

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

Caracterização funcional de um fator de transcrição putativo de *Cryptococcus  
neoformans* potencialmente associado à patogênese

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANTONIA LUZIA LIMA DO NASCIMENTO**

Porto Alegre, junho de 2022

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

Caracterização funcional de um fator de transcrição putativo de *Cryptococcus neoformans* potencialmente associado à patogênese

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.

**ANTONIA LUZIA LIMA DO NASCIMENTO**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva

Coorientadora: Dra. Júlia Catarina Vieira Reuwsaat

Porto Alegre, junho de 2022

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos, coordenado pela Professora Lívia Kmetzsch, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por sempre me guiar pelos caminhos corretos para alcançar meus sonhos;

À professora Lívia Kmetzsch por aceitar ser minha orientadora e por toda sua paciência, carinho e dedicação;

Agradeço a minha coorientadora Júlia Reuwsaat que foi um anjo em minha vida durante o desenvolver deste trabalho;

Ao professor Charley Staats pela revisão do manuscrito e ensinamentos;

À professora Marilene Vainstein e ao professor Augusto Schrank pela confiança, preocupação e colaboração;

Ao meu colega de laboratório Heryk Motta por todo conhecimento compartilhado e carinho;

Aos meus amigos de laboratório Ana Perin, Daiane Falcão e Andrea Tavanti por me receberem tão bem, pelo carinho e ajuda durante o mestrado;

A todos os colegas do 222, 220, 219 e 217 por fazerem os meus dias mais felizes no laboratório durante a pandemia;

Em especial à Mayara e Val pela amizade, companheirismo e risadas diariamente;

À Mauren e Maria Eduarda que em pouco tempo de convivência deixaram boas lembranças;

Aos meus amigos de Porto Alegre em especial ao Pedro, Geovana, Maria, Fernanda e o grupo de oração por fazerem parte dessa etapa da minha vida;

Aos meus pais Luíza e Constantino por sempre apoiarem os meus sonhos e não medirem esforços para que sejam realizados;

Ao meu irmão André pelo apoio e amizade;

À minha família e amigos por apoiarem meus projetos de vida;

Agradeço ao PPGBCM, à UFRGS e os demais colegas, professores e funcionários que contribuem para a realização de pesquisa de excelência neste país;

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades .....	7
Lista de figuras .....	9
Resumo .....	10
Abstract .....	11
1. Introdução .....	12
1.1. Características gerais de <i>C. neoformans</i> .....	13
1.2 Fatores de virulência .....	14
1.2.1 Cápsula polissacarídica .....	14
1.2.2 Melanina.....	15
1.2.3 Desenvolvimento a 37°C.....	16
1.2.4 Patogênese e imunidade do hospedeiro .....	17
1.2.5 <i>Titan cells</i> .....	18
2. Objetivos .....	20
2.1 Objetivo geral .....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
3. Manuscrito: “Functional characterization of a <i>Cryptococcus neoformans</i> putative transcription factor potentially associated with pathogenesis” .....	21
4. Discussão.....	47
5 Conclusões.....	49
6. Perspectivas.....	50
7. Referências .....	51
8. Currículo resumido .....	56

## Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
CDC	do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Crz1	do inglês <i>calcineurin responsive zinc finger 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
h	Hora
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i> )
HOG	Glicerol de alta osmolaridade
IFN-γ	interferon gama, do inglês <i>interferon gamma</i>
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
M1	macrófagos tipo 1
M2	macrófagos tipo 2
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico

qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (do inglês <i>quantitative Polymerase chain reaction</i> )
s	Segundo
SNC	Sistema Nervoso Central
TF	Fator de transcrição (do inglês <i>transcription factor</i> )
Th1	T <i>helper</i> 1
Th2	T <i>helper</i> 2
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>

## Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de *C. neoformans* ..... 11

Figura 2. Células de *C. neoformans* com e sem cápsula polissacarídica..... 12

## Resumo

Entre os diversos fungos patogênicos de importância médica, um dos mais relevantes é *Cryptococcus neoformans*, agente causador da criptococose. Este fungo destaca-se pela sua capacidade de causar infecção no sistema nervoso central e por possuir diversos mecanismos de virulência. Para sobreviver e evadir o sistema imune do hospedeiro, esta levedura apresenta alguns determinantes de virulência essenciais, como a formação da cápsula polissacarídica, produção de melanina e desenvolvimento a 37°C. Outro fator importante é a formação de células gigantes (*Titan cells*), que é regulada negativamente pelo fator de transcrição (TF) Pdr802, o qual também influencia a fagocitose e espessura da cápsula de *C. neoformans*. Existem ainda muitos genes codificadores de TFs putativos cuja função é desconhecida, como o codificado pelo gene *CNAG\_01965*. Este gene contém um domínio de ligação ao DNA tipo Zn(2)-C6 e sua expressão é reprimida durante a formação de células gigantes. Nesse estudo, realizamos uma meta-análise de dados transcritômicos e verificamos que *CNAG\_01965* é diferencialmente expresso em diversas condições estressoras para *C. neoformans*. Uma análise de biologia de sistemas mostrou que *CNAG\_01965* e seus interatores estão relacionados à organização do peroxissomo ligada a produção de energia e resposta a estresse oxidativo, transporte transmembrana e atividade da enzima D-aminoácido oxidase. Além disso, identificamos na sequência regulatória de *CNAG\_01965* a presença de um sítio de ligação para os fatores de transcrição Crz1 e Pdr802, importantes reguladores da resposta a diferentes estresses em *C. neoformans*. Para melhor caracterizar a função desse gene na biologia de *C. neoformans*, foram construídos dois mutantes nulos independentes. Ambos apresentaram uma maior abundância de células com dimensões alteradas em condições que induzem a formação de células gigantes *in vitro*, porém não apresentaram nenhum defeito de crescimento nas condições estressoras testadas. Além disso, *CNAG\_01965* é importante para regulação do tamanho da cápsula de *C. neoformans*. O alvo deste estudo demonstra potencial para regular a virulência de *C. neoformans*, sendo relevante maiores análises para entender detalhes da sua função em *C. neoformans*.

## Abstract

Among pathogenic fungi of medical importance, one of the most relevance is *Cryptococcus neoformans*, the agent of cryptococcosis. This yeast stands out for its ability to cause infection in the central nervous system and to develop different mechanisms of virulence. To survive and evade the host's immune system, this pathogen presents essential virulence determinants, such the formation of a polysaccharide capsule, melanin production and development at 37°C. Another important factor is the formation of giant cells (*Titan cells*), which is negatively regulated by the transcription factor (TF) Pdr802, that also influences phagocytosis and capsule thickness of *C. neoformans*. There are still many genes encoding TFs whose function is unknown, such as the one encoded by the *CNAG\_01965*. *CNAG\_01965* contains a fungal-like Zn(2)-C6 DNA-binding domain and its expression is repressed during the formation of giant cells. In this study, a meta-analysis of transcriptomic data showed that *CNAG\_01965* is differentially expressed during stress conditions for *C. neoformans*. A system biology analysis revealed that *CNAG\_01965* and its interactors are related to peroxisome organization linked to energy production and response to oxidative stress, transmembrane transport and D-amino acid oxidase enzyme activity. Furthermore, we identified in the regulatory sequence of *CNAG\_01965* the presence of a binding site for the transcription factors Crz1 and Pdr802, important regulators of the response to different stresses in *C. neoformans*. To better characterize the function of this gene in the biology of *C. neoformans*, two independent null mutants were constructed. Both showed a greater abundance of cells with altered cell dimensions under conditions that induce the formation of giant cells *in vitro*, but did not show any growth defect under the tested stress conditions. Furthermore, *CNAG\_01965* is important for the regulation of *C. neoformans* capsule size. The target of this study can be important for cryptococcal virulence, and further analyzes are relevant to understand details of its function in *C. neoformans*.

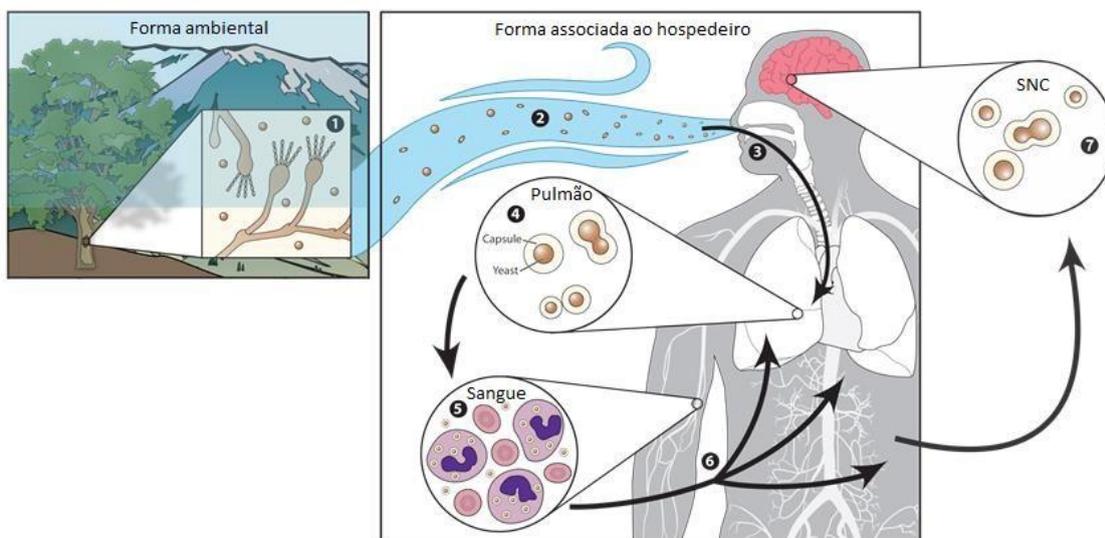
## 1. Introdução

*Cryptococcus neoformans* é um patógeno fúngico oportunista, agente causador da criptococose. Esta levedura encontra-se de forma onipresente no meio ambiente, causando doença grave em indivíduos imunocomprometidos (ZHAO; LIN, 2021).

A infecção por *C. neoformans* inicia-se através da inalação de esporos ou da levedura dessecada que se depositam nos pulmões. No ambiente pulmonar, células de *C. neoformans* podem ser facilmente eliminadas pelo sistema imune de pacientes saudáveis ou podem manter-se latentes por um extenso período. No contexto de imunossupressão, células da levedura podem disseminar para o sistema nervoso central (SNC), causando meningoencefalite com alta taxa de mortalidade (Figura 1) (ZHAO et al., 2019).

Nos diferentes cenários de infecções em que a população mundial convive atualmente, a criptococose tornou-se um problema de saúde pública, diante do que pode causar. De acordo com dados disponibilizados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), *C. neoformans* é uma das principais causas de morte em indivíduos acometidos pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e/ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), atingindo aproximadamente 223.000 casos de meningite criptocócica em todo o mundo anualmente e causando aproximadamente 181.000 mortes (PARK et al., 2009; RAJASINGHAM et al., 2017).

Este fungo encapsulado pode adaptar-se a diferentes condições ambientais, assim facilitando sua disseminação. Geralmente é encontrado em isolados de excretas de pombos ou em árvores, onde seus esporos podem ser inalados e causar uma possível infecção (MAZIARZ; PERFECT, 2016) (Figura 1).



**Figura 1. Ciclo de vida de *C. neoformans*.** *C. neoformans* no ambiente (1) geralmente em associação com árvores ou no solo. As leveduras desidratadas ou esporos (2) se dispersam no ar e podem ser inalados pelo hospedeiro (3). Na forma de levedura ou esporos podem alojar-se no tecido pulmonar. Os macrófagos alveolares fagocitam *C. neoformans*, o qual pode adquirir fenótipo de aumento do tamanho do corpo celular para sua proteção (4). Posteriormente, as leveduras dividem-se e multiplicam-se por brotamento. Depois de infectar os pulmões, células de *C. neoformans* podem alcançar a corrente sanguínea (5), disseminando pelo organismo (6) e atingindo o sistema nervoso central (7). (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

### 1.1. Características gerais de *C. neoformans*

O gênero *Cryptococcus* faz parte do grupo de fungos do filo Basidiomycota presentes no ambiente. Entre as diversas leveduras encontradas, há duas espécies que se destacam por causar doença em seres humanos: *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2015). *C. neoformans* infecta principalmente pacientes em estado imunossuprimido, o que difere de *C. gattii* que acomete indivíduos imunocompetentes, porém ambos podem causar meningoencefalite (NG CHEE PING, 2013).

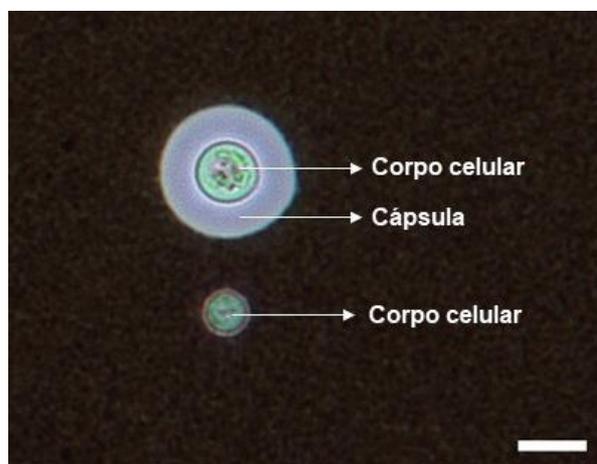
O modo de infecção e sobrevivência de *C. neoformans* no interior dos pulmões e disseminação para o cérebro do hospedeiro faz com que este fungo possua características singulares e importantes dentre os demais do mesmo gênero. A presença de uma cápsula polissacarídica, produção do pigmento melanina e fatores como a adaptação a altas temperaturas contribuem de forma

essencial para a resposta deste fungo frente ao sistema imunológico (GIBSON; JOHNSTON, 2015).

## 1.2 Fatores de virulência

### 1.2.1 Cápsula polissacarídica

Para sobrevivência e disseminação em diferentes ambientes e sob diversas condições, *C. neoformans* apresenta distintos determinantes de virulência. Entre um dos mais importantes, destaca-se a cápsula polissacarídica que desempenha um papel essencial na biologia deste fungo (Figura 2). A cápsula possui no ambiente a função de proteger contra agentes externos como a dessecação; já no hospedeiro humano, seu papel é modular o sistema imune, inibindo a fagocitose por macrófagos e desempenhando defesa para que consiga disseminar e causar infecção (CASADEVALL et al., 2019; MUSELIUS; DURAND; GEDDES-MCALISTER, 2021).



**Figura 2. Células de *C. neoformans* com e sem cápsula polissacarídica.** Microscopia óptica com nanquim para visualização da cápsula. Escala, 10  $\mu\text{m}$ .

A cápsula é composta por dois principais polissacarídeos: glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM). Há também, em menor quantidade, a presença de manoproteínas. Estes polissacarídeos atuam como moduladores de resposta imune (CHERNIAK; JONES; REISS, 1988;

ZARAGOZA, 2019). Esses componentes são sintetizados no interior da célula fúngica e transportados por vesículas. Além disso, as vesículas não carregam apenas polissacarídeos, mas também outros componentes que influenciam na virulência de *C. neoformans* como enzimas extracelulares e componentes da parede celular (OLIVEIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2007).

A espessura da cápsula pode ultrapassar o tamanho do corpo celular, isto vai depender da síntese de moléculas de polissacarídeos, que será induzida de acordo com o ambiente em que *C. neoformans* está inserido (CORDERO; BERGMAN; CASADEVALL, 2013; FRASES et al., 2009). Essa produção é provocada por estímulos específicos, como o baixo nível de glicose, hipóxia, reduzida quantidade de ferro e alterações de pH (SMITH et al., 2015; WANG; LI; DOERING, 2018).

A cápsula pode ser utilizada para identificação e diagnóstico da criptococose. A detecção do polissacarídeo capsular é realizada em ensaios sensíveis e específicos, utilizando líquido cefalorraquidiano de pacientes, majoritariamente. Dificilmente são encontradas células não encapsuladas desta levedura em amostras clínicas, demonstrando o papel e importância da cápsula (O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012).

### 1.2.2 Melanina

A melanina é um polímero associado à parede celular de *C. neoformans*, a qual contribui para a sobrevivência desta levedura. Este pigmento é produzido através da polimerização de compostos fenólicos e/ou indólicos, sendo carregados negativamente e hidrofóbicos (CASADEVALL et al., 2017).

Quando na presença de compostos difenólicos exógenos, como L-dopa, um substrato da enzima lacase (Lac), *C. neoformans* pode produzir melanina pela atividade de Lac1 e Lac2. Estas lacases são transportadas em vesículas secretoras e fixadas na parede celular através das camadas de quitinas ou são conduzidas para fora da célula (LEE et al., 2019).

A melanina possui papel fundamental na proteção contra oxidantes sintetizados pelas células imunes e contribui para diminuição da permeabilidade

da parede celular (MOMIN; WEBB, 2021). A deposição de melanina na parede celular fúngica colabora na inibição de fatores externos, como temperatura, exposição ao estresse oxidativo e metais pesados (CAMACHO et al., 2017).

Os mecanismos que regulam a produção de melanina ainda não são totalmente elucidados, mas há duas vias principais de sinalização para a sua produção em *C. neoformans*. A primeira é a via de AMP cíclico/proteína quinase A (cAMP/PKA) e segunda se dá pela resposta de glicerol de alta osmolaridade (HOG) (LEE et al., 2019). Quando a via de cAMP/PKA está alterada, há a redução da atividade de Lac1 e conseqüente diminuição da produção de melanina. Já a inibição da via HOG aumenta a produção de melanina e contribui para a sua produção em mutantes de componentes da via cAMP/PKA, fatores importantes para entender os processos de sinalização e síntese de melanina junto a patogenicidade de *C. neoformans* (BAHN et al., 2004; BAHN; GEUNES-BOYER; HEITMAN, 2007).

### 1.2.3 Desenvolvimento a 37°C

A resistência a altas temperaturas é um fator essencial para que *C. neoformans* consiga causar infecção no hospedeiro. Um dos primeiros estressores que este fungo encontra ao entrar em contato com o hospedeiro é o aumento da temperatura, onde é necessária uma adaptação de acordo com o ambiente em que este está presente (PERFECT, 2006). *C. neoformans* utiliza alguns fatores de resistência a alta temperatura para que consiga progredir com a infecção no organismo, entre os quais estão as propriedades ligadas ao açúcar trealose, produção de antioxidantes e vias de sinalização como a da calcineurina (WILSON, M.S. , METINK-KANE, 2012). A trealose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose ligada ao carbono 1 e tem como função proteger a célula de estresse interno e externo, aumentando a resistência à temperatura, impedindo a desnaturação de algumas proteínas (PETZOLD et al., 2006). A produção de antioxidantes é essencial para proteger a célula contra diferentes agressores, assim como a via de sinalização da calcineurina, onde a proteína serina/treonina fosfatase calcineurina é essencial para a sobrevivência de *C. neoformans* a 37°C (ODOM et al., 1997; STEMPINSKI et al., 2021).

A calcineurina é uma proteína fosfatase que depende do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, desempenhando atividade essencial em *C. neoformans*, como a regulação de resposta ao estresse, reprodução sexual e virulência (ARAMBURU; HEITMAN; CRABTREE, 2004; STEINBACH et al., 2007). A calcineurina é composta pela subunidade catalítica A (Cna1) e subunidade regulatória B (Cnb1) (ARAMBURU; HEITMAN; CRABTREE, 2004). Em resposta à sinais de estresse, os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da célula aumentam, este se liga à calmodulina e ambos a subunidade catalítica A, ativando a calcineurina (HEMENWAY; HEITMAN, 1999).

A calcineurina ativa fatores de transcrição como Crz1 (*calcineurin responsive zinc finger 1*) que induz a expressão de genes de respostas ao estresse no hospedeiro. Crz1 está localizado no citoplasma, onde a calcineurina o desfosforila e ocorre sua translocação para o núcleo (CHOW et al., 2017; PARK et al., 2016). Crz1 é um alvo da calcineurina que foi encontrado primeiramente em *Saccharomyces cerevisiae* (STATHOPOULOS; CYERT, 1997). Posteriormente, ortólogos de Crz1 foram encontrados em vários eucariotos (CRAMER et al., 2008; HIRAYAMA et al., 2003; THEWES et al., 2012). Em *C. neoformans*, a via de sinalização calcineurina-Crz1 controla a expressão de genes envolvidos em processos de oxidação-redução, metabolismo, integridade da parede celular, transporte de íons e moléculas (CHOW et al., 2017).

As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* podem se desenvolver em temperaturas acima de 30°C, com tolerância a altas temperaturas no ambiente e no interior do hospedeiro. Esta capacidade os diferenciam de muitas outras espécies de fungos que não são capazes de causar doença em mamíferos devido a incapacidade de sobreviver ao aumento da temperatura (MARTINEZ; GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001).

#### 1.2.4 Patogênese e imunidade do hospedeiro

A forma mais comum de infecção de *C. neoformans* é através da inalação de esporos ou células de levedura dessecadas que se depositam nos pulmões

do hospedeiro, podendo continuar de forma latente ou gerar uma invasão, ativando a resposta imune no organismo afetado (HOLE; WORMLEY, 2016). Em indivíduos imunocomprometidos, esta levedura pode provocar danos severos e irreversíveis, principalmente em pacientes com AIDS/HIV (PARK et al., 2009).

Na resposta imune do hospedeiro, o principal modo de defesa se dá pela ativação de macrófagos presente nos alvéolos pulmonares, os quais exercem o papel de fagocitose desses agentes infecciosos. Esta resposta de defesa tem o reforço das células dendríticas e também de eosinófilos (SETIANINGRUM; RAUTEMAA-RICHARDSON; DENNING, 2019). A resposta imune de linfócitos T *helper* 1 (Th1), caracterizada pela secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e recrutamento de macrófagos M1 é considerada protetora contra a criptococose (CHEN et al., 2008; STENZEL et al., 2009). Já a resposta majoritariamente mediada por linfócitos T *helper* 2 (Th2), caracterizada pela produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, ativação de macrófagos M2, eosinofilia pulmonar e aumento dos níveis de imunoglobulina E (IgE), é considerada prejudicial ao hospedeiro no combate à criptococose (CHEN et al., 2007; JAIN et al., 2009).

Células de *C. neoformans* fagocitadas por macrófagos podem ser eliminadas no local primário da infecção, assim como persistir e migrar para o cérebro no interior dos mesmos, através do mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”. Esse mecanismo é essencial para disseminação de *C. neoformans* e estabelecimento da meningoencefalite criptocócica, a forma mais grave e letal desta infecção (BICANIC; HARRISON, 2017; COLOMBO; RODRIGUES, 2015; SANTIAGO-TIRADO et al., 2017).

#### 1.2.5 Titan cells

A produção de *Titan cells* é importante para a virulência de *C. neoformans*. Esse morfotipo celular, conhecido pelo seu tamanho aumentado em comparação com as demais células de *C. neoformans*, ocorre quando há um crescimento acentuado tanto da cápsula quanto do corpo celular, tornando estas células gigantes. Células criptocócicas são consideradas gigantes quando o diâmetro do

corpo celular possui 10 µm ou mais ou quando o tamanho total incluindo a cápsula ultrapassa 30 µm (GARCIA-SANTAMARINA et al., 2019; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2018).

Alguns fatores favorecem a produção de células gigantes no hospedeiro, como a falta de nutrientes, baixo pH, hipóxia e diminuição da densidade celular (DAMBUZA et al., 2018). A formação de *Titan cells* é regulada por moléculas de *quorum sensing*, mecanismo de comunicação célula a célula de *C. neoformans*, no qual são liberadas moléculas de acordo com o crescimento populacional. A principal molécula envolvida neste mecanismo é a Qsp1 que está ligada a virulência de *C. neoformans* através da regulação da atividade de proteases, síntese da parede e replicação celular (HOMMEL et al., 2018).

No ambiente pulmonar, as células gigantes não conseguem ser fagocitadas pelas células imunes, permitindo a sobrevivência da levedura e assim desempenhando um papel importante na infecção pulmonar e patogenicidade de *C. neoformans* (OKAGAKI; NIELSEN, 2012).

O fator de transcrição Pdr802 regula negativamente a formação de *Titan cells*, exercendo importante função na virulência de *C. neoformans* (REUWSAAT et al., 2021). Foram realizadas análises de ChIP-Seq em um estudo anterior (REUWSAAT et al., 2021), onde foi verificado que o fator de transcrição Pdr802 interage diretamente com a região regulatória de *CNAG\_01965*, gene ainda não caracterizado em *C. neoformans*. Com isso, no presente estudo, foi realizado o levantamento de dados relacionados ao presente alvo e a busca para entender qual o papel de *CNAG\_01965* na patogênese de *C. neoformans*.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar a função do gene *CNAG\_01965* e elucidar sua participação na patogenicidade e virulência de *C. neoformans*.

### 2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Análise *in silico* da expressão diferencial de *CNAG\_01965*;

2.2.2. Busca por domínios de ligação de fatores de transcrição na região promotora do alvo;

2.2.3. Análise de enriquecimento funcional na rede de interação de *C. neoformans* para *CNAG\_01965*;

2.2.4. Geração de mutantes nulos de *CNAG\_01965*;

2.2.5. Ensaio fenotípico *in vitro* das linhagens selvagem e nulas para *CNAG\_01965*;

2.2.6. Avaliação de formação da cápsula polissacarídica e de células gigantes *in vitro* pelas linhagens selvagem e nulas para *CNAG\_01965*.

### **3. Manuscrito**

“Functional characterization of a *Cryptococcus neoformans* putative transcription factor potentially associated with pathogenesis”

Manuscrito será submetido à revista mSphere, após incorporação de experimentos adicionais.

1 **“Functional characterization of a *Cryptococcus neoformans* putative**  
2 **transcription factor potentially associated with pathogenesis”**

3

4 Antonia Luzia Lima do Nascimento<sup>a</sup>, Andrea Gomes Tavanti<sup>a</sup>, Heryk Motta<sup>a</sup>, Julia  
5 C. V. Reuwsaat<sup>a</sup>, Livia Kmetzsch<sup>a,b</sup>

6

7 <sup>a</sup>Molecular Biology of Pathogens Laboratory, Biotechnology Center,  
8 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

9 <sup>b</sup>Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do  
10 Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

11

## 12 **ABSTRACT**

13 The yeast *Cryptococcus neoformans* is the etiological agent of cryptococcosis, a  
14 disease that occurs mainly in immunocompromised patients. The mostly affected  
15 individuals are those with HIV/AIDS, leading to more than 181,000 deaths  
16 worldwide every year. The main traits associated with the clinical importance of  
17 this pathogen are related to several virulence determinants, such as the presence  
18 of a polysaccharide capsule and morphogenetic alterations that lead to titan cell  
19 formation. Such virulence determinants cause tissue damage and subvert the  
20 host immune system. The transcription factor (TF) Pdr802 is involved in the  
21 modulation of *C. neoformans* virulence, as it negatively regulates Titan cell  
22 formation, and influences the outcome of the interaction with macrophages.  
23 Among the genes repressed during the development of Titan cells, the TF coded  
24 by *CNAG\_01965*, which contains a Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain,  
25 is also regulated by Pdr802. Here, we functionally characterized *CNAG\_01965*  
26 and showed that null mutants of this gene presented high cell sizes compared to  
27 wild-type. Furthermore, no alteration in the sensitivity to cell wall stressors in the  
28 mutant cells was detected. Therefore, the TF coded by *CNAG\_01965* may play  
29 important roles in the production of Titan cells and *C. neoformans* pathogenicity.

## 30 **IMPORTANCE**

31 Considering the different infections which the world population currently faces,  
32 cryptococcosis may be considered a public health problem. Due to the production  
33 of several virulence determinants, *C. neoformans* is effective to infect some  
34 individuals, as well to easily adapt to different environmental conditions. As the  
35 mainly infected patients are those with compromised immune system, the  
36 development of effective antifungal strategies is necessary. Thus, the

37 understanding of mechanisms that regulate the production of such determinants  
38 may pave new roads for the development of more effective therapeutic targets.

39 **KEYWORDS**

40 *Cryptococcus neoformans*, fungi, pathogenesis, transcription factors, Titan cells.

## 41 INTRODUCTION

42 *Cryptococcus neoformans* is an opportunistic fungal pathogen and the  
43 etiologic agent of cryptococcosis, a disease mainly found in  
44 immunocompromised individuals (1). The infection is initiated by inhalation of  
45 desiccated yeasts or spores that are found in the environment, as in trees and  
46 pigeon droppings. Due to its small size, cryptococcal cells can reach the alveoli  
47 and start the lungs colonization, depending on the individual immune status and  
48 the place where this fungus settles (2). However, *C. neoformans* infection can  
49 reach the central nervous system, ultimately causing meningoencephalitis (3).  
50 Deaths from cryptococcal meningitis reaches more than 181,000 cases per year  
51 worldwide (4). Many individuals can remain with these *C. neoformans* cells in a  
52 latent form for years, and then cause infection in face of an immunosuppressed  
53 or immunocompromised state, as in the case of patients infected with the human  
54 immunodeficiency virus (HIV) (5).

55 The main characteristics associated with the clinical importance of this  
56 pathogen are related to the expression of virulence determinants, such as the  
57 production of a polysaccharide capsule and the formation of Titan cells (6). The  
58 polysaccharide capsule is one of the most important virulence factors of *C.*  
59 *neoformans* and is composed by glucuronoxylomannan (GXM),  
60 galactoxylomannan (GalGXM) and, to a lesser extent, mannoproteins. These  
61 components act by interfering with both phagocytosis and host immune  
62 responses (7). In addition, Titan cells are important mediators of cell survival  
63 during infection. Due to their increased cell body size (above 10  $\mu\text{m}$ ) compared  
64 to cells grown in routine laboratory conditions (5 to 10  $\mu\text{m}$ ), these cells have a

65 reduced chance of being internalized by phagocytes and increased surviving to  
66 different types of stress from the immune system (8,9).

67 *C. neoformans* can control the expression of virulence factors in response  
68 to the host environment through several pathways (10). To facilitate infection and  
69 adaptation within the host, this pathogen relies on a network of transcription  
70 factors (TFs). In fact, 17 among 155 functionally characterized TF are associated  
71 with virulence (11), among them is Crz1, a TF important for the maintenance of  
72 the plasma membrane and cell wall integrity, as well as calcium signaling (12).  
73 Furthermore, the transcription factor Pdr802, which, according to recent studies,  
74 negatively regulates the formation of Titan cells (giant cells), influencing survival  
75 and dissemination of *C. neoformans* (6,13,14).

76 The *CNAG\_01965* gene is one of the set of genes repressed during the  
77 development of Titan cells. It codes a predicted TF regulated by Pdr802 that  
78 contains a DNA-binding domain of the fungal type Zn(2)-C6. This study sought to  
79 analyze and characterize the function of the *CNAG\_01965*, a gene restricted to  
80 cryptococcal species. Employing system biology tools, we inferred the  
81 participation of its product in several biological processes. Null mutants of this  
82 gene exhibited altered cell size, allowing us to infer that there is a potential  
83 intersection among genes regulated by Pdr802, during titan cell formation and by  
84 *CNAG\_01965* product.

85

## 86 MATERIALS AND METHODS

### 87 Search for transcriptomic data from *CNAG\_01965*

88 The search in the literature for transcriptomic data in which the target gene  
89 appears among differentially expressed genes in various culture conditions was  
90 based on the FungiDB database (26).

91 226

### 92 Verification of transcription factor binding sites

93 The potential regulatory region of *CNAG\_01965* was defined as the 1000  
94 nucleotides upstream to the transcriptional start site (TSS). FungiDB was used to  
95 obtain the regulatory region of *CNAG\_01965*. We used Find Individual Motifs  
96 Occurrences (FIMO) to search for TFBS of Crz1 and Pdr802 (6,12) in the possible  
97 regulatory region of *CNAG\_01965*. The parameters used were standard and the  
98 FIMO results were filtered considering a p-value < 0.0001.

99 234

### 100 Functional enrichment analysis

101 The Cryptonet network was imported into Cytoscape software where the ClueGo  
102 plug-in was used to perform the functional enrichment analysis. The default  
103 parameters were applied for the analysis except for the selection to allow showing  
104 only pathways with p-value  $\leq 0.05$  and also to use fusion of "GO" terms. The  
105 selected ontologies belong to the Gene Ontology (GO) and correspond to  
106 biological processes, cellular components, and molecular function (27).

107242

### 108 Construction of deleted strains for *CNAG\_01965*

109 The generation of null mutants strains was performed using the method of Jung  
110 and collaborators (28) using the split marker methodology with the hygromycin B

111 resistance marker. Cells were routinely cultivated in YPD medium (2% [wt/vol]  
112 dextrose, 2% [wt/vol] Bacto peptone, and 1% [wt/vol] yeast extract in distilled  
113 water [dH<sub>2</sub>O]) or in YPD agar (YPD medium, 2% agar [wt/vol]). For the qRT-PCR  
114 experiments, the WT and null mutants strains were cultured in YPD at 30°C and  
115 stirring at 200 rpm for 15h. RNA were isolated using Trizol and all qRT-PCR  
116 procedures were performed as previously described (28).

117252

### 118 **Phenotypic characterization**

119 For the stress assays, *C. neoformans* cells were grown in YPD overnight, then  
120 washed with PBS and diluted to 10<sup>7</sup> cells/ml. 3 µl aliquots of 10-fold serial  
121 dilutions were plated in solid YPD plates supplemented with different stressors,  
122 such as sodium chloride (NaCl, 1 M), sorbitol (2 M), calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>, 200  
123 mM), caffeine (1 mg/ml), calcofluor white (CFW, 1.5 mg/ml and 0.5 mg/ml),  
124 congo red (5 mg/ml and 0.5 mg/ml) and in temperature variations at 30°C, 37°C  
125 and 37°C + 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours. After the incubation periods, plates were  
126 photographed.

127262

### 128 **Polysaccharide capsule**

129 To evaluate the capsule size, cells were cultured in YPD medium for 15h, washed  
130 with PBS, and incubated at 10<sup>6</sup> cells/ml in DMEM at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 and  
131 48h. After washing 2 times with PBS and fixed in paraformaldehyde, India ink  
132 was used to counterstain the polysaccharide capsule. A minimum of 50 cells of  
133 each strain were analyzed by microscopy and the total cell size and cell body size  
134 were measured with ImageJ (29). Capsule thickness was determined by

135 subtracting the total cell size from the cell body size and compared by one-way  
136 analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc multiple comparison test.

137272

### 138 **Titan cell**

139 Cells were pre-cultured in YNB without amino acids and 2% glucose for 15 h  
140 under agitation at 200 rpm and incubated in a 24-well plate with 1x PBS + 10%  
141 fetal bovine serum (FBS) for 72 h at 37°C + 5% CO<sub>2</sub> at OD<sub>600nm</sub> = 0.001. Cultures  
142 were washed with PBS and counterstained with India ink. At least 50 cells of each  
143 strain were evaluated for its size using ImageJ. For the statistical tests, one-way  
144 ANOVA with Dunnett's post hoc multiple comparison test was used (30).

145280

### 146 **CFU growth rating**

147 To evaluate the growth in tissue culture medium, cells were grown in YPD  
148 medium for 15 h, washed with PBS, and incubated at 10<sup>6</sup> cells/ml in DMEM in 24-  
149 well plates. Cells were incubated for 24, 48, and 72 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After  
150 the incubation time, the cells were recovered, diluted in PBS and plated in solid  
151 YPD for assessment of viability. After 48 h growth at 30°C, the colony-forming  
152 unit (CFU) was determined.

153288

### 154 **Acknowledgements**

155 We thank Dr. Charley Staats for comments and suggestions on the manuscript.  
156 This project has the support of the funding agencies Coordenação de  
157 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Conselho  
158 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and

159 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS,  
160 Brazil).

161296

## 162 **Conflicts of interest**

163 The authors declare no conflict of interest.

164299

## 165 **References**

- 166 1. Thinyane KH, Motsemme KM, Cooper VJL. Clinical Presentation,  
167 Aetiology, and Outcomes of Meningitis in a Setting of High HIV and TB  
168 Prevalence. *J Trop Med*. 2015;2015.
- 169 2. Momin M, Webb G. The environmental effects on virulence factors and  
170 the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. *Int J Mol Sci*.  
306 2021;22(12).
- 307 3. Zhao Y, Lin J, Fan Y, Lin X. MI73CH01\_Lin ARjats.cls Life Cycle of  
308 *Cryptococcus neoformans*. 2019;1–26.
- 309 4. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM,  
310 et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis:  
311 an updated analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017;17(8):873–81.
- 312 5. Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, et al.  
313 Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via  
314 Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. *Infect Immun*.  
315 2004;72(11):6753–6753.
- 316 6. Reuwsaat JCV, Agostinho DP, Motta H, Chang AL, Brown H, Brent MR,  
317 et al. The transcription factor Pdr802 regulates titan cell formation and  
318 pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *MBio*. 2021;12(2):1–20.

- 319 7. Casadevall A, Coelho C, Cordero RJB, Dragotakes Q, Jung E, Vij R, et al.  
320 The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*. 2019;10(1):822–31.
- 321 8. Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, et  
322 al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and  
323 pathogenicity. *PLoS Pathog*. 2010;6(6).
- 324 9. Zaragoza O, Rocío GR, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-  
325 Tudela JL, Casadevall A. Fungal cell gigantism during mammalian  
326 infection. *PLoS Pathog*. 2010;6(6).
- 327 10. Matsumoto Y, Azami S, Shiga H, Nagamachi T, Moriyama H, Yamashita  
328 Y, et al. Induction of signal transduction pathways related to the  
329 pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* in the host environment. *Drug*  
330 *Discov Ther*. 2019;13(4):177–82.
- 331 11. Jung KW, Yang DH, Maeng S, Lee KT, So YS, Hong J, et al. Systematic  
332 functional profiling of transcription factor networks in *Cryptococcus*  
333 *neoformans*. *Nat Commun*. 2015;6.
- 334 12. Chow EWL, Clancey SA, Billmyre RB, Averette AF, Granek JA,  
335 Mieczkowski P, et al. Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response  
336 transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus*  
337 *neoformans*. *PLoS Genet*. 2017;13(4):1–29.
- 338 13. Maier EJ, Haynes BC, Gish SR, Wang ZA, Skowrya ML, Marulli AL, et al.  
339 Model-driven mapping of transcriptional networks reveals the circuitry and  
340 dynamics of virulence regulation. *Genome Res*. 2015;125(5):690–700.
- 341 14. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG,  
342 Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal  
343 meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*. 2009;23(4):525–30.

- 344 15. FungiDB [Internet]. CNAG\_01965 hypothetical protein. [cited 2020 Aug  
345 19]. [https://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/CNAG\\_01965](https://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/CNAG_01965)
- 346 16. Trevijano-Contador N, de Oliveira HC, García-Rodas R, Rossi SA,  
347 Llorente I, Zaballos Á, et al. *Cryptococcus neoformans* can form titan-like  
348 cells *in vitro* in response to multiple signals. Vol. 14, PLoS Pathogens.  
349 2018.
- 350 17. Derengowski L da S, Paes HC, Albuquerque P, Tavares AHFP,  
351 Fernandes L, Silva-Pereira I, et al. The transcriptional response of  
352 *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and  
353 macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the  
354 mammalian host. *Eukaryot Cell*. 2013;12(5):761–74.
- 355 18. Quiles-Melero I, García-Rodríguez J. Systemic antifungal drugs. *Rev*  
356 *Iberoam Micol* [Internet]. 2021;38(2):42–6.
- 357 19. Lai YW, Pang CNI, Campbell LT, Chen SCA, Wilkins MR, Carter DA.  
358 Different Pathways Mediate Amphotericin-Lactoferrin Drug Synergy in  
359 *Cryptococcus* and *Saccharomyces*. *Front Microbiol*. 2019;10(October):1–  
360 12.
- 361 20. Bloom ALM, Jin RM, Leipheimer J, Bard JE, Yergeau D, Wohlfert EA, et  
362 al. Thermotolerance in the pathogen *Cryptococcus neoformans* is linked  
363 to antigen masking via mRNA decay-dependent reprogramming. *Nat*  
364 *Commun* [Internet]. 2019;10(1):1–13.
- 365 21. Haynes BC, Skowyra ML, Spencer SJ, Gish SR, Williams M, Held EP, et  
366 al. Toward an integrated model of capsule regulation in *Cryptococcus*  
367 *neoformans*. *PLoS Pathog*. 2011;7(12).
- 368 22. Lev S, Desmarini D, Chayakulkeeree M, Sorrell TC, Djordjevic JT. The

- 369 Crz1/Sp1 Transcription Factor of *Cryptococcus neoformans* Is Activated  
370 by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. PLoS One. 2012;7(12).
- 371 23. Thewes S. Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. Eukaryot Cell.  
372 2014;13(6):694–705.
- 373 24. Park HS, Chow EWL, Fu C, Soderblom EJ, Moseley MA, Heitman J, et al.  
374 Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence.  
375 PLoS Pathog. 2016;12(9):1–28.
- 376 25. Aramburu J, Heitman J, Crabtree GR. Calcineurin: A central controller of  
377 signalling in eukaryotes. Workshop on the calcium/calcineurin/NFAT  
378 pathway: Regulation and function. EMBO Rep. 2004;5(4):343–8.
- 379 26. Basenko EY, Pulman JA, Shanmugasundram A, Harb OS, Crouch K,  
380 Starns D, et al. FungiDB: An integrated bioinformatic resource for fungi  
381 and oomycetes. J Fungi. 2018;4(1):1–28.
- 382 27. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et  
383 al. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene  
384 ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics.  
385 2009;25(8):1091–3.
- 386 28. Jung KW, Lee KT, So YS, Bahn YS. Genetic Manipulation of  
387 *Cryptococcus neoformans*. Curr Protoc Microbiol. 2018;50(1):1–32.
- 388 29. ImageJ Software [Internet]. Available from: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- 389 30. Dambuza IM, Drake T, Chapuis A, Zhou X, Correia J, Taylor-Smith L, et  
390 al. The *Cryptococcus neoformans Titan cell* is an inducible and regulated  
391 morphotype underlying pathogenesis. PLoS Pathog. 2018;14(5):1–28.

392392

393 **TABLE**

394 **Table 1. Transcriptomic data of *CNAG\_01965*.** The *CNAG\_01965* gene  
 395 appears differentially expressed under different conditions influencing the  
 396 virulence and pathogenicity of *C. neoformans*.

Expression	Condition	Reference
Upregulated	WT37in X ccr4 37in	Bloom <i>et al.</i> 2019
	ccr4 30in X ccr4 37in	
Downregulated	ccr4 37poly X ccr4 30poly	Garcia-Santamarina <i>et al.</i> 2018
	WT37poly X ccr4 37poly	
Upregulated	WT Cu X WT BCS	Haynes <i>et al.</i> 2011
Downregulated	WT Cu X cuf1 Cu	
Upregulated	30°C cir1 X WT	Trevijano-Contador <i>et al.</i> 2018
Upregulated	37°C + CO <sub>2</sub> cir1 X WT	
Downregulated	Titan cells induction medium for 7 h	Derengowski <i>et al.</i> 2013
Downregulated	Titan cells induction medium for 18 h	
Upregulated	Macrophage internalization	Lai <i>et al.</i> 2019
Downregulated	Amphotericin B	
Downregulated	Amphotericin B + Lactoferrin	

397397

#### 4. Discussão

*C. neoformans* possui a capacidade de driblar o sistema imune por meio de diferentes mecanismos de virulência para sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Alguns mecanismos são essenciais para o estabelecimento da infecção, como a produção da cápsula, adaptação a diferentes temperaturas, deposição de melanina na parede celular e formação de células gigantes. O fator de transcrição Pdr802 regula negativamente a formação de células gigantes, sendo o aumento do tamanho do corpo celular um fator determinante para impedir a fagocitose por macrófagos (CASADEVALL; COELHO; ALANIO, 2018; REUWSAAT et al., 2021).

Análises de ChIP-Seq, realizadas em um estudo anterior (REUWSAAT et al., 2021), mostraram que o fator de transcrição Pdr802 interage diretamente com a região regulatória de *CNAG\_01965* e também foi revelada a presença de sítio de ligação para o TF Crz1 que está envolvido na resposta ao estresse em *C. neoformans*. O mutante nulo para Crz1 possui defeito de crescimento em condições estressoras da membrana e parede celular (PARK et al., 2016; THEWES, 2014), o que não foi observado para mutantes de *CNAG\_01965*. Os mutantes de componentes da via calcineurina-Crz1 estão envolvidos no transporte de cálcio, remodelamento da parede celular e produção de feromônios, onde suas expressões aumentam sob estresse térmico (CHOW et al., 2017). Entretanto, nenhuma associação clara de *CNAG\_01965* à Crz1 foi descrita ainda, sendo necessário maiores verificações.

Durante a análise de dados transcritômicos de *C. neoformans*, foi possível observar que *CNAG\_01965* é diferencialmente expresso em diversas condições que são importantes para virulência e patogenicidade de *C. neoformans*. Entre os estudos mais notáveis, *CNAG\_01965* foi encontrado diferencialmente expresso em resposta ao estresse térmico (BLOOM et al., 2019), homeostase de cobre (GARCIA-SANTAMARINA et al., 2019), regulação de cápsula (HAYNES et al., 2011), indução de células gigantes (TREVIJANO-CONTADOR et al., 2018), internalização por macrófagos murinos (DERENGOWSKI et al., 2013) e resposta a antifúngicos (LAI et al., 2019). Essas condições são importantes para a resposta direta ou indireta na virulência de *C. neoformans*, evidenciando que *CNAG\_01965* pode estar possivelmente envolvido em

diferentes respostas. Também foi verificado que a deleção do gene *CNAG\_01965* não influenciou o desenvolvimento das células fúngicas em ensaios de caracterização fenotípica frente a diferentes condições de estresse, sendo necessário mais ensaios com diferentes estressores.

Durante a formação de células gigantes, os mutantes apresentaram maior proporção de células com dimensões alteradas em comparação com o selvagem, demonstrando que *CNAG\_01965* pode estar envolvido na regulação deste fenótipo. As células gigantes possuem um papel essencial na patogênese de *C. neoformans*, por serem menos fagocitadas por macrófagos impedido a migração para o cérebro (GERSTEIN et al., 2015). A produção dessas células gigantes é regulada negativamente por Pdr802, o qual também influencia o tamanho da cápsula polissacarídica de *C. neoformans* (REUWSAAT et al., 2021). Nos mutantes de *CNAG\_01965* foram observados fenótipos similares, como a maior produção de células gigantes e células hipercapsulares, demonstrando uma possível ação conjunta de Pdr802 e *CNAG\_01965* na regulação desses dois importantes determinantes de virulência criptocócicos. No entanto, outros testes necessitam ser realizados para melhor caracterização deste alvo para que seja possível inferir qual o seu principal papel na virulência de *C. neoformans*.

## 5 Conclusões

5.1 *CNAG\_01965* é diferencialmente expresso em diversas condições estressoras para *C. neoformans*;

5.2 A região regulatória de *CNAG\_01965* possui motivos de ligação para os fatores de transcrição Pdr802 e Crz1;

5.3 *CNAG\_01965*, seu potencial interator direto e interatores indiretos estão vinculados à produção de energia e resposta a estresse oxidativo, transporte transmembrana e atividade da enzima D-aminoácido oxidase;

5.4 A deleção do gene *CNAG\_01965* não influenciou o crescimento de *C. neoformans* sob as diferentes condições de estresse testadas;

5.5 *CNAG\_01965* está envolvido na formação de células gigantes e na regulação do tamanho da cápsula polissacarídica de *C. neoformans*.

## **6. Perspectivas**

6.1 Construção do mutante complementado para *CNAG\_01965*;

6.2 Repetição dos ensaios de indução da formação de células gigantes e da cápsula polissacarídica com as linhagens selvagem, nulas e complementadas de *CNAG\_01965*;

6.3 Caracterização da parede celular e poliploidia das células gigantes formadas pelos mutantes para *CNAG\_01965*;

6.4 Ensaio de fagocitose com macrófagos J774.A1 para a avaliação da taxa de fagocitose e replicação intracelular das linhagens selvagem, nulas e complementadas de *CNAG\_01965*.

## 7. Referências

ARAMBURU, J.; HEITMAN, J.; CRABTREE, G. R. Calcineurin: A central controller of signalling in eukaryotes. Workshop on the calcium/calcineurin/NFAT pathway: Regulation and function. **EMBO Reports**, v. 5, n. 4, p. 343–348, 2004.

BAHN, Y. S. et al. Adenylyl cyclase-associated protein Aca1 regulates virulence and differentiation of *Cryptococcus neoformans* via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 6, p. 1476–1491, 2004.

BAHN, Y. S.; GEUNES-BOYER, S.; HEITMAN, J. Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase governs divergent patterns of the stress-activated Hog1 signaling pathway in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 12, p. 2278–2289, 2007.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal\_meningitis\_Sertraline. **Infection**, v. 78, n. 8, p. 99–118, 2017.

BLOOM, A. L. M. et al. Thermotolerance in the pathogen *Cryptococcus neoformans* is linked to antigen masking via mRNA decay-dependent reprogramming. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019.

CAMACHO, E. et al. N-acetylglucosamine affects *Cryptococcus neoformans* cell-wall composition and melanin architecture. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 163, n. 11, p. 1540–1556, 2017.

CASADEVALL, A. et al. Melanin, radiation, and energy transduction in fungi. **The Fungal Kingdom**, p. 509–514, 2017.

CASADEVALL, A. et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822–831, 2019.

CASADEVALL, A.; COELHO, C.; ALANIO, A. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-mediated host damage. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, p. 1–8, 2018.

**Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-gattii/causes.html>>. Acesso em: 18 fev. 2022.

CHEN, G. H. et al. Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in host defense against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection during murine allergic bronchopulmonary mycosis. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 1028–1040, 2007.

CHEN, G. H. et al. Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2379–2391, 2008.

CHERNIAK, R.; JONES, R. G.; REISS, E. Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by <sup>13</sup>C-N.M.R. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 172, n. 1, p. 113–138, 1988.

CHOW, E. W. L. et al. Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response

transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 4, p. 1–29, 2017.

COLOMBO, A. C.; RODRIGUES, M. L. Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis epidemic in HIV patients ( Armstrong-James et al . people die each year because of systemic fungal cryptococcosis presented in the last ( 9 th ) edition and Cryp. **An Acad Bras Cienc**, v. 87, n. 2 Suppl, p. 1293–1309, 2015.

CORDERO, R. J. B.; BERGMAN, A.; CASADEVALL, A. Temporal behavior of capsule enlargement by *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 10, p. 1383–1388, 2013.

CRAMER, R. A. et al. Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 7, p. 1085–1097, 2008.

DAMBUZA, I. M. et al. The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. 1–28, 2018.

DERENGOWSKI, L. DA S. et al. The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 5, p. 761–774, 2013.

FRASES, S. et al. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 4, p. 1228–1233, 2009.

GARCIA-SANTAMARINA, S. et al. **HHS Public Access**. v. 108, n. 5, p. 473–494, 2019.

GERSTEIN, A. C. et al. Polyploid Titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. **mBio**, v. 6, n. 5, p. 1–14, 2015.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 76–86, 2015.

HAYNES, B. C. et al. Toward an integrated model of capsule regulation in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, 2011.

HEMENWAY, C. S.; HEITMAN, J. Calcineurin: Structure, function, and inhibition. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 30, n. 1, p. 115–151, 1999.

HIRAYAMA, S. et al. Zinc finger protein Prz1 regulates Ca<sup>2+</sup> but not Cl<sup>-</sup> homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 18078–18084, 2003.

HOLE, C.; WORMLEY, F. L. Innate host defenses against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 202–211, 2016.

HOMMEL, B. et al. Titan cells formation in *Cryptococcus neoformans* is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative

genetic regulators. *Genetic*. [s.l: s.n.]. v. 14

JAIN, A. V. et al. Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5389–5399, 2009.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, p. 1–27, 2015.

LAI, Y. W. et al. Different Pathways Mediate Amphotericin-Lactoferrin Drug Synergy in *Cryptococcus* and *Saccharomyces*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. October, p. 1–12, 2019.

LEE, D. et al. Unraveling melanin biosynthesis and signaling networks in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 10, n. 5, p. 1–21, 2019.

MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3365–3367, 2001.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.

MOMIN, M.; WEBB, G. The environmental effects on virulence factors and the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2021.

MUSELIUS, B.; DURAND, S. L.; GEDDES-MCALISTER, J. Proteomics of *Cryptococcus neoformans*: From the lab to the clinic. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, 2021.

O'MEARA, T. R.; ANDREW ALSPAUGH, J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2576–2589, 1997.

OKAGAKI, L. H.; NIELSEN, K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 6, p. 820–826, 2012.

OLIVEIRA, D. L. et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1601–1609, 2010.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 2009.

PARK, H. S. et al. Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. 1–28, 2016.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: The yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 463–468, 2006.

- PETZOLD, E. W. et al. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5877–5887, 2006.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017.
- REUWSAAT, J. C. V. et al. The transcription factor Pdr802 regulates titan cell formation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 12, n. 2, p. 1–20, 2021.
- RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 1, p. 48–59, 2007.
- SANTIAGO-TIRADO, F. H. et al. Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a eukaryotic pathogen. **mBio**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2017.
- SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 57, n. 2, p. 133–150, 2019.
- SMITH, K. D. et al. *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, 2015.
- STATHOPOULOS, A. M.; CYERT, M. S. Calcineurin acts through factor to regulate gene expression in yeast. **Genes & development**, p. 3432–3444, 1997.
- STEINBACH, W. J. et al. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 418–430, 2007.
- STEMPINSKI, P. R. et al. Genetic contribution to high temperature tolerance in *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 217, n. 1, 2021.
- STENZEL, W. et al. IL-4/IL-13-dependent alternative activation of macrophages but not microglial cells is associated with uncontrolled cerebral cryptococcosis. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 2, p. 486–496, 2009.
- THEWES, S. et al. The calcineurin dependent transcription factor TacA is involved in development and the stress response of *Dictyostelium discoideum*. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 10, p. 789–799, 2012.
- THEWES, S. Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 6, p. 694–705, 2014.
- TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. **Eukaryotic Cell**. [s.l.: s.n.]. v. 14
- WANG, Z. A.; LI, L. X.; DOERING, T. L. Wall and capsule. **Glycobiology**, v. 28, n. 10, p. 719–730, 2018.
- ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019.

ZHAO, Y.; LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Sex, morphogenesis, and virulence. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, n. December 2020, p. 104731, 2021.

## 8. Currículo resumido

NASCIMENTO, A. L. L.

### 1. Dados pessoais

**Nome:** Antonia Luzia Lima do Nascimento

**Local e data de nascimento:** Piracuruca, Piauí, Brasil, 08 de julho de 1995.

**Endereço profissional:** Centro de Biotecnologia, avenida Bento Gonçalves, 9500, Setor 4, Prédio 43421, laboratório 222, Porto Alegre, RS; CEP 91501-970

**Telefone profissional:** +55 51 3308-6055; +55 51 3308-6077

**E-mail:** [antonaluzialimaa@gmail.com](mailto:antonaluzialimaa@gmail.com)

### 2. Formação

**Graduação:** Biomedicina, Universidade Federal do Piauí (UFPI). Período: 2015 – 2019.

Título: Avaliação da prevalência e perfil de malformações congênitas encontradas em recém-nascidos vivos no município de Parnaíba, Piauí, no período de 2016 a 2018.

Orientadora: Renata Canalle

**Pós-Graduação em andamento:** Mestrado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), UFRGS. Período: 2020-2022.

Título: Caracterização funcional de um fator de transcrição putativo de *Cryptococcus neoformans* potencialmente associado à patogênese.

Orientadora: Lívia Kmetzsch

Coorientadora: Júlia Reuwsaat

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

## 2.1. Formação complementar

**Curso de curta duração em “Hemograma, Anemia e Linfadenopatia”.** Carga horária: 30h. Período: 2020 – 2020. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil.

**Curso de curta duração em Biomedicina.** Carga horária: 10h. Período: 2020 – 2020. Associação Piauiense de Biomedicina, APBM, Brasil.

**Curso de curta duração em Curso de Hematologia.** Período: 2020 - 2020  
Carga horária: 4h. Nihon Kohden do Brasil Departamento IVD, NKBR, Brasil

**Workshop: Emergência Médica - Tríade Letal do Trauma em Hands On.**  
Carga horária: 4h. Período: 2019 – 2019. Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde, SBC Saúde, Goiania, Brasil.

**Curso de curta duração em Ciclo de Palestras em Análises Clínicas do Delta do Parnaíba.** Carga horária: 10h. Período: 2019 – 2019. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil.

**Curso de curta duração em Programa de Treinamento no uso do Portal de Periódicos da CAPES.** Carga horária: 2h. Período: 2018 – 2018. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasília, Brasil.

**Curso de curta duração em “Análise citológica do líquido cefalorraquidiano (LCR)”.** Carga horária: 4h. Período: 2017 – 2017. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil.

**Curso de curta duração em Técnicas em Ciências Morfológicas (Imunohistoquímica/Imunofluorescência).** Carga horária: 4h. Período: 2017 – 2017. Sociedade Brasileira de Anatomia, SBA, São Paulo, Brasil.

**Curso de curta duração em “O olhar Biomédico no âmbito da Fisiofarmacologia do trato gastrointestinal”.** Carga horária: 4h. Período: 2017 – 2017. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil.

**Curso de curta duração em Técnicas Anatômicas: Emblocamento.** Carga horária: 4h. Período: 2017 – 2017. Sociedade Brasileira de Anatomia, SBA, São Paulo, Brasil.

**Curso de curta duração em “Medidas de prevenção e diagnóstico das infecções sexualmente transmissível”.** Carga horária: 4h. Período: 2017 – 2017. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil.

## 3. Estágio e Monitoria

**Vínculo: Iniciação Científica Voluntária.** Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI), Brasil. Período: 2017 – 2018. Programa Institucional de Iniciação Científica Voluntária – ICV/UFPI.

Projeto: Estudo da associação do polimorfismo A-1438G no gene *5HT2A* e a dependência do álcool em uma população masculina no Nordeste do Brasil.

Orientadora: Renata Canalle

**Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica.** Instituição: Universidade Federal do Piauí (UFPI), Brasil. Período: 2018 – 2019.

Projeto: Prevalência e Perfil de Malformações Congênitas encontradas em recém-nascidos vivos no município de Parnaíba, Piauí, no período de 2016 a 2018.

Orientadora: Renata Canalle

Bolsista PIBIC CNPq/UFPI.

**Vínculo: Monitor.** Carga horária: 192h. Regime: Parcial. Período: 2019 – 2019. Programa de Monitoria da Universidade Federal do Piauí (UFPI), disciplina CMR0278 - Imunologia Médica.

**Vínculo: Monitor.** Carga horária: 192h. Regime: Parcial. Período: 2018 – 2018. Programa de Monitoria da Universidade Federal do Piauí (UFPI), disciplina Fundamentos de Análises de Alimentos.

**Vínculo: Monitor.** Carga horária: 192h. Regime: Parcial. Período: 2018 – 2018. Programa de Monitoria da Universidade Federal do Piauí (UFPI), disciplina CMR0299 - Práticas em Biomedicina IV.

**Vínculo: Monitor.** Carga horária 192h. Regime: Parcial. Período: 2017 – 2017. Programa de Monitoria da Universidade Federal do Piauí (UFPI), disciplina CMR0254 - Micologia.

#### 4. Prêmios e títulos

1º Lugar, Comunicação Oral. Título: O uso de vírus como vetores para técnicas de edição gênica (técnica de CRISPR/Cas9): vantagens e desvantagens, I Congresso Regional em Virologia, 2019.

1º Lugar, Comunicação Oral. Título: Prevalência e Perfil de Malformações Congênitas encontradas em recém-nascidos vivos no município de Parnaíba, Piauí, no período de 2016 a 2018., Universidade Federal do Piauí, 2019.

3º Lugar, Comunicação Oral. Título: "Importância da técnica de PCR em tempo real na detecção de infecções virais: uma revisão de literatura", I Congresso Regional em Virologia, 2019.

#### 5. Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. VASCONCELOS, V. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; SA, R. E.; COSTA, T. R. M.; OLIVEIRA, A. T. A importância da utilização de biossensores para detecção do papilomavírus

humano: uma revisão de literatura In: I Congresso Regional de Virologia, 2019, Teresina. Anais do I Congresso Regional de Virologia, 2019. Revista Eletrônica Acervo Saúde, 2019.

2. VASCONCELOS, V. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; OLIVEIRA, A. T.; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; SA, R. E.; COSTA, T. R. M. O uso de vírus como vetores para técnicas de edição gênica (técnica de CRISPR/Cas9): vantagens e desvantagens In: I Congresso Regional de Virologia, 2019, Teresina. Anais do I Congresso Regional de Virologia, 2019. Revista Eletrônica Acervo Saúde, 2019.

3. CARVALHO, B. L. L.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; NASCIMENTO, C. K. R.; VILARINHO, M. F. S. B.; SOARES, T. C.; MARTINS, V. B. D. Desenvolvimento de uma estratégia de cuidado nutricional para pneumonia: um estudo de caso In: III Congresso Internacional de Saúde Pública do Delta do Parnaíba - COPISP 2018, Luís Correia. Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde - RICS - ISSN: 2358-6966. 2018.

4. **NASCIMENTO, A. L. L.**; SILVA, E. E. R. E.; MOTTA, F. J. N.; SILVA JUNIOR, F. C.; CANALLE, R. Estudo da associação do polimorfismo A-1438G no gene 5HT2A e o alcoolismo em uma população masculina no Nordeste do Brasil. In: III Congresso Internacional de Saúde Pública do Delta do Parnaíba, 2018, Luís Correia-PI. Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde – RICS. ISSN: 2358-6966. 2018.

5. **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; CANALLE, R.; VASCONCELOS, V. R. M. Malformações congênitas em recém-nascidos vivos: uma revisão sistemática In: VI Encontro Piauiense de Biomedicina – IV EPBM, 2018, Teresina. Anais do VI Encontro Piauiense de Biomedicina – IV EPBM. 2018.

6. MELO, B. F.; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; VASCONCELOS, V. R. M.; DRUMOND, K. O. Gravidez ectópica em cicatriz de cesárea: uma revisão sistemática In: III Jornada Cearense de Ciências Morfológicas e I Encontro Brasileiro de Técnicas Anatômicas, 2017, Fortaleza. Anais da III Jornada Cearense de Ciências Morfológicas e I Encontro Brasileiro de Técnicas Anatômicas. 2017.

## 6. Apresentação de trabalho e palestra

1. VASCONCELOS, V. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; SA, R. E.; COSTA, T. R. M.; OLIVEIRA, A. T. A importância da utilização de biossensores para detecção do papilomavírus humano: uma revisão de literatura, 2019.

2. SA, R. E.; CARVALHO, B. L. L.; SANTOS, J. C.; MONTEIRO, L. D.; VASCONCELOS, V. R. M.; GOMES, T. N.; **NASCIMENTO, A. L. L.** Análise

comparativa da mortalidade por câncer do cólon, reto e ânus no Piauí e no Nordeste Brasileiro, no período de 2008 a 2018, 2019.

3. MONTEIRO, L. D.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; SANTOS, J. C.; SILVA, L. F.; SA, R. E.; PINHO, S. S.; GARCIA, Y. D. O. Análise da cobertura vacinal do Brasil no período 2015 a 2018, 2019.

4. COSTA, T. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; VASCONCELOS, V. R. M.; SA, R. E.; SILVA, F. D. S.; GOMES, T. N. Avaliação do risco de transmissão do Zika vírus (ZIKV) por transfusão sanguínea: uma revisão bibliográfica, 2019.

5. SALES, M. E. O.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; VASCONCELOS, V. R. M.; CARVALHO, K. M. C.; SA, R. E.; GOMES, T. N. Esclerose múltipla associada à infecção pelo Vírus Epstein-Barr (EBV): uma revisão de literatura, 2019.

6. **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; SALES, M. E. O.; VASCONCELOS, V. R. M.; SA, R. E.; GOMES, T. N. Importância da técnica de PCR em tempo real na detecção de infecções virais: uma revisão de literatura, 2019.

7. FERREIRA, N. C. C.; SA, R. E.; VASCONCELOS, V. R. M.; SILVA, F. D. S.; CARVALHO, B. L. L.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; SILVA, L. F. Incidência de neoplasia maligna da pele no estado do Piauí, no período de 2016 a 2018, 2019.

8. FERREIRA, N. C. C.; SA, R. E.; CUNHA, J. H.; CARVALHO, B. L. L.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; SILVA, F. D. S.; PINHO, S. S. Mortalidade por neoplasias malignas no Piauí, no período de 2000 a 2018, 2019.

9. SALES, M. E. O.; CARVALHO, B. L. L.; VASCONCELOS, V. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, K. M. C.; SA, R. E.; SILVA, K. M. R. O perfil epidemiológico das hepatites virais no estado do Piauí, 2019.

10. VASCONCELOS, V. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; SA, R. E.; COSTA, T. R. M.; OLIVEIRA, A. T. O uso de vírus como vetores para técnicas de edição gênica (técnica de CRISPR/Cas9): vantagens e desvantagens, 2019.

11. CARVALHO, B. L. L.; VASCONCELOS, V. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; SA, R. E.; SILVA JUNIOR, F. C.; MOTTA, F. J. N.; CANALLE, R. Perfil sociodemográfico e padrão de consumo de álcool de uma população de alcoolistas de Parnaíba – PI, 2019.

12. VASCONCELOS, V. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; SALES, M. E. O.; OLIVEIRA, D. V.; MELO, J. F. A importância de palestras e dinâmicas sobre sífilis na Educação de Jovens e Adultos (EJA) em escolas municipais de Parnaíba - PI, 2018.

13. VASCONCELOS, V. R. M.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; SALES, M. E. O.; MELO, J. F. Construção de atividades

didáticas para prevenção da sífilis na Educação de Jovens e Adultos (EJA) no município de Parnaíba-PI, 2018.

14. **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; NASCIMENTO, C. K. R.; VILARINHO, M. F. S. B.; SOARES, T. C.; MARTINS, V. B. D. Construção de um plano de cuidado nutricional para o tratamento de constipação intestinal: estudo de caso, 2018.

15. CARVALHO, B. L. L.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; NASCIMENTO, C. K. R.; VILARINHO, M. F. S. B.; SOARES, T. C.; MARTINS, V. B. D. Cuidado nutricional para o tratamento de insuficiência cardíaca: estudo de caso, 2018.

16. CARVALHO, B. L. L.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; NASCIMENTO, C. K. R.; VILARINHO, M. F. S. B.; SOARES, T. C.; MARTINS, V. B. D. Desenvolvimento de uma estratégia de cuidado nutricional para pneumonia: um estudo de caso, 2018.

17. MARTINS, V. B. D.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; NASCIMENTO, C. K. R.; VILARINHO, M. F. S. B.; SOARES, T. C. Elaboração de um plano dietético para o tratamento do diabetes mellitus do tipo dois: estudo de caso, 2018.

18. **NASCIMENTO, A. L. L.**; SILVA, E. E. R. E.; SILVA JUNIOR, F. C.; MOTTA, F. J. N.; CANALLE, R. Estudo da associação do polimorfismo A-1438G no gene *5HT2A* e o alcoolismo em uma população masculina no Nordeste do Brasil, 2018.

19. **NASCIMENTO, A. L. L.**; CANALLE, R. “Estudo da associação do polimorfismo A-1438G no gene *5HT2A* e a dependência do álcool em uma população masculina no Nordeste do Brasil.”, 2018.

20. NASCIMENTO, C. K. R.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; VILARINHO, M. F. S. B.; SOARES, T. C.; MARTINS, V. B. D. Implementação de estratégia nutricional para a recuperação de derrame pleural: um estudo de caso, 2018.

21. **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; VASCONCELOS, V. R. M.; CANALLE, R. Malformações congênitas em recém-nascidos vivos: uma revisão sistemática, 2018.

22. MARTINS, V. B. D.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; CARVALHO, B. L. L.; NASCIMENTO, C. K. R.; VILARINHO, M. F. S. B.; SOARES, T. C. Planejamento dietoterápico para paciente com colecistite aguda: estudo de caso, 2018.

23. SILVA JUNIOR, F. C.; ARAUJO, R. M. L.; SILVA, E. E. R. E.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; SARMENTO, A. S. C.; FERNANDES, H. F.; YOSHIOKA, F. K. N.; PINTO, G. R. Polimorfismos A-1438G e T102C no gene *HTR2A* e duplicação de 120pb no gene *DRD4* na dependência do álcool, 2018.

24. SANTOS, J. J.; SILVA, E. E. R. E.; ALVES, E. H. P.; SILVA JUNIOR, F. C.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; FARIAS, A. L. C. Transtorno do espectro autista e presença de endogamia no Nordeste Brasileiro, 2018.

25. MELO, B. F.; CARVALHO, B. L. L.; CARVALHO, K. M. C.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; VASCONCELOS, V. R. M.; DRUMOND, K. O. Gravidez ectópica em cicatriz de cesárea: uma revisão sistemática, 2017.

26. PEREIRA, H. S.; NOLETO, R. P.; **NASCIMENTO, A. L. L.**; MOTTA, F. J. N.; CANALLE, R. Perfil de malformações congênitas encontradas em recém-nascidos vivos no período de 2013 a 2015 em Parnaíba – PI, 2017.