gattii* R265. Mais estudos necessitam ser realizados a fim de caracterizar mecanismos moleculares específicos das linhagens hipervirulentas, uma vez que, os mesmos autores mostram que genes envolvidos no metabolismo celular, divisão celular e receptores de feromônios apresentam expressão reduzida em relação à linhagem R272 (Ngamskulrunroj *et al.*, 2011a).

Em geral, as leveduras patogênicas do complexo *Cryptococcus* desenvolveram diversos mecanismos que dificultam a internalização pelas células fagocíticas, alguns dependendo da cápsula e outros dependendo de proteínas antifagocíticas ou vias de sinalização (Dixit *et al.*, 2009), a fim de infectar o hospedeiro com êxito, causando, então, o quadro clínico conhecido como criptococose.

1.3. Criptococose

As leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* são os agentes etiológicos da criptococose, doença que acomete humanos, animais selvagens, agrários ou domésticos. Inclusive, infecções também podem ocorrer em mamíferos marinhos, mostrando a diversidade de ambientes em que estas leveduras podem ser encontradas. São responsáveis por diversas formas clínicas da doença, podendo acometer diversos órgãos do hospedeiro, desde pele, pulmões e mostra certo tropismo pelo SNC; desta forma, causam desde infecções cutâneas, pneumonia a formação de criptocomas e meningite (Byrnes *et al.*, 2011; Sorrell, 2001).

Acredita-se que o início do processo de infecção ocorra pela inalação de células dessecadas ou esporos das leveduras (Giles *et al.*, 2009) que geralmente desenvolvem uma infecção assintomática limitada ao pulmão. As leveduras, *C. neoformans* e *C. gattii*, geralmente são encontradas no ambiente em associação com solo, pombos e árvores. Células dessecadas são consideradas propágulos infecciosos que, pelo seu pequeno tamanho (cerca de 3 μm), podem se depositar no interior dos alvéolos pulmonares; entretanto, os esporos da levedura possuem tamanhos menores (1-2 μm). Desta forma, acredita-se que os esporos, por possuírem uma compacta parede celular e maior resistência a altas temperaturas e estresse oxidativo, são mais facilmente dispersos através do ar, inclusive pela resistência apresentada por eles (Botts *et al.*, 2009; Giles *et al.*, 2009; Velagapudi *et al.*, 2009). Após infecção pulmonar inicial, *C. neoformans* e *C. gattii* podem se disseminar pela via hematogênica e atravessam a barreira hematoencefálica, causando meningoencefalite (Chang *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010; Sorrell, 2001) (Figura 2).

Portanto, durante o processo de infecção, os macrófagos alveolares se tornam a primeira linha de defesa contra as células das leveduras, que podem sobreviver e proliferar

dentro das células fagocíticas (Feldmesser *et al.*, 2000; Sorrell, 2001), entretanto, esses dois processos somente são possíveis na ausência de uma ativação prévia de macrófagos por lipopolissacarídeos ou IFN- γ (Kronstad *et al.*, 2011). Diversas evidências mostram que a interação com macrófagos é o mecanismo pelo qual o fungo pode se disseminar pelo organismo (Charlier *et al.*, 2009; Mansour e Levitz, 2002; Shao *et al.*, 2005).

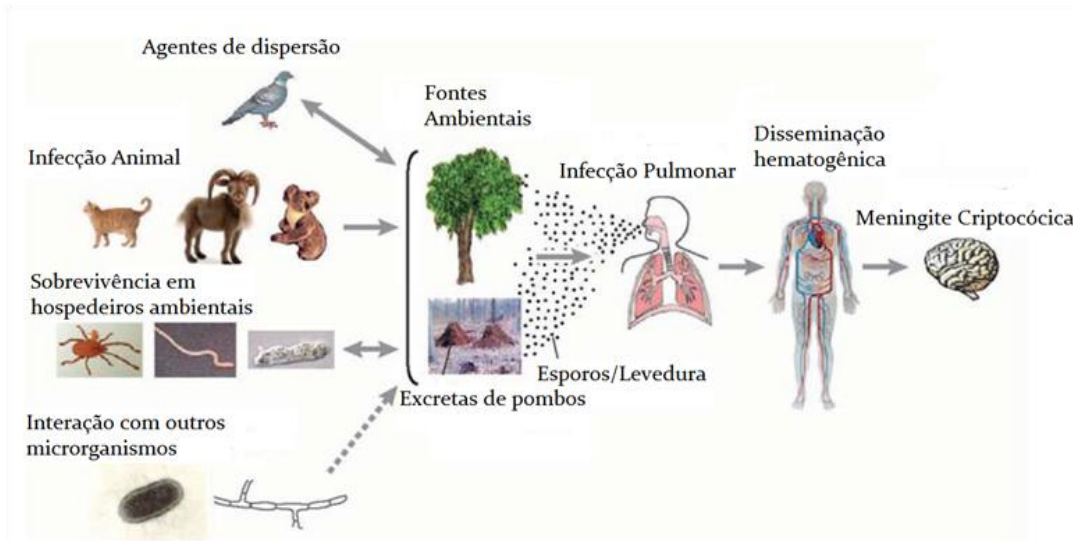


Figura 2: Ciclo infeccioso de espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*. O fungo sobrevive no solo e está, geralmente, associado com excretas de pombos e troncos de árvores, podendo infectar outros hospedeiros, como gatos, coalas e cabras. Os pombos são considerados a principal forma de dispersão do fungo. Além disso, as células fúngicas podem sobreviver em associação com predadores como, amebas, carrapatos e vermes. Acredita-se que a principal forma de infecção ocorre por inalação de esporos ou células dessecadas, que se depositando no pulmão e podem sofrer disseminação hematogênica e causar infecção do SNC. Adaptado de Lin e Heitman, 2006.

Quando internalizado, o fungo é contido no fagossomo, que sofre maturação e, como resultado, há fusão da membrana do lisossomo com o fagosossomo, gerando o fagolisossomo. Este é caracterizado pelo pH ácido, presença de enzimas hidrolíticas e altos níveis de radicais livres (García-Rodas e Zaragoza, 2012). Além da capacidade de se replicar no interior dos macrófagos, as células da levedura também podem ser transferidas

de um macrófago para outro (Alvarez e Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006), não sendo expostos diretamente ao sistema imune quando na via hematogênica. Porém, as células podem transitar pelo organismo sozinhas. Quando internalizadas e sob processo de proliferação, muitas divisões da levedura podem causar a lise dos macrófagos (Del Poeta, 2004) ou, ainda, as células leveduriformes podem sair dos macrófagos pelo mecanismo chamado extrusão, no qual não há lise da célula hospedeira (Figura 3, painel esquerdo) (Alvarez e Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006; Voelz *et al.*, 2009). Trata-se de um processo extremamente rápido, levando menos de 5 minutos, uma vez que foi iniciado (Ma *et al.*, 2006).

Quando presente dentro das células fagocíticas, a levedura pode migrar e atravessar membranas celulares, incluindo a barreira hematoencefálica, no modelo de disseminação conhecido como “cavalo de Tróia” (Figura 3) (Chrétien *et al.*, 2002; Luberto *et al.*, 2003). Este modelo mostra que as células podem ser liberadas no SNC, com possibilidade de disseminação, sem serem expostas ao sistema imune (Drevets e Leenen, 2000). Em estudo com modelo de infecção animal, foi visto que macrófagos que já continham células de *C. neoformans* fagocitadas *in vitro* mostraram maior grau de disseminação, quando comparados com animais com células fagocíticas sem a levedura (Charlier *et al.*, 2009).

Além deste mecanismo, células da levedura podem atravessar a barreira hematoencefálica em um processo ativo, chamado transcitose, no qual a célula leveduriforme adquire um formato ovoide no início da interação com as células endoteliais (Shi *et al.*, 2010). Este processo também conta com modificações nas próprias células endoteliais do cérebro quando a célula fúngica se adere a elas, alterando a morfologia do citoesqueleto (Chen *et al.*, 2003) (Figura 3, painel direito).

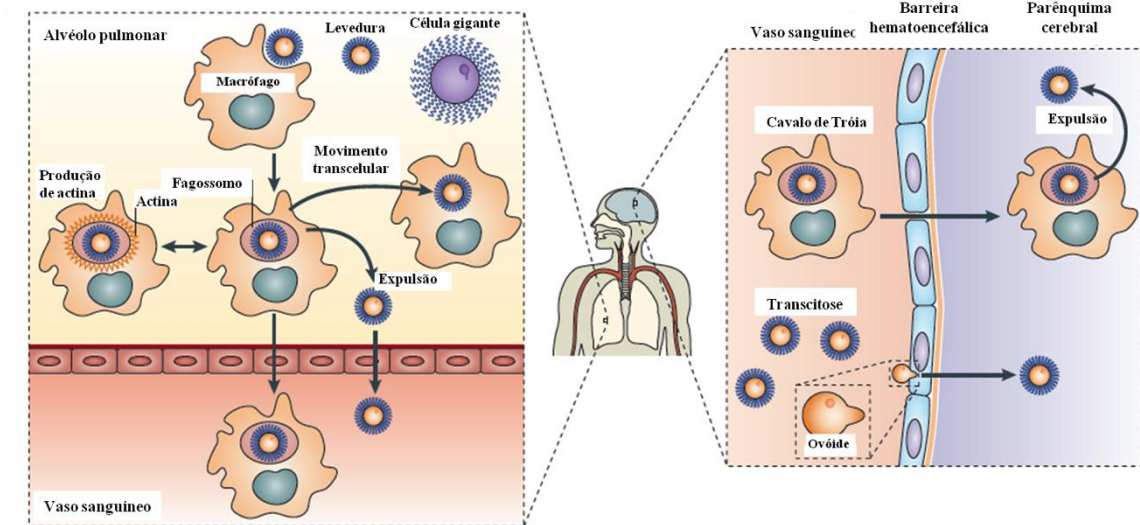


Figura 3: Mecanismos de disseminação de *Cryptococcus* pelo via hematogênica e pelo SNC. Após a inalação, as células de *Cryptococcus* são fagocitadas por macrófagos alveolares e outras células fagocíticas. A disseminação pela via hematogêncica (painel esquerdo) é consequência da capacidade da levedura de sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos. A infecção do SNC pode ocorrer por duas formas: a primeira envolve alteração morfológica da célula leveduriforme, a qual adquire um formato ovoide e interage com as células endoteliais, sendo capaz de cruzar a barreira hemato-encefálica, mecanismo chamado de transcitose. A segunda forma, conhecida como “Cavalo de Tróia” envolve a internalização da célula fúngica pelos macrófagos, os quais atravessam o endotélio, onde, posteriormente ocorrerá a expulsão das células fúngicas (painel direito). Adaptado de Kronstad *et al.*, 2011.

Após a infecção, as duas espécies apresentam diferenças entre o quadro clínico apresentado. *C. gattii* frequentemente produz criptococomas nos pulmões ou cérebro, os quais podem estar associados com complicações no SNC, como hidrocefalia, paralisia de nervos cranianos, convulsões ou grandes lesões inflamatórias nos pulmões. O tratamento envolve, muitas vezes, terapia mais prolongada e/ou intervenção cirúrgica. Apesar de baixos níveis de mortalidade, há grande risco de morbidez neurológica e fraca resposta a antifúngicos, enquanto que, em infecções por *C. neoformans*, o nível de mortalidade é muito maior e as lesões pulmonares e cerebrais se apresentam na forma de infiltrados difusos (Lin, 2009; Mitchell e Perfect, 1995).

Durante o processo de infecção, além dos fatores de virulência citados anteriormente, outros mecanismos desenvolvidos pelo fungo são necessários para sua virulência. Sabe-se que a levedura deve ter capacidade de sobreviver sob hipóxia, baixas concentrações de glicose (Dixit *et al.*, 2009) e, inclusive, passaram a desenvolver mecanismos de adaptação à privação de metais e outros nutrientes.

1.4. Importância da homeostase de metais para os organismos

Metais, como zinco, ferro e cobre, possuem natureza essencial para os organismos ao mesmo tempo em que podem ser tóxicos. Desta forma, os organismos desenvolveram mecanismos especializados para controlar os níveis de metais no interior das células (Ehrensberger e Bird, 2011).

Em doenças infecciosas, o metabolismo destes metais é importante para ambos, hospedeiro e patógeno. Para prevenir a infecção por organismos patogênicos, humanos e outros mamíferos restringem o acesso a metais essenciais em um processo chamado imunidade nutricional. Este termo foi originalmente utilizada para se referir à restrição do metal ferro mediada pelo hospedeiro, mas também pode ser atribuído aos mecanismos de retenção de outros metais essenciais contra microrganismos invasores (Hood e Skaar, 2012).

Portanto, uma das estratégias desenvolvidas pelos hospedeiros mamíferos para prevenir infecções é limitar a disponibilidade de ferro (Weinberg, 2009) e, recentemente, foi demonstrado que a privação de zinco é um mecanismo de defesa utilizado pelos macrófagos durante infecção por *Histoplasma capsulatum* (Winters *et al.*, 2010).

1.4.1. Ferro

Ferro é o metal de transição mais abundante no corpo humano (Hood e Skaar, 2012). Presente na forma de heme ou clusters de enxofre possui função em sistemas de transferência de elétrons e, por tal propriedade, é amplamente utilizado como cofator em enzimas necessárias para respiração, replicação do DNA, biossíntese de ribossomos, fotossíntese e transporte de oxigênio (Ehrensberger e Bird, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Este metal se encontra em baixas concentrações nos fluidos e tecidos corporais, já que o ferro é, predominantemente, intracelular e o restante, que se encontra no ambiente extracelular, está associado com proteínas ou heme. Esta associação com proteínas do hospedeiro ocorre, porque, tanto ferro como heme livres podem ter efeitos deletérios ao organismo (Drakesmith e Prentice, 2012; Dunn *et al.*, 2007). Em vertebrados, maior parte do ferro está em um complexo do heme, o qual é o cofator da proteína de transporte de oxigênio, a hemoglobina. A hemoglobina faz parte dos eritrócitos circulantes, representando uma barreira adicional ao acesso por patógenos (Hood e Skaar, 2012). Também pode estar presente na haptoglobina, hemopexina e outras proteínas (Drakesmith e Prentice, 2012). Além disso, o ferro pode ser armazenado intracelularmente, como Fe^{+3} , na proteína de estoque ferritina, e se torna disponível para patógenos intracelulares com a lise da célula hospedeira. Fe^{+3} também se liga à lactoferrina, uma glicoproteína globular que está presente em secreções, como leite, lágrimas e saliva (Hood e Skaar, 2012). As lactoferrinas atuam quelando ferro preferencialmente em condições de pH ácido, normalmente em sítios de inflamação (Baveye *et al.*, 1999).

Em pH fisiológico, Fe^{+2} extracelular é oxidado para a forma insolúvel Fe^{+3} e mobilizado pela proteína do soro transferrina, a qual liga Fe^{+3} com alta afinidade (Hood e

Skaar, 2012). As transferrinas acumulam aproximadamente 1% do total de ferro presente no corpo humano, sequestrando esses íons do plasma sanguíneo, preferencialmente em condições de pH neutro (Weinberg, 1974). Juntamente com o heme, as transferrinas vem se mostrando como fonte de ferro para *C. albicans* e *C. neoformans var. grubii* (Jung *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011). Inclusive, já foi demonstrado que o soro humano inibe o crescimento de *C. albicans* e sua atividade antifúngica pode ser devido à presença de transferrina, a qual liga o ferro e reduz sua concentração a níveis que não permitem o desenvolvimento do fungo (Howard, 1999).

Além dessas proteínas, a proteína NRAMP1 de macrófagos, localizada na membrana fagossômica, é responsável pelo transporte para o ambiente extracelular de ferro e manganês, reduzindo o acesso destes metais para patógenos intracelulares que residem nos fagossomos (Hood e Skaar, 2012). Desta forma, fica evidente que os patógenos desenvolveram estratégias de aquisição de ferro em resposta à imunidade nutricional imposta pelo sequestro de ferro livre pelo organismo hospedeiro (Jung e Do, 2013).

Em relação às leveduras do complexo *Cryptococcus*, a disponibilidade de ferro se mostrou como um importante fator para o desenvolvimento da doença, uma vez que foi demonstrado que altas concentrações de ferro exacerbam a infecção cerebral por *C. neoformans* em camundongos, mostrando maior quantidade de células fúngicas nos órgãos e maior mortalidade (Barluzzi *et al.*, 2002). Além disso, já foi demonstrado que as principais mudanças fenotípicas em *C. neoformans* são reguladas pela disponibilidade de ferro, como a expressão de dois principais fatores de virulência: a cápsula polissacarídica e produção de melanina. Baixas concentrações do metal podem causar indução de cápsula e a repressão da enzima lacase (Jung *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011; Liu e Nizet, 2009; Silva *et al.*, 2011; Vartivarian *et al.*, 1993).

Em outro estudo foi demonstrado, através de uma análise comparativa do proteoma de *C. gattii* obtido em duas condições diferentes (disponibilidade de ferro e privação de ferro), que 48 proteínas foram encontradas exclusivamente quando o fungo foi submetido à privação do metal (Crestani et al., 2012). Dentre as proteínas, UDP-glicose desidrogenase e GMC-oxireductase mostraram expressão elevada. Ambas possuem relação com a formação capsular e, no caso da oxireductase, também com a produção de melanina. Desta forma, há evidência da associação entre os níveis de ferro com a virulência em *C. gattii* (Crestani et al., 2012).

Até então, muitos mecanismos têm sido descritos para aquisição de ferro por patógenos incluindo a produção de componentes quelantes de ferro (sideróforos), a solubilização redutiva de Fe^{+3} a Fe^{+2} antes da captação e ligação, com posterior retirada, de ferro de proteínas como transferrina e lactoferrina (Lian *et al.*, 2005). Os mecanismos envolvidos na aquisição de ferro por *C. neoformans* estão sendo elucidados. Sabe-se que a levedura possui sistemas de captação de ferro de alta e baixa afinidade, assim como há papel da melanina, redutases e do ácido 3-hidroxi-antranílico 3HAA na redução de ferro férrico para ferroso (Jacobson *et al.*, 1998; Nyhus *et al.*, 1997). A Figura 4 mostra um esquema dos mecanismos de captura e homeostase de ferro em *C. neoformans*.

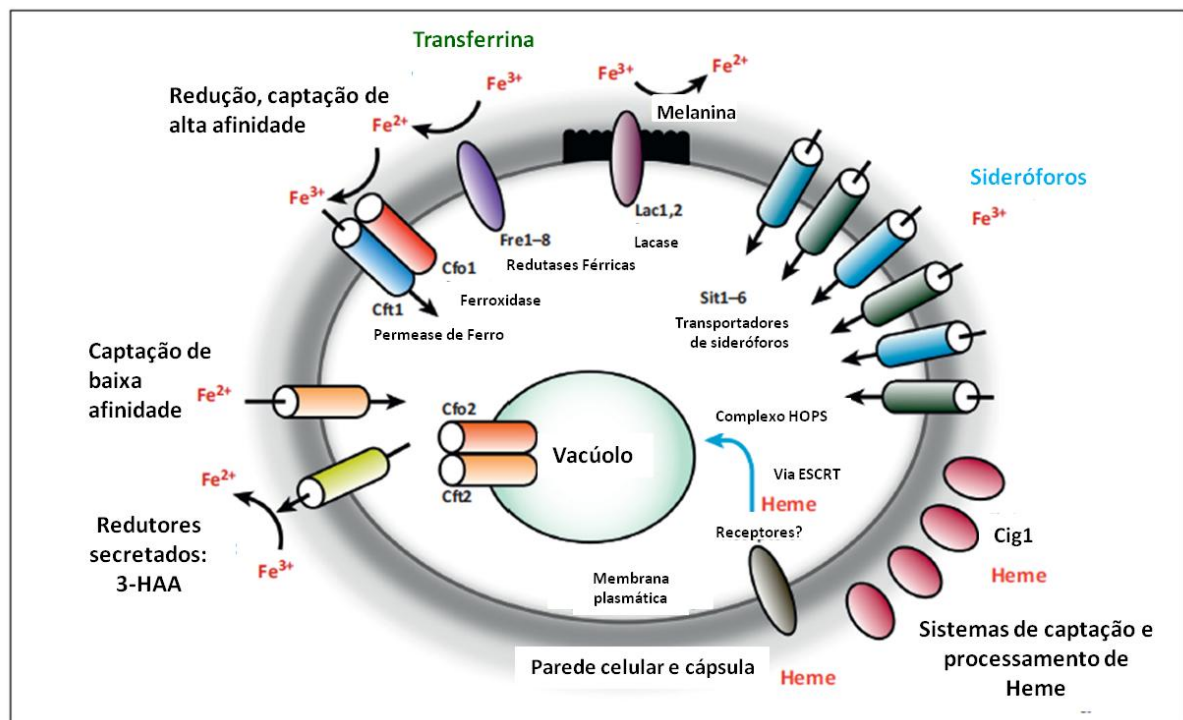


Figura 4: Mecanismos de captura e homeostase de ferro em *Cryptococcus neoformans*.

A via de captura de ferro de alta afinidade, envolvendo redução do íon envolve a atividade de uma redutase férrica (Fre), a permease de ferro Cft1 e ferroxidase Cfo1. Outra permease de ferro (Cft2) e ferroxidase (Cfo2), aparentemente, estão envolvidas no transporte vacuolar de ferro. Atividades de redução do íon também foram descritas para melanina, presente na parede celular, e pelo ácido 3HAA. Sit1 é um transportador de sideróforo que já foi caracterizado, enquanto Cig1 é uma manoproteína envolvida no sistema de captura de ferro a partir do heme. Adaptado de Kronstad *et al.*, 2013.

1.4.2. Zinco

Zinco é um micronutriente indispensável para todos os organismos, uma vez que é um íon que possui papel catalítico, estrutural e regulatório (Mocchegiani *et al.*, 2000). É componente estrutural de numerosos fatores de transcrição, cofator de mais de 300 enzimas e importante para o correto dobramento dos domínios estruturais das proteínas tais como dedo de zinco (Ehrensberger e Bird, 2011; Rink e Haase, 2007). Além disso, atua na

prevenção de formação de radicais livres, danos nas estruturas biológicas, na correta função do sistema imune e na modulação de processos envolvidos na transdução de sinal (Stefanidou *et al.*, 2006).

Em humanos, a deficiência de zinco está associada com várias condições patológicas, incluindo função deficiente do sistema imune, problemas gastrointestinais, anorexia, retardo no desenvolvimento e teratogênese (Barceloux, 1999; Dainty *et al.*, 2008). Em excesso, entretanto, se torna tóxico para o organismo. Pode se ligar a sítios inapropriados das proteínas e impedir sua correta função. Assim, para manter níveis suficientes e não tóxicos de zinco, todos os organismos desenvolveram mecanismos para regular sua concentração (Ehrensberger e Bird, 2011), englobando mecanismos de captura de zinco (Eide, 2009) e proteínas que atuam no transporte intracelular do metal (Palmiter e Findley, 1995).

A disponibilidade de zinco pode ser reduzida pela presença de um complexo protéico, a calprotectina, que são proteínas heterodiméricas que possuem capacidade quelante de zinco e manganês (Corbin *et al.*, 2008). Neutrófilos mostraram ter atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos baseado na presença deste complexo que conta como, aproximadamente, 40-50% da composição proteica do citoplasma de neutrófilos. Este sistema também é encontrado em sobrenadantes de abscessos, onde provavelmente ocorre o seu acúmulo pela lise de neutrófilos (Lulloff *et al.*, 2004). Em relação às leveduras do complexo *Cryptococcus*, foi mostrado que a exposição da levedura à calprotectina causa inibição do crescimento e morte celular (Mambula *et al.*, 2000).

Desta forma, assim como o ferro, o zinco se mostra como um metal essencial para o processo de infecção e desenvolvimento, e, por isso, fungos e outros patógenos devem assimilar este metal do hospedeiro e, para isso, desenvolveram mecanismos de captação de

zinco (Wilson *et al.*, 2012). Apesar da importância do ferro, muitos organismos mostram maior sensibilidade à privação de zinco do que à privação de ferro (Lulloff *et al.*, 2004).

Desta forma, vários transportadores de zinco têm sido reportados como fatores de virulência em bactérias e patógenos eucarióticos, incluindo *Salmonella enterica* e *A. fumigatus* (Ammendola *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2007; Simm *et al.*, 2011). Entretanto, em comparação à homeostase de ferro em microrganismos e sua importância nas interações patógeno-hospedeiro, pouco é conhecido sobre o papel do zinco nesta relação, incluindo os mecanismos de captação do metal, nas espécies de *Cryptococcus* (Schneider *et al.*, 2012).

Em relação à homeostase deste metal, sabe-se que é regulada por mecanismos pós-transcricionais e pós-traducionais. Ao contrário do ferro e cobre, zinco não é oxidado nem reduzido (Silva *et al.*, 2011). Os mecanismos moleculares que controlam a sua homeostase são bem compreendidos em *S. cerevisiae* (Wilson *et al.*, 2012). Neste organismo, a captação de zinco é mediada por dois sistemas separados envolvendo transportadores de zinco da família ZIP, Zrt1p e Zrt2p (Zhao *et al.*, 1998). O primeiro sistema, envolvendo o transportador Zrt1p, tem alta afinidade por zinco e é ativo em condições de privação do metal (Zhao e Eide, 1996a). O segundo, envolvendo o transportador Zrt2p, tem baixa afinidade por zinco e não é altamente regulado pelas concentrações de zinco (Zhao e Eide, 1996b). Além desses genes, a proteína codificada pelo gene ZRT3 também auxilia na homeostase de zinco. A proteína não é proximamente relacionada a Zrt1p ou Zrt2p, porém, os três apresentam 8 domínios transmembrana preditos e, desta forma, Zrt3 também é considerado da classe de transportadores ZIP (Gaither e Eide, 2001). A expressão dos transportadores de zinco é regulada pelo fator de transcrição Zap1p (Silva *et al.*, 2011). A proteína ativada por zinco 1 (Zap1) é uma proteína responsiva a zinco que ativa a

expressão de cerca de 80 genes durante a privação do mesmo (Wu *et al.*, 2008). Regula genes necessários para captação de zinco ou sua liberação de estoques intracelulares, assim como genes necessários para sobrevivência por períodos maiores em privação severa (Eide, 2009; Wu *et al.*, 2008) (Figura 5).

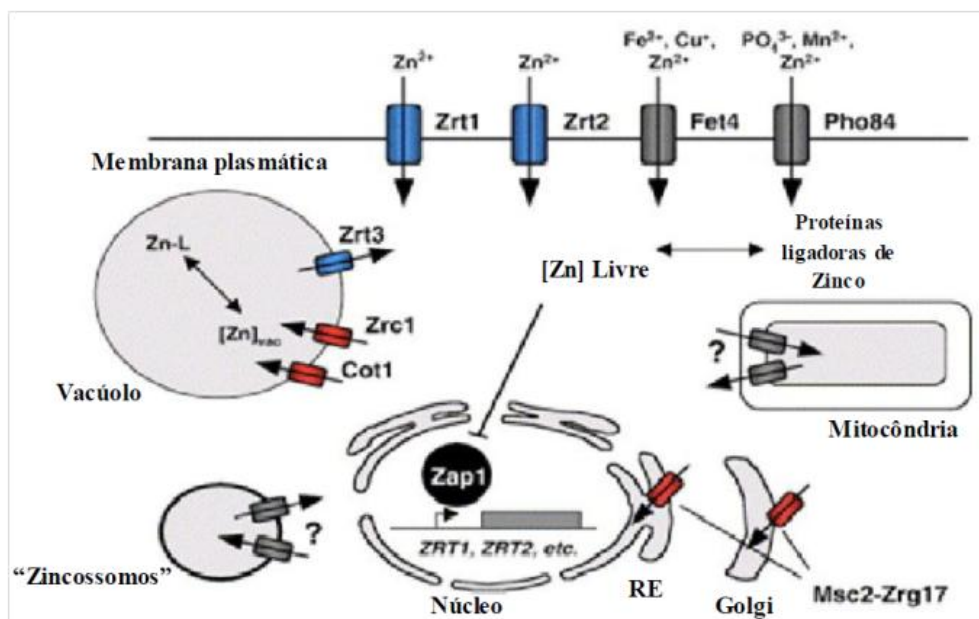


Figura 5: Esquema dos sistemas de captura de zinco em *S. cerevisiae*. O controle da captação de zinco é exercido em múltiplos níveis, sendo que o fator de transcrição Zap1p tem importante papel nesse controle. Os transportadores de zinco da família ZIP estão representados em azul, os transportadores de baixa afinidade Fet4 e Pho84 em cinza e os transportadores da família CDF em vermelho. Em células com deficiência de zinco, em *S. cerevisiae*, Zrt1 é estável e localizado na membrana plasmática, mas a exposição a elevadas concentrações de zinco resultam em rápida endocitose e degradação no vacúolo. Transporte intracelular de zinco para organelas, processo associado com alto desenvolvimento na presença de zinco, é realizado pela família de facilitadores de difusão de cátions: Zrc1p, Cot1p e Msc2p. Células de *S. cerevisiae* também respondem à deficiência de zinco aumentando a expressão de Zrt3, outro transportador ZIP que é responsável pela mobilização de zinco do vacúolo. Adaptado de Eide, 2006.

Além disso, a importância da homeostase de zinco também vem sendo demonstrada em outros fungos, inclusive patogênicos. Estudos com *Candida albicans*, *Aspergillus*

fumigatus e *C. gattii* já demonstraram a presença de uma proteína homóloga a Zap1p de *S. cerevisiae*, as quais estão diretamente relacionadas à virulência e ao desenvolvimento em condições de privação de zinco (Kim *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2007; Nobile *et al.*, 2009). Porém, outros mecanismos ainda são desconhecidos nas espécies patogênicas de *Cryptococcus*, mostrando a importância de mais estudos relacionados à captação de zinco nestas leveduras.

Desta forma, se torna evidente que o mecanismo de imunidade nutricional, originado no hospedeiro, desencadeia diversos mecanismos moleculares nos patógenos em resposta à restrição de metais, os quais constituem um importante campo de estudo no que diz respeito a novos fatores de virulência que ainda podem ser descobertos em relação aos patógenos (Wilson *et al.*, 2012).

1.5. Mecanismos de regulação de processos biológicos por pequenos RNAs

Pequenos RNAs não codificadores, com cerca de 20 a 30 nt de tamanho, são importantes reguladores de processos celulares, como defesa do organismo, transcrição, tradução, desenvolvimento, estabilidade e processamento de RNA, entre outros (Carmell *et al.*, 2002; Carthew e Sontheimer, 2009; Ding e Voinnet, 2007; Ghildiyal e Zamore, 2009; Li *et al.*, 2010). Tais pequenos RNAs são as moléculas efetoras do silenciamento gênico sequência-específico em resposta a um RNA dupla fita (dsRNA), mecanismo chamado de RNA de interferência (Grosshans e Filipowicz, 2008).

Os pequenos RNAs eucarióticos são, geralmente, classificados em três tipos principais, os pequenos RNAs de interferência (siRNAs), microRNAs (miRNAs) e RNAs que interagem com Piwi (piRNAs) (Grosshans e Filipowicz, 2008). A distinção entre as

diferentes classes de pequenos RNAs é realizada com base na biogênese, padrão de expressão, processamento e função nas células (Farazi *et al.*, 2008). Os siRNAs e miRNAs derivam de precursores que possuem RNA dupla fita, mas se diferenciam em dois aspectos: (i) miRNAs são gerados a partir de genes codificadores de miRNAs, os quais geram um RNA precursor simples fita (ssRNA) que, pela complementariedade de bases entre si, forma um dsRNA, enquanto os siRNAs são derivados de dsRNA exógeno (exemplo: RNA viral), de transcritos endógenos de sequências repetidas (como transposons) ou de longos transcritos que formam um grampo (Carthew e Sontheimer, 2009; Ghildiyal e Zamore, 2009; Hannon, 2002). Em muitos organismos, o silenciamento mediado por siRNAs depende de RNA-polimerase dependente de RNA (RdRPs) para formar dsRNA a partir de ssRNA ou a fim de amplificar os sinais dos pequenos RNAs (Allen *et al.*, 2005; Cogoni e Macino, 1999; Gent *et al.*, 2010). (ii) Em relação aos mRNAs que são alvos dos pequenos RNAs, os miRNAs podem não ter uma complementariedade de bases completa com o alvo e causar degradação ou repressão traducional; em contraste, os siRNAs geralmente causam clivagem do RNA alvo ou silenciamento transcricional após, geralmente, uma complementariedade de bases completa e, normalmente, atuam na defesa do genoma (Bartel, 2004).

Os piRNAs têm esse nome pela associação do pequeno RNA com proteínas Piwi da família de proteínas Argonauta (Ago) de animais. Até então, foram descritos somente em animais e possuem biogênese diferenciada. São derivados de elementos repetitivos, transposons ou clusters de piRNAs em células germinativas (Siomi *et al.*, 2011). Parecem ser processados a partir de precursores de RNA de fita simples e amplificados através de um mecanismo “ping-pong” (Brennecke *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Malone *et al.*, 2009). Possuem grande importância na manutenção da estabilidade do genoma de células

germinativas, mas as funções de muitos ainda não são completamente conhecidas (Kim *et al.*, 2009; Moazed, 2009; Siomi e Siomi, 2009; Thomson e Lin, 2009).

De todos os RNAs em uma célula eucariótica, somente 1% é referente a pequenos RNAs e, geralmente, os miRNAs são a classe mais abundante (Farazi *et al.*, 2008). Os miRNAs tem função em processos como desenvolvimento, doenças, adaptação a mudanças ambientais e diferenciação celular. Já foram descritos em plantas e animais e, por um longo tempo, foi considerado que não existiam em fungos (Nicolás e Ruiz-Vázquez, 2013).

Os primeiros miRNAs identificados, *lin-4* e *let-7*, foram encontrados em *Caenorhabditis elegans* e mostraram a existência de um mecanismo de regulação gênica eucariótica no qual pequenos grampos geram RNAs pequenos de, aproximadamente, 22 nt de tamanho que reprimem mRNAs-alvo específicos. Estes dois miRNAs mostraram importantes papéis no desenvolvimento de *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000; Wightman *et al.*, 1993). Embora miRNAs estejam envolvidos em diversos mecanismos de desenvolvimento e fisiologia tanto em plantas quanto em animais, existem diferenças entre eles (Axtell *et al.*, 2011; Flynt e Lai, 2008; Voinnet, 2009), porém, o mecanismo de biogênese canônica, em ambos, já se mostra bem elucidado. No entanto, fungos mostram os componentes centrais envolvidos na produção de pequenos RNAs, incluindo miRNAs, porém, o processo de síntese ainda não é bem conhecido.

A biogênese clássica de miRNAs é bem estabelecida em plantas, como *Arabidopsis thaliana*. Sabe-se que transcritos com repetições invertidas formam uma estrutura secundária na forma de grampo, chamado miRNA primário (pri-miRNA), os quais são produtos da RNA-polimerase II (Xie *et al.*, 2005b). O tamanho dos pri-miRNAs são de 70 a muitas centenas de nucleotídeos. O pri-miRNA é clivado pelo complexo *D-body*, constituído por RNases do tipo III, conhecidas como *Dicer-like* (DCL) e outras proteínas

acessórias (Voinnet, 2009). Uma das quatro enzimas do tipo Dicer, a Dicer-like 1 (DCL), é conhecida pela importância na biogênese de miRNA (Fahlgren *et al.*, 2007). DCL1 geralmente cliva na base do grampo do pri-miRNA, gerando o precursor de miRNA, o pre-miRNA, o qual é clivado, novamente, liberando o duplex miRNA/miRNA*, que consiste em um duplex contendo uma fita que é considerada o miRNA maduro e será funcional e sua complementar, chamada miRNA*. As proteínas Dicer foram identificadas em 2001 e foi demonstrado que tais enzimas são capazes de clivar RNAs dupla fita (dsRNA) (Bernstein *et al.*, 2001). Possui dois sítios de RNase III, domínio PAZ, domínio de helicase e um domínio de ligação a dsRNA. A proteína se liga ao final do dsRNA e cliva o “loop” do grampo, gerando no final, em plantas, um duplex de miRNAs, geralmente com 20 a 25 nt (Meister, 2013). Estudos com Dicer de *Giardia lamblia*, sugerem que o domínio PAZ é responsável pelo reconhecimento da região terminal do dsRNA e que o tamanho do pequeno RNA produzido é determinado pela distância física entre os domínios PAZ e de RNase III de Dicer (Macrae *et al.*, 2006).

Maioria dos grampos produz apenas um duplex de miRNA, enquanto alguns loci produzem vários *duplexes*, como de MIR159 e MIR319 (Addo-Quaye *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010a). Este processamento produz pequenos RNAs contendo entre 21-24 nt de tamanho que, posteriormente, sofrem metilação na extremidade 3'-OH pela enzima HEN1, característica que os protege da degradação por nucleases degradadoras de pequenos RNAs (SDN) (Yu *et al.*, 2005). Após isso, HASTY, um homólogo de Exportina-5 (Exp-5) em plantas, exporta o duplex para o citoplasma (Park *et al.*, 2005). A exportina-5, em animais, facilita a biogênese de miRNAs tanto pelo seu papel como fator nuclear de exportação como por proteger a degradação de pre-miRNAs de degradação por nucleases (Okada *et al.*, 2009).

Uma das fitas é carregada nas proteínas da família Argonauta (Ago), no complexo RISC (Complexo de Silenciamento induzido por RNAs), formando o complexo miRISC (Park *et al.*, 2005). A proteína Ago é o componente central do RISC, já que, quando carregada com o pequeno RNA, é guiada até o mRNA alvo correspondente, permitindo uma correta posição do pequeno RNA ao seu mRNA alvo (Faehnle e Joshua-Tor, 2007; Mallory e Vaucheret, 2010). As proteínas dessa família são formadas por um domínio amino-terminal, domínios PAZ e MID, os quais são unidos por uma dobradiça, a qual permite rearranjos durante a ligação do RNA. O domínio N-terminal é necessário para o correto carregamento do RNA e auxilia no desenrolamento do duplex de pequenos RNAs (Kwak e Tomari, 2012). O domínio PAZ ancora a extremidade 3' do pequeno RNA enquanto o domínio MID forma um bolso de ligação para a extremidade 5' fosforilada do pequeno RNA. O domínio PIWI tem estrutura semelhante à de RNase H e, desta forma, as proteínas Ago podem ter atividade de endonucleases e clivar o RNA alvo complementar ao pequeno RNA (Jinek e Doudna, 2009). O mRNA alvo é situado entre o domínio PAZ e a base formada pelos domínios N-terminal, Mid e PIWI (Ye *et al.*, 2007).

A escolha da fita do duplex de miRNA que será carregada na Ago, geralmente, se dá pela estabilidade da fita, na qual tem carregamento preferencial no complexo aquela que é menos estável na extremidade 5', enquanto a fita complementar (miRNA*) é degradada. (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). A fita complementar, entretanto, também pode ser carregada na Ago e regular a expressão do transcrito alvo correspondente ou pode ser degradada pela nuclease SDN (Axtell *et al.*, 2011). Outros determinantes para seleção da fita, além do acúmulo assimétrico, é a estrutura do duplex miRNA/miRNA* (Ghildiyal e Zamore, 2009; Okamura e Lai, 2008; Tomari *et al.*, 2007), a identidade do nucleotídeo em 5' do miRNA (Chen, 2009; Czech *et al.*, 2009; Okamura e Lai, 2008), entre outros (Hu

et al., 2009). Quando carregado no complexo RISC, o miRNA é, então, guiado ao seu alvo e causa silenciamento gênico (Ding e Han, 2007) (Figura 6).

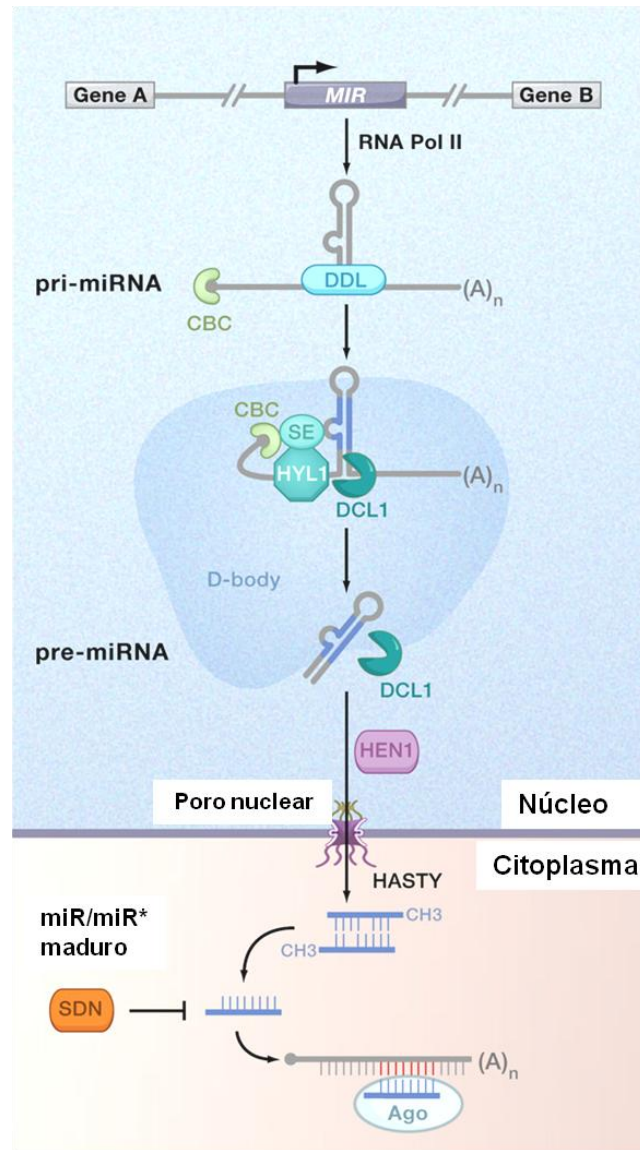


Figura 6: Biogênese de microRNAs em plantas. Os pri-miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, os quais são clivados no D-body pela enzima Dicer (DCL1), gerando o pre-miRNA. O D-body ainda contém as proteínas Serrata (SE), Hyponastic Leaves 1 (HYL1), nuclear cap-binding complex (CBC). O pre-miRNA resultante é clivado novamente por uma DCL1, que irá gerar o duplex de miRNA, o qual será exportado para o citoplasma pela HASTY, sendo que a sequência do miRNA é metilada por HEN1, antes do transporte. Uma das fitas é carregada na proteína Ago, do complexo RISC, que irá se ligar ao seu transcrito alvo, enquanto a outra fita é degradada. Adaptado de (Voinnet, 2009).

Em mamíferos, existem algumas diferenças no mecanismo de biogênese de miRNAs, embora a via seja semelhante. A maioria dos genes codificadores de miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, embora alguns miRNAs de animais sejam produzidos pela RNA polimerase III (Borchert *et al.*, 2006). A maior diferença entre a biogênese de miRNAs entre plantas e animais, se encontra na etapa de clivagem do pri-miRNA e pre-miRNA, que é realizada por enzimas RNase III nucleares e citoplasmáticas, respectivamente (Axtell *et al.*, 2011).

Um transcrito, também contendo complementariedade de bases entre si, forma o pri-miRNA. O complexo microprocessador presente no núcleo, que contém a enzima Drosha, proteína do tipo RNase III, cliva o grampo, gerando, então, o precursor de miRNA (pre-miRNA) (Bartel, 2009). Após, o pre-miRNA é exportado para o citoplasma pela Exportina-5 e, então, há uma nova clivagem, catalisada pela enzima Dicer, a qual retira o *loop* do grampo e gera um RNA dupla fita. A fita correspondente ao miRNA maduro é, então, incorporada no RISC, gerando o miRISC, no qual ele se liga à proteína Ago. A outra fita, pode ser degradada ou funcional (Bartel, 2009), assim como em plantas. Uma outra diferença, em relação ao miRNA maduro e funcional, é que, em plantas, eles são metilados a sua extremidade 3', como citado anteriormente, enquanto os de animais, não (Czech *et al.*, 2009; Ghildiyal e Zamore, 2009; Okamura e Lai, 2008)

As diferenças na biogênese de miRNAs de animais e plantas também reflete em diferença no reconhecimento dos mRNAs alvos. Acredita-se que atuem de duas formas: clivagem do mRNA ou repressão traducional (Millar e Waterhouse, 2005). Aparentemente, o mecanismo parece depender do grau de complementariedade entre miRNA e seu sítio de ligação no alvo. Quando há alta complementariedade de bases, há clivagem do alvo,

enquanto que, se há baixa ou complementariedade parcial, há repressão traducional (Doench *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2003).

1.6. RNAi em fungos

Os componentes centrais da via de RNAi são as proteínas Dicer, Ago e RdRP, que já foram identificadas em todo o domínio eucariótico, sugerindo que este é um mecanismo de defesa ou regulação importante que existiu em um ancestral eucariótico comum (Song *et al.*, 2004). Em alguns fungos os componentes-chave da via não estão presentes, indicando que a via pode ser dispensável para alguns organismos (Dang *et al.*, 2011), incluindo fungos como *S. cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Candida albicans*, entre outros (Tabela 2). Em contraste, ortólogos dos componentes essenciais da via de RNAi são encontrados em muitos genomas de fungos já sequenciados (Nakayashiki *et al.*, 2006), como *Neurospora crassa* e *C. neoformans*.

Tabela 2: Presença dos genes codificadores dos componentes da via de RNAi nos filios *Basidiomycota*, *Zygomycota* e *Ascomycota* de fungos.

Levedura	Ago	Dcr	RdRP
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ¹	-	-	-
<i>Saccharomyces pastorianus</i> ¹	Ψ	Ψ	-
<i>Saccharomyces bayanus</i> ¹	-	*	-
<i>Candida glabrata</i> ¹	-	-	-
<i>Saccharomyces castellii</i> ¹	+	*	-
<i>Kluyveromyces polysporus</i> ¹	+	*	-
<i>Kluyveromyces lactis</i> ¹	-	-	-
<i>Ashbya gossypii</i> ¹	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ¹	+	*	-
<i>Candida tropicalis</i> ¹	+	*	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> ¹	-	*	-
<i>Pichia stipitis</i> ¹	-	*	-
<i>Neurospora crassa</i> ²	+	+	+
<i>Magnaporthe grisea</i> ²	+	+	+
<i>Aspergillus nidulans</i> ²	+	+	+
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ³	+	+	+
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> ³	+	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i> ⁴	+	+	+
<i>Coprinus cinereus</i> ⁴	+	+	+
<i>Ustilago maydis</i> ⁴	-	-	-
<i>Ustilago hordei</i> ⁴	+	+	+
<i>Rhizopus oryzae</i> ⁵	+	+	+

* A presença de genes clássicos envolvidos na via de RNAi é indicada por (+), a presença de ortólogos é indicado com (*) e pseudogenes são indicados com Ψ. Os fungos pertencentes ao filo *Ascomycota* foram divididos em subfilios, representados por 1 (*Saccharomycotina*), 2 (*Pezizomycotina*) e 3 (*Taphrinomycotina*). Os pertencentes ao filo *Basidiomycota* são representados pelo número 4 e o pertencente ao filo *Zygomycota* é representado por 5. Tabela baseada em (Drinnenberg *et al.*, 2009).

O genoma do patógeno humano *C. neoformans* codifica os componentes essenciais de RNAi, incluindo uma Ago, Dicers e RdRP (Loftus *et al.*, 2005), entretanto, há diferenças em relação ao número de proteínas envolvidas na via de RNAi codificadas entre as linhagens desta espécie. O sorotipo A de *C. neoformans* (linhagem H99) contém apenas uma Ago (Ago1), uma RdRP (Rdp1) e duas Dicers (Dcr1 e Dcr2), enquanto o sorotipo D

(linhagem JEC21) contém duas Ago (Ago1 e Ago2), duas Dicers (Dcr 1 e Dcr2) e uma única RdRP (Rdp1) (Nakayashiki *et al.*, 2006; Nakayashiki e Nguyen, 2008). Outra característica é que as proteínas Ago e RdRP possuem estruturas e domínios semelhantes a de outros fungos, mostrando que são evolutivamente conservadas. Entretanto, os domínios de Dicer se mostraram diferentes, uma vez que possuem domínios de ligação a dsRNA e ribonuclease, porém não possuem o domínio de helicase C e DEAD ou DEAD-like, o que é uma característica típica desta proteína em outros fungos, como a de *N. crassa* e *S. pombe*, além disso, são menores que em *S. pombe* e *N. crassa*, mas maiores que em *S. castellii* (Janbon *et al.*, 2010; Nakayashiki *et al.*, 2006; Nakayashiki e Nguyen, 2008).

Quando se compara as linhagens pertencentes à espécie de *C. gattii* as diferenças são mais evidentes. Em contraste a *C. neoformans*, as leveduras *C. gattii*, mais especificamente a linhagem hipervirulenta responsável pelo surto nos Estados Unidos, R265, quando analisada, mostrou a ausência dos genes codificantes das proteínas Ago1 ou Ago2, enquanto genes codificadores de Dcr1, Dcr2 e Rdp1 foram encontrados. Um fato interessante, é que outra linhagem de *C. gattii*, WM276, também avaliada, mostrou a presença dos genes codificadores de todas as proteínas essenciais para RNAi, mostrando que houve perda de certos componentes em espécies próximas no gênero *Cryptococcus*, assim como foi visto para leveduras do gênero *Saccharomyces* (Drinnenberg *et al.*, 2009). Este fato levanta a questão se a linhagem hipervirulenta deste fungo, que é patógeno humano, possui uma via de RNAi não funcional ou se possui, porém, independente de Ago.

Em fungos, a existência de classes de pequenos RNAs como ex-siRNAs (siRNAs de origem exômica) e qi-RNAs (pequenos RNAs que interagem com QDE-2) vem sendo elucidada, também como moléculas importantes para RNAi (Nicolás e Ruiz-Vázquez,

2013), porém, a grande maioria dos pequenos RNAs descritos em fungos são siRNAs, como nas leveduras *Schizosaccharomyces pombe* (Bühler e Moazed, 2007), *Saccharomyces castellii*, *C. albicans*, *C. neoformans* (Catalanotto *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010) e em *N. crassa* (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Os siRNAs vem demonstrando papel importante na defesa do genoma dos fungos contra genoma viral, no controle de transposons, entre outros (Nicolás e Ruiz-Vázquez, 2013). Em *C. neoformans*, já foi descrito que os siRNAs são responsáveis pelo controle de transposons durante o ciclo sexual do fungo, a fim de defender o genoma da progênie. Este mecanismo ficou conhecido como SIS (*Sex Induced Silencing*) (Wang *et al.*, 2010). Entretanto, o fenômeno de silenciamento gênico por RNA, em fungos, foi descrito primeiramente no fungo filamentosso *N. crassa* (Borkovich *et al.*, 2004; Kelly e Aramayo, 2007; Selker, 1997).

Este fungo possui três mecanismos de silenciamento que ocorrem em diferentes estágios do seu ciclo de desenvolvimento: *quelling*, MSUD (*Meiotic Silencing of Unpaired DNA*) e RIP (*Repeat-Induced Point mutation*) (Borkovich *et al.*, 2004; Kelly e Aramayo, 2007; Selker, 1997). O *quelling* foi o primeiro fenômeno relacionado à RNAi descrito em eucariotos e se trata de um silenciamento pós-transcricional guiado por siRNAs (Romano e Macino, 1992). Este mecanismo ocorre durante o crescimento vegetativo, mostrando envolvimento na defesa contra vírus e no silenciamento de transposons ativos (Cogoni e Macino, 1999). Em estudos posteriores, foram identificados diversos genes componentes da maquinaria de *quelling*, como os genes QDE-1 (codificador de uma RNA polimerase dependente de RNA, RdRP), QDE-2 (codificador da proteína Argonauta), QDE-3 e genes DCL1 e DCL2 (codificadores das proteínas Dicers) (Catalanotto *et al.*, 2002; Cogoni e Macino, 1997; 1999); (Catalanotto *et al.*, 2000), os quais foram identificados

posteriormente em outros organismos eucarióticos nos quais a via de RNAi foi identificada (Cerutti e Casas-Mollano, 2006; Shabalina e Koonin, 2008).

Da mesma forma, MSUD também é induzido por siRNAs e necessita dos componentes centrais de RNAi, a diferença é que *quelling* ocorre na mitose e MSUD durante a meiose (Wang *et al.*, 2010). RIP já é um mecanismo diferente, que ocorre antes da meiose, durante o ciclo sexual do fungo, e inativa sequências repetidas pela introdução transições de C a T ou G a A (Selker 1987). Desta forma, RIP é um mecanismo de defesa contra elementos transponíveis repetitivos (Galagan and Selker, 2004).

Além do silenciamento gênico realizado por siRNAs, os miRNAs também se mostram importantes para via de RNAi. Embora esta classe de pequenos RNAs seja bem estudada em plantas e animais, pouco é conhecido sobre a produção de miRNAs em fungos. Até 2005 havia apenas o registro da presença de transcritos antisense em *C. neoformans* (Lau *et al.*, 2013; Loftus *et al.*, 2005), então a descoberta desta classe de pequenos RNAs é relativamente recente nestes organismos. Até então sua presença é descrita em *N. crassa* (Lee *et al.*, 2010), em *Sclerotinia sclerotiorum*, fungo patogênico de plantas (Zhou *et al.*, 2012a), em *Metarhizium anisopliae* (Zhou *et al.*, 2012b), em *Penicillium marneffeii* (Lau *et al.*, 2013) e, i, em *C. neoformans* (Jiang *et al.*, 2012). Em *N. crassa*, miRNAs-like (milRNAs) foram identificados e mostraram diversidade na biogênese, utilizando diferentes componentes da maquinaria de RNAi para produzir quatro tipos diferentes de milRNAs. Por exemplo, milR-1 é dependente das proteínas Dicers, QDE-2 e QIP, enquanto milR-2 depende de QDE-2 mas não de Dicer. A biogênese de milR-3 depende apenas da atividade de Dicers, sendo o mais semelhante a via de síntese de miRNAs em plantas. Já milR-4 se mostrou parcialmente dependente de Dicer, sugerindo o envolvimento de outra nuclease desconhecida (Zhang *et al.*, 2013). Uma diferença

encontrada na busca de miRNAs em *N. crassa*, é que estes quatro tipos mostraram ser produzidos pela RNA polimerase III, ao invés da II, como em plantas e animais, entretanto, sugerem a colaboração entre as duas polimerases, uma vez que RNA polimerase II foi encontrada em associação com alguns loci de miRNA (Yang *et al.*, 2013).

Em *C. neoformans*, a identificação de dois miRNAs foi descrita em 2012, a partir do sequenciamento de 200 clones contendo pequenos RNAs com cerca de 20 a 25 nt de tamanho, com a qual identificaram dois miRNAs. Ambos foram capazes de silenciar genes repórteres, quando modificados para possuir a sequência alvo dos miRNAs. O estudo ainda demonstrou que os genes de *DCR1* e *DCR2*, *AGO1* e *RDPI* foram essenciais para o silenciamento, uma vez que linhagens mutantes para cada um deles mostrou falha no silenciamento dos genes repórteres. Entretanto, ainda falta estudo em relação à função exata destes miRNAs em relação à patogênese e elucidar o mecanismo de biossíntese e os alvos destes miRNAs (Jiang *et al.*, 2012).

Pouco é conhecido sobre a influência da disponibilidade de metais na atividade da via de RNAi em fungos. De fato, em relação a fungos, esta área se mostra muito recente e um potencial alvo de estudo. Desta forma, visto que nunca foi descrita a presença de nenhuma classe de pequenos RNAs em *C. gattii*, especialmente na linhagem hipervirulenta R265 que, teoricamente, não possui via de RNAi funcional, é de interesse investigar se esta levedura é capaz de produzir miRNAs-like, em condições de privação de metais, as quais mimetizam o ambiente de infecção, os quais, desta forma, mostrariam um novo e adicional mecanismo de virulência deste fungo em relação ao hospedeiro.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a existência e o perfil de expressão de miRNAs-*like* produzidos por *C. gattii* em condições que mimetizam o ambiente de infecção.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar o sequenciamento de pequenos RNAs de *C. gattii* R265 cultivado em condições de privação de ferro ou zinco, assim como a condição controle;
- Mapear as sequências obtidas contra genomas de *C. gattii* R265 e *C. gattii* WM276;
- Determinar as principais classes de pequenos RNAs expressos nestas condições;
- Realizar análises *in silico* em busca de possíveis precursores de miRNAs e verificar sua estrutura;
- Determinar a sequência e a abundância relativa dos possíveis miRNAs existentes a partir dos precursores obtidos e verificar o grau de conservação;
- Avaliar a expressão diferencial dos miRNAs nas diferentes condições analisadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas e condições de cultivo

Células de *Cryptococcus gattii*, linhagem R265, foram utilizadas no estudo. A levedura foi rotineiramente mantida em placa com meio YPD-ágar (2% dextrose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e 1,5% ágar) e, em condições experimentais, foram cultivadas em meio YPD líquido, por 18 h a 200 rpm, a 30°C.

3.2. Cultivo de *C. gattii* para extração de RNA

A linhagem de *C. gattii* R265 foi mantida em meio YPD-ágar e cultivada em 100 mL de meio YPD líquido, por 18 h a 200 rpm, a temperatura de 30°C. As células foram centrifugadas (5000 g - 5 min) e lavadas duas vezes com tampão PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4). O sedimento de células foi ressuspensionado em 20 mL de meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*, sem sulfato de amônio e aminoácidos) 1X, seguido da medida da OD, a 600 nm, a partir de uma diluição 1:100 da suspensão de células. Foi inoculado o equivalente a, aproximadamente, 10⁷ células de *C. gattii* (OD₆₀₀=1) em cada uma das três condições, em 100 mL de meio YNB líquido. A primeira condição, controle, continha apenas YNB 1X; a segunda, privação de ferro, continha YNB 1X acrescido de 1 mM de BPDS (*ácido bisulfônico de batofenantrolina*) e, por fim, a terceira condição, privação de zinco, continha YNB 1X acrescido de 10 µM TPEN (N, N, N', N' - Tetraquis-2-pirimidil-etil-etiledodiamino). Os cultivos foram mantidos em sob agitação por 18h a 200 rpm.

Após 18h, foi realizada a recuperação das células. Cada cultivo foi centrifugado (5000 g - 5 min) e o sobrenadante foi descartado, seguido do congelamento imediato das células em nitrogênio líquido e armazenamento das mesmas em ultrafreezer (- 80°C) até sua liofilização.

3.3. Extração de RNA e RNA-Seq

Após a liofilização das células e maceração das mesmas com nitrogênio líquido, procedeu-se com a extração de RNA utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A verificação da integridade do RNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%.

A quantificação das amostras foi realizada por análise fluorométrica utilizando o fluorômetro Qubit (Invitrogen) e o kit de quantificação de RNA Quant-iT, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). As amostras foram armazenadas em tubos com reagente RNA stable (Biomatrix). Tal reagente protege as amostras de RNA de degradação à temperatura ambiente e garante a recuperação da mesma. Após a adição de cada amostra em um tubo específico, as mesmas foram concentradas à vácuo (Concentrator Plus – Eppendorf) e estocadas a -20°C até o envio para realização do sequenciamento.

O fracionamento das amostras de RNA, síntese de cDNA, ligação de adaptadores e consequente sequenciamento foram realizados pela empresa Fasteris Life Sciences SA, Plan-les-Ouates, na Suíça, utilizando a tecnologia Solexa na plataforma Illumina HiSeq 2000. Foram construídas três bibliotecas de pequenos RNAs no total, referentes às condições diferenciais de cultivo.

3.4. Análises *in silico* do RNA-Seq

Para cada uma das 3 bibliotecas obtidas, referentes à condição Controle, Privação de Zinco e Privação de Ferro, o conjunto de sequências, no formato fastQ, foi disponibilizado pela empresa Fasteris sem a sequência dos adaptadores. Estas sequências foram então avaliadas conforme o tamanho e distribuição. Após, para cada biblioteca individualmente, somente as sequências únicas entre 16 a 28 nt foram agrupadas, pois nesta faixa de tamanho pode-se encontrar miRNAs. Estas sequências foram reunidas em uma biblioteca única, a qual foi mapeada contra os genomas de *C. gattii* R265 e *C. gattii* WM276, utilizando o programa Bowtie (Langmead *et al.*, 2009), não permitindo *mismatch* entre o duplex do pequeno RNA e a sequência gênica de cada linhagem.

Sequências de outros RNAs, como RNA ribossômico (rRNA), RNA transportador (tRNA), pequenos RNAs nucleares (*small nuclear RNAs*, snRNAs) e pequenos RNAs nucleolares (*small nucleolar RNAs*, snoRNAs) presentes no banco de dados Rfam (Burge *et al.*, 2013) foram excluídas da biblioteca única.

A predição de potenciais miRNAs-*like* foi realizada com uso do algoritmo MIREAP, o qual pode identificar todos precursores candidatos que contém estrutura de grampo. O software também fornece informações sobre a localização do precursor em relação ao cromossomo, tamanho, contagem do precursor e sequências dos miRNAs, incluindo as isoformas (isomiRNAs), além da Energia Livre Mínima (MFE, *Minimal Free Energy*). Os dados obtidos, foram filtrados com base na contagem dos precursores (maior ou igual a 5) e MFE (menor ou igual a - 20kcal/mol). As sequências dos miRNAs correspondentes a cada precursor foram escolhidas com base na isomiRNA mais abundante. A sequência do precursor foi confirmada, em relação à capacidade de formar

um grampo, utilizando RNAfold, um algoritmo do banco de ferramentas sRNA Workbench (Stocks *et al.*, 2012).

A quantificação dos precursores dos miRNAs foi realizada, primeiramente, utilizando o programa Bowtie, a fim de criar um banco de dados dos precursores dos miRNAs, de cada uma das linhagens de *C. gattii*. Subsequente a isso, os bancos foram mapeados contra cada uma das três bibliotecas isoladamente, cada uma contendo sequências não redundantes de 16-28 nt. Após, foi calculado o RPKM (*reads per kilo base per million*) (Mortazavi *et al.*, 2008) referente a cada precursor, em cada uma das condições, considerando o número total de sequências em cada uma delas, para normalização dos resultados.

Após, foi calculada a expressão diferencial (*fold change*) dos pre-miRNAs entre as bibliotecas, comparando a biblioteca controle *versus* cada uma das privações, sendo considerado com diferença de expressão aqueles com valor maior a 3 ou menor a 0,33. A partir disso, os pre-miRNAs foram separados em três grupos específicos:

- (1) em comum (presentes nas 3 bibliotecas/ foi possível calcular *fold change*);
- (2) privação *versus* controle (presentes em apenas uma condição de privação e no controle/ foi possível calcular *fold change*);
- (3) apenas privação (pre-miRNAs presentes em ambas as condições de privação, mas não no controle/ não foi possível calcular *fold change*).

3.5. Predição de genes-alvo dos miRNAs de *C. gattii*

A fim de predizer os possíveis genes alvo dos miRNAs de *C. gattii* R265, foi utilizado o programa miRanda (Enright *et al.*, 2003). Foram escolhidos quatro miRNAs para tal análise: cga-miR-4, cga-miR-15, cga-miR-37 and cga-miR-46. Tais miRNAs foram mapeados contra o transcrito de três organismos: o da própria levedura, *C. gattii* R265, do hospedeiro modelo, camundongo (*Mus musculus*) e humano (*Homo sapiens*). Para os modelos vertebrados, foi utilizado apenas a porção 3' UTR dos transcritos, uma vez que é descrito que, em mamíferos, esta região é a principal para pareamento do miRNA (Xie *et al.*, 2005a; Betel, 2008) . Tal porção dos transcritos foram recuperadas junto ao banco de dados do UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Os parâmetros utilizados foram baseados em um estudo prévio em *Metarhizium anisopliae* (Zhou *et al.*, 2012b).

3.6. Análise por inferência funcional dos alvos dos miRNAs de *C. gattii*

Após a predição dos alvos dos miRNAs (miR-4, miR-15, miR-37 and miR-46) em cada um dos genomas, o código referente a cada alvo foi utilizado no Broad Institute (para *C. gattii* R265) e UCSC Genome Browser (Kent *et al.*, 2002) (para camundongo e humanos), a fim de obter a sequência proteica do gene-alvo de cada miRNA. Estas sequências foram então utilizadas para análise conforme ontologia utilizando o programa Blast2GO[®] (<http://www.blast2go.com/>). A análise foi realizada com os alvos de cada um dos miRNAs em relação a cada um dos genomas.

4. RESULTADOS

4.1. Geração das bibliotecas de sRNAs a partir do RNA-Seq

Através do RNA-Seq, pela Plataforma Illumina HiSeq 2000, foram obtidas três bibliotecas de pequenos RNAs, cada uma referente a uma das condições em que *C. gattii* R265 foi cultivado: condição controle, condição de privação de ferro (com adição de 1 mM do quelante de ferro BPDS) e condição de privação de zinco (adição de 10 μ M do quelante de zinco TPEN). O conjunto de sequências obtidas, cujo tamanho variava de 1-45 nt, quando analisadas de acordo com o tamanho e abundância em cada condição isolada, mostraram um predomínio de pequenos RNAs contendo entre 15 a 27 nt de tamanho, com um pico em cerca de 25 nt, quando analisadas as três condições em conjunto (Figura 7).

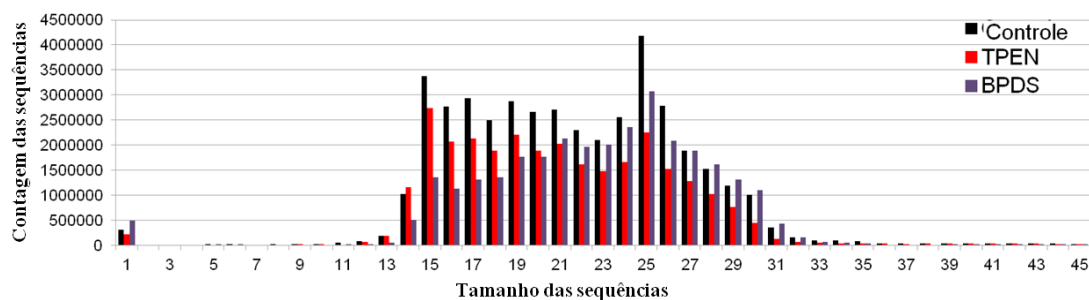


Figura 7: Tamanho e distribuição dos pequenos RNAs obtidos em cada uma das bibliotecas de referência: controle, privação de zinco (TPEN) e privação de ferro (BPDS). Sequências com 1-45 nt mostraram predomínio de tamanho entre 15-27 nt na condição controle (preto), privação de zinco (vermelho) e privação de ferro (roxo). Os dados foram obtidos através do sequenciamento pela Plataforma Illumina HiSeq 2000 e analisados com base na contagem de reads não redundantes sequenciadas.

Quando consideradas apenas a fração de sequências de 16-28 nt, tamanho classicamente associado a microRNAs, foi observado que as bibliotecas apresentavam um

número diferente de sequências. Porém, quando considerado o número de sequências únicas oriundas do processo de agrupamento de sequências idênticas em cada biblioteca, foram observados números similares nas três bibliotecas (Tabela 3).

Tabela 3: Número total de sequências entre 16-28 nt e número de sequências únicas entre 16-28nt em cada condição de cultivo de *C. gattii* R265.

Condição	Número total de sequências (16-28 nt)	Número de sequências únicas (16-28 nt)
Controle	32.246.330	843.546
Privação de Ferro (BPDS)	24.707.711	835.071
Privação de Zinco (TPEN)	21.789.694	775.674

Para predição de miRNAs, as sequências únicas (de 16-28 nt) contendo em seu identificador (formato FASTA) o número de repetições, de cada uma das condições, foram reunidas em uma única biblioteca. As análises de bioinformática foram realizadas a partir desta biblioteca e todos os resultados obtidos, que serão detalhados a seguir, estão representados no fluxograma da Figura 8.

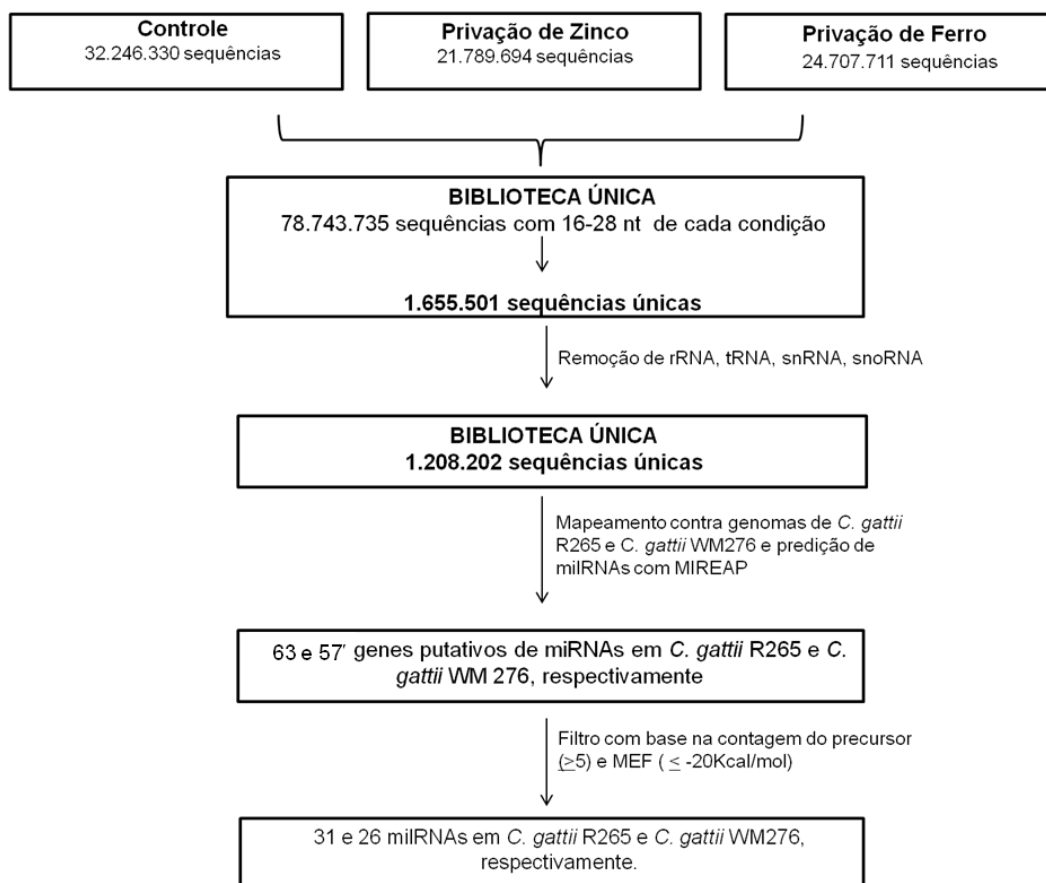


Figura 8: Fluxograma da identificação de miRNAs a partir dos dados obtidos por RNA-Seq.

Conforme mostra o fluxograma, as sequências presentes na biblioteca única foram alinhadas contra o genoma de *C. gattii* R265 utilizando o programa Bowtie. Como resultado, foi obtido um total de 1.655.501 reads processadas e 736.507 (44.49%) mostraram pareamento perfeito com o genoma. Originalmente, a biblioteca única sem nenhum processamento, continha 78.743.735 sequências, das quais 5.812.868 (7.92%) mostraram pelo menos um alinhamento ao genoma de R265. Quando a mesma foi mapeada contra genoma de *C. gattii* WM276, 347.692 (21%) das sequências alinharam perfeitamente. Este fato se deve a uma região presente na montagem do sequenciamento do

genoma de *C. gattii* WM276 e ausente na montagem do sequenciamento do genoma de *C. gattii* R265 correspondente a *clusters* de genes responsáveis por rRNAs.

A mesma biblioteca, com sequências não redundantes, quando mapeada contra um banco de dados do Rfam de tRNAs, rRNAs, snoRNAs e snRNAs, mostrou 447.299 (27.02%) sequências que alinharam ao banco de dados, as quais foram excluídas da biblioteca, originando uma biblioteca única com 1.208.202 sequências.

4.2. Identificação de miRNAs-like em *C. gattii*

Com o uso do algoritmo MIREAP, utilizando estas sequências de pequenos RNAs, o software mostrou 63 genes putativos de miRNAs em *C. gattii* R265. Já na linhagem WM276, foram encontrados 57 genes. Para estes precursores de miRNAs, o software apontou, 250 isoformas de miRNAs (isomiRNAs) para a primeira linhagem e 248 para a segunda.

Os dados foram filtrados como citado anteriormente, resultando em um total de 28 possíveis pre-miRNAs em *C. gattii* R265 e 23 em *C. gattii* WM276. Desta forma, a análise resultou em 31 miRNAs na linhagem R265 (Tabela 4) e 26 miRNAs na linhagem WM276 (Tabela 5). Estes precursores apresentaram diversos comprimentos, desde 69 a 98 nt, com uma média de 82 nt, em *C. gattii* R265 (Tabela 6) e 62 a 100 nt, com média de 80 nt, em *C. gattii* WM276 (Tabela 7).

Tabela 4: Lista dos 31 miRNAs identificados em *C. gattii* R265 utilizando algoritmo 'MIREAP' e informação sobre a localização dos precursores dos miRNAs.

miRNA	Sequência (5'-3')	Tamanho ¹	Localização ²	Região Genoma ³
cga-milR-1	GAATGAAGCTCGTTGGCCCC	20	SC_1.10:236721:236794:+	Éxon CNBG_3008.2
cga-milR-2.1	GAAGTCAATTCTCGATGCC	19	SC_1.10:97818:97882:-	Éxon CNBG_3751.2
cga-milR-2.2	GAAGTCAATTCTCGATGCCT	20	SC_1.10:97818:97882:-	Éxon CNBG_3751.2
cga-milR-4	GGGTATGATGGAAATGAGCTGACT	24	SC_1.11:536055:536148:-	Éxon/intron/éxon CNBG_4440.2
cga-milR-10	GGGAAGAGGATCGCGAAAAATGC	23	SC_1.14:66619:66712:+	Íntron/ Éxon CNBG_4976.2
cga-milR-11	CATCTTGTCGAATTCCGCT	19	SC_1.14:622536:622616:+	Éxon CNBG_5166.2
cga-milR-15	TATGGATCTGGGATTCTTGGCT	22	SC_1.1:1110315:1110412:+	Éxon/intron CNBG_0395.2
cga-milR-16	TGGCGGTCTATATGGATGATGC	22	SC_1.1:466502:466570:-	Éxon CNBG_0166.2
cga-milR-17	ATGATGTAACCTGTACTGCC	20	SC_1.1:589012:589096:-	Região intergênica
cga-milR-19	ACTTGTGGAACAGGACCAGGCA	22	SC_1.1:828519:828596:-	Íntron CNBG_0305
cga-milR-20	AAAGGAAGATGAGGGAGAATTC	22	SC_1.1:1196598:1196681:-	Éxon CNBG_0428
cga-milR-21	CACCGGATCTCTCCAGCCCCGA	22	SC_1.1:1481237:1481330:-	Éxon CNBG_0533
cga-milR-23.1	GATGGACGTCGTCGACGGCGT	21	SC_1.20:155178:155246:-	Éxon CNBG_5991
cga-milR-23.2	ATGGACGTCGTCGACGGCGT	20	SC_1.20:155178:155246:-	Éxon CNBG_5991
cga-milR-25	AGGCGGGCTATGCGCAACTGGC	22	SC_1.22:57497:57581:-	Éxon CNBG_6113
cga-milR-30	TCGGACGCCGGCCTGAGTCT	21	SC_1.2:1224789:1224880:+	Éxon CNBG_0999
cga-milR-33	AGGGATGGAGGGAGGTTGGAGCCT	24	SC_1.2:284248:284342:-	Éxon CNBG_0658/ intergênica
cga-milR-37	CGGGGCTGGGACGGGACCGGGA	22	SC_1.3:240497:240571:+	Região intergênica
cga-milR-40	CTGCTCGAGAGCAAGTCGGTT	21	SC_1.3:595437:595534:-	Éxon CNBG_1286
cga-milR-44	ATGATTTGATGGACGAAGCT	20	SC_1.4:557693:557761:+	Éxon CNBG_1773
cga-milR-46	ATGGTCGAGGGTATGTTCTCC	21	SC_1.4:681115:681204:-	Éxon CNBG_1819.2
cga-milR-51	AACTGACGAGGCTGTACTCATAG	23	SC_1.5:2986:3068:-	Éxon/intron/éxon CNBG_2030
cga-milR-52.1	TCGCCTGGGAGACTCAGCCT	20	SC_1.6:515169:515238:+	Éxon CNBG_2676
cga-milR-52.2	CGCCTGGGAGACTCAGCCT	19	SC_1.6:515169:515238:+	Éxon CNBG_2676
cga-milR-53	CTGGGGTATGATCACTGCCT	20	SC_1.6:625220:625295:+	Éxon CNBG_2712.2
cga-milR-54	CGAGGATTGGAAGGTTGAGGAGCT	24	SC_1.6:532960:533050:-	Éxon CNBG_2681.2/ intergênica
cga-milR-55	TCCCCGTCGGTCTCAAGCGCA	21	SC_1.6:829166:829242:-	Éxon CNBG_2795
cga-milR-57	GAGGACTGGGCGCGAGCTTCA	21	SC_1.7:474254:474347:+	Éxon/intron CNBG_3097.2
cga-milR-58	GCTGTACGTCGGTTTGGTGCT	21	SC_1.7:591179:591245:+	Éxon CNBG_3136
cga-milR-59	CGGCGACTGAGGTTGTGTGAAGCT	24	SC_1.8:256908:256988:+	Éxon CNBG_3412.2
cga-milR-60	CTGGGTGGGATCGTCATCGCT	21	SC_1.9:211852:211924:+	Intergênica/ éxon CNBG_4053

1. Tamanho do isomiRNA mais abundante.

1. Localização do precursor predito conforme anotação dos supercontigs obtidos no sequenciamento de *C. gattii* R265, depositados no Broad Institute.

3. Localização do precursor predito obtida por BLAST no genoma da levedura.

Tabela 5: Lista dos 26 miRNAs identificados em *C. gattii* WM276 utilizando algoritmo ‘MIREAP’ e informação sobre a localização dos precursores dos miRNAs.

miRNA	Sequência (5'-3')	Tamanho ¹	Localização ²	Região Genoma ³
cga-milR-1	GCGCCGGAGGGCATCGGACTAGA	23	Chr_A:39636:39712:+	Éxon CGB_A0150W
cga-milR-3	CACCGGATCTCTCCAGCCCCGA	22	Chr_B:35951:36046:+	Éxon CGB_B0110W
cga-milR-14	TTGAGGCTGCTCTTGATTCTCGCC	24	Chr_B:1894879:1894963:+	Região intergênica
cga-milR-18.1	TCGGGACCGGAACAGTCACAC	21	Chr_B:529171:529243:-	Éxon CGB_B2340C
cga-milR-18.2	CGGGACCGGAACAGTCACA	19	Chr_B:529171:529243:-	Éxon CGB_B2340C
cga-milR-19	CACTGGTGTTCGGCGGTGCT	21	Chr_B:765598:765688:-	Éxon CGB_B3420C
cga-milR-20	CAGGTCGAGATGGGGATTCCTC	23	Chr_B:1045422:1045497:-	Éxon CGB_B4530C
cga-milR-22	GCCTGGTTCGCGTGCGGGGCT	21	Chr_C:1528748:1528821:+	Éxon CGB_C7570W
cga-milR-23	ATGGACACTTTTGTTCCTCTCGACT	25	Chr_C:246904:246970:-	Íntron /éxon CGB_C1160C
cga-milR-24	GAATGAAGCTCGTTGGCCCC	20	Chr_C:494774:494845:-	Éxon CGB_C2380C
cga-milR-26	GCGGGATTGTCAAGACGGACTCT	23	Chr_C:1001850:1001949:-	Éxon CGB_C5090C/ intergênica
cga-milR-27	TTCCGGTATTAGGTTGTCGTAT	23	Chr_D:1471871:1471963:+	Íntron /éxon CGB_D6430W/ intergênica
cga-milR-28	GCGAGACGACCGATTCTGGCT	21	Chr_D:288360:288443:-	Éxon / íntron CGB_D1300C
cga-milR-30	TGGCTGTAGCACCTGTGCT	20	Chr_D:2038201:2038296:-	Éxon CGB_D9100C
cga-milR-33	CGAGATTTCAATCGTGCGGT	20	Chr_E:946991:947058:-	Região intergênica
cga-milR-34	ATTCGGAGTATGATGAGCCCCG	21	Chr_E:1174935:1175012:-	Éxon CGB_E6140C/ intergênica
cga-milR-35	AGGTCCGCAATGAGATCCGA	20	Chr_F:703146:703207:+	Éxon CGB_F3550W
cga-milR-38	TGCGGCATGGACGGAAGGTGA	21	Chr_F:843248:843328:-	Éxon CGB_F4320C
cga-milR-41	GAAGCCTAGACCGTCGGATAGTC	23	Chr_H:371218:371289:+	Éxon CGB_H1600W
cga-milR-42.1	TCGCCTGGGAGACTCAGCCT	20	Chr_H:555721:555790:+	Éxon CGB_H2490W
cga-milR-42.2	CGCCTGGGAGACTCAGCCT	19	Chr_H:555721:555790:+	Éxon CGB_H2490W
cga-milR-45	CTGCCGACGCCGTCTCGCT	20	Chr_H:1238010:1238073:-	Éxon CGB_H5690C
cga-milR-46	AGGGGAGGGCTGGGAAGAGGA	21	Chr_I:176675:176763:+	Éxon CGB_I0600W
cga-milR-50	GAGGACTGGGCGCGAGCTTCA	21	Chr_K:479414:479507:+	Éxon / íntron CGB_K2190W
cga-milR-52	CTGCTGAGCGAACGCGACTTGCC	23	Chr_L:165360:165442:-	Éxon CGB_L0530C
cga-milR-54	TTGGCGTCGGTGGTGCATCTCA	22	Chr_M:284477:284558:-	Éxon CGB_M1370C

1. Tamanho do isomiRNA mais abundante.
2. Localização do precursor predito conforme anotação dos cromossomos obtidos no sequenciamento de *C. gattii* WM276, depositados no NCBI.
3. Localização do precursor predito obtida por BLAST no genoma da levedura.

Tabela 6: Informação sobre comprimento, contagem e MFE dos precursores dos miRNAs identificados em *C. gattii* R265 pelo algoritmo ‘MIREAP’.

miRNA	Tamanho do precursor (nt)	MFE (kcal/mol)	Contagem
cga-miR-1	74	-24.00	14
cga-miR-2.1	65	-21.70	8
cga-miR-2.2	65	-21.70	8
cga-miR-4	94	-31.30	48
cga-miR-10	94	-21.05	5
cga-miR-11	81	-27.80	5
cga-miR-15	98	-23.32	5
cga-miR-16	69	-20.50	7
cga-miR-17	85	-21.39	6
cga-miR-19	78	-24.00	4
cga-miR-20	84	-25.80	7
cga-miR-21	94	-31.60	5
cga-miR-23.1	69	-20.76	6
cga-miR-23.2	69	-20.76	6
cga-miR-25	85	-30.30	5
cga-miR-30	92	-32.00	8
cga-miR-33	95	-33.30	7
cga-miR-37	75	-24.90	113
cga-miR-40	98	-24.90	5
cga-miR-44	69	-23.70	5
cga-miR-46	90	-26.40	5
cga-miR-51	83	-25.60	5
cga-miR-52.1	70	-20.90	5
cga-miR-52.2	70	-20.90	5
cga-miR-53	76	-24.60	6
cga-miR-54	91	-22.30	6
cga-miR-55	77	-25.30	5
cga-miR-57	94	-24.90	9
cga-miR-58	67	-26.50	8
cga-miR-59	81	-22.20	5
cga-miR-60	73	-20.59	8

Tabela 7: Informação sobre tamanho, contagem e MFE dos precursors dos miRNAs identificados em *C. gattii* WM276 pelo algoritmo ‘MIREAP’.

miRNA	Tamanho do precursor (nt)	MFE (kcal/mol)	Contagem
cga-miR-1	77	-36.90	11
cga-miR-3	96	-33.70	5
cga-miR-14	85	-21.90	43
cga-miR-18.1	73	-22.00	17
cga-miR-18.2	73	-22.00	17
cga-miR-19	91	-30.50	6
cga-miR-20	76	-21.60	10
cga-miR-22	74	-28.30	10
cga-miR-23	67	-27.40	5
cga-miR-24	72	-24.00	14
cga-miR-26	100	-29.50	6
cga-miR-27	93	-25.00	7
cga-miR-28	84	-24.60	5
cga-miR-30	96	-29.34	7
cga-miR-33	68	-30.30	30
cga-miR-34	78	-33.60	22
cga-miR-35	62	-32.80	6
cga-miR-38	81	-22.70	5
cga-miR-41	72	-21.00	7
cga-miR-42.1	70	-20.90	5
cga-miR-42.2	70	-20.90	5
cga-miR-45	64	-22.80	8
cga-miR-46	89	-27.70	21
cga-miR-50	94	-30.20	9
cga-miR-52	83	-22.70	11
cga-miR-54	82	-20.56	5

Estes miRNAs escolhidos foram avaliados conforme a identidade do nucleotídeo na extremidade 5'. Em *C. gattii* R265, os 31 miRNAs resultaram em um total de 178 isomiRNAs na biblioteca, com predomínio (59%) de Citosina na extremidade 5'. Na linhagem WM276, os 26 tipos de miRNAs resultaram em um total de 134 isomiRNAs, com predomínio (42%) de Uridina como nucleotídeo em 5' (Figura 9).

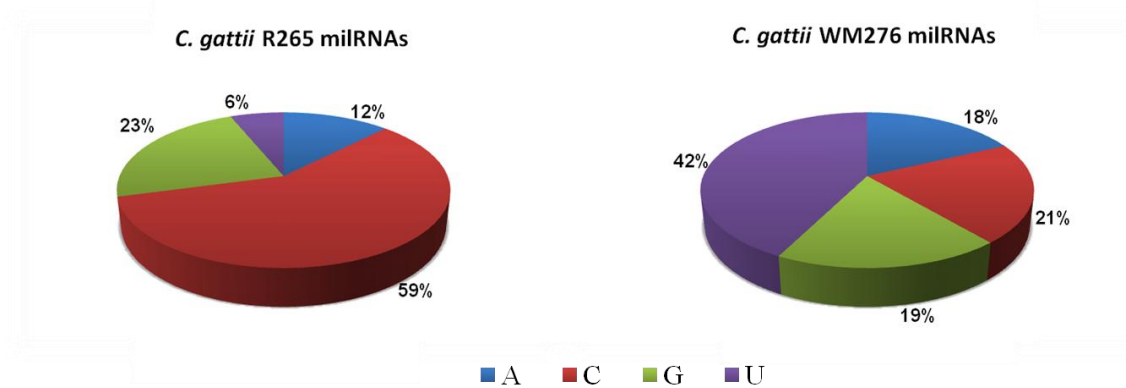


Figura 9: Porcentagem da identidade do nucleotídeo na extremidade 5' dos miRNAs selecionados de *C. gattii* R265 (esquerda) e WM276 (direita). A linhagem R265 mostrou prevalência de Citosina (59%) e a linhagem WM276 em Uridina (42%) na extremidade 5'.

Na comparação entre os miRNAs obtidos na linhagem R265 com os de WM276, foi observado que a sequência de cinco miRNAs era exatamente a mesma em ambas as linhagens (Tabela 8), enquanto a sequência e estrutura dos precursores (obtida pelo RNAfold) não era necessariamente a mesma: 2 precursores (correspondendo a 3 dos 5 miRNAs) era iguais ou com uma diferença menor que 2 nt entre as linhagens, enquanto os outros 2 precursores mostraram uma estrutura muito semelhante, mas com diferença maior do que 5 nt entre as linhagens, porém, produziram miRNAs contendo a mesma sequência (Figura 10). A estrutura de todos os precursores de miRNAs, encontrados em cada uma das linhagens WM276 e R265 de *C. gattii*, é demonstrada nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Tabela 8: miRNAs preditos presentes em ambas as linhagens *C. gattii* R265 e *C. gattii* WM276.

<i>C. gattii</i> R265	<i>C. gattii</i> WM276
cga-miR-1	cga-miR-24
cga-miR-21	cga-miR-3
cga-miR-52.1	cga-miR42.1
cga-miR-52.2	cga-miR42.2
cga-miR- 57	cga-miR-50

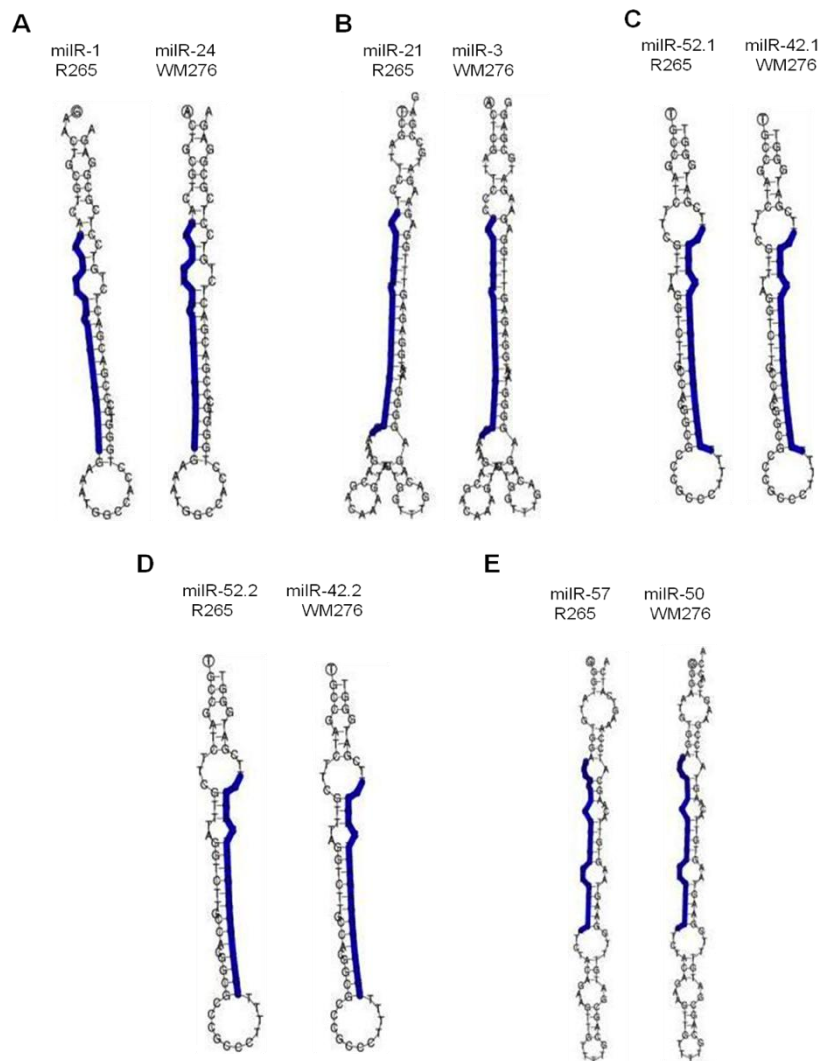


Figura 10: Estrutura dos precursores dos miRNAs presentes em ambas as linhagens de *C. gattii*, R265 e WM27, obtidas por análise em RNAfold. Na letra A, C e D, são mostrados os pre-miRNAs que possuem exatamente a mesma sequência e estrutura ou aqueles com apenas 2 nt de diferença, no máximo, entre as linhagens. Em B e E, são mostrados os pre-miRNAs que possuem diferença maior que 5 nt na sequência, mas que dão origem a miRNAs com a mesma sequência nas duas linhagens.

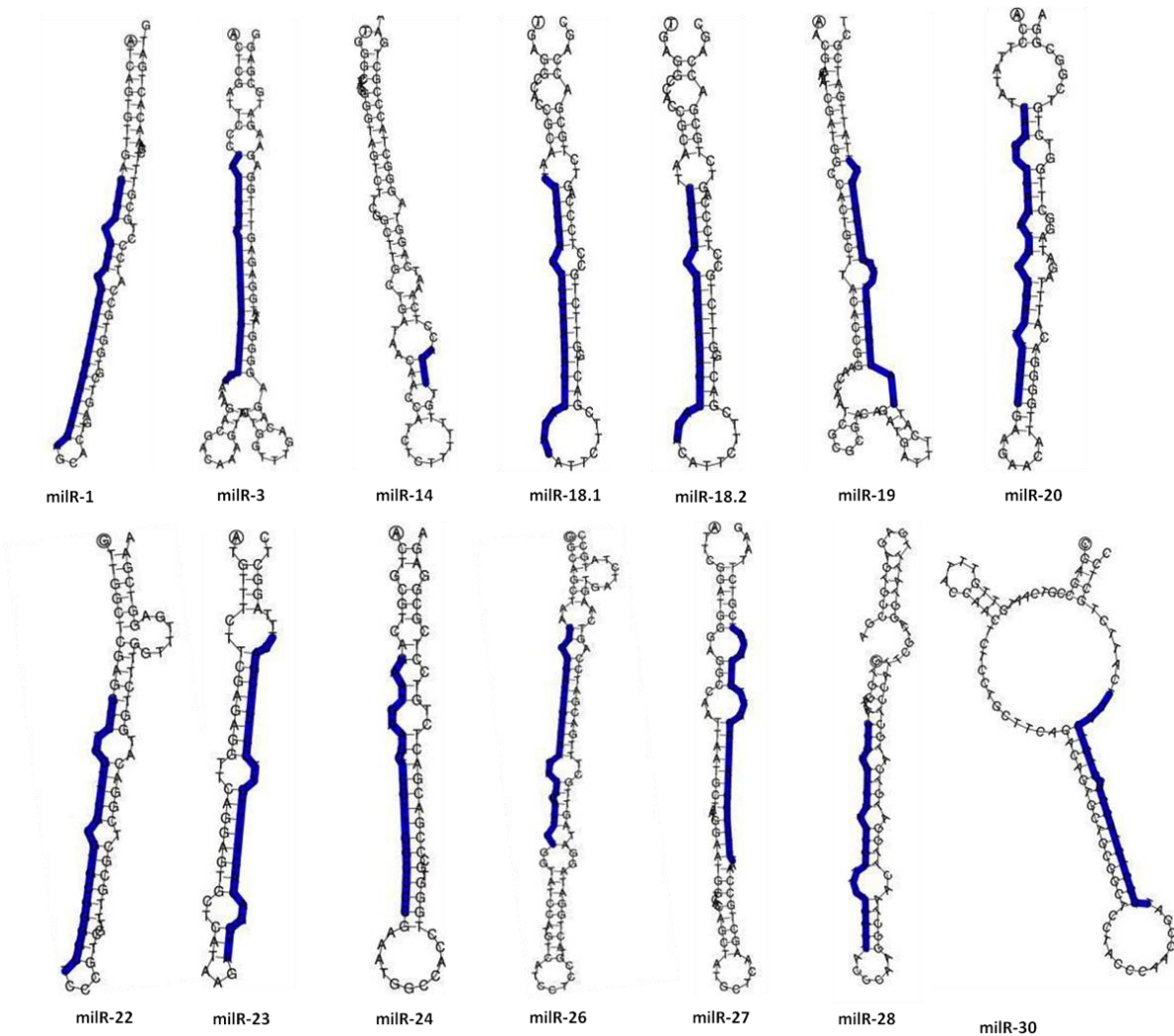


Figura 11: Estrutura dos precursores de miRNAs na linhagem de *C. gattii* WM276. A estrutura dos pre-miRNAs foi obtida com RNAfold do banco de ferramentas UEA sRNAworkbench.

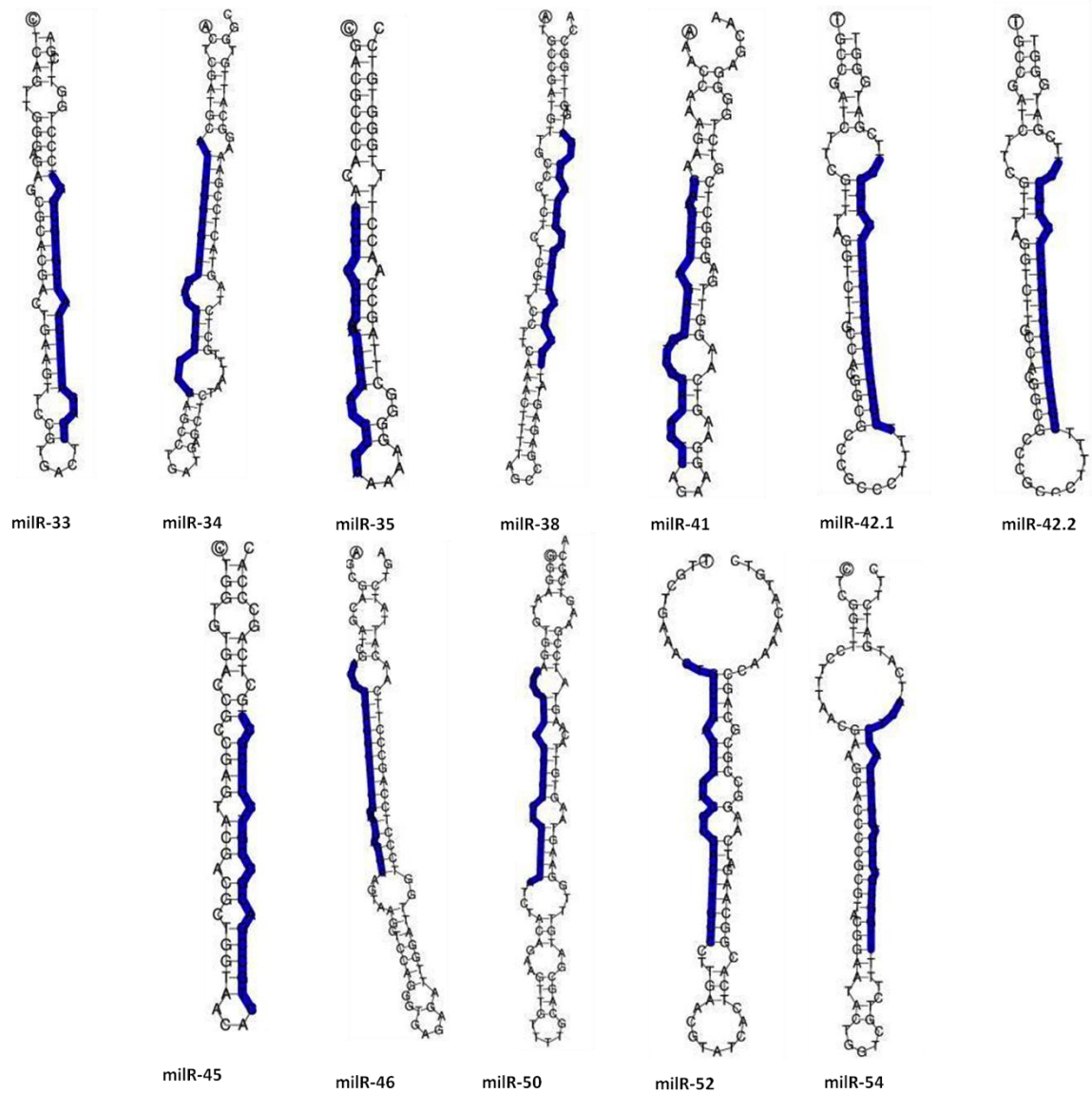


Figura 11: Estrutura dos precursores de miRNAs na linhagem de *C. gattii* WM276. *Continuação.* A estrutura dos pre-miRNAs foi obtida com RNAfold do banco de ferramentas UEA sRNAworkbench.

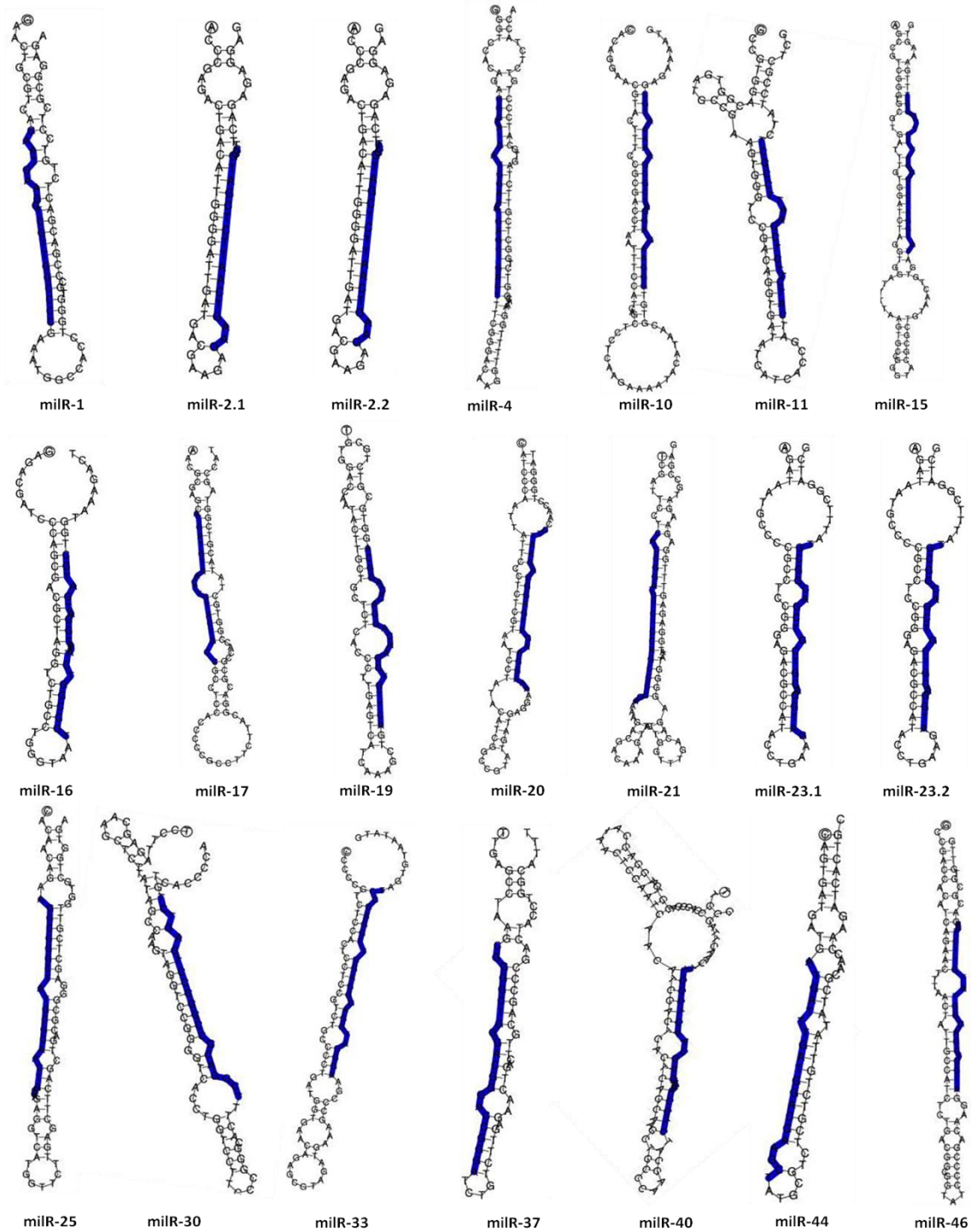


Figura 12: Estrutura dos precursores de miRNAs na linhagem de *C. gattii* R265. A estrutura dos pre-miRNAs foi obtida com RNAfold do banco de ferramentas UEA sRNAworkbench.

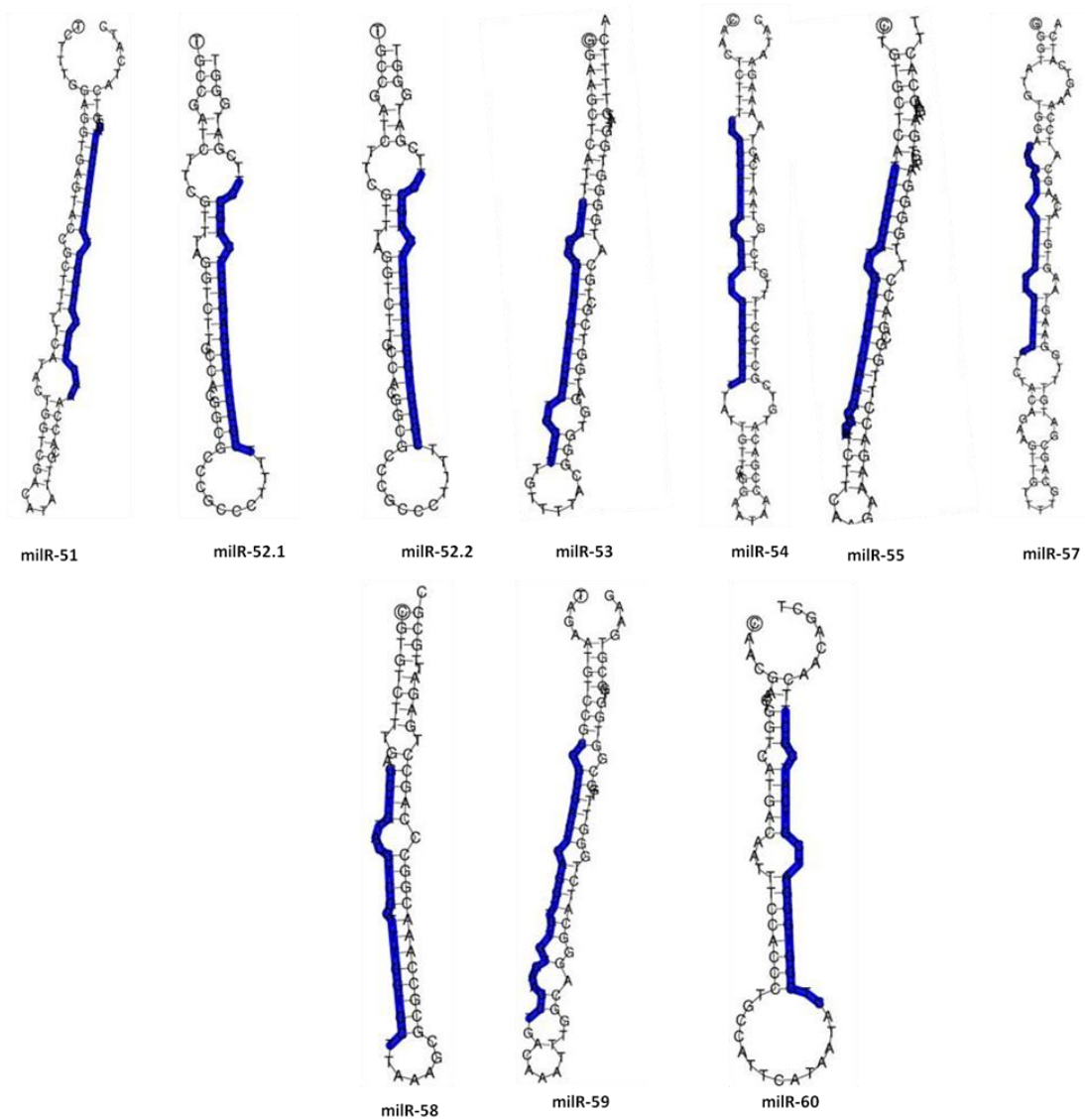


Figura 12: Estrutura dos precursores de miRNAs na linhagem de *C. gattii* R265. Continuação. A estrutura dos pre-miRNAs foi obtida com RNAfold do banco de ferramentas UEA sRNAworkbench.

4.3. Avaliação da presença dos miRNAs de *C. gattii* R265 em cada condição e predição de alvos

Subsequentemente, foi realizada análise *in silico* para avaliar a abundância de cada miRNA de *C. gattii* R265 nas três condições avaliadas. A análise da presença dos miRNAs em diferentes condições originou três grupos: (1) pre-miRNAs em comum (aqueles presentes nas três condições), (2) privação versus controle (correspondente aos que estavam presentes em alguma das privações de metal e no controle) e, por fim, (3) apenas privação (contendo pre-miRNAs presentes em ambas as condições de privação, mas não na biblioteca controle).

Esta análise mostrou que o grupo 1 contém a maioria dos precursores, totalizando 21 deles, o grupo 2 contém 4 precursores que estão presentes tanto na condição controle como na privação de ferro (com BPDS) e 1 precursor que está presente na condição controle e privação de zinco (adição de TPEN). A lista dos pre-miRNAs específicos para cada um dos três grupos encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9: Classificação dos miRNAs presentes em cada um dos três grupos determinados na quantificação.

Grupos de classificação de miRNAs			
Comum às três condições			
miRNA-1	miRNA-21	miRNA-52	
miRNA-2	miRNA-23	miRNA-53	
miRNA-4	miRNA-25	miRNA-54	
miRNA-11	miRNA-30	miRNA-57	
miRNA-16	miRNA-33	miRNA-58	
miRNA-17	miRNA-37	miRNA-59	
miRNA-20	miRNA-40	miRNA-60	
Controle e Privação de Ferro			
miRNA-10	miRNA-19	miRNA-44	miRNA-51
Controle e Privação de Zinco			
miRNA-55			
Privação de Ferro e Privação de Zinco			
miRNA-15		miRNA-46	

Com o intuito de avaliar se os miRNAs dos grupos 1 e 2 apresentavam expressão diferencial entre as condições avaliadas, comparamos o valor de RPKM de cada miRNA em cada condição. Foram considerados como diferencialmente expressos aqueles miRNAs cuja razão entre os RPKMs associados a cada condição fosse maior a 3 ou menor que 0,33. Com esta análise, miRNA-40 e miRNA-51 mostraram ser mais expressos na condição de privação de ferro (*fold change* de 3,92 e 5,22; respectivamente), enquanto miRNA-55 e miRNA-57 mostraram ter expressão reduzida na privação de zinco (*fold*

change de 0,30 em ambos) (Tabela 10) quando comparados à condição controle; entretanto, a contagem referente a estes miRNAs e seus precursores em cada uma das condições foi muito baixa.

Tabela 10: Valor do RPKM obtido para cada pre-miRNAs dos grupos 1 e 2 de *C. gattii* R265, em cada uma das condições, e valor da expressão diferencial.

miRNA	RPKM Controle	RPKM BPDS	BPDS/ Controle	RPKM TPEN	TPEN/ Controle
miRNA-1	2,10	4,38	2,09	1,86	0,89
miRNA-2	1,43	1,87	1,31	1,41	0,99
miRNA-4	8,91	6,03	0,68	7,32	0,82
miRNA-11	0,77	0,50	0,65	1,13	1,48
miRNA-16	0,90	2,35	2,61	2,00	2,22
miRNA-17	1,09	2,38	2,18	0,54	0,49
miRNA-20	1,11	0,96	0,87	1,64	1,48
miRNA-21	0,66	0,43	0,65	0,98	1,48
miRNA-23	0,90	1,17	1,31	2,66	2,96
miRNA-25	0,73	1,43	1,96	0,54	0,74
miRNA-30	1,35	0,88	0,65	1,00	0,74
miRNA-33	1,31	1,28	0,98	0,97	0,74
miRNA-37	17,37	24,82	1,43	15,91	0,92
miRNA-40	0,32	1,24	3,92	0,47	1,48
miRNA-52	0,89	1,16	1,31	0,66	0,74
miRNA-53	0,82	1,07	1,31	1,81	2,22
miRNA-54	1,02	1,33	1,31	0,50	0,49
miRNA-57	1,65	1,29	0,78	0,49	0,30
miRNA-58	1,85	1,21	0,65	0,68	0,37
miRNA-59	1,15	1,00	0,87	1,13	0,99
miRNA-60	1,27	1,11	0,87	1,89	1,48
miRNA-10	0,66	1,29	1,96		
miRNA-19	0,80	1,04	1,31		
miRNA-44	1,35	1,17	0,87		
miRNA-51	0,37	1,95	5,22		
miRNA-55	2,01	ND	ND	0,60	0,30

*Em negrito são destacados os miRNAs que mostraram expressão diferencial entre as condições analisadas.

4.4. Identificação e classificação funcional dos alvos dos miRNAs detectados nos genomas de *C. gattii* R265, *Homo sapiens* e *Mus musculus*

Tendo sido identificados os possíveis miRNAs, foi realizada a predição dos genes que potencialmente constituem alvos para regulação pós-transcricionais por estes pequenos RNAs. A análise de predição de genes alvos foi realizada com quatro miRNAs de *C. gattii* R265: miR-4, miR-15, miR-37 e miR-46, dos quais miR-4 e miR-37 tiveram a maior contagem em todas as condições e miR-15 e miR-46 foram os que estiveram presentes somente nas condições de privação de metais. A análise mostrou que, em todos os genomas avaliados (*C. gattii* R265, humano e camundongo) eles podem estar regulando uma grande diversidade de genes alvos, que são mostrados nas Tabelas 11-22 em Apêndice.

Em *C. gattii* R265, a maioria dos alvos codificam proteínas hipotéticas enquanto que, em humanos e camundongo, os alvos estão associadas a inúmeras atividades. Mais especificamente, em *Homo sapiens*, entre todos os alvos preditos estão proteínas F-box e proteínas ricas em repetições de leucina, canal de cálcio tipo T e muitos relacionados à resposta imune, como receptor de interleucina 4, receptor de interferon (α e β), receptor de fator de necrose tumoral (TNF), molécula CD40, receptor do fator 1 de crescimento insulina-like, fator 1 de crescimento de fibroblasto, syntaxina 3 (STX3), entre outros. Em *Mus musculus*, alvos envolvidos na atividade neuronal foram encontrados, como neuronatina (Nnat) e receptor 1 de neurotensina, assim como alvos envolvidos na resposta imune, como receptor de interleucina e transportina-2, além do fator de iniciação da tradução 4A2, entre outros.

Para clarificar e contextualizar a função biológica dos alvos preditos dos miRNAs, foi utilizado o software Blast2GO[®] e os resultados obtidos, para cada miRNA separadamente, em cada um dos genomas, são mostrados nas Figuras 13-16.

Análise dos alvos de miR-4 nos três genomas mostrou alvos envolvidos no transporte transmembrana, regulação da atividade de Rab GTPase e regulação da transdução de sinal da proteína Rho, no genoma de *C. gattii* R265 (Figura 13A). Em *Homo sapiens*, os alvos estão envolvidos, em sua maioria, na transdução de sinal, morfogênese da estrutura anatômica e processos de modificação de proteínas celulares (Figura 13B) enquanto que, em *Mus musculus*, estão envolvidos na regulação da transcrição, regulação de processos de desenvolvimento, processos de oxidação-redução, entre outros (Figura 13C).

Alvos do miR-15 estão envolvidos no transporte transmembrana e reparo de *mismatch* em *C. gattii* R265 (Figure 14A). Em *Homo sapiens*, estão envolvidos principalmente em processos de modificação de proteínas celulares, processos catabólicos e organização de organelas (Figura 14B) enquanto que, em *Mus musculus*, estão envolvidos em processos biológicos, diferenciação e proliferação celular e desenvolvimento de organismos multicelulares (Figura 14C).

Em *C. gattii* R265, os alvos de miR-37, o miRNA mais abundante, mostraram envolvimento com transporte transmembrana, regulação da atividade de Rab GTPase e regulação da transdução de sinal da proteína Rho, assim como para miR-4, e em processos catabólicos e deaminação de citidina (Figura 15A). No genoma humano, a maioria dos processos biológicos regulados pelos alvos de miR-37 foram transdução de sinal, diferenciação e proliferação celular, morfogênese estrutural anatômica e resposta a estresses e estímulos (Figura 15B). No genoma de camundongo, seus alvos mostraram

envolvimento na transdução de sinal, morfogênese estrutural anatômica e processos de modificação de proteínas (Figura 15C). Em relação às proteínas alvo de miR-46, mostraram envolvimento na regulação da transcrição no promotor da RNA polimerase II no genoma de *C. gattii* R265 (Figura 16A), enquanto que, em humanos, mostraram prevalência de envolvimento em transdução de sinal, resposta a estresses e estímulos endógenos e morfogênese estrutural anatômica, entre outros (Figura 16B). Em camundongos, os alvos mostraram envolvimento na diferenciação celular, processos metabólicos, entre outros (Figura 16C).

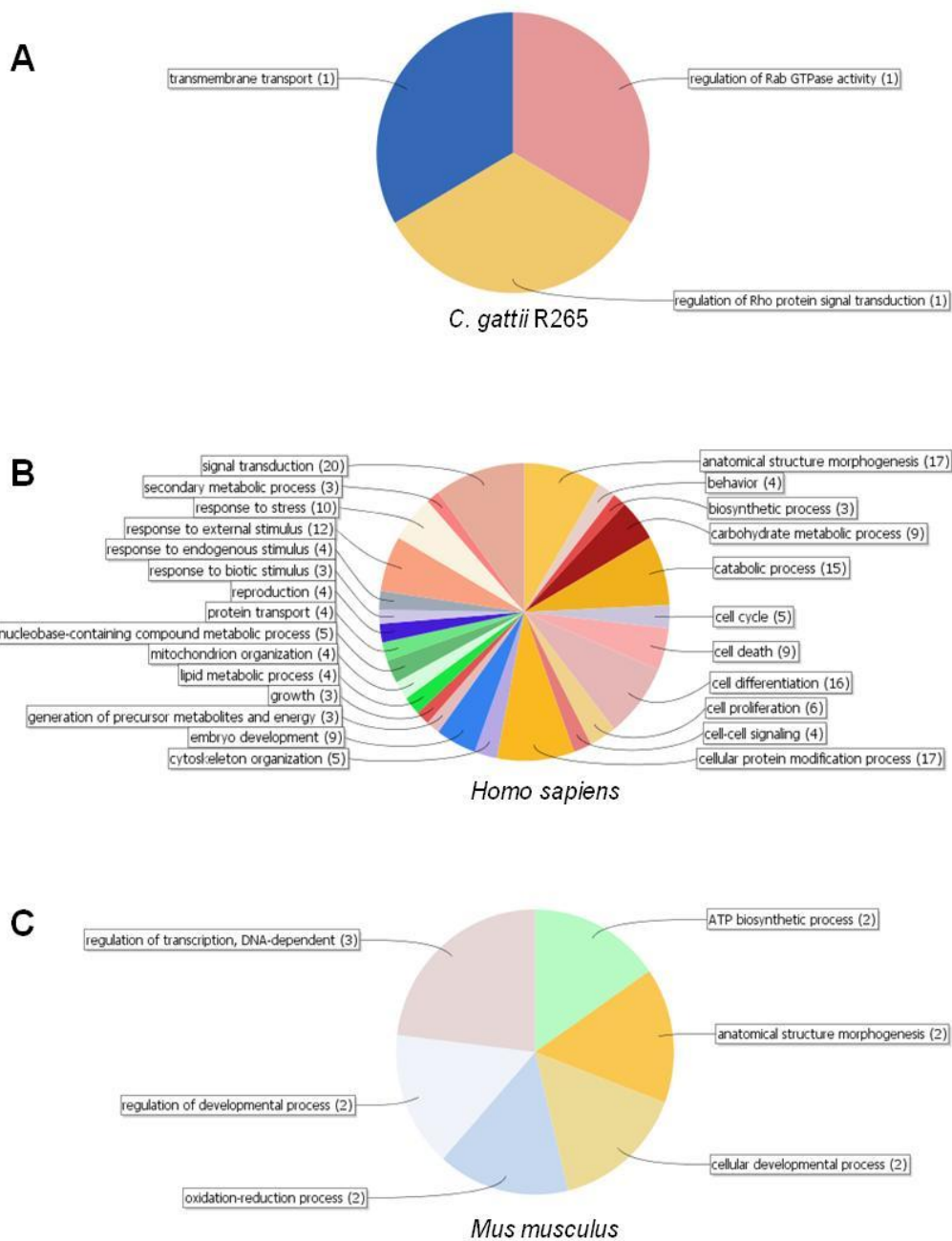


Figura 13: Classificação de acordo com processo biológico, dos alvos de miR-4 nos genomas de *C. gattii* R265, *H. sapiens* e *M. musculus*. (A) Envolvimento dos alvos de miR-4, no genoma de R265, em processos como transporte transmembrana, regulação da atividade de Rab GTPase e regulação da transdução de sinal da proteína Rho. (B) Relação dos alvos do miR-4 no genoma de *H. sapiens*, os quais mostraram predominância de transdução de sinal, morfogênese da estrutura anatômica e processos envolvidos na modificação de proteínas. (C) Processos biológicos dos alvos no genoma de *M. musculus*, envolvidos principalmente na regulação da transcrição, regulação de processos de desenvolvimento e processos de oxidação-redução. Estas análises foram realizadas com software Blast2 GO, utilizando as sequencias de proteínas dos alvos.

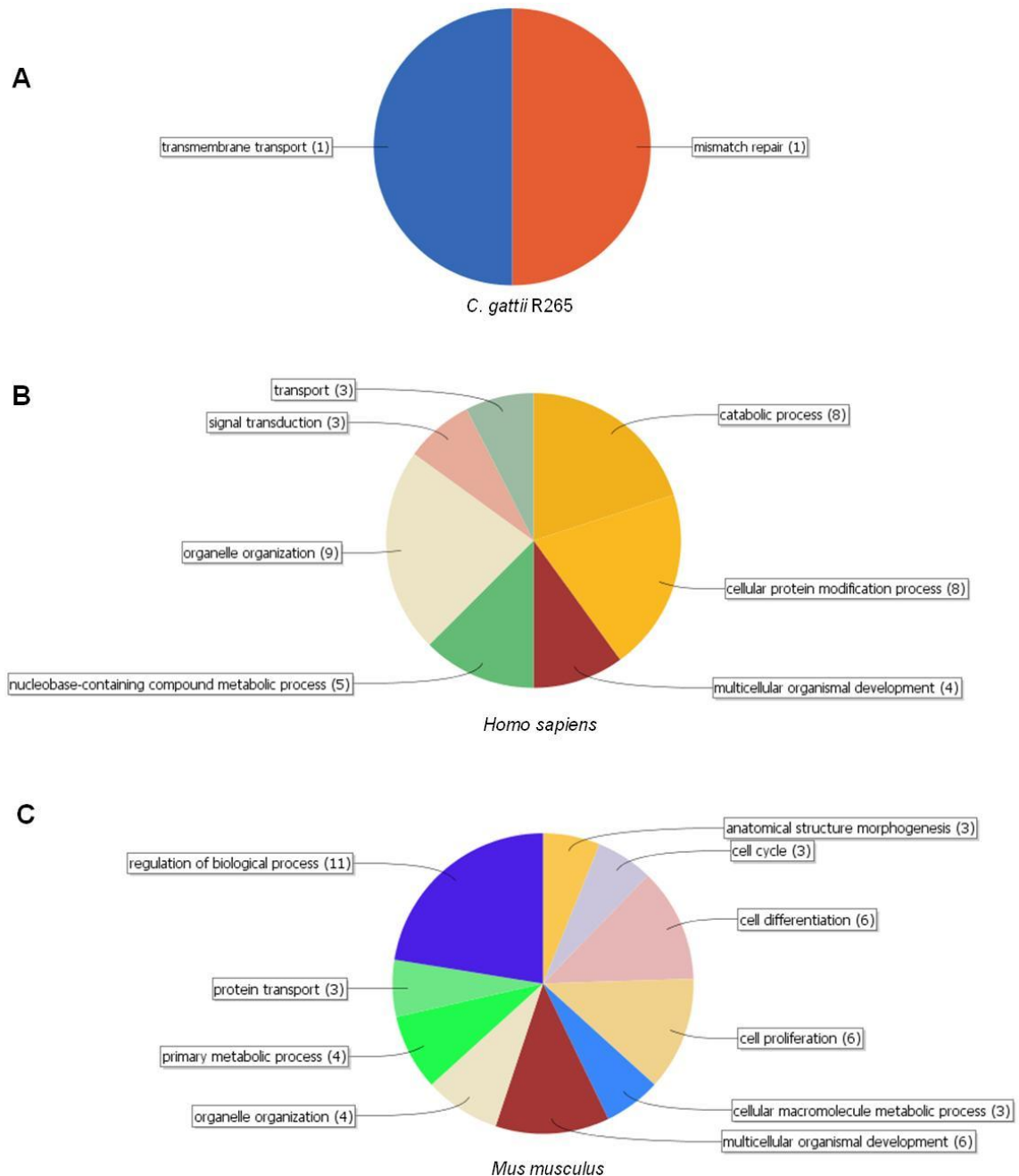


Figura 14: Classificação de acordo com processo biológico, dos alvos de miR-15 nos genomas de *C. gattii* R265, *H. sapiens* e *M. musculus*. (A) Envolvimento dos alvos dos miR-15 nos genomas de R265, em processos como transporte transmembrana e reparo de mismatch. (B) Alvos do miR-15 no genoma de *H. sapiens*, os quais mostraram predominância de processos de modificação de proteínas, processos catabólicos e processos de organização de organelas. (C) Processos biológicos dos alvos no genoma de *M. musculus*, envolvidos principalmente em processos biológicos, diferenciação celular e proliferação e processos de desenvolvimento de organismos multicelulares. Estas análises foram realizadas com software Blast2GO, utilizando as sequências de proteínas dos alvos.

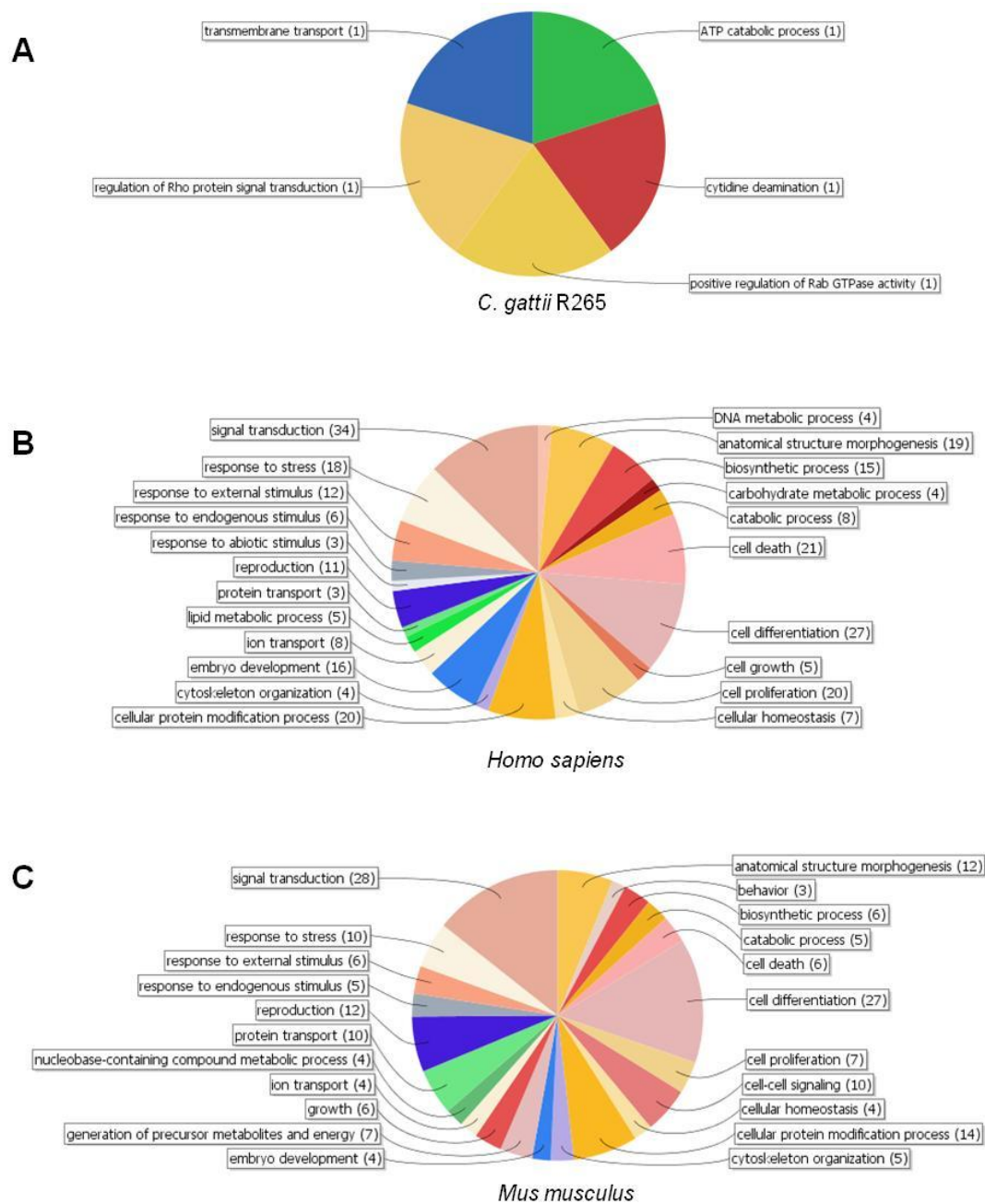


Figura 15: Classificação de acordo com processo biológico, dos alvos de miR-37 nos genomas de *C. gattii* R265, *H. sapiens* e *M. musculus*. (A) Envolvimento dos alvos de miR-37, no genoma de R265, no transporte transmembrana, regulação da atividade de Rab GTPase e regulação da transdução de sinal da proteína Rho, assim como miR-4, e processos catabólicos dependente de ATP e deaminação de citidina. (B) Alvos de miR-37 no genoma de *H. sapiens*, mostraram predominância em transdução de sinal, diferenciação celular e proliferação, morfogênese da estrutura anatômica e resposta a estresse e estímulos. (C) Processos biológicos dos alvos no genoma de *M. musculus*, como transdução de sinal e diferenciação celular, morfogênese estrutural anatômica e processos de modificação de proteínas. Estas análises foram realizadas com software Blast2GO, utilizando as sequências de proteínas dos alvos.

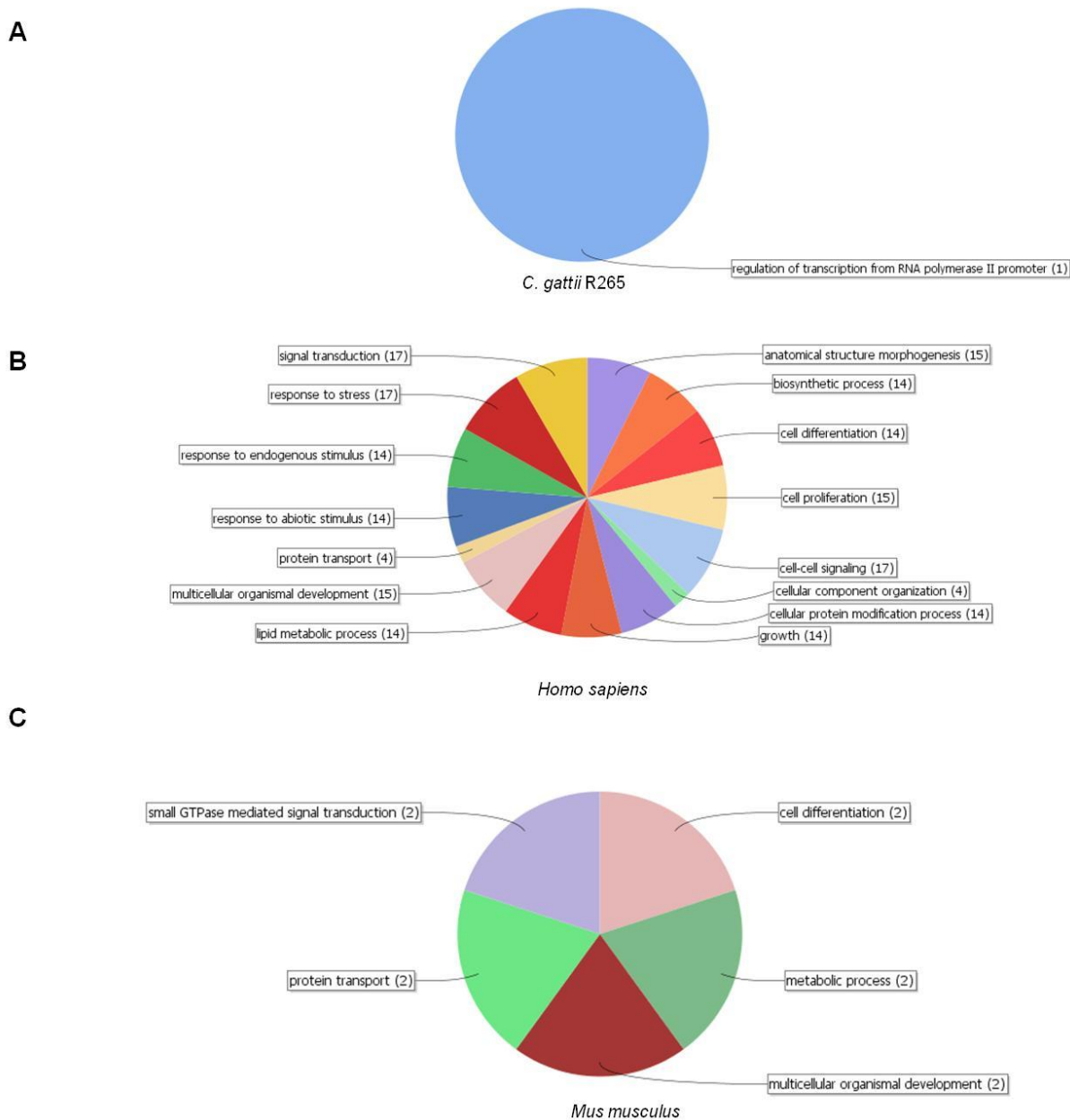


Figura 16: Classificação de acordo com processo biológico, dos alvos de miR-46 nos genomas de *C. gattii* R265, *H. sapiens* e *M. musculus*. (A) Envolvimento dos alvos de miR-46 na regulação da transcrição por RNA polimerase II, no genoma de *C. gattii* R265. (B) Alvos de miR-46 no genoma de *H. sapiens*, mostrou prevalência de envolvimento na transdução de sinal, resposta a estresse e estímulos endógenos e morfogênese estrutural anatômica. (C) Alvos de miR-46 no genoma de camundongo estão envolvidos na diferenciação celular e processos metabólicos. Estas análises foram realizadas com software Blast2GO, utilizando as sequencias de proteínas dos alvos.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vem sendo abordado o papel de miRNAs em muitas doenças (Lemons *et al.*, 2013) e em interações patógeno-hospedeiro, incluindo plantas com fungos fitopatogênicos (Lau *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2012a). Os miRNAs também vem mostrando função importante na homeostase de metais em plantas e animais, incluindo em resposta à toxicidade causada por eles ou privação dos mesmos (Castoldi e Muckenthaler, 2012; Gielen *et al.*, 2012; Sangokoya *et al.*, 2013; Waters *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012c), porém, em fungos, este papel ainda não foi elucidado.

Um dos principais motivos da falta de estudos de miRNAs em fungos se deve a recente descoberta de miRNAs nos mesmos, uma vez que, até o ano de 2005, não havia registros de miRNAs endógenos nestes organismos, apenas a descrição da presença de transcritos antisense em *C. neoformans* (Lau *et al.*, 2013; Loftus *et al.*, 2005). A presença de siRNAs e miRNAs já foi descrita neste patógeno, sendo que os miRNAs mostraram atividade no silenciamento de transposons e foi proposto que a expressão de pseudogenes e transposons seja regulada por estes miRNAs (Jiang *et al.*, 2012), embora o mecanismo exato de ação e os alvos destes siRNAs ainda não estejam bem esclarecidos. Em tal estudo foram identificados apenas dois miRNAs (miR-1 e miR-2) de forma que, isto se deve provavelmente, ao tipo de metodologia utilizada, na qual foi construída uma biblioteca de pequenos RNAs com 20-25 nt de tamanho, contendo cerca de 20.000 clones, dos quais apenas 200 foram sequenciados e avaliados para detecção de miRNAs (Jiang *et al.*, 2012).

Já que nunca foi descrita a presença de nenhuma classe de pequenos RNAs em *C. gattii*, especialmente na linhagem hipervirulenta R265, investigamos se esta linhagem é capaz de produzir miRNAs em condições de privação de metais, as quais poderiam

mimetizar o microambiente da infecção. A busca de sRNAs em *C. gattii* R265 foi realizada utilizando sequenciamento com a tecnologia Solexa para fracionamento de sRNAs, a fim de aumentar a capacidade de detecção de possíveis miRNAs. A metodologia de sequenciamento de alto desempenho vem se mostrando como uma ferramenta importante para gerar milhões de sequências de sRNAs a fim de determinar o perfil de miRNAs em muitos organismos (Guzman *et al.*, 2012). Além disso, miRNAs menos abundantes podem ser identificados, já que este tipo de sequenciamento é capaz de produzir grandes bibliotecas de sRNAs, o que já foi comprovado em diversos organismos (Sunkar e Zhu, 2004; Yang *et al.*, 2011).

Todas as análises, após RNA-Seq da cultura da levedura nas condições citadas anteriormente, foram realizadas utilizando o genoma da linhagem R265 e, em paralelo, o genoma de *C. gattii* WM276, uma vez que são próximas filogeneticamente. A linhagem WM276 é um dos representantes do genótipo VGI, que se caracteriza por ser o isolado mais comum no ambiente pelo mundo todo, enquanto VGII é o isolado predominante em casos clínicos, dos quais a linhagem R265 se destaca como o agente etiológico da criptococose no surto da Ilha de Vancouver e nos Estados Unidos (D'souza *et al.*, 2011; Li e Mody, 2010).

Além desta razão, a análise comparativa foi realizada em decorrência do melhor estado de anotação e montagem do genoma da linhagem WM276 em comparação com o da linhagem R265, somado ao fato de que as linhagens de *C. gattii* possuem genomas colineares, mostrando alguns rearranjos entre si, entretanto, o genoma de WM276 possui apenas 8 gaps, enquanto que, um fator limitante em estudos com *C. gattii* R265 é a anotação incompleta do seu genoma. Em um estudo comparando o genoma destas duas leveduras, foi visto que ambas as linhagens possuíam genes específicos. Em WM276,

existem 154 genes que não estão presentes em R265, enquanto R265 possui 108 genes específicos a esta linhagem. A maioria deles codifica proteínas hipotéticas, entretanto, a diferença no conteúdo gênico também se referiu a genes AGO1 e AGO2 (CGB_D9320W e CGB_D9160, respectivamente) presentes somente em WM276, indicando a existência de uma via canônica funcional de RNAi nesta linhagem (D'souza *et al.*, 2011).

No total, o presente estudo foi capaz de identificar 31 milRNAs em *C. gattii* R265 a partir da análise de RNA-Seq, o qual mostrou sRNAs com pico de tamanho em cerca de 25 nt, similar aos encontrados em *Sclerotinia sclerotiorum* e *Magnaporthe oryzae*, que mostraram pico em cerca de 24 nt de tamanho (Raman *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2012a). Os resultados obtidos na comparação entre as sequências dos milRNAs detectados em ambas as linhagens mostrou que alguns deles possuíam a mesma sequência, o que corrobora com a similaridade genômica (D'souza *et al.*, 2011) entre as duas linhagens de *C. gattii* avaliadas. Também em concordância com isto, as sequências dos precursores não eram necessariamente as mesmas, porém, a diferença entre eles era muito pequena, produzindo o mesmo milRNA. Desta forma, embora a anotação do genoma de *C. gattii* R265 não esteja completa, as sequências obtidas como potenciais precursores de milRNAs mostram evidência de que realmente podem produzir milRNAs nesta linhagem, uma vez que alguns precursores foram encontrados no genoma da linhagem R265 e, com grande similaridade, na linhagem próxima WM276, que possui o genoma completo.

O achado que os possíveis milRNAs obtidos na análise utilizando o genoma da linhagem WM276 mostraram predomínio de uridina (46%) no nucleotídeo na extremidade 5' corrobora com dados anteriores que demonstram que sRNAs em animais, plantas e outros fungos, incluindo *C. neoformans*, possuem preferência por U na extremidade 5' (Jiang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). Inclusive, foi demonstrado que, em *Arabidopsis*, por

exemplo, o carregamento dos sRNAs no complexo contendo a proteína Argonauta é especificado pelo nucleotídeo 5' terminal (Mi *et al.*, 2008). Plantas possuem 10 Ago e cada uma reconhece sRNAs conforme seus tamanhos e identidade do nucleotídeo em 5'. Por exemplo, AGO1 se associa, preferencialmente, com pequenos RNAs que possuem U (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008) e, já que a maioria dos miRNAs em plantas possuem este nucleotídeo na porção 5', AGO1 se mostra como a proteína Ago mais importante na biogênese de miRNAs em plantas (Vaucheret, 2008). AGO2 se associa principalmente a sRNAs contendo adenosina (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008), AGO4 se associa com sRNAs com 24 nt que possuem A e, desta forma, alguns miRNAs contendo A podem se associar a AGO1 ou AGO4 (Mi *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2006). Em um estudo em que testaram a mudança do nucleotídeo em 5', foi demonstrado que isso afeta o carregamento em uma específica Ago. Por exemplo, quando mudaram U por A, o sRNA se mostrou associado com AGO2 e não AGO1, ao contrário do perfil de associação anteriormente comprovado (Mi *et al.*, 2008).

Outros estudos com fungos que possuem todos os componentes da maquinaria de RNAi, como *Metarhizium anisopliae* (Zhou *et al.*, 2012b), mostrou que, dos 15 miRNAs identificados, 10 apresentaram predomínio de 5'-U, assim como em estudo com o fungo patogênico de plantas *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhou *et al.*, 2012a) e com *Penicillium marneffeii* (Lau *et al.*, 2013). Em um experimento realizado em *C. neoformans*, no qual geraram um mutante *ago1*, foi visto que a deleção do gene também causou mudança no perfil dos sRNAs, os quais perderam predomínio de U e, além disso, a levedura se mostrou incapaz de produzir siRNAs (Dumesic *et al.*, 2013).

Tal fato pode explicar o motivo pelo qual os miRNAs identificados em *C. gattii* R265 possuíram predomínio de citosina (59%), ao contrário de uridina, uma vez que esta

linhagem não possui gene codificador de Ago (Nicolás *et al.*, 2013). Esta associação também foi demonstrada em *S. cerevisiae*, fungo que não possui via de RNAi funcional devido à falta dos genes *AGO* e *DICER*. No geral, o perfil de sRNAs da levedura mostra predomínio de A na extremidade 5' e, quando inseriram ambos os genes, o perfil de sRNAs mudou completamente: além da distribuição de sRNAs em uma faixa mais estreita e homogênea de tamanho, mostrou predomínio de 5'-U (Drinnenberg *et al.*, 2011).

Em relação à ausência da proteína Ago em *C. gattii* R265, é importante não excluir a possibilidade de existência de uma via ativa de silenciamento gênico independente desta proteína na levedura, seja pela existência de outra proteína que tenha função semelhante ou uma via, em si, com outros componentes que realizem esta função. Isso se mostra possível já que, em um estudo comparando o genoma da linhagem do genótipo VGII com VGI e com genomas de *C. neoformans* sorotipos A e D, foi demonstrado que a linhagem R265 sofreu perda de 14 genes ou que estes estavam truncados. Um dos genes, CPR2, codifica um receptor de feromônio acoplado a proteína G que, quando ausente, causou defeito no mecanismo de silenciamento já descrito em *C. neoformans*, o SIS, mas não afetou o desenvolvimento vegetativo. Outro, o fator Znf3 que contém três domínios dedo de zinco, também ausente em R265, mostrou ser necessário para o acasalamento de *C. neoformans* e, o mais interessante, é que mostrou direta influência no silenciamento por RNAi (SIS) e no crescimento vegetativo do fungo. O grupo levanta a hipótese, então, de que este seja um novo elemento na via de RNAi que opera na defesa do genoma de *C. neoformans* durante o desenvolvimento sexual do fungo e desenvolvimento vegetativo (Billmyre *et al.*, 2013). Desta forma, mesmo em um fungo que possui maquinaria clássica de RNAi funcional, possíveis novos fatores envolvidos vêm sendo descobertos, até mesmo porque o estudo nestas leveduras ainda é muito recente. Além da possível ausência de uma via de RNAi

funcional em *C. gattii* R265, é descrito que as espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* podem modular a defesa do hospedeiro durante o processo de patogênese e, por esta razão, foi realizada a análise dos alvos de quatro possíveis miRNAs identificados em *C. gattii* R265 no genoma do hospedeiro (humano) e hospedeiro modelo (camundongo), além da busca no genoma da própria levedura. Os miRNAs escolhidos foram aqueles que apresentaram maior contagem (miR-4 e miR-37) e aqueles presentes apenas nas condições de privação de metais (miR-15 e miR-46). Foram encontrados muitos alvos potenciais nos genomas de *H.sapiens* e *M. musculus* em comparação com o número de alvos obtidos no genoma de *C. gattii* R265. A avaliação conforme processos biológicos das proteínas alvo desses miRNAs mostrou, em relação aos hospedeiros, que estes possuem papel regulatório na transdução de sinal, diferenciação celular, proliferação, resposta a estresses e estímulos, desenvolvimento celular, conforme já foi demonstrado em plantas (Guzman *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos pelo software miRanda nos genomas dos hospedeiros mostraram alguns genes envolvidos na resposta imune. Isto é uma evidência de que, durante o processo de patogênese, incluindo privação de metal ao qual o fungo é submetido, as células de *C. gattii* podem produzir miRNAs que podem atuar em importantes efetores da resposta imune do hospedeiro, sendo que tal relação de miRNAs com resposta imune já foi documentada (Chen *et al.*, 2013). Estes dados corroboram com o que foi citado anteriormente que, durante a criptococose, macrófagos são responsáveis pela defesa inata contra a levedura, através da fagocitose. Além disso, as células fúngicas podem sobreviver dentro deles e, secretando vários tipos de moléculas, podem modular a resposta imune da célula hospedeira. É descrito que citocinas do tipo Th1 ativam macrófagos, a fim de criar um ambiente oxidativo como mecanismo antimicrobiano e

estudos demonstraram que elevada expressão de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) aumentaram o controle da infecção por parte do hospedeiro (Flesch *et al.*, 1989; Kawakami *et al.*, 1995; Milam *et al.*, 2007; Wormley *et al.*, 2007). Desta forma, a resposta Th1, responsável pela ação de IFN- γ , interleucina-2 (IL-2) e TNF- α é considerada protetora para o hospedeiro e, já foi demonstrado que um dos mecanismos de regulação, causada pelo patógeno, é a perda da resposta Th1 no hospedeiro (Huffnagle, 1996; Johnston e May, 2013; Mambula *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2010; Shoham e Levitz, 2005).

Outro gene que se mostrou como possível alvo é o codificador de CD40, que se trata de um receptor de superfície responsável pela ativação de células dendríticas e é membro da família dos receptores de fator de necrose tumoral (Pietrella *et al.*, 2004). Em *C.neoformans* foi relatado que a resposta das citocinas Th1, em células mononucleares do sangue periférico, é dependente da interação de CD40 com seu ligante e que esta interação está envolvida na produção de IL-12 e IFN- γ , já que a ausência de CD40 mostrou defeito na produção destas citocinas (Vecchiarelli *et al.*, 2000). Desta forma, a ausência da interação exacerba a infecção por esta levedura e influencia a atividade antimicrobiana de macrófagos e aumenta a carga fúngica nos pulmões (Pietrella *et al.*, 2004). Assim, a predição de tais alvos pode ser uma evidência de que os miRNAs poderiam estar atuando tanto sobre os genes codificadores dos receptores destas citocinas responsáveis pela resposta Th1 como outras moléculas importantes na resposta imune do hospedeiro, conforme predito pelas análises de bioinformática e, desta forma, facilitando a infecção.

Em *C. gattii* R265, foram encontrados poucos alvos e, a maioria deles, mostrou ser proteína predita ou hipotética, o que também limitou a análise de processos biológicos nos quais estão envolvidas, utilizando Blast2GO[®]. Isto pode ser devido à anotação não

completa do genoma da levedura, o qual contém muitos gaps ainda, porém, também leva a especular que estes miRNAs podem não estar atuando na levedura. Estes resultados levantam a questão se estes miRNAs produzidos no fungo seriam funcionais no seu próprio organismo, já que, teoricamente, não existe uma via de RNAi funcional pela ausência da proteína central para funcionalidade da maquinaria, a proteína Ago. Até então, já foram descritas vias de RNAi ativas envolvidas na biogênese de miRNAs, independentes de Drosha, em animais, e de Dicer (Miyoshi *et al.*, 2010), inclusive uma via alternativa é descrita para *N. crassa*, na produção de miRNAs (Lee *et al.*, 2010). Porém, até hoje, não há descrição de uma via funcional de RNAi ou semelhante a esta, sem uma proteína da família Ago. Desta forma, uma das hipóteses é que *C. gattii* R265 está produzindo miRNAs que podem reprimir a expressão de alvos nos seus hospedeiros, mas não em seu próprio genoma, mostrando virulência aumentada quando comparado com outras linhagens do complexo *Cryptococcus*.

Nossa hipótese está baseada em estudos anteriores que mostraram que existe a translocação de material genético produzido em um organismo para outro e que este pode ser funcional na espécie receptora (Jorgensen, 2002; Tinoco *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012). Mais recentemente, em um estudo que buscava evidência da transferência de sRNAs, foi realizada a transformação de tabaco para expressar o gene reporter *GUS* e, posteriormente, retransformaram a planta inserindo uma construção na forma de grampo, a qual produziu siRNAs para *GUS*. Quando a planta foi exposta ao fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides*, o qual continha gene *GUS*, o fungo mostrou silenciamento da expressão do gene, comprovando a translocação de siRNAs originados a partir de dsRNA da planta até o fungo (Tinoco *et al.*, 2010). Também já é descrito que miRNAs de plantas, presentes na dieta, são capazes de reprimir seu alvo em células

mamíferas, com alta estabilidade. Isto foi descrito em um estudo realizado utilizando soro humano, no qual detectaram níveis consideráveis de MIR168a, um miRNA de plantas. Além disso, tal miRNA se mostrou associado à Ago da célula receptora humana, cuja associação permitiu o silenciamento do alvo LDLRAP1 (proteína adaptadora do receptor das lipoproteínas de baixa densidade), proteína que auxilia na remoção de LDL da circulação sanguínea (Zhang *et al.*, 2012).

Outra evidência que fornece forte suporte a nossa hipótese é um recente estudo, desenvolvido por Weiberg e colaboradores (2013), que demonstrou que sRNAs produzidos pelo fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* possuem função regulatória em genes da planta hospedeira, como *A. thaliana* e *Solanum lycopersicum* (tomate) e, em experimento de imunoprecipitação da proteína Ago, também foi verificada a associação destes sRNAs com a proteína do hospedeiro para exercerem sua função. Um outro aspecto interessante do estudo foi a comprovação de que alguns dos alvos dos sRNAs estão envolvidos na resposta imune vegetal, como MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), MPK1 e MPK2 (*mitogen activated protein kinase 2*), PRXIIF (*peroxiredoxin*) e WAK (*cell wall-associated kinase*), que mostraram redução nos níveis de seus transcritos quando as plantas foram expostas ao fungo (Weiberg *et al.*, 2013). De fato, o estudo desenvolvido comprovou que os sRNAs produzidos por *B. cinerea* são capazes de silenciar genes envolvidos na imunidade da planta hospedeira e, além de tudo, utilizando a maquinaria de RNAi da planta (Weiberg *et al.*, 2013).

Como *C. gattii* R265 possui genes codificadores de Dicer e RdRP (Wang *et al.*, 2010) e mostrou, através das análises deste estudo, a existência de miRNAs sendo produzidos no organismo, é possível que a levedura possua a etapa de produção e processamento ativos até a formação do duplex de sRNAs, porém, pela ausência de Ago,

os mesmos não sejam atuantes no organismo. Desta forma, sRNAs podem ser produzidos no fungo e, posteriormente, translocados para o hospedeiro se tornando ativos ao se associar com a proteína Ago da célula hospedeira, como pode ocorrer para alguns miRNAs de plantas (Zhang *et al.*, 2012) e de outros fungos (Weiberg *et al.*, 2013), citados anteriormente.

Outra característica interessante, é que no estudo de Zhang e colaboradores (2010), foi abordada a existência de microvesículas (MV) no plasma, que atuam como potenciais moléculas envolvidas na entrega de micropartículas, exossomos e, até mesmo, miRNAs (Zhang *et al.*, 2010b) e, inclusive, estudos prévios mostram que exossomos de células cultivadas atuam como carreadores fisiológicos de miRNAs (Skog *et al.*, 2008; Valadi *et al.*, 2007). É bem elucidado na literatura que leveduras patogênicas do complexo *Cryptococcus* produzem vesículas que contém diversos tipos de moléculas, incluindo importantes fatores de virulência descritos anteriormente como, por exemplo, lacase, componentes da cápsula polissacarídica, fosfolipase B, urease (Alvarez e Casadevall, 2007; Feldmesser *et al.*, 2000; Tucker e Casadevall, 2002). As vesículas são internalizadas pelos macrófagos do hospedeiro e são capazes de modular a resposta imune, incluindo a produção de fator de necrose tumoral, interleucina-10, óxido nítrico e fator transformante de crescimento- β (Oliveira *et al.*, 2010). Assim, como miRNAs se mostraram presentes em vesículas em fluidos corporais (Kosaka *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2009b), é possível que esta seja a forma de entrega de miRNAs produzidos por *C. gattii* R265 aos macrófagos do hospedeiro, regulando sua resposta ao patógeno, já que miRNAs podem atuar além do limite entre espécies e reinos (Zhang *et al.*, 2012). Estes trabalhos, então, sustentam a hipótese de que *C. gattii* R265 se tornaria mais virulento por não possuir um mecanismo que silencie os seus próprios transcritos, levando à questão de que esses miRNAs

produzidos na levedura podem estar atuando no hospedeiro, modulando a sua resposta ao fungo, incluindo a resposta imune. A ausência de uma via de RNAi funcional vem sendo abordada como uma possível vantagem evolutiva em parasitas e outros fungos, como *S. cerevisiae* (Drinnenberg *et al.*, 2011; Nicolás *et al.*, 2013). A linhagem R265 se mostrou evolutivamente mais recente que WM276 (divergência de cerca de 12.4 milhões de anos) e mostra um perfil hipervirulento. Autores já vêm considerando que a perda seletiva de alguns genes contribua para a sua maior virulência em relação a WM276 e, inclusive, a perda do gene AGO pode ser a causa desta vantagem (Cheng *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2005). A hipótese de vantagem evolutiva foi avaliada em *S. cerevisiae*, inserindo os genes AGO e DCR1 no fungo, o que não alterou o seu desenvolvimento, entretanto, afetou a resistência ao vírus *killer*. Este vírus possui dsRNA e codifica uma toxina que é capaz de matar células vizinhas enquanto confere imunidade àquelas células que a produzem. Na linhagem contendo a via de RNAi funcional, o dsRNA é processado em siRNAs, de forma que não produz mais a toxina e as células se tornam suscetíveis à toxina produzida por células que mantiveram o vírus (Drinnenberg *et al.*, 2011). Já no parasita *Leishmania*, o qual pode ser infectado pelos vírus LRVs, também há evidências de que a via de RNAi não funcional seja benéfica para o mesmo, assim como a presença do vírus no parasita. Já que o mesmo é fagocitado por macrófagos do hospedeiro, ocorre reconhecimento do vírus, que está dentro do parasita, pelos receptores Toll-like pelos macrófagos, o que aumenta a expressão de moléculas pró-inflamatórias que torna o animal mais suscetível a infecções, levando à disseminação e persistência parasitária (Ives *et al.*, 2011).

Além das hipóteses citadas, é persistente considerar que *C. gattii* R265 pode ter perdido a via de RNAi recentemente como uma vantagem evolutiva e ainda ser capaz de produzir miRNAs, porém, com menor frequência e que, conforme o decorrer do tempo,

essa produção pode se tornar nula, o que poderia explicar a baixa contagem dos miRNAs obtidos no RNA-Seq. Desta forma, os possíveis miRNAs identificados na levedura podem não ser um aspecto determinante no perfil de virulência da linhagem R265 em relação às outras.

Vale a pena ainda citar que dois miRNAs foram encontrados apenas nas condições de privação de metais, porém, não mostraram similaridade com outros miRNAs já anotados no miRBase, para que se pudesse fazer algum tipo de associação com a homeostase de metais. Independentemente da hipótese de atuação dos miRNAs pela associação com a Ago do hospedeiro ou de uma possível via não canônica de silenciamento, estes miRNAs podem estar atuando em alguma rota envolvida na homeostase de metais, incluindo em algum sistema de aquisição de metal do hospedeiro, mas isso só pode ser confirmado após evidência experimental de seus alvos.

6. CONCLUSÕES

Em resumo, o trabalho apresentou, pela primeira vez, a identificação de 31 possíveis miRNAs produzidos em *C. gattii* R265, uma linhagem que é descrita como ausente de via de RNAi funcional, em condições que mimetizam o microambiente de infecção. Foi demonstrado que estes miRNAs possuem poucos genes-alvo na própria levedura, entretanto, possuem vários possíveis alvos nos genomas do hospedeiro (homem) e hospedeiro modelo (camundongo). Desta forma, se torna de interesse evolutivo o motivo pelo qual esta linhagem produziria miRNAs que, teoricamente, não seriam atuantes no próprio organismo. Assim, a hipótese de atuação destes miRNAs no hospedeiro tendo como alvo importantes genes, incluindo alguns envolvidos na resposta imune, poderia explicar, pelo menos em parte, a capacidade da levedura em evadir o sistema imune e causar uma doença severa, uma vez que este genótipo de *C. gattii* mostrou maior capacidade de proliferação intrafagocítica e virulência em modelo murino de infecção, em relação aos outros genótipos da espécie (Ma *et al.*, 2009). Além disso, foi a primeira descrição associando a presença de miRNAs e homeostase de metais neste importante patógeno humano e animal.

7. PERSPECTIVAS

Assim, se mostra necessário a confirmação destes miRNAs através de PCR em tempo real e, após, a avaliação experimental dos reais alvos destes miRNAs produzidos no fungo, a fim de investigar onde estão atuando, no seu próprio organismo e/ou no hospedeiro. Apenas com estas análises, se tornará mais clara a correlação entre estes miRNAs, produzidos na levedura, com sua virulência acentuada, associando com mecanismos de defesa durante condições de privação de metais. Também se mostraria interessante realizar as mesmas análises com *C. neoformans* e *C. gattii* WM276, já que estas leveduras possuem via de RNAi funcional a fim de comparar os resultados de possíveis miRNAs identificados e alvos que estariam sendo regulados por eles em cada um dos genomas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARD, P.; HERR, A.; BAULCOMBE, D. C.; HARBERD, N. P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. **Development**, v. 131, n. 14, p. 3357-65, Jul 2004.

ADDO-QUAYE, C.; SNYDER, J. A.; PARK, Y. B.; LI, Y. F.; SUNKAR, R.; AXTELL, M. J. Sliced microRNA targets and precise loop-first processing of MIR319 hairpins revealed by analysis of the *Physcomitrella patens* degradome. **RNA**, v. 15, n. 12, p. 2112-21, Dec 2009.

AKHTER, S.; MCDADE, H. C.; GORLACH, J. M.; HEINRICH, G.; COX, G. M.; PERFECT, J. R. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 71, n. 10, p. 5794-802, Oct 2003.

ALLEN, E.; XIE, Z.; GUSTAFSON, A. M.; CARRINGTON, J. C. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. **Cell**, v. 121, n. 2, p. 207-21, Apr 2005.

ALSPAUGH, J. A.; CAVALLO, L. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 36, n. 2, p. 352-65, Apr 2000.

ALSPAUGH, J. A.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genet Biol**, v. 25, n. 1, p. 1-14, Oct 1998.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2161-5, Nov 2006.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC Immunol**, v. 8, p. 16, 2007.

AMMENDOLA, S.; PASQUALI, P.; PISTOIA, C.; PETRUCCI, P.; PETRARCA, P.; ROTILIO, G.; BATTISTONI, A. High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. **Infect Immun**, v. 75, n. 12, p. 5867-76, Dec 2007.

ASHIDA, H.; OGAWA, M.; KIM, M.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. **Nat Chem Biol**, v. 8, n. 1, p. 36-45, Jan 2012.

ASHIDA, H.; OGAWA, M.; MIMURO, H.; KOBAYASHI, T.; SANADA, T.; SASAKAWA, C. *Shigella* are versatile mucosal pathogens that circumvent the host innate immune system. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 4, p. 448-55, Aug 2011.

AXTELL, M. J.; WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. **Genome Biol**, v. 12, n. 4, p. 221, 2011.

BAHN, Y. S.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. **Curr Biol**, v. 15, n. 22, p. 2013-20, Nov 2005.

BARCELOUX, D. G. Zinc. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 37, n. 2, p. 279-92, 1999.

BARLUZZI, R.; SALEPPICO, S.; NOCENTINI, A.; BOELAERT, J. R.; NEGLIA, R.; BISTONI, F.; BLASI, E. Iron overload exacerbates experimental meningoencephalitis by *Cryptococcus neoformans*. **J Neuroimmunol**, v. 132, n. 1-2, p. 140-6, Nov 2002.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, Jan 2009.

BAVEYE, S.; ELASS, E.; MAZURIER, J.; SPIK, G.; LEGRAND, D. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. **Clin Chem Lab Med**, v. 37, n. 3, p. 281-6, Mar 1999.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363-6, Jan 2001.

BETEL, D.; WILSON, M.; GABOW, A.; MARKS, D.S.; SANDER, C. The microRNA.org resource: targets and expression. **Nucleic Acids Res**, v.36, p. 149-53, Jan 2008.

BILLMYRE, R. B.; WANG, X.; FERETZAKI, M.; HEITMAN, J. Loss of the RNAi pathway in VGII *Cryptococcus gattii* sheds light on the intact system in *Cryptococcus neoformans*. In: 27th Fungal Genetics Conference, Asilomar, Genetics Society of America. Programm Book, p. 180, 2013.

BOEKHOUT, T.; VAN BELKUM, A.; LEENDERS, A. C.; VERBRUGH, H. A.; MUKAMURANGWA, P.; SWINNE, D.; SCHEFFERS, W. A. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. **Int J Syst Bacteriol**, v. 47, n. 2, p. 432-42, Apr 1997.

BOLOGNA, N. G.; MATEOS, J. L.; BRESSO, E. G.; PALATNIK, J. F. A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. **EMBO J**, v. 28, n. 23, p. 3646-56, Dec 2009.

BORCHERT, G. M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, v. 13, n. 12, p. 1097-101, Dec 2006.

BORKOVICH, K. A.; ALEX, L. A.; YARDEN, O. *et al.* Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 1, p. 1-108, Mar 2004.

BOSE, I.; REESE, A. J.; ORY, J. J.; JANBON, G.; DOERING, T. L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 4, p. 655-63, Aug 2003.

BOTTS, M. R.; GILES, S. S.; GATES, M. A.; KOZEL, T. R.; HULL, C. M. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 4, p. 595-605, Apr 2009.

BOZKURT, T. O.; SCHORNACK, S.; BANFIELD, M. J.; KAMOUN, S. Oomycetes, effectors, and all that jazz. **Curr Opin Plant Biol**, v. 15, n. 4, p. 483-92, Aug 2012.

BRENNECKE, J.; ARAVIN, A. A.; STARK, A.; DUS, M.; KELLIS, M.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1089-103, Mar 2007.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998 Jan-Mar 1998.

BÜHLER, M.; MOAZED, D. Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 11, p. 1041-8, Nov 2007.

BURGE, S. W.; DAUB, J.; EBERHARDT, R.; TATE, J.; BARQUIST, L.; NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R.; GARDNER, P. P.; BATEMAN, A. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Database issue, p. D226-32, Jan 2013.

BYRNES, E. J.; BARTLETT, K. H.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infect**, v. 13, n. 11, p. 895-907, Oct 2011.

BYRNES, E. J.; LI, W.; LEWIT, Y. *et al.* Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010.

BYRNES, E. J.; LI, W.; LEWIT, Y.; PERFECT, J. R.; CARTER, D. A.; COX, G. M.; HEITMAN, J. First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5851, 2009.

CAMPBELL, L. T.; CURRIE, B. J.; KROCKENBERGER, M.; MALIK, R.; MEYER, W.; HEITMAN, J.; CARTER, D. Clonality and recombination in genetically differentiated subgroups of *Cryptococcus gattii*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 8, p. 1403-9, Aug 2005.

CARMELL, M. A.; XUAN, Z.; ZHANG, M. Q.; HANNON, G. J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes Dev**, v. 16, n. 21, p. 2733-42, Nov 2002.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-55, Feb 2009.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 354-8, Aug 2000.

CASTOLDI, M.; MUCKENTHALER, M. U. Regulation of iron homeostasis by microRNAs. **Cell Mol Life Sci**, Jun 2012.

CATALANOTTO, C.; AZZALIN, G.; MACINO, G.; COGONI, C. Gene silencing in worms and fungi. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 245, Mar 2000.

CATALANOTTO, C.; AZZALIN, G.; MACINO, G.; COGONI, C. Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. **Genes Dev**, v. 16, n. 7, p. 790-5, Apr 2002.

CATALANOTTO, C.; NOLAN, T.; COGONI, C. Homology effects in *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, n. 2, p. 182-9, Jan 2006.

CERUTTI, H.; CASAS-MOLLANO, J. A. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. **Curr Genet**, v. 50, n. 2, p. 81-99, Aug 2006.

CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, M. J. *et al.* Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 4985-95, Sep 2004.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 120-7, Jan 2009.

CHEN, C. Z.; SCHAFFERT, S.; FRAGOSO, R.; LOH, C. Regulation of immune responses and tolerance: the microRNA perspective. **Immunol Rev**, v. 253, n. 1, p. 112-28, May 2013.

CHEN, L. C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 5, p. 570-4, Sep 1996.

CHEN, S. H.; STINS, M. F.; HUANG, S. H.; CHEN, Y. H.; KWON-CHUNG, K. J.; CHANG, Y.; KIM, K. S.; SUZUKI, K.; JONG, A. Y. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 11, p. 961-70, Nov 2003.

CHEN, X. Small RNAs and their roles in plant development. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 25, p. 21-44, 2009.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009.

CHRÉTIEN, F.; LORTHOLARY, O.; KANSAU, I.; NEUVILLE, S.; GRAY, F.; DROMER, F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J Infect Dis**, v. 186, n. 4, p. 522-30, Aug 2002.

COGONI, C.; MACINO, G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 19, p. 10233-8, Sep 1997.

COGONI, C.; MACINO, G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. **Nature**, v. 399, n. 6732, p. 166-9, May 1999.

COLLINS, H. L.; BANCROFT, G. J. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* impairs antigen-specific T-cell responses. **Infect Immun**, v. 59, n. 11, p. 3883-8, Nov 1991.

CORBIN, B. D.; SEELEY, E. H.; RAAB, A. *et al.* Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 962-5, Feb 15 2008.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C. *et al.* Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 166-75, Jan 2001.

CRESTANI, J.; CARVALHO, P. C.; HAN, X. *et al.* Proteomic profiling of the influence of iron availability on *Cryptococcus gattii*. **J Proteome Res**, v. 11, n. 1, p. 189-205, Jan 2012.

CROCE, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 10, p. 704-14, Oct 2009.

CZECH, B.; ZHOU, R.; ERLICH, Y.; BRENNECKE, J.; BINARI, R.; VILLALTA, C.; GORDON, A.; PERRIMON, N.; HANNON, G. J. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. **Mol Cell**, v. 36, n. 3, p. 445-56, Nov 2009.

D'SOUZA, C. A.; KRONSTAD, J. W.; TAYLOR, G. *et al.* Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. **MBio**, v. 2, n. 1, p. e00342-10, 2011.

DAINTY, S. J.; KENNEDY, C. A.; WATT, S.; BÄHLER, J.; WHITEHALL, S. K. Response of *Schizosaccharomyces pombe* to zinc deficiency. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 3, p. 454-64, Mar 2008.

DANG, Y.; YANG, Q.; XUE, Z.; LIU, Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 9, p. 1148-55, Sep 2011.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-75, Oct 2004.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 303-10, Jun 2012.

DING, L.; HAN, M. GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing. **Trends Cell Biol**, v. 17, n. 8, p. 411-6, Aug 2007.

DING, S. W.; VOINNET, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 413-26, Aug 2007.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 840452, 2009.

DOENCH, J. G.; PETERSEN, C. P.; SHARP, P. A. siRNAs can function as miRNAs. **Genes Dev**, v. 17, n. 4, p. 438-42, Feb 2003.

DRAKESMITH, H.; PRENTICE, A. M. Heparin and the iron-infection axis. **Science**, v. 338, n. 6108, p. 768-72, Nov 2012.

DREVETS, D. A.; LEENEN, P. J. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. **Microbes Infect**, v. 2, n. 13, p. 1609-18, Nov 2000.

DRINNENBERG, I. A.; FINK, G. R.; BARTEL, D. P. Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. **Science**, v. 333, n. 6049, p. 1592, Sep 2011.

DRINNENBERG, I. A.; WEINBERG, D. E.; XIE, K. T.; MOWER, J. P.; WOLFE, K. H.; FINK, G. R.; BARTEL, D. P. RNAi in budding yeast. **Science**, v. 326, n. 5952, p. 544-50, Oct 2009.

DUMESIC, P. A.; NATARAJAN, P.; CHEN, C. *et al.* Stalled spliceosomes are a signal for RNAi-mediated genome defense. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 957-68, Feb 2013.

DUNN, L. L.; SURYO RAHMANTO, Y.; RICHARDSON, D. R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends Cell Biol**, v. 17, n. 2, p. 93-100, Feb 2007.

EHRENSBERGER, K. M.; BIRD, A. J. Hammering out details: regulating metal levels in eukaryotes. **Trends Biochem Sci**, v. 36, n. 10, p. 524-31, Oct 2011.

EIDE, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 7, p. 711-22, Jul 2006.

EIDE, D. J. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 284, n. 28, p. 18565-9, Jul 2009.

ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D.; MEYER, W.; BARTON, R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. **Med Mycol**, v. 38 Suppl 1, p. 173-82, 2000.

EMERY, H. S.; SHELBURNE, C. P.; BOWMAN, J. P.; FALLON, P. G.; SCHULZ, C. A.; JACOBSON, E. S. Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5694-7, Dec 1994.

ENRIGHT, A. J.; JOHN, B.; GAUL, U.; TUSCHL, T.; SANDER, C.; MARKS, D. S. MicroRNA targets in *Drosophila*. **Genome Biol**, v. 5, n. 1, p. R1, 2003.

ERICKSON, T.; LIU, L.; GUEYIKIAN, A.; ZHU, X.; GIBBONS, J.; WILLIAMSON, P. R. Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on VPH1. **Mol Microbiol**, v. 42, n. 4, p. 1121-31, Nov 2001.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **J Immunol**, v. 64, n. 5, p. 423-30, May 1950.

FAEHNLE, C. R.; JOSHUA-TOR, L. Argonautes confront new small RNAs. **Curr Opin Chem Biol**, v. 11, n. 5, p. 569-77, Oct 2007.

FAHLGREN, N.; HOWELL, M. D.; KASSCHAU, K. D. *et al.* High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. **PLoS One**, v. 2, n. 2, p. e219, 2007.

FARAZI, T. A.; JURANEK, S. A.; TUSCHL, T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. **Development**, v. 135, n. 7, p. 1201-14, Apr 2008.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; NOVIKOFF, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4225-37, Jul 2000.

FLESCH, I. E.; SCHWAMBERGER, G.; KAUFMANN, S. H. Fungicidal activity of IFN-gamma-activated macrophages. Extracellular killing of *Cryptococcus neoformans*. **J Immunol**, v. 142, n. 9, p. 3219-24, May 1989.

FLYNT, A. S.; LAI, E. C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 11, p. 831-42, Nov 2008.

FONSECA, F. L.; NOHARA, L. L.; CORDERO, R. J.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, I. C.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. **Infect Immun**, v. 78, n. 9, p. 3861-70, Sep 2010.

FOX, D. S.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Phospholipid-binding protein Cts1 controls septation and functions coordinately with calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 5, p. 1025-35, Oct 2003.

FRASER, J. A.; GILES, S. S.; WENINK, E. C. *et al.* Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1360-4, Oct 2005.

GAITHER, L. A.; EIDE, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. **Biometals**, v. 14, n. 3-4, p. 251-70, Sep-Dec 2001.

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORRELL, T.; WIDMER, F.; WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes Infect**, v. 8, n. 4, p. 1006-15, Apr 2006.

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 64, n. 2, p. 147-61, Mar 2012.

GENT, J. I.; LAMM, A. T.; PAVELEC, D. M.; MANIAR, J. M.; PARAMESWARAN, P.; TAO, L.; KENNEDY, S.; FIRE, A. Z. Distinct phases of siRNA synthesis in an endogenous RNAi pathway in *C. elegans* soma. **Mol Cell**, v. 37, n. 5, p. 679-89, Mar 2010.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 1, p. 122-43, table of contents, Jan 2000.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 2, p. 94-108, Feb 2009.

GIELEN, H.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. MicroRNAs in Metal Stress: Specific Roles or Secondary Responses? **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 12, p. 15826-47, 2012.

GILES, S. S.; DAGENAIS, T. R.; BOTTS, M. R.; KELLER, N. P.; HULL, C. M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 8, p. 3491-500, Aug 2009.

GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **J Clin Invest**, v. 76, n. 2, p. 508-16, Aug 1985.

GROSSHANS, H.; FILIPOWICZ, W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 414-6, Jan 2008.

GUO, H. S.; XIE, Q.; FEI, J. F.; CHUA, N. H. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *arabidopsis* lateral root development. **Plant Cell**, v. 17, n. 5, p. 1376-86, May 2005.

GUZMAN, F.; ALMERÃO, M. P.; KÖRBES, A. P.; LOSS-MORAIS, G.; MARGIS, R. Identification of microRNAs from *Eugenia uniflora* by high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49811, 2012.

HAGEN, F.; CERESINI, P. C.; POLACHECK, I. *et al.* Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71148, 2013.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-51, Jul 2002.

HE, W.; CASADEVALL, A.; LEE, S. C.; GOLDMAN, D. L. Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis. **Infect Immun**, v. 71, n. 2, p. 930-6, Feb 2003.

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 525-37, Aug 2012.

HOWARD, D. H. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 3, p. 394-404, Jul 1999.

HU, H. Y.; YAN, Z.; XU, Y.; HU, H.; MENZEL, C.; ZHOU, Y. H.; CHEN, W.; KHAITOVICH, P. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. **BMC Genomics**, v. 10, p. 413, 2009.

HUFFNAGLE, G. B. Role of cytokines in T cell immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Biol Signals**, v. 5, n. 4, p. 215-22, 1996 Jul-Aug 1996.

HUFFNAGLE, G. B.; CHEN, G. H.; CURTIS, J. L.; MCDONALD, R. A.; STRIETER, R. M.; TOEWS, G. B. Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. **J Immunol**, v. 155, n. 7, p. 3507-16, Oct 1995.

IROKANULO, E. O.; MAKINDE, A. A.; AKUESGI, C. O.; EKWONU, M. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* isolated from droppings of captive birds in Nigeria. **J Wildl Dis**, v. 33, n. 2, p. 343-5, Apr 1997.

IVES, A.; RNET, C.; PREVEL, F. *et al.* *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. **Science**, v. 331, n. 6018, p. 775-8, Feb 2011.

JACOBSON, E. S.; GOODNER, A. P.; NYHUS, K. J. Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 66, n. 9, p. 4169-75, Sep 1998.

JAIN, N.; LI, L.; MCFADDEN, D. C.; BANARJEE, U.; WANG, X.; COOK, E.; FRIES, B. C. Phenotypic switching in a *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* strain is associated with changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 896-903, Feb 2006.

JANBON, G.; MAENG, S.; YANG, D. H.; KO, Y. J.; JUNG, K. W.; MOYRAND, F.; FLOYD, A.; HEITMAN, J.; BAHN, Y. S. Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genet Biol**, v. 47, n. 12, p. 1070-80, Dec 2010.

JENNEY, A.; PANDITHAGE, K.; FISHER, D. A.; CURRIE, B. J. *Cryptococcus* infection in tropical Australia. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 8, p. 3865-8, Aug 2004.

JIANG, N.; YANG, Y.; JANBON, G.; PAN, J.; ZHU, X. Identification and functional demonstration of miRNAs in the fungus *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52734, 2012.

JINEK, M.; DOUDNA, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 405-12, Jan 2009.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 403-11, Mar 2013.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 57, p. 19-53, 2006.

JORGENSEN, R. A. RNA traffics information systemically in plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 18, p. 11561-3, Sep 2002.

JUNG, W. H.; DO, E. Iron acquisition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, Aug 2013.

JUNG, W. H.; SHAM, A.; LIAN, T.; SINGH, A.; KOSMAN, D. J.; KRONSTAD, J. W. Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, p. e45, Feb 8 2008.

JUNG, W. H.; SHAM, A.; WHITE, R.; KRONSTAD, J. W. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Biol**, v. 4, n. 12, p. e410, Nov 2006.

KAWAKAMI, K.; KOHNO, S.; KADOTA, J.; TOHYAMA, M.; TERUYA, K.; KUDEKEN, N.; SAITO, A.; HARA, K. T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed *Cryptococcus neoformans*: involvement of IFN-gamma and its protective effect against cryptococcal infection. **Microbiol Immunol**, v. 39, n. 2, p. 135-43, 1995.

KELLY, W. G.; ARAMAYO, R. Meiotic silencing and the epigenetics of sex. **Chromosome Res**, v. 15, n. 5, p. 633-51, 2007.

KENT, W. J.; SUGNET, C. W.; FUREY, T. S.; ROSKIN, K. M.; PRINGLE, T. H.; ZAHLER, A. M.; HAUSSLER, D. The human genome browser at UCSC. **Genome Res**, v. 12, n. 6, p. 996-1006, Jun 2002.

KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 209-16, Oct 2003.

KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P. J.; CHEN, H.; HINGSTON, A. O.; KRONSTAD, J. W.; BARTLETT, K. H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 5, p. 1433-43, Mar 2007.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 7 2004.

KIM, J.; JUNG, J. H.; REYES, J. L. *et al.* microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis inflorescence* stems. **Plant J**, v. 42, n. 1, p. 84-94, Apr 2005.

KIM, M. J.; KIL, M.; JUNG, J. H.; KIM, J. Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 2, p. 242-7, Feb 2008.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 126-39, Feb 2009.

KOSAKA, N.; IGUCHI, H.; YOSHIOKA, Y.; TAKESHITA, F.; MATSUKI, Y.; OCHIYA, T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17442-52, Jun 2010.

KRAUS, P. R.; FOX, D. S.; COX, G. M.; HEITMAN, J. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1377-87, Jun 2003.

KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011.

KRONSTAD, J. W.; HU, G.; JUNG, W. H. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol**, v. 21, n. 9, p. 457-65, Sep 2013.

KUMAR, P.; YANG, M.; HAYNES, B. C.; SKOWYRA, M. L.; DOERING, T. L. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. **Curr Opin Struct Biol**, v. 21, n. 5, p. 597-602, Oct 2011.

KWAK, P. B.; TOMARI, Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. **Nat Struct Mol Biol**, v. 19, n. 2, p. 145-51, Feb 2012.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, v. 257, n. 2, p. 213-8, Jul 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 574-87, Jun 2006.

KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; BOOTH, J. L.; VISHNIAC, H. S.; BENNETT, J. E. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 55, n. 8, p. 1751-4, Aug 1987.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biol**, v. 10, n. 3, p. R25, 2009.

LAU, S. K.; CHOW, W. N.; WONG, A. Y.; YEUNG, J. M.; BAO, J.; ZHANG, N.; LOK, S.; WOO, P. C.; YUEN, K. Y. Identification of MicroRNA-Like RNAs in Mycelial and Yeast Phases of the Thermal Dimorphic Fungus *Penicillium marneffeii*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2398, 2013.

LEE, H. C.; CHANG, S. S.; CHOUDHARY, S.; AALTO, A. P.; MAITI, M.; BAMFORD, D. H.; LIU, Y. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 274-7, May 2009.

LEE, H. C.; LI, L.; GU, W. *et al.* Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. **Mol Cell**, v. 38, n. 6, p. 803-14, Jun 2010.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec 1993.

LEMONS, D.; MAURYA, M. R.; SUBRAMANIAM, S.; MERCOLA, M. Developing microRNA screening as a functional genomics tool for disease research. **Front Physiol**, v. 4, p. 223, 2013.

LI, C.; VAGIN, V. V.; LEE, S. *et al.* Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 509-21, May 2009.

LI, L.; CHANG, S. S.; LIU, Y. RNA interference pathways in filamentous fungi. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 22, p. 3849-63, Nov 2010.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**, v. 7, n. 3, p. 186-96, May 2010.

LI, X.; CARTHEW, R. W. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. **Cell**, v. 123, n. 7, p. 1267-77, Dec 2005.

LIAN, T.; SIMMER, M. I.; D'SOUZA, C. A.; STEEN, B. R.; ZUYDERDUYN, S. D.; JONES, S. J.; MARRA, M. A.; KRONSTAD, J. W. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 55, n. 5, p. 1452-72, Mar 2005.

LIM, L. P.; LAU, N. C.; WEINSTEIN, E. G.; ABDELHAKIM, A.; YEKTA, S.; RHOADES, M. W.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. **Genes Dev**, v. 17, n. 8, p. 991-1008, Apr 2003.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 401-16, Jul 2009.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends Microbiol**, v. 17, n. 9, p. 406-13, Sep 2009.

LOFTUS, B. J.; FUNG, E.; RONCAGLIA, P. *et al.* The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1321-4, Feb 2005.

LUBERTO, C.; MARTINEZ-MARIÑO, B.; TARASKIEWICZ, D. *et al.* Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest**, v. 112, n. 7, p. 1080-94, Oct 2003.

LULLOFF, S. J.; HAHN, B. L.; SOHNLE, P. G. Fungal susceptibility to zinc deprivation. **J Lab Clin Med**, v. 144, n. 4, p. 208-14, Oct 2004.

MA, H.; CROUDACE, J. E.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2156-60, Nov 2006.

MA, H.; HAGEN, F.; STEKEL, D. J.; JOHNSTON, S. A.; SIONOV, E.; FALK, R.; POLACHEK, I.; BOEKHOUT, T.; MAY, R. C. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12980-5, Aug 4 2009.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009.

MACRAE, I. J.; ZHOU, K.; LI, F.; REPIC, A.; BROOKS, A. N.; CANDE, W. Z.; ADAMS, P. D.; DOUDNA, J. A. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. **Science**, v. 311, n. 5758, p. 195-8, Jan 2006.

MALLORY, A.; VAUCHERET, H. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. **Plant Cell**, v. 22, n. 12, p. 3879-89, Dec 2010.

MALONE, C. D.; BRENNECKE, J.; DUS, M.; STARK, A.; MCCOMBIE, W. R.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 522-35, May 2009.

MAMBULA, S. S.; SIMONS, E. R.; HASTEY, R.; SELSTED, M. E.; LEVITZ, S. M. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 68, n. 11, p. 6257-64, Nov 2000.

MANSOUR, M. K.; LEVITZ, S. M. Interactions of fungi with phagocytes. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 359-65, Aug 2002.

MEISTER, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. **Nat Rev Genet**, v. 14, n. 7, p. 447-59, Jul 2013.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1790-9, Jun 1999.

MI, S.; CAI, T.; HU, Y. *et al.* Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. **Cell**, v. 133, n. 1, p. 116-27, Apr 2008.

MILAM, J. E.; HERRING-PALMER, A. C.; PANDRANGI, R.; MCDONALD, R. A.; HUFFNAGLE, G. B.; TOEWS, G. B. Modulation of the pulmonary type 2 T-cell response to *Cryptococcus neoformans* by intratracheal delivery of a tumor necrosis factor alpha-expressing adenoviral vector. **Infect Immun**, v. 75, n. 10, p. 4951-8, Oct 2007.

MILLAR, A. A.; WATERHOUSE, P. M. Plant and animal microRNAs: similarities and differences. **Funct Integr Genomics**, v. 5, n. 3, p. 129-35, Jul 2005.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995.

MIYOSHI, K.; MIYOSHI, T.; SIOMI, H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. **Mol Genet Genomics**, v. 284, n. 2, p. 95-103, Aug 2010.

MOAZED, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 413-20, Jan 2009.

MOCCHEGIANI, E.; MUZZIOLI, M.; GIACCONI, R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 6, p. 205-8, Jun 2000.

MONTGOMERY, T. A.; HOWELL, M. D.; CUPERUS, J. T. *et al.* Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. **Cell**, v. 133, n. 1, p. 128-41, Apr 2008.

MOOSBRUGGER, E. A.; ADAMS, B. B.; KRALOVIC, S. M. Cutaneous cryptococcosis in a patient on corticosteroid therapy for rheumatoid arthritis. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 6, p. 630-2, Jun 2008.

MORENO, M. A.; IBRAHIM-GRANET, O.; VICENTEFRANQUEIRA, R.; AMICH, J.; AVE, P.; LEAL, F.; LATGE, J. P.; CALERA, J. A. The regulation of zinc homeostasis by

the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mol Microbiol**, v. 64, n. 5, p. 1182-97, Jun 2007.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat Methods**, v. 5, n. 7, p. 621-8, Jul 2008.

NAKAYASHIKI, H.; KADOTANI, N.; MAYAMA, S. Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. **J Mol Evol**, v. 63, n. 1, p. 127-35, Jul 2006.

NAKAYASHIKI, H.; NGUYEN, Q. B. RNA interference: roles in fungal biology. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 494-502, Dec 2008.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; GILGADO, F.; FAGANELLO, J.; LITVINTSEVA, A. P.; LEAL, A. L.; TSUI, K. M.; MITCHELL, T. G.; VAINSTEIN, M. H.; MEYER, W. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5862, 2009.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; PRICE, J.; SORRELL, T.; PERFECT, J. R.; MEYER, W. *Cryptococcus gattii* virulence composite: candidate genes revealed by microarray analysis of high and less virulent Vancouver island outbreak strains. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16076, 2011a.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; SERENA, C.; GILGADO, F.; MALIK, R.; MEYER, W. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 251-8, Feb 2011b.

NICOLÁS, F. E.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. Functional Diversity of RNAi-Associated sRNAs in Fungi. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 15348-60, 2013.

NICOLÁS, F. E.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. Loss and retention of RNA interference in fungi and parasites. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 1, p. e1003089, Jan 2013.

NOBILE, C. J.; NETT, J. E.; HERNDAY, A. D.; HOMANN, O. R.; DENEALD, J. S.; NANTEL, A.; ANDES, D. R.; JOHNSON, A. D.; MITCHELL, A. P. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. **PLoS Biol**, v. 7, n. 6, p. e1000133, Jun 2009.

NYHUS, K. J.; WILBORN, A. T.; JACOBSON, E. S. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 434-8, Feb 1997.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, v. 16, n. 10, p. 2576-89, May 1997.

OKADA, C.; YAMASHITA, E.; LEE, S. J.; SHIBATA, S.; KATAHIRA, J.; NAKAGAWA, A.; YONEDA, Y.; TSUKIHARA, T. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1275-9, Nov 2009.

OKAMURA, K.; LAI, E. C. Endogenous small interfering RNAs in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 9, p. 673-8, Sep 2008.

OLIVEIRA, D. L.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infect Immun**, v. 78, n. 4, p. 1601-9, Apr 2010.

OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G. H.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am J Pathol**, v. 164, n. 5, p. 1761-71, May 2004.

OSTERHOLZER, J. J.; SURANA, R.; MILAM, J. E. *et al.* Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **Am J Pathol**, v. 174, n. 3, p. 932-43, Mar 2009.

PAGANO, L.; FIANCHI, L.; LEONE, G. Fungal pneumonia due to molds in patients with hematological malignancies. **J Chemother**, v. 18, n. 4, p. 339-52, Aug 2006.

PALMITER, R. D.; FINDLEY, S. D. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. **EMBO J**, v. 14, n. 4, p. 639-49, Feb 1995.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 20 2009a.

PARK, M. Y.; WU, G.; GONZALEZ-SULSER, A.; VAUCHERET, H.; POETHIG, R. S. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 10, p. 3691-6, Mar 2005.

PARK, N. J.; ZHOU, H.; ELASHOFF, D.; HENSON, B. S.; KASTRATOVIC, D. A.; ABEMAYOR, E.; WONG, D. T. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 17, p. 5473-7, Sep 2009b.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 395-404, Sep 2005.

PERFECT, J. R.; WONG, B.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J.; WILLIAMSON, P. R. *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 79-86, 1998.

PERICOLINI, E.; CENCI, E.; MONARI, C.; DE JESUS, M.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A.; VECCHIARELLI, A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 267-75, Feb 2006.

PIETRELLA, D.; LUPO, P.; PERITO, S.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Disruption of CD40/CD40L interaction influences the course of *Cryptococcus neoformans* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 40, n. 1, p. 63-70, Jan 2004.

QI, Y.; HE, X.; WANG, X. J.; KOHANY, O.; JURKA, J.; HANNON, G. J. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 1008-12, Oct 2006.

RAFIQI, M.; ELLIS, J. G.; LUDOWICI, V. A.; HARDHAM, A. R.; DODDS, P. N. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. **Curr Opin Plant Biol**, v. 15, n. 4, p. 477-82, Aug 2012.

RAKESH, V.; SCHWEITZER, A. D.; ZARAGOZA, O.; BRYAN, R.; WONG, K.; DATTA, A.; CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E. Finite-element model of interaction between fungal polysaccharide and monoclonal antibody in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **J Phys Chem B**, v. 112, n. 29, p. 8514-22, Jul 2008.

RAMAN, V.; SIMON, S. A.; ROMAG, A.; DEMIRCI, F.; MATHIONI, S. M.; ZHAI, J.; MEYERS, B. C.; DONOFRIO, N. M. Physiological stressors and invasive plant infections alter the small RNA transcriptome of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 326, 2013.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUGVIE, A. E.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901-6, Feb 2000.

RINK, L.; HAASE, H. Zinc homeostasis and immunity. **Trends Immunol**, v. 28, n. 1, p. 1-4, Jan 2007.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Mol Microbiol**, v. 6, n. 22, p. 3343-53, Nov 1992.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS Microbiol Lett**, v. 153, n. 2, p. 265-72, Aug 1997.

SANGOKOYA, C.; DOSS, J. F.; CHI, J. T. Iron-responsive miR-485-3p regulates cellular iron homeostasis by targeting ferroportin. **PLoS Genet**, v. 9, n. 4, p. e1003408, Apr 2013.

SANTANGELO, R. T.; NOURI-SORKHABI, M. H.; SORRELL, T. C.; CAGNEY, M.; CHEN, S. C.; KUCHEL, P. W.; WRIGHT, L. C. Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. **J Med Microbiol**, v. 48, n. 8, p. 731-40, Aug 1999.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 12, p. 946-53, Dec 2004.

SCHNEIDER, R. E. O.; FOGAÇA, N. E. S.; KMETZSCH, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; STAATS, C. C. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43773, 2012.

SCHWARZ, D. S.; HUTVÁGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, Oct 2003.

SELKER, E. U. Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion? **Trends Genet**, v. 13, n. 8, p. 296-301, Aug 1997.

SHABALINA, S. A.; KOONIN, E. V. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. **Trends Ecol Evol**, v. 23, n. 10, p. 578-87, Oct 2008.

SHAO, X.; MEDNICK, A.; ALVAREZ, M.; VAN ROOIJEN, N.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **J Immunol**, v. 175, n. 5, p. 3244-51, Sep 2005.

SHI, M.; LI, S. S.; ZHENG, C.; JONES, G. J.; KIM, K. S.; ZHOU, H.; KUBES, P.; MODY, C. H. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1683-93, May 2010.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 569-82, Jun 2005.

SILVA, M. G.; SCHRANK, A.; BAILAO, E. F. *et al.* The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. **Front Microbiol**, v. 2, p. 49, 2011.

SIMM, C.; LUAN, C. H.; WEISS, E.; O'HALLORAN, T. High-throughput screen for identifying small molecules that target fungal zinc homeostasis. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25136, 2011.

SIOMI, H.; SIOMI, M. C. On the road to reading the RNA-interference code. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 396-404, Jan 2009.

SIOMI, M. C.; SATO, K.; PEZIC, D.; ARAVIN, A. A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 4, p. 246-58, Apr 2011.

SKOG, J.; WÜRDINGER, T.; VAN RIJN, S. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 12, p. 1470-6, Dec 2008.

SONG, J. J.; SMITH, S. K.; HANNON, G. J.; JOSHUA-TOR, L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1434-7, Sep 2004.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 7, p. 667-75, Jun 2003.

STEFANIDOU, M.; MARAVELIAS, C.; DONA, A.; SPILIOPOULOU, C. Zinc: a multipurpose trace element. **Arch Toxicol**, v. 80, n. 1, p. 1-9, Jan 2006.

STOCKS, M. B.; MOXON, S.; MAPLESON, D.; WOOLFENDEN, H. C.; MOHORIANU, I.; FOLKES, L.; SCHWACH, F.; DALMAY, T.; MOULTON, V. The UEA sRNA workbench: a suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. **Bioinformatics**, v. 28, n. 15, p. 2059-61, Aug 2012.

SUNKAR, R.; ZHU, J. K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 16, n. 8, p. 2001-19, Aug 2004.

TAKEDA, A.; IWASAKI, S.; WATANABE, T.; UTSUMI, M.; WATANABE, Y. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. **Plant Cell Physiol**, v. 49, n. 4, p. 493-500, Apr 2008.

THOMSON, T.; LIN, H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 25, p. 355-76, 2009.

TINOCO, M. L.; DIAS, B. B.; DALL'ASTTA, R. C.; PAMPHILE, J. A.; ARAGÃO, F. J. In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. **BMC Biol**, v. 8, p. 27, 2010.

TOFFALETTI, D. L.; DEL POETA, M.; RUDE, T. H.; DIETRICH, F.; PERFECT, J. R. Regulation of cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) expression in *Cryptococcus neoformans* by temperature and host environment. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 4, p. 1041-9, Apr 2003.

TOMARI, Y.; DU, T.; ZAMORE, P. D. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 299-308, Jul 2007.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; GUTIÉRREZ-GALLEGU, R. Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 1, p. 27-31, Mar 2008.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. O. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455-62, Aug 2008.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3165-70, Mar 2002.

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJÖSTRAND, M.; LEE, J. J.; LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 654-9, Jun 2007.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3394-400, Nov 2002.

VANBREUSEGHEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. **Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol**, v. 50, n. 6, p. 695-702, 1970.

VARTIVARIAN, S. E.; ANAISSIE, E. J.; COWART, R. E.; SPRIGG, H. A.; TINGLER, M. J.; JACOBSON, E. S. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **J Infect Dis**, v. 167, n. 1, p. 186-90, Jan 1993.

VAUCHERET, H. Plant ARGONAUTES. **Trends Plant Sci**, v. 13, n. 7, p. 350-8, Jul 2008.

VECCHIARELLI, A.; RETINI, C.; PIETRELLA, D.; MONARI, C.; KOZEL, T. R. T lymphocyte and monocyte interaction by CD40/CD40 ligand facilitates a lymphoproliferative response and killing of *Cryptococcus neoformans* in vitro. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 5, p. 1385-93, May 2000.

VECCHIARELLI, A.; RETINI, C.; PIETRELLA, D.; MONARI, C.; TASCINI, C.; BECCARI, T.; KOZEL, T. R. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. **Infect Immun**, v. 63, n. 8, p. 2919-23, Aug 1995.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y. P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4345-55, Oct 2009.

VOELZ, K.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 8, p. 3450-7, Aug 2009.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 6, p. 835-46, Jun 2010.

VOINNET, O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 669-87, Feb 2009.

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 5, p. 1381-96, Sep 2005.

WANG, X.; HSUEH, Y. P.; LI, W.; FLOYD, A.; SKALSKY, R.; HEITMAN, J. Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. **Genes Dev**, v. 24, n. 22, p. 2566-82, Nov 2010.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, n. 10, p. 3864-6, Oct 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect Immun**, v. 62, n. 7, p. 3004-7, Jul 1994b.

WATERS, B. M.; MCINTURF, S. A.; STEIN, R. J. Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. **J Exp Bot**, v. 63, n. 16, p. 5903-18, Oct 2012.

WAUGH, M. S.; NICHOLS, C. B.; DECESARE, C. M.; COX, G. M.; HEITMAN, J.; ALSPAUGH, J. A. Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 1, p. 191-201, Jan 2002.

WEIBERG, A.; WANG, M.; LIN, F. M.; ZHAO, H.; ZHANG, Z.; KALOSHIAN, I.; HUANG, H. D.; JIN, H. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. **Science**, v. 342, n. 6154, p. 118-123, Oct 2013.

WEINBERG, E. D. Iron and susceptibility to infectious disease. **Science**, v. 184, n. 4140, p. 952-6, May 1974.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 7, p. 600-5, Jul 2009.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855-62, Dec 1993.

WILLIAMSON, P. R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 180, n. 6, p. 1570-2, Mar 1998.

WILSON, D.; CITIULO, F.; HUBE, B. Zinc exploitation by pathogenic fungi. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 12, p. e1003034, Dec 2012.

WINTERS, M. S.; CHAN, Q.; CARUSO, J. A.; DEEPE, G. S., JR. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. **J Infect Dis**, v. 202, n. 7, p. 1136-45, Oct 1 2010.

WORMLEY, F. L.; PERFECT, J. R.; STEELE, C.; COX, G. M. Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. **Infect Immun**, v. 75, n. 3, p. 1453-62, Mar 2007.

WRIGHT, L. C.; PAYNE, J.; SANTANGELO, R. T.; SIMPANYA, M. F.; CHEN, S. C.; WIDMER, F.; SORRELL, T. C. Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Biochem J**, v. 384, n. Pt 2, p. 377-84, Dec 2004.

WU, C. Y.; BIRD, A. J.; CHUNG, L. M.; NEWTON, M. A.; WINGE, D. R.; EIDE, D. J. Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics**, v. 9, p. 370, 2008.

XIAO, C.; RAJEWSKY, K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 26-36, Jan 2009.

XIE, X.; LU, J. ; KULKOBAS, E.J.; GOLUB T, R.; MOOTHA,V. ; LINDBLAD-TOH, K.; LANDER, E.S. ; KELLIS, M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. **Nature**, v. 434, p. 338-45, Feb 2005a.

XIE, Z.; ALLEN, E.; FAHLGREN, N.; CALAMAR, A.; GIVAN, S. A.; CARRINGTON, J. C. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. **Plant Physiol**, v. 138, n. 4, p. 2145-54, Aug 2005b.

YANG, Q.; LI, L.; XUE, Z.; YE, Q.; ZHANG, L.; LI, S.; LIU, Y. Transcription of the major *Neurospora crassa* microRNA-like small RNAs relies on RNA polymerase III. **PLoS Genet**, v. 9, n. 1, p. e1003227, 2013.

YANG, X.; ZHANG, H.; LI, L. Global analysis of gene-level microRNA expression in *Arabidopsis* using deep sequencing data. **Genomics**, v. 98, n. 1, p. 40-6, Jul 2011.

YAUCH, L. E.; LAM, J. S.; LEVITZ, S. M. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 11, p. e120, Nov 2006.

YE, X.; PAROO, Z.; LIU, Q. Functional anatomy of the *Drosophila* microRNA-generating enzyme. **J Biol Chem**, v. 282, n. 39, p. 28373-8, Sep 2007.

YOO, B. C.; KRAGLER, F.; VARKONYI-GASIC, E.; HAYWOOD, V.; ARCHER-EVANS, S.; LEE, Y. M.; LOUGH, T. J.; LUCAS, W. J. A systemic small RNA signaling system in plants. **Plant Cell**, v. 16, n. 8, p. 1979-2000, Aug 2004.

YU, B.; YANG, Z.; LI, J.; MINAKHINA, S.; YANG, M.; PADGETT, R. W.; STEWARD, R.; CHEN, X. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. **Science**, v. 307, n. 5711, p. 932-5, Feb 2005.

ZARAGOZA, O.; CHRISMAN, C. J.; CASTELLI, M. V.; FRASES, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CASADEVALL, A. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2043-57, Oct 2008.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. **Infect Immun**, v. 71, n. 11, p. 6155-64, Nov 2003.

ZENG, Y.; YI, R.; CULLEN, B. R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 17, p. 9779-84, Aug 2003.

ZHANG, L.; HOU, D.; CHEN, X. *et al.* Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. **Cell Res**, v. 22, n. 1, p. 107-26, Jan 2012.

ZHANG, W.; GAO, S.; ZHOU, X.; XIA, J.; CHELLAPPAN, P.; ZHANG, X.; JIN, H. Multiple distinct small RNAs originate from the same microRNA precursors. **Genome Biol**, v. 11, n. 8, p. R81, 2010a.

ZHANG, Y.; LIU, D.; CHEN, X. *et al.* Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. **Mol Cell**, v. 39, n. 1, p. 133-44, Jul 2010b.

ZHANG, Z.; CHANG, S. S.; XUE, Z.; ZHANG, H.; LI, S.; LIU, Y. Homologous recombination as a mechanism to recognize repetitive DNA sequences in an RNAi pathway. **Genes Dev**, v. 27, n. 2, p. 145-50, Jan 2013.

ZHAO, H.; BUTLER, E.; RODGERS, J.; SPIZZO, T.; DUESTERHOEFT, S.; EIDE, D. Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. **J Biol Chem**, v. 273, n. 44, p. 28713-20, Oct 1998.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 6, p. 2454-8, Mar 19 1996a.

ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 38, p. 23203-10, Sep 20 1996b.

ZHOU, J.; FU, Y.; XIE, J.; LI, B.; JIANG, D.; LI, G.; CHENG, J. Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. **Mol Genet Genomics**, v. 287, n. 4, p. 275-82, Apr 2012a.

ZHOU, Q.; WANG, Z.; ZHANG, J.; MENG, H.; HUANG, B. Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. **Fungal Biol**, v. 116, n. 11, p. 1156-62, Nov 2012b.

ZHOU, Z. S.; ZENG, H. Q.; LIU, Z. P.; YANG, Z. M. Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. **Plant Cell Environ**, v. 35, n. 1, p. 86-99, Jan 2012c.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. A CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 1271-81, Nov 2003.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 1, p. 1-10, Oct 2004.

9. APÊNDICE

Tabela 11: Genes alvo em *C. gattii* R265 de miR-4.

Genes alvo no genoma de <i>C. gattii</i> R265 de miR-4
CNBG_0992 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_1069 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 predicted protein
CNBG_1733 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_2159 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 ATP-binding cassette transporter
CNBG_2572 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 rab GTPase activator
CNBG_3530 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 cytidine deaminase
CNBG_3756 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 predicted protein
CNBG_4436 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_5687 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_5917 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein

Tabela 12: Genes alvo em *Mus musculus* de miR-4.

Genes alvo em <i>Mus musculus</i> de miR-4.
<i>Mus musculus</i> pleiomorphic adenoma gene 1 (Plag1), mRNA.
<i>Mus musculus</i> basonuclin 2 (Bnc2), mRNA.
<i>Mus musculus</i> RIKEN cDNA 4932443I19 gene (4932443I19Rik), mRNA.
<i>Mus musculus</i> lactate dehydrogenase D (Ldhd), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
<i>Mus musculus</i> DENN/MADD domain containing 4A (Dennd4a), mRNA.
<i>Mus musculus</i> bromodomain and WD repeat domain containing 3 (Brwd3), mRNA.

Tabela 13: Genes alvo em *Homo sapiens* de miR-4.

Genes alvo em <i>Homo sapiens</i> de miR-4
<i>Homo sapiens</i> ectodysplasin A (EDA), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> ubinuclein 1 (UBN1), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> zinc finger and BTB domain containing 10 (ZBTB10), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (ARNT2), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> coiled-coil domain containing 34 (CCDC34), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> coiled-coil serine-rich protein 2 (CCSER2), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> complement component 5 (C5), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> ectodysplasin A (EDA), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> iens ectodysplasin A (EDA), transcript variant 5, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> F-box and leucine-rich repeat protein 7 (FBXL7), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> H3 histone, family 3A (H3F3A), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> heart development protein with EGF-like domains 1 (HEG1), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> KIAA1755 (KIAA1755), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> kinase suppressor of ras 2 (KSR2), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> l(3)mbt-like 1 (Drosophila) (L3MBTL1), transcript variant I, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 (MAP3K2), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp667N1113
<i>Homo sapiens</i> paraneoplastic Ma antigen family-like 2 (PNMAL2), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> PHD finger protein 6 (PHF6), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> phosphoglycerate mutase 1 (brain) (PGAM1), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> phosphoglycerate mutase family member 4 (PGAM4), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> polymerase (DNA directed) kappa (POLK), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> prostaglandin F receptor (FP) (PTGFR), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> prostaglandin F receptor (FP) (PTGFR), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> PX domain containing serine/threonine kinase (PXX), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> ring finger protein 144B (RNF144B), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> ring finger protein 213 (RNF213), transcript variant 3, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> suppressor of glucose, autophagy associated 1 (SOGA1), transcript variant 1,

mRNA.

Homo sapiens synaptojanin 2 (SYNJ2), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens synaptojanin 2 (SYNJ2), transcript variant 2, mRNA.

Homo sapiens v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (ABL2), transcript variant b, mRNA.

Homo sapiens v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (ABL2), transcript variant c, mRNA.

Homo sapiens v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (ABL2), transcript variant d, mRNA.

Homo sapiens v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (ABL2), transcript variant f, mRNA.

Homo sapiens v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (ABL2), transcript variant g, mRNA.

Homo sapiens v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (ABL2), transcript variant h, mRNA.

Homo sapiens v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (ABL2), transcript variant i, mRNA.

Homo sapiens YdjC homolog (bacterial) (YDJC), mRNA.

Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 10 (ZBTB10), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 10 (ZBTB10), transcript variant 2, mRNA.

Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 10 (ZBTB10), transcript variant 3, mRNA.

Homo sapiens zinc finger protein 562 (ZNF562), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens zinc finger protein 562 (ZNF562), transcript variant 2, mRNA.

Homo sapiens zinc finger protein 562 (ZNF562), transcript variant 3, mRNA.

Tabela 14:: Genes alvo em *C. gattii* R265 de miR-37.

Genes alvo em <i>C. gattii</i> R265 de miR-37
CNBG_0060 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_0299 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 nucleus protein
CNBG_0508 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 proteasome regulatory subunit 12
CNBG_0745 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_1009 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_1407 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_1617 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 SLY1 protein
CNBG_1665 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 glycosyl transferase
CNBG_1829 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
CNBG_2076 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_2104 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_2137 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_2175 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_2185 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 predicted protein
CNBG_2954 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_3202 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_3224 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 Na ⁺ /H ⁺ exchanger AnNHA1
CNBG_3486 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 drug:H ⁺ antiporter
CNBG_3834 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 GTP-binding family protein
CNBG_4026 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_4174 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_6146 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 predicted protein
<i>Cryptococcus gattii</i> pre-mRNA-processing protein 45
<i>Cryptococcus gattii</i> R265 sphingomyelin phosphodiesterase

Tabela 15: Genes alvo no genoma de *Mus musculus* de miR-37

Genes alvo em <i>Mus musculus</i> de miR-37
<i>Mus musculus</i> translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog-like (yeast) (Tomm40l), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
<i>Mus musculus</i> MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 (Mark1), mRNA.
<i>Mus musculus</i> syntaxin binding protein 1 (Stxbp1), transcript variant 1, mRNA
<i>Mus musculus</i> Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 (Rapgef4), transcript variant 4, mRNA
<i>Mus musculus</i> EH-domain containing 4 (Ehd4), mRNA.
<i>Mus musculus</i> neuronatin (Nnat), transcript variant 1, mRNA
<i>Mus musculus</i> neurotensin receptor 1 (Ntsr1), mRNA
<i>Mus musculus</i> SET domain containing (lysine methyltransferase) 7 (Setd7), mRNA
<i>Mus musculus</i> cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, <i>Drosophila</i>) (Celsr2), transcript variant 1, mRNA
<i>Mus musculus</i> RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1 (Rap1gds1), transcript variant 1, mRNA
<i>Mus musculus</i> acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 1 (Acnat1), mRNA
<i>Mus musculus</i> urocortin (Ucn), mRNA
<i>Mus musculus</i> predicted gene 20605 (Gm20605), non-coding RNA
<i>Mus musculus</i> thioredoxin reductase 3 (Txnrd3), transcript variant 1, mRNA
<i>Mus musculus</i> RIKEN cDNA 4931406B18 gene (4931406B18Rik), mRNA.
<i>Mus musculus</i> growth factor receptor bound protein 2-associated protein 2 (Gab2), transcript variant 1, mRNA
<i>Mus musculus</i> interleukin 4 receptor, alpha (Il4ra), mRNA
<i>Mus musculus</i> phosphorylase kinase, gamma 2 (testis) (Phkg2), mRNA
<i>Mus musculus</i> MAS-related GPR, member G (Mrgprg), mRNA.
<i>Mus musculus</i> RIKEN cDNA 4931406B18 gene (4931406B18Rik), mRNA.
<i>Mus musculus</i> DET1 and DDB1 associated 1 (Dda1), mRNA.
<i>Mus musculus</i> Janus kinase 3 (Jak3), transcript variant 2, mRNA.
<i>Mus musculus</i> trafficking protein, kinesin binding 1 (Trak1), mRNA.
<i>Mus musculus</i> AT rich interactive domain 5B (MRF1-like) (Arid5b), mRNA.
<i>Mus musculus</i> DOT1-like, histone H3 methyltransferase (<i>S. cerevisiae</i>) (Dot1l), mRNA.

Mus musculus AT rich interactive domain 5B (MRF1-like) (Arid5b), mRNA.

Mus musculus hairy and enhancer of split 7 (*Drosophila*) (Hes7), mRNA.

Mus musculus zinc finger and BTB domain containing 4 (Zbtb4), mRNA.

Mus musculus coiled-coil domain containing 43 (Ccdc43), mRNA.

Mus musculus trafficking protein particle complex 9 (Trappc9), transcript variant 5, mRNA.

Mus musculus interferon (alpha and beta) receptor 1 (Ifnar1), mRNA.

Mus musculus RAB11B, member RAS oncogene family (Rab11b), mRNA.

Mus musculus non-coding RNA, oocyte_piRNA3616, complete sequence.

Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1700001G01 product:unclassifiable, full insert sequence.

Mus musculus RIKEN cDNA 1700066B19 gene (1700066B19Rik), mRNA.

Mus musculus neurexin II (Nrxn2), transcript variant 2, mRNA.

Mus musculus stress-induced phosphoprotein 1 (Stip1), mRNA.

Mus musculus oxysterol binding protein (Osbp), mRNA.

Mus musculus hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor (Hif1an), mRNA.

Mus musculus paired box gene 2 (Pax2), mRNA.

Tabela 16: Genes alvo de miR-37 no genoma de *Homo sapiens*.

Genes alvo em <i>Homo sapiens</i> de miR-37
<i>Homo sapiens</i> von Willebrand factor A domain containing 1 (VWA1), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> DDB1 and CUL4 associated factor 8 (DCAF8), transcript variant 2, non-coding RNA
<i>Homo sapiens</i> pre-B-cell leukemia homeobox 1 (PBX1), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> synaptosomal-associated protein, 47kDa (SNAP47), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> DDB1 and CUL4 associated factor 8 (DCAF8), transcript variant 3, non-coding RNA.
<i>Homo sapiens</i> left-right determination factor 1 (LEFTY1), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> uncharacterized LOC388692 (LOC388692), non-coding RNA.

Homo sapiens SLFNL1 antisense RNA 1 (SLFNL1-AS1), non-coding RNA.

Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 11 (SAMD11), mRNA.

Homo sapiens heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1 (HS6ST1), mRNA.

Homo sapiens Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 (ARHGEF4), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens SPEG complex locus (SPEG), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens tetra-peptide repeat homeobox-like (TPRXL), non-coding RNA.

Homo sapiens ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 2 (ATP2B2), transcript variant 2, mRNA.

Homo sapiens ZBED3 antisense RNA 1 (ZBED3-AS1), non-coding RNA.

Homo sapiens ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 19 (ADAMTS19), mRNA.

Homo sapiens cDNA FLJ38900 fis, clone NT2NE2001021.

Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11 (PPP1R11), mRNA.

Homo sapiens peptidase inhibitor 16 (PI16), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens cDNA FLJ34451 fis, clone HLUNG2002303.

Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11 (PPP1R11), mRNA.

Homo sapiens forkhead box K1 (FOKK1), mRNA.

Homo sapiens Ras association and DIL domains (RADIL), mRNA

Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 18 (FBXL18), mRNA

Homo sapiens adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I (ADCYAP1R1), transcript variant 3, mRNA

Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain (TNFRSF10D), mRNA

Homo sapiens Ly6/neurotoxin 1 (LYNX1), transcript variant 4, mRNA

Homo sapiens cDNA FLJ32056 fis, clone NTONG2001619

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1, beta (LMX1B), transcript variant 1, mRNA

Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 114 (C9orf114), mRNA

Homo sapiens SH3-domain GRB2-like endophilin B2 (SH3GLB2), mRNA

Homo sapiens SPATA31 subfamily D, member 5, pseudogene (SPATA31D5P), non-coding RNA

Homo sapiens pregnancy up-regulated non-ubiquitously expressed CaM kinase (PNCK), transcript variant 1, mRNA

Homo sapiens paired box 2 (PAX2), transcript variant e, mRNA

Homo sapiens solute carrier family 25, member 45 (SLC25A45), transcript variant 3, mRNA

Homo sapiens solute carrier family 25, member 45 (SLC25A45), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens solute carrier family 25, member 45 (SLC25A45), transcript variant 2, mRNA.

Homo sapiens melanoma cell adhesion molecule (MCAM), mRNA

Homo sapiens KCNQ1 downstream neighbor (non-protein coding) (KCNQ1DN), non-coding RNA.

Homo sapiens harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain) (HRK), transcript variant 1, mRNA

Homo sapiens 5'-nucleotidase domain containing 3 (NT5DC3), mRNA

Homo sapiens uncharacterized LOC100507091 (LOC100507091), non-coding RNA

Homo sapiens cDNA FLJ30897 fis, clone FEBRA2005476

Homo sapiens gamma-glutamylamine cyclotransferase (GGACT), transcript variant 1, mRNA

Homo sapiens KIAA0247 (KIAA0247), mRNA

Homo sapiens sorting nexin 22 (SNX22), transcript variant 2, non-coding RNA

Homo sapiens pleckstrin homology domain containing, family O member 2 (PLEKHO2), transcript variant 1, mRNA

Homo sapiens pleckstrin homology domain containing, family O member 2 (PLEKHO2), transcript variant 2, mRNA

Homo sapiens coronin, actin binding protein, 2B (CORO2B), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), mRNA

Homo sapiens unc-51-like kinase 3 (*C. elegans*) (ULK3), mRNA

Homo sapiens mahogunin ring finger 1, E3 ubiquitin protein ligase (MGRN1), transcript variant 3, mRNA

Homo sapiens solute carrier family 38, member 7 (SLC38A7), mRNA

Homo sapiens zinc finger protein 469 (ZNF469), mRNA

Homo sapiens CTF18, chromosome transmission fidelity factor 18 homolog (*S. cerevisiae*) (CHTF18), mRNA

Homo sapiens RAS-like, family 10, member B (RASL10B), mRNA

Homo sapiens dephospho-CoA kinase domain containing (DCAKD), transcript variant 2, mRNA.

Homo sapiens WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 2 (WFIKKN2), mRNA

Homo sapiens BAH domain and coiled-coil containing 1 (BAHCC1), mRNA.

Homo sapiens dephospho-CoA kinase domain containing (DCAKD), transcript variant 2, mRNA.

Homo sapiens transmembrane channel-like 6 (TMC6), transcript variant 2, mRNA.

Homo sapiens myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, *Drosophila*);

translocated to, 1 (MLLT1), mRNA

Homo sapiens periaxin (PRX), transcript variant 1, mRNA

Homo sapiens epithelial membrane protein 3 (EMP3), mRNA.

Homo sapiens solute carrier family 52, riboflavin transporter, member 3 (SLC52A3), mRNA

Homo sapiens tocopherol (alpha) transfer protein-like (TTPAL), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5 (CD40), transcript variant 2, mRNA

Homo sapiens zinc finger protein 341 (ZNF341), mRNA

Homo sapiens tocopherol (alpha) transfer protein-like (TTPAL), transcript variant 3, mRNA

Homo sapiens EST from clone 208499, full insert

Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1I subunit (CACNA1I), transcript variant 1, mRNA.

Homo sapiens SET binding factor 1 (SBF1), mRNA

Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11 (PPP1R11), mRNA

Tabela 17: Genes alvo de milR-15 no genoma de *C. gattii* R265.

Genes alvo em *C. gattii* R265 de milR-15

CNBG_1211_Cryptococcus gattii R265 conserved hypothetical protein

CNBG_26910_Cryptococcus gattii R265 nicotinamide mononucleotide permease

CNBG_3284_Cryptococcus gattii R265 ATPase

Tabela 18: Genes alvo de miR-15 no genoma de *Mus musculus*.

Genes alvo em <i>Mus musculus</i> de miR-15
<i>Mus musculus</i> leukemia inhibitory factor (Lif), transcript variant 1, mRNA.
<i>Mus musculus</i> leukemia inhibitory factor (Lif), transcript variant 2, mRNA.
<i>Mus musculus</i> SMEK homolog 2, suppressor of mek1 (<i>Dictyostelium</i>) (Smek2), mRNA.
<i>Mus musculus</i> schlafen 1 (Slfn1), mRNA.
<i>Mus musculus</i> osteoglycin (Ogn), mRNA.
<i>Mus musculus</i> eukaryotic translation initiation factor 4A2 (Eif4a2), transcript variant 3, mRNA.
<i>Mus musculus</i> syntaphilin (Snph), mRNA.
<i>Mus musculus</i> PR domain containing 5 (Prdm5), mRNA.
<i>Mus musculus</i> transportin 2 (importin 3, karyopherin beta 2b) (Tnpo2), transcript variant 1, mRNA.
<i>Mus musculus</i> transportin 2 (importin 3, karyopherin beta 2b) (Tnpo2), transcript variant 2, mRNA.
<i>Mus musculus</i> PHD finger protein 8 (Phf8), transcript variant 2, mRNA.
<i>Mus musculus</i> interleukin 7 receptor (Il7r), mRNA.
<i>Mus musculus</i> PR domain containing 5 (Prdm5), mRNA.
<i>Mus musculus</i> transportin 2 (importin 3, karyopherin beta 2b) (Tnpo2), transcript variant 2, mRNA.
<i>Mus musculus</i> RIKEN cDNA 4933411E08 gene (4933411E08Rik), non-coding RNA.

Tabela 19: Genes alvo de miR-15 no genoma de *Homo sapiens*.

Genes alvo em <i>Homo sapiens</i> de miR-15
<i>Homo sapiens</i> RUN and SH3 domain containing 1 (RUSC1), transcript variant 9, non-coding RNA.
<i>Homo sapiens</i> lysine (K)-specific demethylase 2A (KDM2A), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> lysine (K)-specific demethylase 2A (KDM2A), transcript variant 2, non-coding RNA.
<i>Homo sapiens</i> lysine (K)-specific demethylase 2A (KDM2A), transcript variant 3, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> dishevelled associated activator of morphogenesis 1 (DAAM1), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> chromosome 16 open reading frame 52 (C16orf52), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 11 (ABCC11), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8 (SERPINB8), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> mediator complex subunit 16 (MED16), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> exosome component 7 (EXOSC7), transcript variant 2, non-coding RNA.
<i>Homo sapiens</i> ZFP41 zinc finger protein (ZFP41), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> mediator complex subunit 16 (MED16), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> exosome component 7 (EXOSC7), transcript variant 2, non-coding RNA.
<i>Homo sapiens</i> uroporphyrinogen decarboxylase (UROD), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> lysine (K)-specific demethylase 2A (KDM2A), transcript variant 3, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8 (SERPINB8), transcript variant 4, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> interleukin 7 receptor (IL7R), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> pim-1 oncogene (PIM1), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ51294 complete cds, highly similar to JmjC domain-containing histone demethylation protein 1A (EC 1.14.11.-).
<i>Homo sapiens</i> uroporphyrinogen decarboxylase (UROD), transcript variant 2, non-coding RNA.
<i>Homo sapiens</i> lysine (K)-specific demethylase 2A (KDM2A), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> dishevelled associated activator of morphogenesis 1 (DAAM1), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> ZFP41 zinc finger protein (ZFP41), transcript variant 2, mRNA.

Tabela 20: Genes alvo no genoma de *C. gattii* R265 de miR-46.

Genes alvo em <i>C. gattii</i> R265 de miR-46
CNBG_0384 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 predicted protein
CNBG_2558 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein
CNBG_4784 <i>Cryptococcus gattii</i> R265 conserved hypothetical protein, fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain-containing protein

Tabela 21: Genes alvo no genoma de *Mus musculus* de miR-46.

Genes alvo em <i>Mus musculus</i> de miR-46
<i>Mus musculus</i> sparc/osteonectin, cwcw and kazal-like domains proteoglycan 1 (Spock1), transcript variant 5, mRNA.
<i>Mus musculus</i> RAB11B, member RAS oncogene family (Rab11b), mRNA.
<i>Mus musculus</i> predicted gene 13752 (Gm13752), non-coding RNA.
<i>Mus musculus</i> ring finger protein 114 (Rnf114), mRNA.
<i>Mus musculus</i> gene trap locus 3 (Gtl3), mRNA.
<i>Mus musculus</i> nidogen 2 (Nid2), mRNA.

Tabela 22: Genes alvo de miR-46 no genoma de *Homo sapiens*.

Genes alvo em <i>Homo sapiens</i> de miR-46
<i>Homo sapiens</i> F-box and WD repeat domain containing 4 (FBXW4), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> syntaxin 3 (STX3), transcript variant 1, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> ras homolog family member F (in filopodia) (RHOF), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> zinc finger protein 136 (ZNF136), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 4, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 5, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 6, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 7, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 8, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> syntaxin 3 (STX3), transcript variant 2, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> zinc finger protein 136 (ZNF136), mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 3, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 7, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 14, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 12, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 13, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 11, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 10, mRNA.
<i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 9, mRNA.
