

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

PAPEL DA HOMEOSTASE DE CÁLCIO NA PATOGÊNESE E SINALIZAÇÃO
CELULAR DE *Cryptococcus neoformans*

Dissertação de Mestrado

Eamim Daidrê Squizani

Porto Alegre, 2016

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

PAPEL DA HOMEOSTASE DE CÁLCIO NA PATOGÊNESE E SINALIZAÇÃO
CELULAR DE *Cryptococcus neoformans*

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.

Eamim Daidrê Squizani

Orientadora: Profª. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Porto Alegre, 2016.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Livia Kmetzsch Rosa e Silva por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, pela sua imensa dedicação, apoio, compreensão, e por ser sempre um exemplo de pessoa a ser seguido.

Ao meu co-orientador Charley Christian Staats, pela sua dedicação, paciência e auxílio em todas as etapas de meu mestrado.

À minha co-orientadora Marilene Henning Vainstein, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo apoio e por todo o incentivo durante o projeto.

Ao professor Augusto Schrank pelos ensinamentos, incentivo e contribuição no projeto.

Aos professores Augusto Schrank e Diego Bonatto, membros da minha comissão de acompanhamento.

À minha amiga e colega Vanessa Barcellos por todo o apoio carinho em todos os momentos.

Ao meu amigo e colega William Lopes por todo o carinho e colaborações.

À minha amiga, colega e iniciação científica Natalia Kronbauer de Oliveira por todo o auxílio e companheirismo.

Aos meus colegas do laboratório 220 e 217 por todo apoio e companheirismo.

À minha mãe Rosana Garcia Fiunte Squizani pelo imenso amor e carinho dedicados durante minha vida, por sempre acreditar no meu potencial e me apoiar nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai Benoni Luís Squizani pelo amor incondicional, por ser meu eterno exemplo de profissional e pelo imenso esforço em me oferecer uma educação de qualidade.

À minha irmã Samia Squizani pelo companheirismo e por ser meu suporte em Porto Alegre.

Ao Eduardo do Nascimento Martins por todo o amor e carinho, dedicação, incentivo e pelo auxílio na concretização de minha dissertação.

À UFRGS e ao PPGBCM por me proporcionarem essa oportunidade e pelo ensino de qualidade.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	V
Lista de figuras	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
1. Introdução	1
1.1 Aspectos Gerais	2
1.2 Virulência e Mecanismos de Disseminação	4
1.2.1 Cápsula polissacarídica	5
1.2.2 Desenvolvimento a 37 °C	7
1.2.3 Urease	8
1.2.4 Fosfolipase B	9
1.2.5 Ácido Hialurônico Sintase	11
1.2.6 Plasmina	12
1.2.7 Metaloprotease	12
1.2.8 Interação com Macrófagos	13
1.3 Via de Sinalização da Calcineurina	15
1.4 Mecanismos de Homeostase de Cálcio	19
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Manuscrito	23
4. Discussão	59
5. Conclusões	64
6. Perspectivas	65
7. Referências bibliográficas	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
cDNA	DNA complementar
CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
GTP	guanosina tri-fosfato
h	hora
HIV	vírus da imunodeficiência humana
mRNA	RNA mensageiro
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
RNA	ácido ribonucléico
RNA-seq	sequenciamento de RNA
rpm	rotações por minuto
RT-MMLV	transcriptase reversa do vírus da leucemia Maloney de camundongos
spp	espécies
CFU	unidades formadoras de colônia
Th1	linfócitos T helper 1
Th2	linfócitos T helper (auxiliar) 2
Kg	quilograma
mg	miligramas

μg microgramas

ng nanogramas

pmol picomol

mL mililitros

μL microlitros

μm micrometros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo infeccioso de <i>Cryptococcus</i>	3
Figura 2- Modelo transmigração de células de <i>C. neoformans</i> através da BHE	5
Figura 3- Cápsula polissacarídica de <i>C. neoformans</i>	7
Figura 4- Via de sinalização mediada pela secreção de Plb1 de <i>C. neoformans</i>	11
Figura 5- Interação entre <i>C. neoformans</i> e macrófagos	16
Figura 6- A via de sinalização mediada por calcineurina em <i>C. neoformans</i> regula o desenvolvimento a 37 °C, virulência e reprodução sexual, ativando diferentes alvos	18
Figura 7- Via de sinalização Ca ²⁺ /calcineurina	19
Figura 8- Transportadores de cálcio em <i>C. neoformans</i>	21

RESUMO

Cryptococcus neoformans é um patógeno humano oportunista e uma das principais causas de infecções fúngicas relacionadas à óbitos, especialmente em pacientes imunocomprometidos. O processo de infecção inicia-se com a colonização do tecido pulmonar, e posteriormente a levedura se dissemina pela via hematogênica até alcançar o sistema nervoso central (SNC), provocando meningite. A fim de transmigrar e alcançar o SNC, as células fúngicas devem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). O estabelecimento adequado da doença é dependente de diferentes fatores de virulência como a cápsula polissacarídica, a capacidade de se desenvolver a 37 °C, e outros fatores diretamente relacionados à transmigração como urease, fosfolipase B1 e ácido hialurônico sintase que são descritas como componentes essenciais para a habilidade de atravessar a BHE. O cálcio (Ca^{2+}) é um segundo mensageiro celular que atua na via de sinalização da calcineurina. Essa via em *C. neoformans* é necessária e responsável pela virulência e adaptação no hospedeiro. Além disso, a regulação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} é mediada pela ação de transportadores de cálcio como Pmc1 e Vcx1, os quais são foco de nossos estudos. Apesar de grandes avanços no entendimento dos mecanismos moleculares de infecção de *C. neoformans*, as opções terapêuticas ainda são escassas, por isso a elucidação de fatores que regulam a transmigração e a descoberta de novos alvos para fármacos é importante. Nesta dissertação foi demonstrado que os mutantes nulos para o transportador de cálcio Pmc1 (*pmc1*) e o duplo mutante *pmc1vcx1* são avirulentos em um modelo murino de infecção sistêmica e incapazes de acessar o SNC. Além disto, a deleção do gene *PMc1* causa alterações no perfil de expressão gênica da levedura, principalmente nas vias envolvidas com a transmigração e homeostase de Ca^{2+} . Genes relacionados com a atividade de urease, e envolvidos com o mecanismo paracelular de transmigração tiveram alterações no seu perfil de expressão. Considerando os dados obtidos, é comprovada a participação do transportador Pmc1 no processo de transmigração através da BHE e para o estabelecimento adequado da doença criptococose.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans an opportunistic human pathogen, is the main cause of fungal infections related to death, especially in immunocompromised patients. The infection starts with the colonization of the lung tissue, thereafter the yeast disseminates hematogenously to reach the central nervous system (CNS), causing meningoencephalitis. In order to transmigrate to CNS the fungal cells must cross the blood brain barrier (BBB). For infection establishment, *C. neoformans* relies on virulence factors, such as polysaccharide capsule, the ability to grow at 37 °C, and some factors directly related to transmigration. Enzymes as urease, phospholipase B and hyaluronic acid synthase are known as essential components to cross the BBB. The calcium (Ca^{2+}) is a cellular second messenger that participates on calcineurin signaling pathway. This pathway in *C. neoformans* is crucial and responsible for virulence and host adaptation. Moreover, the regulation of Ca^{2+} intracellular levels is coordinated by Ca^{2+} transporters such as Pmc1 and Vcx1, which are the main focus of our studies. Despite of many advances in understanding the molecular mechanisms of *C. neoformans* infection the available repertoire of antifungal drugs is still poor, therefore it is necessary to comprise the factors that regulate dissemination to CNS, and also unveil new targets for antifungal therapy. In the present study it was demonstrated through a murine model of systemic infection that the null mutants *pmc1* and *pmc1vcx1* are avirulent and unable to access the SNC. Besides, the disruption of *PMc1* gene leads to alterations on the gene expression profile, mainly in pathways involved with transmigration and calcium homeostasis. Genes related to urease activity, and connected to paracellular mechanism of transmigration had alterations on their expression profile. Taken together the result shows the requirement of Pmc1 transporter to transmigration events through BBB and for proper cryptococcosis establishment.

1.Introdução

Infecções fúngicas invasivas têm sido causa de grande preocupação devido a sua alta taxa de mortalidade. É estimado que mais de um milhão de pessoas morram por ano devido a essas infecções (Armstrong-James *et al.*, 2014), números comparáveis aos causados por malária e tuberculose (Park *et al.*, 2009). Mais de 90% das mortes relacionadas a infecções fúngicas são provocados por espécies pertencentes aos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, e *Pneumocystis* (Brown *et al.*, 2012).

O agente etiológico da meningite criptocócica é a levedura basidiomicética *Cryptococcus neoformans*, que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos (Horgan *et al.*, 1990; Park *et al.*, 2009), cuja importância médica aumentou drasticamente devido a pandemia da AIDS. Desde 1981, *Cryptococcus* têm sido uma das principais causas de morte de pacientes infectados com HIV (Casadevall e Perfect, 1998; Park *et al.*, 2009; Armstrong-James *et al.*, 2014), o que possui um grande impacto na saúde pública mundial. Dados da UNIAIDS demonstram que, em 2015, aproximadamente 36,7 milhões de pessoas estão infectadas com HIV. Ademais, é estimado que ocorram globalmente 1 milhão de casos de meningite criptocócica com aproximadamente 624 mil mortes anuais (Park *et al.*, 2009). Devido a seu impacto global e alta taxa de mortalidade, *C. neoformans* tornou-se importante alvo de estudo pela comunidade científica.

A disponibilidade da sequência genômica de *C. neoformans* (Loftus *et al.*, 2005) possibilitou o estudo avançado de mecanismos moleculares envolvidos com a virulência dessa levedura. Dessa forma, houve progressos na caracterização de alvos potenciais para terapias antifúngicas, mas a atual disponibilidade de fármacos ainda é escassa. Diferentes estudos têm demonstrado que componentes de vias de sinalização como a calcineurina e elementos da homeostase de cálcio possuem grande potencial como alvos para drogas antifúngicas (revisado por Liu *et al.*, 2015). Neste contexto, o presente estudo analisa a respeito da alteração da homeostase de cálcio e suas consequências na adaptação da levedura no hospedeiro, focando principalmente nos mecanismos necessários para a transmigração através da barreira hematoencefálica (BHE).

1.1 Revisão Literária

A levedura encapsulada *C. neoformans* pertencente ao filo Basidiomycota foi descrita primeiramente em 1894, mas apenas ganhou importância com a ocorrência da pandemia da AIDS. Com o crescente número de indivíduos imunocomprometidos houve um aumento drástico na incidência de criptococose (Idnurm *et al.*, 2005).

Baseado nas características antigênicas da cápsula polissacarídica, *Cryptococcus* está classificado em quatro sorotipos: A, B, C e D, apresentando diferentes distribuições geográficas e propriedades antigênicas (Lin e Heitman, 2006). Conforme esta classificação, *C. neoformans* var. *grubbi* (sorotipo A) (Franzot *et al.*, 1999) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Sorrell *et al.*, 1996) possuem distribuição mundial e acometem indivíduos imunocomprometidos ou sob tratamento com drogas imunossupressoras (Casadevall e Perfect, 1998). Mais recentemente, *Cryptococcus gattii* foi reconhecido como uma espécie separada (sorotipos B e C) (Kwon-Chung *et al.*, 2002). Esta acomete principalmente indivíduos imunocompetentes e é restrita a regiões tropicais e subtropicais (Sorrell *et al.*, 2001). No entanto, recentemente também foi registrado como epidemia em Vancouver, Canadá, região de clima temperado (Kidd *et al.* 2004).

Existem diferenças significativas na manifestação da patogênese de *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans*, apesar de causar infecção pulmonar, possui tropismo para o tecido cerebral provocando meningite, enquanto *C. gattii* está mais associado com doença pulmonar sem causar meningoencefalite (Chen *et al.*, 2000; Gallanis e Macdougall *et al.* 2010; Ngamskulrunroj *et al.*, 2012). Além disso, as principais fontes ambientais em que *C. neoformans* é isolado são o solo e excretas de pombos (Casadevall e Perfect 1998), ao passo que *C. gattii* está associado a árvores de eucaliptos (*Eucalyptus* spp.) e madeiras em decomposição (Sorrel *et al.*, 1996, 2001).

C. neoformans é isolado de pacientes e do ambiente na forma leveduriforme. No entanto, essa levedura pode passar por uma transição dimórfica, desenvolvendo-se na forma filamentosa através de duas vias distintas: *mating* e frutificação monocariótica. As duas vias resultam na formação de basidiósporos após o processo de meiose, que representam as partículas infecciosas (Idnurm *et al.*, 2005). O ciclo sexual (*mating*) em *C. neoformans* ocorre pela fusão de células haplóides de *matings* distintos (a e α) produzindo

filamentos dicarióticos (Kwon-Chung *et al.*, 1976; Nielsen *et al.*, 2003). Já durante a frutificação monocariótica as células respondem a um ambiente com limitação nutricional e sofrem diploidização de um mesmo *mating* (Lin e Heitman, 2006).

A infecção fúngica por *C. neoformans* inicia-se com a inalação de esporos ou células dessecadas que se depositam no pulmão. Essa infecção pode ser assintomática mediante a permanência das leveduras na forma latente no tecido pulmonar. Se, porventura, o indivíduo passar por um período de imunossupressão é possível que ocorra a reativação da forma latente, provocando a doença. Quando reativada, essa levedura é capaz de se disseminar por via hematogênica, podendo alcançar o sistema nervoso central (SNC) provocando meningite (Figura 1) (Lin e Heitman, 2006).

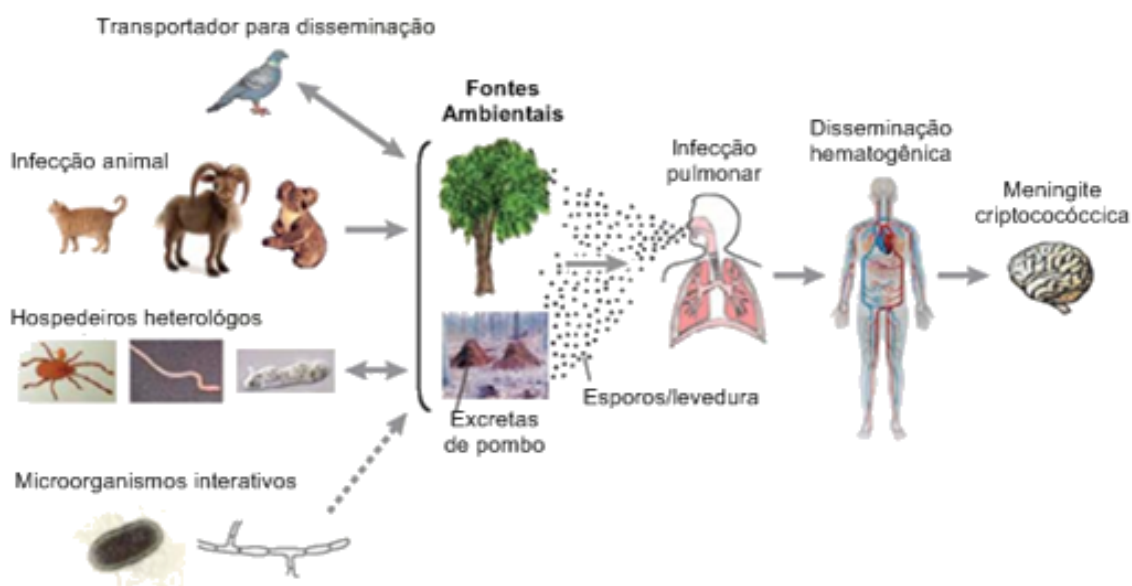


Figura 1 – Ciclo infeccioso de *Cryptococcus*. O fungo sobrevive no solo, principalmente em excretas de pombos (*C. neoformans*) ou em troncos de árvores (*C. gattii*). Os pombos são responsáveis pela dispersão global do fungo. *Cryptococcus* possui capacidade de infectar outros hospedeiros como gatos, cabras e coalas. Também pode sobreviver a predadores como insetos, vermes e amebas. Além disso, pode interagir com outros micro-organismos como bactérias ou outros fungos. Nos humanos a infecção inicia-se com a inalação de partículas infecciosas que se depositam no pulmão, as quais disseminam por via hematogênica até o SNC. Adaptado de Lin e Heitman, 2006.

O tratamento de infecções fúngicas e o desenvolvimento de novos fármacos têm sido um desafio devido a semelhanças na maquinaria celular dos fungos e humana (Idnurm *et al.*, 2005). Segundo o *Guidelines for Management of Cryptococcosis*, a intervenção terapêutica de pacientes HIV positivos infectados com *C. neoformans* baseia-se na administração de anfotericina B (0,7 - 1,0 mg/kg por dia, por via intravenosa) e flucitosina (100 mg/kg por dia, por via oral, dividida em 4 doses) por, pelo menos, 2-4 semanas, seguido de fluconazol (400- 800 mg/kg por dia, por via oral) por 8 semanas. A estratégia terapêutica pode diferir a cada caso e também para pacientes transplantados (Perfect *et al.*, 2010).

Mesmo com uma terapêutica bem estabelecida, é evidente a dificuldade de reversão da doença. Alguns estudos demonstram que o tratamento é efetivo em 50 a 80% dos casos, com toxicidade antifúngica associada a um terço destes (Bratton *et al.*, 2013). O antifúngico anfotericina B possui alta toxicidade, podendo provocar náusea, febre, hipertensão/hipotensão e hipóxia. Ademais, a nefrotoxicidade associada ao uso crônico de anfotericina B limita seu tempo de aplicação (Laniado-Laborín *et al.*, 2009; Hamill, 2013). É notável também, o crescente número de episódios de resistência a fluconazol, principalmente com recaídas no quadro de meningoencefalite (Bicanic *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2015). Neste contexto, se faz necessário novas alternativas terapêuticas buscando novos alvos, e também o reposicionamento de fármacos já utilizados na clínica que possuam um potencial antifúngico. Além disso, considerando a reincidência de meningite em pacientes em tratamento, também seria pertinente a utilização de fármacos que bloqueassem a transmigração para o SNC.

1.2 Virulência e Mecanismos de Disseminação

Para que *C. neoformans* instaure um quadro de infecção, incluindo a disseminação para o SNC, essa levedura depende da expressão de diferentes fatores referidos como fatores de virulência. Esses fatores de virulência são descritos como componentes de um patógeno que, quando ausentes, prejudicam fortemente a capacidade de estabelecer a doença (Casadevall e Pirofski, 2001). Alguns desses fatores já foram muito bem caracterizados como a elaboração da cápsula polissacarídica, melanização, habilidade de desenvolvimento a 37 °C, e secreção de enzimas como urease e fosfolipase B1 (Cox *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2001; Zhu & Williamson, 2004; McClelland *et al.*, 2006 Ma e May,

2009). Ademais, a secreção de enzimas como lacase e urease pode ser mediada pela ação de vesículas extracelulares, denominadas *virulence bags*, nas células ou tecidos do hospedeiro (Rodrigues *et al.*, 2008).

A fim de desenvolver efetivamente a meningoencefalite e acessar o parênquima cerebral, *C. neoformans* ainda necessita de alguns fatores específicos, os quais serão detalhados a seguir. Esses fatores podem atuar nos três potenciais mecanismos estabelecidos para atravessar a BHE. Células de *C. neoformans* podem transmigrar livremente através das células endoteliais cerebrais, pelos mecanismos transcelular ou paracelular. De outro modo, *C. neoformans* pode transmigrar dentro de fagócitos como macrófagos, constituindo o mecanismo de cavalo de tróia (Figura 2) (Chang *et al.*, 2004; Charlier *et al.*, 2009).

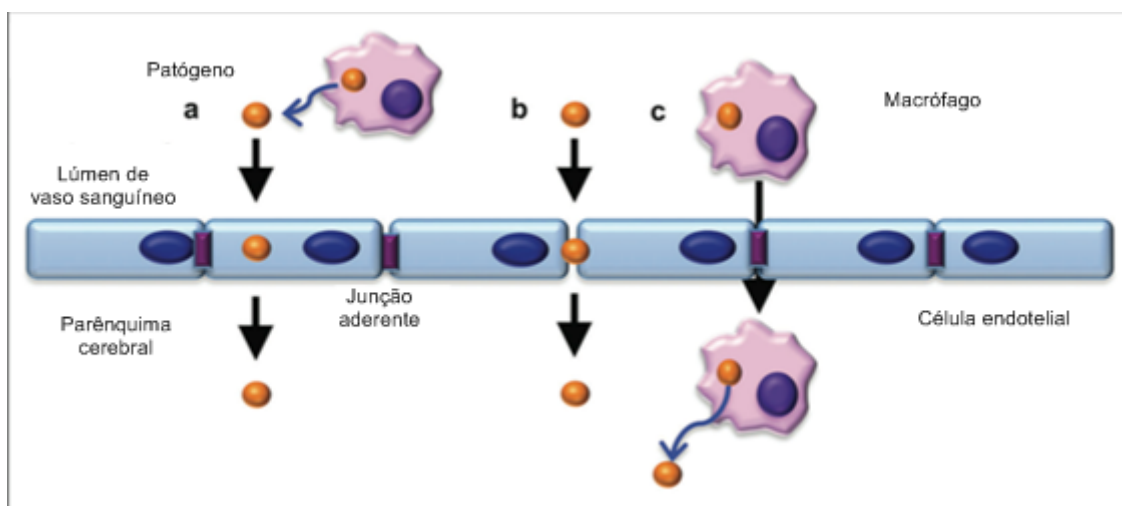


Figura 2- Modelo transmigração de células de *C. neoformans* através da BHE. *C. neoformans* se dissemina por via hematogênica dentro de fagócitos ou livremente. A invasão do SNC por transmigração através da BHE pode ocorrer por diferentes vias. Transcelular (a), na qual a levedura é endocitada pelas células endoteliais cerebrais. Paracelular (b), danificando as junções aderentes da BHE, ou por junções aderentes frouxas. Pelo mecanismo de cavalo de tróia (c), mediado por células fagocíticas, células de *C. neoformans* transmigram dentro de macrófagos, sendo que após a penetração os patógenos ficam livres dos fagócitos. Adaptado de Liu *et al.*, 2012.

1.2.1 Cápsula polissacarídica

Uma das características mais marcantes de *C. neoformans* é a presença de uma cápsula polissacarídica associada a parede celular (Figura 3). Como principais funções da

cápsula polissacarídica temos a proteção da levedura contra desidratação e atuação como barreira física contra fagocitose. Além disso, a cápsula é descrita como imunomoduladora no hospedeiro, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, inativando componentes do sistema complemento e reduzindo a migração de leucócitos no local da infecção (Bose *et al.*, 2003).

Esta cápsula é constituída por polissacarídeos, o que atribui uma característica altamente hidrofílica, além de conferir à cápsula uma carga geral negativa, em virtude da presença de resíduos de ácido glucurônico. Os principais constituintes polissacarídicos são glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM). A GXM consiste de uma cadeia principal linear de α (1,3)-manose e resíduos de β (1,2) ácido glucurônico ligados à cada primeira manose, o que forma o cerne principal. Os resíduos de manose podem ser O-acetilados e substituídos com xylose β (1,2) ou β (1,4) laterais (Cherniak e Sundstrom, 1994; Zaragoza *et al.*, 2009). Já a GalXM é constituída de α (1,6) galactose que forma o esqueleto principal, podendo apresentar ramificações 3-O-ligadas de α (1,3)-manose, α (1,4)-manose, β -galactosidase trissacarídica e um número variável de cadeias laterais xilosiladas (Vaishnav *et al.*, 1998; Zaragoza *et al.*, 2009). Aproximadamente 90-95% da massa capsular é composta de GXM, 5-8% de GalXM e uma pequena porção de manoproteínas (< 1%) (Zaragoza *et al.*, 2009).

A síntese da cápsula polissacarídica é complexa e depende da atividade de diferentes produtos gênicos. Genes *CAP* (*CAP59*, *CAP60*, *CAP10*, *CAP64*) quando deletados conferem um fenótipo de alteração da formação capsular e inabilitam a virulência (Chang e Kwon-Chung, 1994; Chang *et al.*, 1996; Chang e Kwon-Chung, 1998, 1999). Os genes *CAS* também foram descritos como necessários à síntese da cápsula e para virulência, por serem responsáveis pela acetilação de GXM (Moyrand *et al.*, 2004). A formação da estrutura capsular requer uma via biossintética complexa, sendo estimado que sejam necessárias pelo menos 12 glicosiltransferases para produção desses polissacarídeos (Klutts *et al.*, 2006). A atividade das glicosiltransferases compreende a transferência de um monossacarídeo para uma molécula aceptora. No caso da GXM as unidades básicas doadoras são UDP-ácido glucurônico, UDP-xilose e GDP-manose (Zaragoza *et al.*, 2009).

Acerca da relação da cápsula com a transmigração, sua estrutura polissacarídica

pode interferir direta ou indiretamente neste processo. No entanto, existem alguns conflitos a respeito de seu papel direto no acesso do SNC através da BHE. Alguns estudos demonstram que modificações na estrutura da cápsula e rápidas modificações no seu tamanho auxiliam na transmigração (Fries *et al.*, 2001; Charlier *et al.*, 2005). Contudo, estudos conduzidos mais recentemente com mutantes acapasulares e leveduras selvagens não evidenciaram diferença no perfil de transmigração (Shi *et al.*, 2010; Sabiiti e May, 2012). Ainda assim, a cápsula é o fator de virulência mais proeminente de *C. neoformans*. Além disso, a cápsula polissacarídica está diretamente relacionada com a suscetibilidade de fagocitose por parte da levedura, e isso está intimamente relacionado com o acesso ao SNC e o estabelecimento da doença (Sabiiti *et al.*, 2014; Bojarczuk *et al.*, 2016).

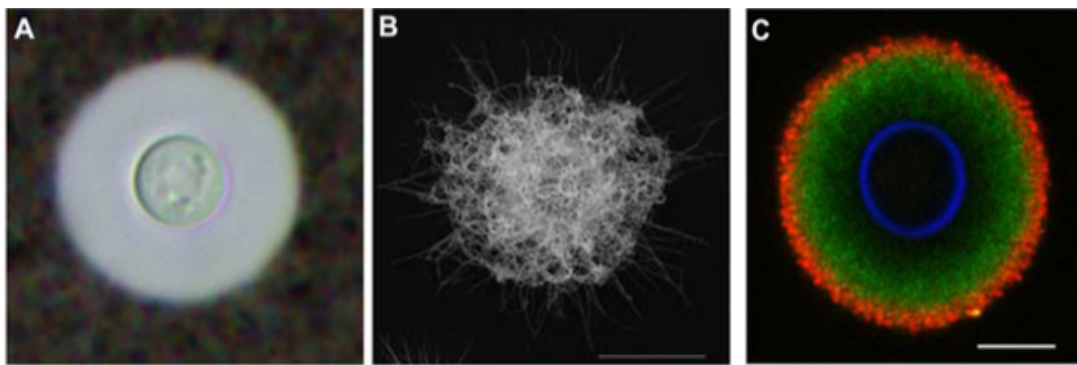


Figura 3- Cápsula polissacarídica de *C. neoformans* visualizada por diferentes métodos. A. Célula de *C. neoformans* corada com tinta da china e visualizada por microscopia óptica. B. Imagem gerada por microscopia eletrônica de varredura evidenciando fibras de polissacarídeo que compõe a cápsula. C. Imagem realizada por meio de imunofluorescência demonstrando a cápsula marcada com anticorpos específicos (vermelho e verde). Em azul a parede celular marcada com *Calcofluor White*. Figura adaptada de Zaragoza *et al.*, 2009.

1.2.2 Crescimento a 37 °C

A habilidade de desenvolvimento a 37 °C é uma característica essencial para um patógeno humano como *C. neoformans*. Essa levedura demonstrou possuir ótimo e máximo crescimento em temperaturas de 32 e 40 °C, respectivamente (Perfect, 2006). Todavia, existem variações na capacidade de crescimento a 37 °C, em que *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) demonstra uma melhor tolerância a altas temperaturas, quando comparado a *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) (Martinez *et al.*, 2001).

Diversos genes necessários à adaptação a 37 °C já foram identificados e validados através de estudos moleculares (Perfect, 2005). Ciclosporina, um fármaco inibidor da fosfatase calcineurina, possui atividade anti-criptococócica a 37 °C mas não a 30 °C. Como reforço, o mutante nulo para o gene *CNA1*, o qual codifica calcineurina, não se apresenta viável a 37 °C e não é patogênico em um modelo de infecção *in vivo* (Odom *et al.*, 1997). Outro componente da rota de sinalização da calcineurina, o gene *CTS1* (*calcineurin temperature suppressor*) foi estudado, sendo que sua disrupção resultou em um fenótipo sensível à temperatura fisiológica de 37 °C (Fox *et al.*, 2001).

Estudos identificando genes regulados pela exposição a temperatura de 37 °C, mas não necessariamente essenciais ao desenvolvimento a 37 °C, foram realizados. Uma análise do perfil transcricional por hibridização em microarranjos demonstrou 49 genes diferencialmente expressos induzidos pela exposição à temperatura de 37 °C. Dentre eles o fator de transcrição MGA2, envolvido na síntese de ácidos graxos, sugere que o remodelamento de membranas é importante para adaptação a altas temperaturas (Kraus *et al.*, 2004). Similarmente, outro estudo foi realizado no intuito de identificar genes diferencialmente expressos a 37 °C, através de Análise da Diferença Representacional (RDA). Este estudo descreveu 29 genes regulados positivamente, com algumas sobreposições a análise por microarranjos de Kraus *et al.*, 2004 (Rosa e Silva *et al.*, 2008). Estes genes se relacionam ao estresse, integridade de membrana e parede celular, e metabolismo celular básico (Rosa e Silva *et al.*, 2008).

1.2.3 Urease

A atividade de urease é um importante fator de virulência para diferentes bactérias (Ma e May, 2009). Além disto, a maioria dos isolados clínicos de *C. neoformans* possui atividade de urease positiva, que atualmente é reconhecida como um importante fator de virulência para essa levedura. A urease é capaz de hidrolisar uréia em amônia e carbamato, o que resulta na elevação do pH no local (Steenbergen e Casadevall, 2003). Ademais, a urease não utiliza uréia exclusivamente, podendo utilizar outros substratos como fonte de nitrogênio, os quais podem afetar o perfil de expressão do gene codificador de urease *URE1* (Singh *et al.*, 2013).

Em *C. neoformans*, a urease é uma apoenzima, que requer a atividade de três

proteínas acessórias, Ure4, Ure6 e Ure7. É notável também que a urease é uma enzima metalocêntrica, que demanda Níquel (Ni^{2+}), sendo dependente do transportador de Ni^{2+} Nic1 para exercer sua atividade catalítica. Por fim, Ure7 foi descrita como uma proteína ligadora de Ni^{2+} , por possuir um domínio conservado rico em histidinas, dessa forma sendo responsável pela incorporação de Ni^{2+} na apoenzima (Singh *et al.*, 2013).

A disrupção do gene *URE1* evidenciou a importância dessa enzima na virulência em infecções de murinos (Cox *et al.*, 2000). Têm sido amplamente demonstrado o papel da atividade de urease na disseminação da doença. Comprovou-se que Ure1 não é essencial para o crescimento no cérebro nem detenção das leveduras nos capilares cerebrais, no entanto, a capacidade de atravessar esses capilares é dependente de Ure1, provavelmente através de danos causados as junções aderentes das células endoteliais cerebrais, promovendo a transmigração paracelular (Olszewski *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010). Isso foi demonstrado de maneira muito clara, através da técnica de *spinning disk confocal* dos capilares da microcirculação cerebral de camundongos (Shi *et al.*, 2010).

Quanto à interação patógeno-hospedeiro, Ure1 apresenta atividade imunomoduladora. A expressão de Ure1 está associada com a polarização de uma resposta imune Th2, que é uma resposta não protetora relacionada com a permanência de *C. neoformans* no hospedeiro, além de interferir com o padrão de citocinas produzidas por leucócitos. Ademais, a urease de *C. neoformans* interfere no fenótipo de células dendríticas, aumentando o número de células imaturas, sendo este padrão relacionado com uma polarização de resposta Th2. Finalmente, a expressão de urease está associada com uma menor taxa de eliminação das células fúngicas do tecido pulmonar (Osterholzer *et al.*, 2009).

1.2.4 Fosfolipase B

Fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam ligações de glicerofosfolipídeos, os quais estão presentes abundantemente nas membranas celulares. Sua atividade pode resultar na desestabilização das membranas, lise celular e liberação de mensageiros secundários lipídicos (Santangelo *et al.*, 1999; Ghannoum, 2000). A fosfolipase B (Plb1) é a enzima mais caracterizada e relacionada com a virulência. Em *C. neoformans*, um único gene *PLB1* codifica para Plb1, sendo que esta fosfolipase possui

atividade de fosfolipase B, lisofosfolipase hidrolase e lisofosfolipase transacilase (Ghannoum, 2000; Cox *et al.*, 2001; Ganedren *et al.*, 2006). Plb1 é secretada pela levedura, em função da presença de um peptídeo sinal de secreção na sua porção terminal, que é crucial para que seja liberado de maneira adequada (Djordjevic, 2010).

A deleção de *PLB1* resulta em uma linhagem hipovirulenta em modelos *in vivo* de infecção com menor disseminação para o SNC, e menor sobrevivência dentro de macrófagos. Essa menor sobrevivência nos macrófagos se relaciona com a inabilidade de degradar a membrana do fagossomo, dessa forma não há expansão celular da levedura (Cox *et al.*, 2001). Além disso, pressupõe-se que também auxilie *C. neoformans* a escapar por extrusão de dentro dos macrófagos (Djordjevic, 2010). Ademais Plb1, por meio da clivagem de dipalmitoil fosfatidilcolina, um dos principais surfactantes pulmonares, facilita o estabelecimento da levedura no tecido pulmonar (Steenbergen e Casadevall, 2003). Reforçando sua importância no tecido pulmonar, Plb1 desempenha um papel significativo na adesão às células epiteliais pulmonares (Ganedren *et al.*, 2006).

Recentemente, foi elucidada a importância que Plb1 exerce na disseminação para o SNC foram descritos. Um estudo realizado com células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (HBMEC) mostra que Plb1 secretada por *C. neoformans* contribui com a ativação de Rac1 do hospedeiro e sua interação com STAT3. A proteína Rac1 é importante para o rearranjo do citoesqueleto de actina, o que promove a endocitose. Já STAT3 é um fator de transcrição, mas no citoplasma auxilia e interage com GTP-Rac1. Propõe-se que Plb1 gera mediadores lipídicos específicos, como fosfoinositóis, que promovem a ativação de Rac1 (Figura 4) (Maruvada *et al.*, 2012).

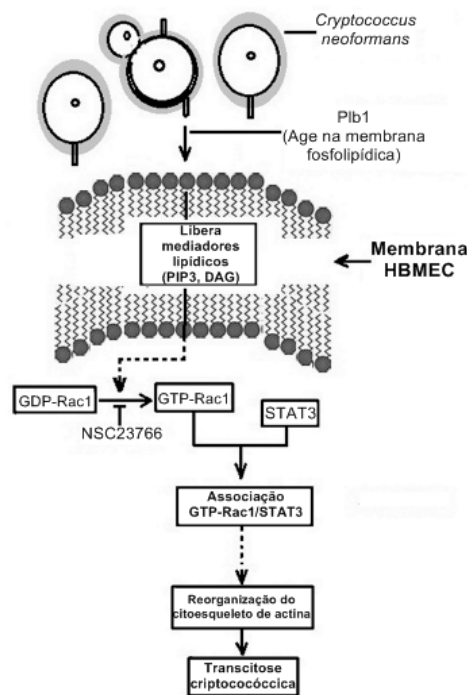


Figura 4- Esquema da via de sinalização mediada pela secreção de Plb1 de *C. neoformans*. Para transcitose através de uma monocamada de HBMEC, Plb1 interage com BHE e ativa Rac1 das células do hospedeiro. GTP- Rac1 interage com STAT3 promovendo o rearranjo do citoesqueleto auxiliando na endocitose de *C. neoformans*. O domínio fosfolipase-like de Plb1 possivelmente atua nos fosfolipídeos da membrana celular do hospedeiro, liberando mensageiros lipídicos que ativam Rac1. Adaptado de Maruvada *et al.*, 2012.

1.2.5 Ácido Hialurônico Sintase

Ácido hialurônico sintase, codificada pelo gene *CPS1*, é responsável pela produção de ácido hialurônico (HA), que se faz presente em uma camada externa da parede celular como também na cápsula polissacarídica. A presença de HA promove a adesão às células endoteliais cerebrais, o que facilita a endocitose da levedura. Estudos *in vitro* demonstram que a taxa de adesão à HBMEC é proporcional à quantidade de HA (Jong *et al.*, 2007). Essa adesão se dá através do reconhecimento por receptores específicos das células endoteliais cerebrais do hospedeiro. O receptor mais relevante é CD44. Em resposta à adesão de *C. neoformans*, CD44 e filamentos de actina acumulam-se e se redistribuem em *lipid rafts* propiciando a endocitose. Camundongos *knockout* para CD44 apresentam maior sobrevivência frente à infecção com *C. neoformans*, confirmando sua importância no acesso ao SNC (Jong *et al.*, 2012).

A produção de HA por *C. neoformans* é aumentada pela presença de inositol. A fonte de carbono preferida da levedura não é o inositol, no entanto, este é encontrado em abundância no tecido cerebral durante a infecção. *Cryptococcus* detecta a presença de inositol que é transportado para o interior da célula fúngica pelos transportadores de inositol Itr1a e Itr3c. O aumento de inositol intracelular promove a produção de fosfatidilinositóis e estimula a expressão gênica de *CPSI*, resultando no aumento de HA disponível. Por fim, a deleção dos genes codificantes para Itr1a e Itr3c, tem como efeito uma redução de 70% na capacidade de acessar o SNC, reforçando sua importância na regulação e promoção da transmigração (Liu, *et al* 2013).

1.2.6 Plasmina

Plasminogênio é uma proteína abundantemente encontrada no plasma no hospedeiro, sendo o componente central da via fibrinolítica que mantém o fluxo sanguíneo adequado. No plasma sanguíneo, plasminogênio se apresenta como uma pró-enzima, que é ativada através de clivagem proteolítica quando ligada a uma superfície celular (Stie e Fox, 2009).

C. neoformans têm a capacidade de usar o plasminogênio para seu benefício, pois a levedura é capaz de recrutar essa proteína, a qual passa a revestir a célula fúngica. A pró-enzima plasminogênio é convertida na sua forma ativa plasmina, que é uma serina protease capaz de degradar fibrina e colágeno, além de ativar outras enzimas proteolíticas. Consequentemente a plasmina é capaz de degradar as junções aderentes das células endoteliais cerebrais, facilitando a transmigração da levedura. A conversão de plasminogênio em plasmina é realizada por dois ativadores do próprio hospedeiro, o ativador de plasminogênio derivados de tecido (tPA) e uroquinase (uPA) (Stie e Fox 2009; Stie e Fox, 2012). Dessa maneira, *C. neoformans* utiliza a atividade de plasmina a seu favor, que possibilita sua invasão paracelular no SNC (Stie e Fox, 2012).

1.2.7 Metaloprotease

O estudo realizado por Vu *et al.*, 2014 demonstrou através de uma análise proteômica da superfície celular de *C. neoformans* o papel desempenhado pela metaloprotease Mpr1 na disseminação para o SNC. Mpr1, é uma fungolisina pertencente à

classe de protease peptidase M36. Essa metaloprotease é altamente expressa durante a infecção do SNC em coelhos. Além disso, a disrupção do gene *MPRI*, dificulta a transmigração através da BHE, devido a falta de aderência ao endotélio cerebral (Vu *et al.*, 2014).

1.2.8 Interação com Macrófagos

Macrófagos são células fagocíticas, também envolvidas com produção de citocinas e apresentação de antígenos (Casadevall e Perfect, 1998). São descritos como primeira defesa contra *C. neoformans*, além de ser a principal célula fagocítica durante a infecção (Luberto *et al.*, 2003; Ma e May, 2009). Existem diferentes subtipos de macrófagos, os classicamente (M1) e alternativamente (M2) ativados. Macrófagos M1 são ativados por interferon- γ e possuem um papel importante na produção de citocinas do tipo Th1, as quais limitam a disseminação para o SNC e levam à morte de *C. neoformans*. Em contrapartida, macrófagos M2 respondem a citocinas do tipo IL-4 e IL-13, além de contribuir com a produção de citocinas do tipo Th2, que levam à disseminação e permanência de *C. neoformans*. Não está claro o que governa o resultado da resposta imune, mas essa polarização é dependente das citocinas prevalentes durante a infecção criptocócica (Chaturvedi e Wormeli, 2013).

C. neoformans é um patógeno intracelular facultativo e possui algumas características de evasão da fagocitose. A cápsula polissacarídica é o principal fator antifagocítico, pois apresenta superfícies não reconhecidas pelos fagócitos (Kozel e Gotschlich, 1982; Del Poeta, 2004; García-Rodas e Zagaroza, 2011). Ademais, modificações morfológicas como o aumento geral da levedura formando uma célula gigante, denominada célula titã, também diminui e dificulta a fagocitose (Okagaki *et al.*, 2010). Além disto, a proteína antifagocítica (App1) é secretada pela levedura e encontrada no soro de pacientes infectados, sendo considerada um importante fator de evasão da fagocitose (Luberto *et al.*, 2003).

C. neoformans é capaz de sobreviver no interior de macrófagos, também é notável que essa levedura é bem adaptada a compartimentos ácidos, crescendo mais rápido do que em ambientes alcalinos (Levitz *et al.*, 1999; De Leon- Rodriguez e Casadevall, 2016). A maturação dos fagolisossomos dos macrófagos não sofre interferência de *C. neoformans*,

no entanto a capacidade da levedura de sobreviver no meio intracelular se relaciona à habilidade de *C. neoformans* de permeabilizar e causar danos ao fagolisossomos, acoplado à secreção de polissacarídeos (Tucker e Casadevall, 2002; Coelho *et al.*, 2014; Davis *et al.*, 2015). Esses danos causados aos fagolisossomos têm como resultado maior subsistência de *C. neoformans* e aumento na taxa de replicação intracelular (Davis *et al.*, 2015). Além disso, outros fatores de virulência foram descritos como necessários para a sobrevivência intracelular, incluindo síntese de melanina, proteinases (Ma e May, 2009), oxidases (*AOXI*) (Akhter *et al.*, 2003), fosfoesfingolípido-fosfolipase inositol C1 (*ISCI*) (Shea *et al.*, 2006), *SKN7* (Coenjaerts *et al.*, 2006) e a proteína vacuolar Vps41 (Liu *et al.*, 2006), a maioria contribuindo para defesa contra estresse oxidativo exógeno (Ma e May, 2009). *Cryptococcus* pode escapar do interior dos fagócitos através de uma via lítica, provavelmente devido à atividade de Plb1, e também por uma via não lítica (vomocitose). Mais dificilmente, o escape pode ocorrer por meio de transferência lateral entre macrófagos (Ma *et al.*, 2006; Alvarez e Casadevall, 2006; Alvarez e Casadevall, 2007; Johnston e May, 2013). Não obstante, os macrófagos podem impedir o processo de escape das leveduras temporariamente, através da atividade de *flashes* de actina que formam estruturas semelhantes à jaulas ao redor do fagolisossomo, bloqueando a saída do *C. neoformans* (Johnston e May, 2010).

É notável que macrófagos atravessam a BHE através de um mecanismo sequencial bem estabelecido de rolamento, parada e diapedese, caracterizado como extravasamento de fagócitos. Durante a diapedese ocorrem mudanças morfológicas dos fagócitos, que se apertam para passar entre as junções aderentes das células endoteliais cerebrais. As células de *Cryptococcus* dentro desses macrófagos podem então ter acesso ao SNC, por utilizar esses fagócitos como veículos de invasão, dessa maneira esse mecanismo é denominado de cavalo de tróia (Figura 5) (Tseng *et al.*, 2015). Experimentos utilizando monócitos derivados da medula de camundongos infectados *in vitro* com *C. neoformans*, com posterior infecção *in vivo* em camundongos, demonstraram que a presença da levedura dentro de monócitos aumenta significativamente a taxa de invasão ao SNC. Estes dados comprovam a relevância do mecanismo de cavalo de tróia no desfecho da meningoencefalite (Charlier *et al.*, 2009).

O papel do HIV na co-infecção com *C. neoformans* demonstrou que a presença do

HIV aumenta a capacidade dos monócitos periféricos de atravessar a BHE, contribuindo com o mecanismo de cavalo de tróia (Wang *et al.*, 2008). Recentemente, um estudo evidenciou que o ectodomínio gp41-190 do HIV acelera a adesão e a transmigração de monócitos, além de interferir com a redistribuição do CD44 nos *lipid rafts*, o que consequentemente auxilia na invasão do SNC provocando meningite (He *et al.*, 2016). Esses resultados são de extrema relevância já que o principal alvo da criptococose são pacientes imunocomprometidos.

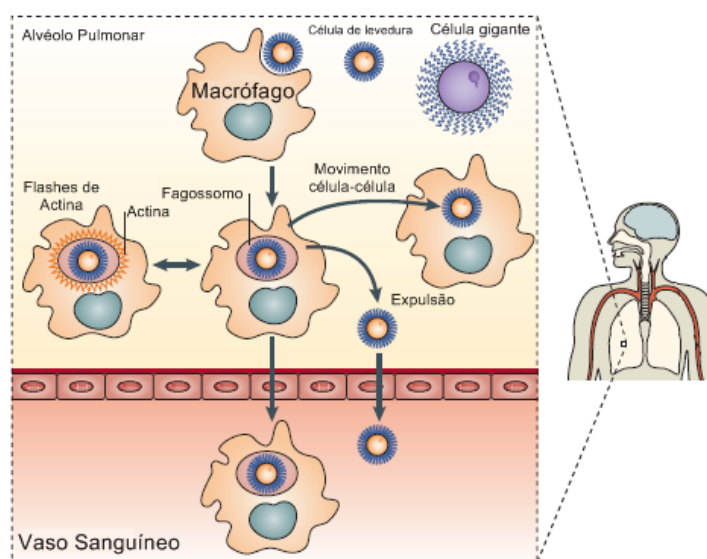


Figura 5 – Esquema de interação entre *C. neoformans* e macrófagos. As células fúngicas no tecido pulmonar são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos alveolares. Entretanto, uma subpopulação de células gigantes no pulmão não pode ser fagocitada e permanece no meio extracelular. *C. neoformans* é capaz de se proliferar no meio intracelular (dentro dos fagolisossomos de macrófagos) ou extracelular (no tecido pulmonar). No processo de saída de dentro dos fagócitos as leveduras podem escapar através das vias lítica ou não lítica. Também pode ocorrer o mecanismo de transferência célula-célula (transferência lateral). Além disso, a inibição da evasão das leveduras pode acontecer, nesse processo as células fúngicas são contidas dentro dos macrófagos por jaulas de actina, o que é conhecido como encarceramento. A disseminação ocorre quando células de *C. neoformans* livres ou dentro de macrófagos acessam a via sanguínea, podendo alcançar o SNC. Adaptado de Kronstad *et al.*, 2011.

1.3 Via de Sinalização mediada por Ca^{2+} e Calcineurina

Os fungos utilizam vias de sinalização complexas para adaptação ao ambiente hospedeiro, as quais regulam proliferação, desenvolvimento e virulência. Dentre essas, a

via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina é responsável pela regulação de diferentes processos, como a tolerância a 37 °C, o processo de *mating*, frutificação monocariótica, resposta ao estresse e virulência (Odom *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2001; Kozubowski *et al.*, 2009). A via da calcineurina é dependente de cálcio (Ca²⁺), um importante mensageiro secundário celular. Com o aumento de Ca²⁺ intracelular, íons ligam-se à proteína sensora de Ca²⁺ calmodulina (Berridge *et al.*, 2000; Kraus *et al.*, 2005). A calmodulina, por sua vez, tem a capacidade de ativar a serina/treonina fosfatase calcineurina, um heterodímero que possui as subunidades A (catalítica) e B (regulatória). Através da ligação da calmodulina à porção C-terminal da subunidade A de calcineurina ocorrem modificações conformacionais que liberam o sítio catalítico da calcineurina de sua auto regulação (Kraus *et al.*, 2005).

Quando a calcineurina encontra-se na sua forma ativa é capaz de desfosforilar seus alvos *downstream* como, por exemplo, o fator de transcrição Crz1, promovendo sua translocação nuclear. Crz1 ativa a expressão de genes responsivos à calcineurina, gerando produtos relacionados com a homeostase de cálcio, tolerância ao estresse e integridade da parede celular (Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 2002; Stie e Fox, 2008; Lev *et al.*, 2012). Além disso, o controle do processo de *mating* é dependente da proteína calcipressina (Cbp1). Membros da família de calcipressina interagem e regulam a via da calcineurina (Fox e Heitman, 2005; Kozubowski *et al.*, 2009).

Em situações em que células de *C. neoformans* são expostas a condições de estresse, ocorre a translocação da subunidade A de calcineurina do citoplasma para o RE, co-localizando com corpos de processamento ou *P-bodies* (PBs) e grânulos de estresse (GE), os quais retém mRNA não traduzidos, repressores de tradução e agregados de RNA. As estruturas PBs e GE representam um dos modos de regulação da expressão gênica em eucariotos. Sugere-se que a mudança na localização subcelular da calcineurina para locais de processamento de mRNA auxilie na resposta ao estresse e virulência de *C. neoformans* (Kozubowski *et al.*, 2011). Enquanto a calcineurina é altamente conservada, é notável que seus alvos *downstream* diferem entre as espécies fúngicas. Recentemente um estudo elucidou os alvos específicos de calcineurina em *C. neoformans*, que com exceção do fator de transcrição Crz1, não apresentam sobreposição de alvos com *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse estudo, foi demonstrado que a calcineurina ativada funciona de maneira ramificada

pela ativação de processos transcricionais e pós-transcricionais, coordenando a tolerância ao estresse, virulência e reprodução sexual. A regulação a nível transcricional ocorre pela ativação do fator de transcrição Crz1 e, paralelamente a isso, acontece a regulação pós-transcricional, que se realiza pela ativação de novos potenciais alvos da calcineurina como Pbp1, Puf4 e Lhp1. Esses potenciais alvos são proteínas ligadoras de RNA que controlam a estabilidade, função e localização dos mRNAs (Figura 6) (Park *et al.*, 2016).

Os fármacos imunossupressores ciclosporina A (CsA) e FK506, além de seus análogos não imunossupressores, possuem atividade antifúngica. CsA e FK506 se difundem dentro da célula de *C. neoformans* e se ligam à proteína ciclofilina A e à imunofilina FKBP12, respectivamente. Os complexos proteína-fármaco resultantes são potentes inibidores de calcineurina (Figura 7). Apesar de estudos *in vitro* demonstrarem atividade antifúngica de CsA e FK506, avaliações *in vivo* evidenciaram uma exacerbação da meningite criptocócica, sugerindo que o efeito imunossupressor sobrepõe qualquer atividade antifúngica (Odom *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2000). No entanto, diversos estudos apontam a via de sinalização da calcineurina e seus componentes como potenciais alvos para terapia antifúngica (Liu *et al.*, 2015).

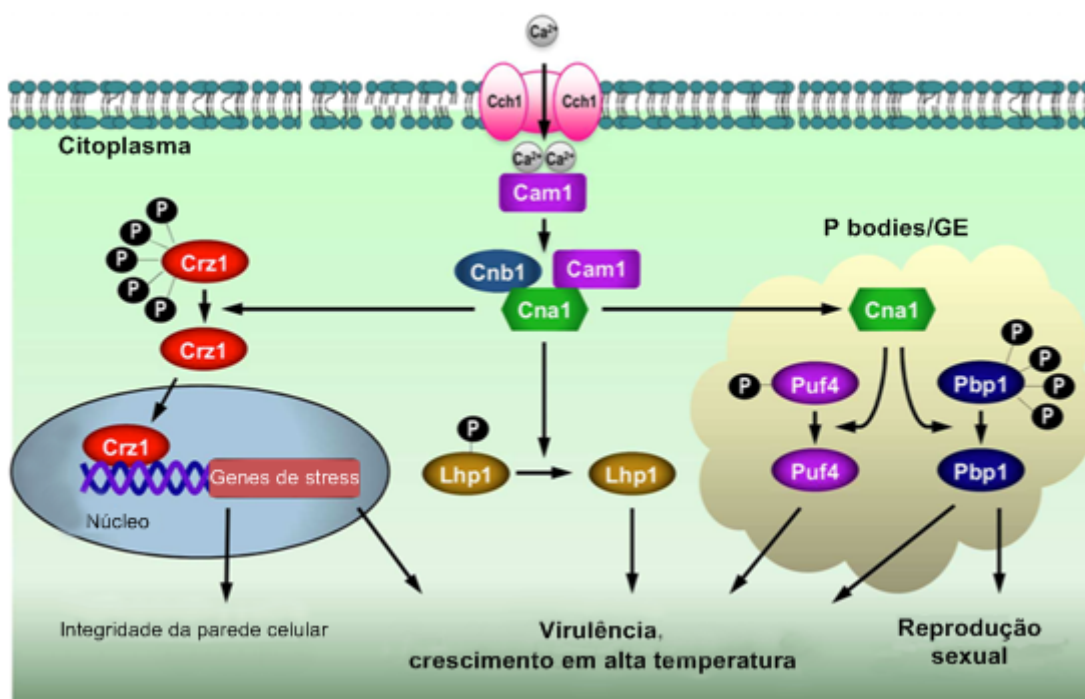


Figura 6- A via de sinalização mediada por calcineurina em *C. neoformans* regula o

desenvolvimento a 37 °C, virulência e reprodução sexual, ativando diferentes alvos. A via de sinalização da calcineurina é ramificada para controlar diferentes alvos, incluindo o fator de transcrição Crz1 e as proteínas ligadoras de RNA, Lhp1, Puf4 e Pbp1, que possuem localizações subcelulares diferentes (núcleo, citoplasma e PBs/GE). Como resultado, temos a ativação transcricional e pós-transcricional necessárias para a termotolerância, virulência e reprodução sexual. Adaptado de Park *et al.*, 2016.

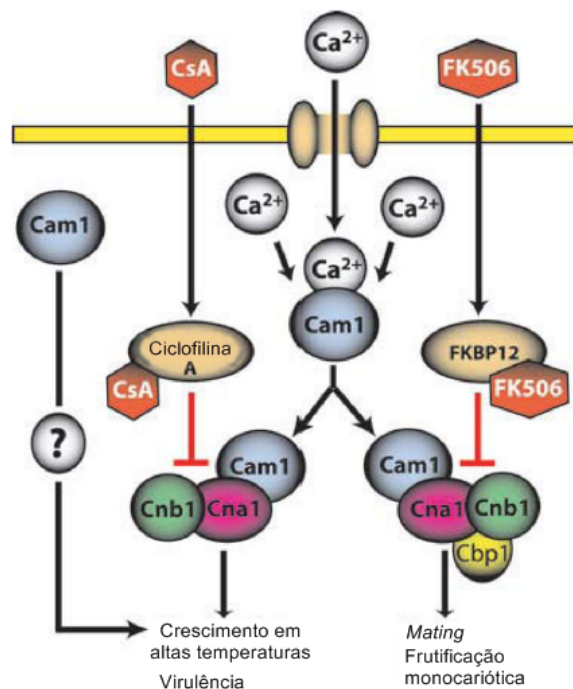


Figura 7- Esquema de via de sinalização Ca²⁺/calcineurina. A entrada de Ca²⁺ no citoplasma da célula fúngica ocorre por meio de transportadores presentes na membrana plasmática. O aumento de Ca²⁺ intracelular é percebido pela calmodulina (Cam1), que se complexa com Ca²⁺ e ativa a calcineurina (representada pelas subunidades Cna1 e Cnb1), resultando na ativação de fatores que regulam o desenvolvimento a 37 °C e virulência em *C. neoformans*. Esses fatores também podem ser regulados independentemente por Cam1. O mating e frutificação monocariótica, são regulados pelos complexos Ca²⁺/Cam1, calcineurina (Cna1 e Cnb1) e calcipressina (Cbp1). Os fármacos imunossupressores ciclosporina A (CsA) e FK506, ligados à ciclofilina A e FKBP12, respectivamente, inibem a calcineurina. Adaptado de Kozubowski *et al.*, 2009.

1.4 Mecanismos de Homeostase de Cálcio

A concentração de Ca^{2+} citosólica de leveduras em crescimento normal está entre 50-200 nM, no entanto a concentração total de Ca^{2+} na célula é aproximadamente 100.000 vezes maior, entre 2-3 mM. Além disso os níveis de Ca^{2+} ambientais variam desde valores inferiores a 1 μM até valores superiores a 100mM (Miseta *et al.*; 1999; Cui *et al.*, 2009). Para tanto, *C. neoformans* possui um sistema de homeostase de cálcio bem regulado. Os níveis de cálcio intracelulares são coordenados por transportadores, canais e bombas, que localizam-se nas membranas plasmática, vacuolares e no retículo endoplasmático (RE). Esses transportadores mantêm a concentração ótima de Ca^{2+} , que pode ser estocado em vacúolos e no RE (Figura 8) (Liu *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007; Kmetzsch *et al.*, 2010; Kmetzsch *et al.*, 2013).

O influxo de Ca^{2+} do ambiente para a levedura pode ser ativado por estímulos estressores, como estresse hiperosmótico, alcalino e de temperaturas. Conseqüentemente, o aumento de Ca^{2+} intracelular afeta diferentes processos celulares e vias de sinalização, como a já mencionada via da calcineurina. Além disso, a elevação de Ca^{2+} intracelular pode ocorrer pela secreção de estoques dos vacúolos ou do RE, que liberam o cátion para o citosol através da atividade de transportadores (Locke *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015). É importante ressaltar que a permanência de altas concentrações de Ca^{2+} intracelular é prejudicial para a viabilidade celular. Isso reforça a importância do bom funcionamento desses mecanismos de regulação (Liu *et al.*, 2015).

Em *C. neoformans* foram identificados transportadores responsáveis pela homeostase de Ca^{2+} que são componentes da via de sinalização da calcineurina: Cch1, EcaI, Vcx1 e Pmc1. O canal Cch1 permeável ao Ca^{2+} localiza-se na membrana plasmática e é capaz de captar Ca^{2+} para o meio intracelular. A disrupção de Cch1 resultou em uma linhagem hipovirulenta, além de demonstrar a necessidade de Cch1 para a captação adequada do cátion em ambientes com baixas concentrações de Ca^{2+} (Liu *et al.*, 2006). EcaI é uma bomba Ca^{2+} /ATPase, que localiza-se no RE. O RE requer altas concentrações de Ca^{2+} para seu funcionamento adequado, além de atuar também como estoque de Ca^{2+} intracelular. EcaI demonstrou ser necessário para a virulência de *C. neoformans* e na manutenção das funções do RE, além de atuar paralelamente à via da calcineurina (Fan *et al.*, 2007). Dentre os transportadores localizados nas membranas vacuolares em *C.*

neoformans, foram caracterizados H^+/Ca^{2+} exchanger Vcx1 e Ca^{2+} -ATPase Pmc1, sendo que ambos têm a capacidade de estocar Ca^{2+} nos vacúolos.

O transportador Vcx1 em *C. neoformans* é caracterizado pela presença de domínios antiporter Ca^{2+}/H^+ , H^+/Ca^{2+} exchanger e Na^+/Ca^{2+} exchanger, além de apresentar de 10 a 11 domínios transmembrana. A deleção do gene *VCX1* provocou alterações no perfil de virulência, sendo hipovirulento em camundongos. Além disso, Vcx1 interfere na fagocitose de *C. neoformans* e está envolvido na via de sinalização da calcineurina. Finalmente, a ausência de Vcx1 leva a um desequilíbrio nos níveis de Ca^{2+} intracelulares, reforçando sua importância no mecanismo de regulação (Kmetzsch *et al.*, 2010). Análise *in silico* dos domínios conservados de Pmc1 revelou a presença de cátion/ATPase no domínio C, E1-E2 ATPase, hidrolase haloácida dealogenase-like e um transportador de cátion/ATPase no domínio N, ademais, apresentou 10 domínios transmembrana. Foi demonstrado que a deleção de *PMCI* de *C. neoformans* resulta em uma linhagem hipovirulenta em modelo murino de infecção intranasal, a infecção com os mutantes nulos *pmc1* e *pmc1vcx1* apresentou uma eliminação eficiente das células fúngicas do tecido pulmonar e não foi recuperada nenhuma unidade formadora de colônia (CFU) do tecido cerebral. Além disso, a disrupção do gene *PMCI* resultou em um fenótipo sensível à altas concentrações de Ca^{2+} , e diferença na capacidade de induzir o crescimento da cápsula polissacarídica. Consequentemente há evidências de sua importância na homeostase de cálcio, assim como no estabelecimento da doença (Kmetzsch *et al.*, 2013).

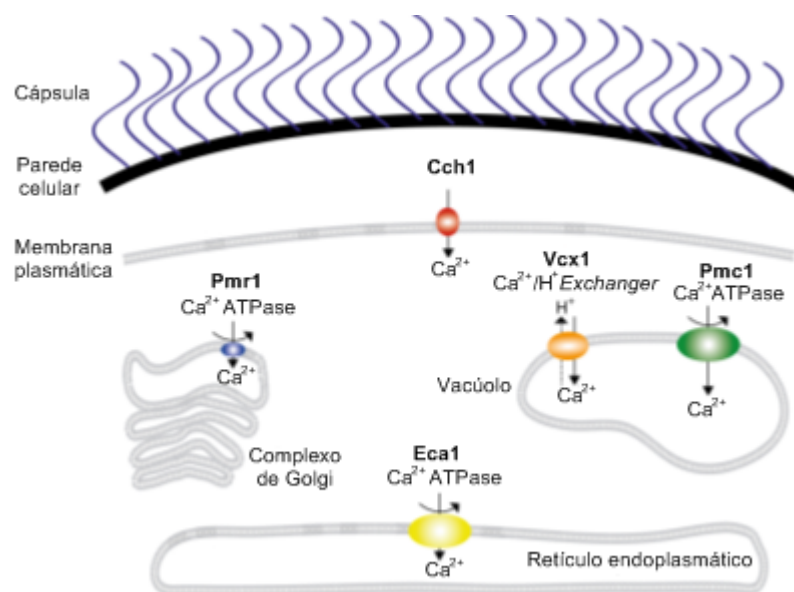


Figura 8- Transportadores de cálcio em *C. neoformans*. Representação esquemática da localização intracelular dos transportadores de Ca^{2+} . O canal Cch1 localiza-se na membrana plasmática. EcaI está localizado no RE. $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger Vcx1 e Ca^{2+} -ATPase Pmc1 ambos localizados na membrana vacuolar. Pmr1 Ca^{2+} -ATPase encontra-se no complexo de Golgi. Figura adaptada de Staats, C., dados não publicados.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O propósito que direcionou o presente estudo foi a avaliação do impacto dos transportadores de Ca^{2+} Vcx1 e Pmc1 na virulência de *C. neoformans* e disseminação para o SNC. Pesquisas anteriores do nosso grupo caracterizaram fenotipicamente linhagens mutantes nulas para os transportadores vacuolares de Ca^{2+} e foi verificado que esses mutantes apresentam defeitos na disseminação para o sistema nervoso central em modelos *in vivo* de infecção intranasal.

Considerando que a forma mais severa de criptococose é a manifestação de meningite e a atual demanda por elucidar os mecanismos envolvidos com a transmigração através da BHE, direcionamos nosso estudo com o objetivo de esclarecer os mecanismos moleculares relacionados à transmigração que estão alterados nos mutantes nulos de transportadores vacuolares de Ca^{2+} em *C. neoformans*.

2.2 Objetivos específicos

- I. Investigar a virulência e carga fúngica em camundongos infectados através de infecção sistêmica com *C. neoformans*, comparando as linhagens mutantes para transportadores de cálcio com a selvagem.
- II. Avaliar o perfil de transmigração *in vitro* de células dos mutantes para transportadores de cálcio através de uma monocamada celular de células endoteliais que mimetiza a BHE.
- III. Analisar os genes diferencialmente expressos afetados pela deleção do transportador Pmc1 em comparação com a linhagem selvagem por RNA-seq, dando enfoque para vias relacionadas à transmigração.
- IV. Confirmar o papel de Pmc1 na virulência e nas vias afetadas que foram identificadas por RNA-seq.
- V. Avaliar o efeito da exposição a cálcio na organização da ultraestrutura da cápsula polissacarídica através de microscopia eletrônica de varredura.

1 The vacuolar calcium transporter Pmc1 is required for cryptococcal urease activity and
2 proper dissemination to central nervous system

3

4 Eamim D. Squizani,^a Natália K. Oliveira,^a William Lopes,^a, Júlia C. V. Reuwsaat^a,
5 Alexandra L. Gerber,^b Ana Tereza R. Vasconcellos,^a Marilene H. Vainstein,^a Charley C.
6 Staats,^a Livia Kmetzsch,^{a*}

7

8 ^a Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil; ^b Laboratório Nacional de
9 Computação Científica, LNCC, Petrópolis, RJ, Brazil

10

11

12 Running Head: Role of calcium transporter on urease activity and transmigration.

13

14 Corresponding author: liviak@cbiot.ufrgs.br

15 Abstract word count: 289. Text word count: 4,996

16

17

18

19 ABSTRACT

20 *Cryptococcus neoformans* is a basidiomycetous yeast and the cause of cryptococcosis on
21 immunocompromised individuals. The most severe form of the disease is the
22 meningoencephalitis, which is the leading cause of death. In order to access the central
23 nervous system (CNS), *C. neoformans* relies on the activity of some virulence factors such
24 as urease activity, which allows transmigration through blood brain barrier (BBB). In the
25 present study, we demonstrate that the calcium transporter Pmc1 is involved with the
26 ability of yeast cells to penetrate the CNS, since the *pmc1* and *pmc1vcx1* null mutant
27 strains cannot reach the brain parenchyma in a murine systemic infection model. Moreover,
28 this mutants lost the ability to transmigrate on *in vitro* devices that mimic the BBB. Hence,
29 the global expression profile of *pmc1* mutant strain was assessed to explore alterations on
30 transmigration pathways. Genes related to urease activity were found to have
31 modifications on their expression levels, as well as genes related to calcineurin pathway
32 and capsule assembly. To confirm the paracellular impairment, a decrease in urease
33 activity was observed in the calcium transporter null mutants. Finally, it was observed that
34 an environment rich in calcium might weaken the capsule ultrastructure.

35 IMPORTANCE

36 In spite of major advances on the knowledge of *Cryptococcus* molecular mechanisms of
37 infection, cryptococcosis still remains the most common opportunistic infection on
38 immunocompromised individuals with a mortality rate close to 30 %. Moreover, there are
39 few alternatives for antifungal therapy with growing resistance episodes and relapse cases
40 of cryptococcal meningitis. Thereby, it is extremely important to better understand the
41 factors that increase and improve the transmigration events. Here we demonstrate that *C.*

42 *neoformans* paracellular transmigration mechanism requires the activity of the vacuolar
43 calcium transporter Pmc1, which guarantees a suitable intracellular calcium level.

44 **INTRODUCTION**

45 *Cryptococcus neoformans*, a basidiomycetous pathogenic yeast and the etiological
46 agent of human cryptococcosis, is one of the most important pathogens related to
47 opportunistic infection on immunocompromised individuals (1, 2, 3). *C. neoformans* can
48 establish pulmonary infection and thereafter spread hematogenously to the central nervous
49 system (CNS), which leads to life-threatening meningitis (4). For this outcome, *C.*
50 *neoformans* relies on various virulence factors such as the presence of polysaccharide
51 capsule, urease activity, secretion of extracellular vesicles, and the ability to grow at 37 °C
52 (5, 6, 7, 8). In order to access the brain parenchyma, the yeast must cross the blood brain
53 barrier (BBB) through three potential mechanisms: transcellular, by which yeast cells
54 invade directly the endothelial cells of the brain vasculature; paracellular, through a
55 weakened BBB; and/or by “Trojan horse” mechanism whereby cryptococci enter the CNS
56 inside macrophages (9, 10). For a efficient transmigration, it has been reported the
57 importance of several factors including urease and host plasmin for paracellular
58 mechanism, which can cause damage to brain microvascular endothelial cells (BMEC)
59 tight junctions (11, 12, 13). The secreted metalloprotease (Mpr1) also participates on
60 paracellular mechanism by facilitating the yeast migration through BMEC (14).
61 Furthermore, phospholipase B1 and hyaluronic acid contribute to transcellular mechanism
62 of transmigration, favoring cell endocytosis by BMEC (15, 16, 17, 18).

63 Intracellular calcium (Ca^{2+}) is an important second messenger that controls
64 numerous cellular processes and signaling networks, as the calcineurin pathway. The Ca^{2+} -

65 calcineurin signaling pathway is activated when the cytosolic Ca^{2+} is increased. This
66 pathway is coordinated by two essential mediators, the Ca^{2+} binding protein calmodulin
67 and the Ca^{2+} calmodulin-activated serine/threonine protein phosphatase calcineurin (19, 20,
68 21, 22). Activated calcineurin may function on transcriptional level by dephosphorylating
69 downstream targets, as the transcription factor Crz1, and so promoting its nuclear
70 translocation. By its turn, nuclear Crz1 stimulates the expression of calcineurin-responsive
71 genes, whose products are related to Ca^{2+} homeostasis and stress tolerance (23, 24, 25, 26).
72 Furthermore, calcineurin can also function at post-transcriptional level, through activation
73 of RNA binding proteins such as Pbp1, which is a poly (A) binding protein that localizes at
74 P-bodies, and upon calcineurin activation it regulates the *C. neoformans* sexual
75 reproduction (26). The calcium-calcineurin signaling pathway in *C. neoformans* is crucial
76 for adaptation within the host, growth at 37 °C, mating, morphogenesis and proper
77 virulence resulting in establishment of infection (27, 28, 29, 30).

78 Intracellular Ca^{2+} levels are maintained by transporters, channels or pumps (31, 32,
79 33, 34). In *C. neoformans*, such proteins were characterized in different cell compartments.
80 Cch1 is located in cellular membranes, promoting calcium uptake from extracellular space
81 (31). The sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase EcaI was found in the
82 endoplasmic reticulum membranes, acting in calcium stress tolerance (32). The $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$
83 exchanger Vcx1 and Ca^{2+} -ATPase Pmc1 were described as vacuolar membrane proteins,
84 regulating the cytosolic calcium concentration (33, 34). It is important to note that Cch1,
85 EcaI, Vcx1 and Pmc1 are necessary for *C. neoformans* virulence (31, 32, 33, 34). The
86 functional characterization of Vcx1 and Pmc1 calcium transporters were described by our
87 group (33, 34). We found that the lack of these transporters results in increased and
88 unbalanced calcium levels on cell and that Vcx1 transporter is involved in calcineurin-

89 dependent Ca^{2+} tolerance, acting in the Ca^{2+} -calcineurin signaling pathway in *C.*
90 *neoformans*. Disruption of *PMCI* led to impaired virulence in an intranasal model of
91 murine cryptococcosis with absence of cryptococcal cells in the brain parenchyma, thus
92 preventing meningoencephalitis (34).

93 Even though the last decade advances on understanding the molecular basis for the
94 occurrence of *Cryptococcus* cells on CNS have been made, a specific pharmacological
95 target that could prevent the yeast transmigration through BBB is missing. Additionally,
96 several reports (reviewed in 35) describe the calcineurin signaling pathway and its
97 components as a potential targets for antifungal therapy. In this study we demonstrate that
98 the knockout of *C. neoformans PMCI* gene prevents the yeast transmigration and access to
99 the brain parenchyma. We also infer the involvement of Pmc1 in the calcineurin signaling
100 pathway and its significance on regulation of different cellular process like transmigration
101 and calcium homeostasis.

102 **RESULTS**

103 **Pmc1 is required for proper transmigration through blood brain barrier.** As our
104 group previously demonstrated, the *pmc1* and *pmc1vcx1* null mutant strains had strongly
105 attenuated virulence and proved absence in brain parenchyma in an intranasal infection
106 murine model (34). In order to evaluate if absence of fungal cells in brain tissue was due to
107 an inability to cross the BBB or a difficulty to evacuate the lung tissue, we performed a
108 murine systemic infection model. Mice infected with wild type (WT) and *vcx1* mutant
109 strain had similar mean survival of 9.5 and 7 days, respectively; however, both *pmc1* and
110 *pmc1vcx1* mutants were avirulent (Fig. 1 A). Moreover, fungal burden in lungs and brain
111 after 3 and 6 days of infection was accessed. WT and *vcx1* mutant had similar fungal

112 burden in lung and brain tissues, in contrast to *pmc1* and *pmc1vcx1* mutants that presented
113 a consistent decrease of fungal burden in lung as compared to WT. Furthermore, in brain
114 tissue both *pmc1* and *pmc1vcx1* mutant strains displayed absence of any fungal cell (Fig. 1
115 B), indicating that Pmc1 is required for proper transmigration to the CNS.

116 To validate this finding *in vitro*, we evaluated the transmigration ability of WT and
117 *pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1*, *pmc1::PMCI* mutant strains in a ThinCert™ accessory covered
118 with a monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cells to mimic the
119 BBB. As expected, *vcx1* mutant and *pmc1::PMCI* complemented strains displayed an
120 efficient transmigration profile, similar to that observed for WT yeast. Contrary, both *pmc1*
121 and *pmc1vcx1* mutants strains were unable to cross the *in vitro* BBB in comparison to WT
122 ($p = 0.0026$) (Fig. 2).

123 **The *pmc1vcx1* null mutant is more susceptible to phagocytosis by murine**
124 **macrophages.** Considering that the null mutant strains *pmc1* and *pmc1vcx1* had no ability
125 to cross BBB, the phagocytic susceptibility of the mutants was evaluated in order to
126 investigate the Trojan horse mechanism. Phagocytic susceptibility assay was performed via
127 co-incubation of opsonized fungal cells and murine macrophage cells J774.A1 during 2
128 hours (37 °C, 5 % CO₂). We observed that *pmc1vcx1* mutant had a higher rate of
129 phagocytosis in comparison to WT (Fig. 3). This result is very plausible considering that
130 the double *pmc1vcx1* mutant strain has a stronger altered phenotype, and notably exhibits a
131 smaller capsule on DMEM media as shown in (34). Since capsule size can influence
132 phagocytosis (36) it is possible that this is one of the reasons that *pmc1vcx1* mutant strain
133 is more susceptible to phagocytosis activity of macrophage. Moreover, this suggests that
134 Pmc1 and Vcx1 transporters have a potential role in the interaction and macrophage

135 recognition leading to phagocytosis.

136 **Knockout of *PMCI* and unbalanced intracellular Ca^{2+} led to a strong alteration in**
137 **global gene expression.** In order to evaluate pathways and functions related to
138 transmigration events through BBB that could be altered by the lack of *PMCI*, we
139 performed a transcriptome analysis and compared the expression profile of *pmc1* mutant
140 strain to WT. The RNA-seq analysis was performed with RNA isolated from fungal cells
141 incubated in DMEM, a medium used in human cell cultures that mimics physiologic
142 conditions. We found 1,946 genes differentially expressed, of which 1,028 were
143 upregulated in WT, 916 were upregulated in *pmc1* mutant, and 2 exclusively expressed in
144 WT (Table S1 and Fig. S1 A). Gene functions were assigned based on the Gene ontology
145 database (37). Enrichment analysis revealed that *pmc1* mutant displayed a drastic decrease
146 compared to WT in the percentage of sequence in several cellular functions, including
147 some associated with gene information processing (Fig. S1 B).

148 After this analysis, we focused on specific gene products related to the ability to
149 cross the BBB. Genes that are essential for urease activity, as nickel-dependent protein
150 complex (Ure1, Ure4, Ure6 and Ure7) were investigated (38). This complex is known to
151 hydrolyze urea to ammonia that damages the tight junctions of BMEC and promoting
152 fungal transmigration (38). The apoprotein-urease coding gene *URE1* was downregulated
153 in *pmc1* mutant. Also, *NICI* that encodes to a nickel transporter required for urease activity
154 was downregulated in *pmc1* mutant. However, at least one gene whose products are
155 associated with the proper function of urease (*URE6*) was upregulated in *pmc1* mutant
156 (Table 1). Furthermore, some transcription factors that are involved in urease activity
157 regulation were analyzed. The *SRE1*, a sterol regulatory element-binding protein,

158 important for yeast survival in brain (39) and described as a positive regulator of urease
159 activity (40), is also upregulated in *pmc1* mutant. Beyond that, *ATF1*, a transcription factor
160 necessary for oxidative stress induction (41) known to regulate negatively urease activity
161 (40), is downregulated in *pmc1* mutant. Moreover, other factors that also improve
162 dissemination and enhance survival on SNC were evaluated. The ABC transporter-coding
163 gene *AFR1* is downregulated in *pmc1* mutant. The overexpression of this gene increases
164 the yeast survival within glial cells (42). Furthermore, we noticed that the expression of the
165 gene *PLB1* was also downregulated in *pmc1* mutant (Table 1). This gene codes the
166 phospholipase B1 that can stimulate the rearrangements of the BMEC actin cytoskeleton
167 leading to fungal endocytosis and it is involved in vomocytosis (16, 43). These results
168 corroborate with the disability in transmigration profile of *pmc1* mutants seen *in vivo* and
169 *in vitro*, and reinforce the possible role of Pmc1 calcium transporter for efficient yeast
170 dissemination to the CNS.

171 Gene products related to calcineurin pathway and associated with Ca^{2+} homeostasis
172 were also investigated. *VCX1* and *ECA1* were upregulated in *pmc1* mutant, probably is a
173 compensatory mechanism for the lack of Ca^{2+} -ATPase Pmc1. The *CAMI* gene that
174 encodes for calmodulin is downregulated in *pmc1* mutant, while the *CRZ1* gene was
175 upregulated in *pmc1* mutant (Table 1). The unbalanced intracellular Ca^{2+} levels observed
176 by the lack of Pmc1 can justify this gene expression profile.

177 Lastly, we investigated the gene expression of products related to capsule
178 biosynthesis. Polysaccharide capsule structure and composition might interfere directly or
179 indirectly in transmigration. There have been some conflicts on understanding the role of
180 capsule in the invasion of CNS through BMEC. Some studies reported that structural

181 changes in capsule (rough to smooth) or rapid change in yeast size and capsule can
182 improve transmigration (44, 45), on another hand, most recent studies revealed no
183 difference in transmigration when comparing WT and acapsular mutants (12, 46). Still, the
184 polysaccharide capsule is one of the most important virulence factors. The capsule size is
185 related to the ability of cryptococcal cells to be phagocytized, which is strongly associated
186 with efficient access to CNS and infection outcome (47, 48). In this context, we decided to
187 investigate genes involved with capsule biosynthesis (49). A heterogeneous gene
188 expression profile was identified, in which some genes of CAP and CAS families essential
189 components of capsule synthesis were downregulated or upregulated in the *pmc1* mutant.
190 Also, the *HXT1* gene encoding a hexose transporter is less expressed in *pmc1* mutant, and
191 *UGT1* producing UDP sugar transporter is more expressed in the mutant cells (Table 1).
192 For validation of the transcriptome analysis, qRT-PCR was conducted on the same
193 conditions and selected genes were evaluated for expression levels (Fig. S2), reproducing
194 the RNA-seq results.

195 **Pmc1 is required for proper urease activity.** To confirm our main findings on RNA-seq
196 analysis, we evaluated the urease activity of mutant cells by hydrolyzing urea as energy
197 source. It was verified that the mutant strain *pmc1* had the lowest urease activity when
198 compared to WT and to the other mutants strains (*pmc1vcx1*, *vcx1* and *pmc1::PMCI*) (OD
199 = 0.293, $p < 0.001$) (Fig. 4) Moreover, all the mutants were statistically different from WT,
200 surprisingly, the *pmc1::PMCI* complemented mutant strain also had a lower urease activity
201 in comparison to WT. Eventually some differences between the complemented strain and
202 WT can happen due to its mechanism of generation that relies on random insertion on
203 genome. Beyond that, this result corroborates with the lower expression of *URE1* gene and
204 the mutants disability of crossing the BBB reinforcing that Pmc1 is somehow associated

205 with the paracellular transmigration mechanism.

206 **The capsule ultra-structure is not affected by the lack of Pmc1 but by an environment**
207 **with high calcium levels.** Given that Kmetzsch *et al.* (2013) demonstrated that *pmc1*
208 mutant strain displays differences on polysaccharide capsule compared to WT, and that
209 capsule ultra-structure might affect dissemination, the ability of *pmc1* mutant to form and
210 maintain the capsule ultra-structure was evaluated by Scanning electron microscopy
211 (SEM). We observed no differences in the capsule ultra-structure of *pmc1* mutant in
212 comparison with WT in capsule inducing conditions (Fig. 5 A). When yeast cells were
213 evaluated in minimal media supplemented with calcium, surprisingly the WT as well as the
214 *pmc1* mutant completely lost capsule ultrastructure (Fig. 5 B). This results reveals that the
215 lack of Pmc1 does not affect the ability to build the capsule ultrastructure. However, the
216 fungal capsule in a calcium-rich environment becomes more fragile to the technique
217 procedures for SEM. Capsule size under the same conditions was evaluated through light
218 microscopy, indicating that *pmc1* mutant had a smaller capsule in comparison to WT (Fig.
219 S3).

220 **DISCUSSION**

221 The maintenance of intracellular calcium homeostasis is a conclusive event for
222 virulence in *C. neoformans*. Several studies addressing calcium homeostasis and
223 transporters such as Cch1, Eca1, Vcx1 and Pmc1 revealed the importance of these
224 transporters in the disease outcome, since the lack of these transporters led to a
225 hypovirulent phenotype (31, 32, 33, 34). Moreover, *C. neoformans* ability to cross the
226 BBB is the key step to invade CNS and cause meningoencephalitis. Here we show through
227 a systemic mice infection that the lack of Pmc1 prevents transmigration through BBB and

228 so preventing brain infection by interfering in different pathways. Consequently, the *pmc1*
229 and *pmc1vcx1* mutants were avirulent. There are some mutants of *C. neoformans* that have
230 lost the ability to penetrate in CNS, as previously reviewed (50). For instance, mutants that
231 have capsule defects demonstrate impairment to cross BBB. Acapsular strain *cap64* failed
232 to appear in the brain and is cleared faster from lung tissue than encapsulated strains (51).
233 Deletion of genes *UGTI* and *UGE1*, encoding for UDP-galactose transporter and UDP-
234 glucose epimerase respectively results in strains that lack galactoxylomannan (GalXM) on
235 capsule, consequently these mutant strains are unable to colonize the brain upon
236 intravenous injection (52). Furthermore, the harsh conditions imposed by macrophage
237 microenvironments also impair the dissemination of the yeast to the brain. This is
238 demonstrated by the mutant lacking the inositol phosphosphingolipid-phospholipase C1
239 (Isc1), which is more sensitive to oxidative and nitrosative stresses present inside
240 macrophage phagolysosomes. Consequently, this mutant strain is unable to reach the brain.
241 However, when macrophages are depleted pharmacologically in murine models of
242 cryptococcosis, the dissemination of the mutant to CNS is restored (53). At last, difficulty
243 on spreading from lung tissue also impairs dissemination, as shown by the disruption of
244 *PLB1* gene, which results on a strain that cannot initiate interstitial pulmonary infection
245 and disseminate from lung through lymphatics vessels and blood. Therefore this strain is
246 not capable of reaching the SNC (54).

247 The *pmc1vcx1* mutant strain was more susceptible on the phagocytosis assay, and
248 this reveals that *Pmc1* and *Vcx1* potentially influence molecules recognized by
249 macrophage. It is possible that *pmc1vcx1* mutant is more sensitive to the antifungal activity
250 of macrophage (55), which would prevent the yeast dissemination event. However, further
251 experiments must be performed to confirm this hypothesis. Besides, we demonstrated that

252 the lack of Pmc1 led to a strong alteration in global gene expression profile, since gene
253 products related to transmigration and to calcium homeostasis were differentially
254 expressed in *pmc1* mutant cells. It was revealed by RNA-seq that the *pmc1* mutant had
255 higher expression levels of *VCXI* and *ECAI* genes, probably due to the unbalanced
256 calcium environment trying to overcome the lack of Pmc1 activity. The components of
257 calcineurin signaling were also altered, as demonstrated by *CRZI* and *CAMI* expression
258 profiles. This alteration is plausible since there is an unbalance on intracellular Ca^{2+} levels
259 on the mutant strain *pmc1* and it can induce the inappropriate activation of calcineurin
260 signaling pathway. In this context this result points to the importance of Pmc1 transporter
261 in this signaling pathway, which is related to the ability of the yeast to adapt to the host
262 *milieu* and essential to pathogenic mechanisms of *C. neoformans* (27, 28, 29, 30). The
263 absence of Pmc1 also affected the expression profile of genes related to transmigration,
264 especially those involved in the urease activity, which is the main mechanism of
265 paracellular transmigration (6, 11, 12, 38). The *URE1* was downregulated in the *pmc1*
266 mutant, and also *NICI*. As it has been described, it is not only the urease protein alone that
267 promotes transmigration, but the activity of all the accessory proteins from the complex
268 (and nickel transporter), which convert urea to ammonia, leading to BBB damage (38).
269 Besides, *URE6* was upregulated likely trying to even the urease activity. Nonetheless two
270 transcription factors known to regulate urease activity (40) had their expression altered in
271 the *pmc1* mutant. *SRE1*, a positive regulator of urease activity, was upregulated while
272 *AFRI*, a negative regulator of urease activity, was downregulated. This profile could also
273 be interpreted as an compensatory mechanism to the urease activity since it was reduced
274 on our *pmc1* mutant strain. It is important to highlight that not only the expression profile
275 but also the enzymatic urease activity was strongly damaged in the *pmc1* mutant. This

276 suggests that the paracellular transmigration mechanism is impaired in mutant cells, and
277 this could be one of the explanations for yeast absence in CNS during mice infection.

278 Our findings on the capsule ultrastructure exhibited no difference between *pmc1*
279 mutant and WT cells when evaluated by SEM, whereas when evaluated by india ink
280 counterstaining through light microscopy, *pmc1* mutant had a smaller capsule size. This
281 result is contradictory with our first findings already published where the same mutant on
282 minimal media had no difference in capsule size (34). Here the assay was performed in
283 different incubation conditions, in which the fungal cells were kept at 37 °C, with 5 % CO₂
284 for 72 hours on static growth. Kmetzsch *et al.* (2013) incubated the cells at 30 °C for 48
285 hours with shaking. We chose to accomplish the same experiment in different conditions to
286 evaluate the capsule profile seen by SEM assay. Surprisingly when SEM was conducted
287 with fungal cells that were in inducing media supplemented with 50 μM of CaCl₂ the yeast
288 completely lost the capsule ultrastructure. This happens probably because the ultrastructure
289 was more fragile and could not tolerate the procedures involved in sample processing prior
290 to analysis by SEM, since the same yeast cells evaluated through india ink counterstaining
291 in light microscopy still presented capsule. To our knowledge this is the first time that this
292 acapsular phenotype and a fragilized capsule ultrastructure due to calcium presence is
293 demonstrated by SEM, and this result corroborate to study conducted by Nimrichter *et al*
294 (56). Those authors proposed a model for GXM assembly, whereby cross link between
295 different polysaccharide fibers are mediated by Ca²⁺ salt bridges that bind to negative
296 charges of glucuronic acid (GlcA) residues from different fibers of GXM. However, an
297 environment with high concentrations of divalent ions could neutralize GlcA negative
298 charges that would not bind to the same Ca²⁺ ion, preventing the cross link between fibers.
299 Consequently it could avoid capsule enlargement (56). This model could likely explain the

300 weakened capsule ultrastructure that was perceived in our experiments, which is an
301 interesting consequence since the capsule is the most important virulence factor and
302 protection for *C. neoformans*.

303 Once the repertoire of antifungal drugs for *C. neoformans* is insufficient, and there
304 have been reported resistance episodes for fluconazole, notably in relapse cases of
305 cryptococcal meningitis (57, 58), different mechanisms and alternatives to block the
306 transmigration could be an interesting target in the antifungal therapy. As mentioned above,
307 the components of calcineurin signaling pathway have been quoted as potential targets for
308 development of antifungal therapy (35). Moreover, several studies report that non-
309 antifungal compounds, such as amiodarone, and some calcium channel blockers pursuits
310 antifungal activity alone or in combination with fluconazole, by affecting calcium
311 homeostasis components (59, 60). Here we describe that *Pmc1* transporter influences the
312 calcineurin signaling pathway and is required for the yeast transmigration through
313 paracellular mechanism. Then we believe that calcium homeostasis and transporters could
314 be a feasible goal for new antifungal drugs. Evidently further studies are necessary to
315 better understand how the unbalanced calcium levels contribute with the attenuation of
316 virulence in cryptococcosis.

317 **MATERIAL AND METHODS**

318 **Fungal strains, plasmids and media.** The *C. neoformans* serotype A strain H99 was
319 chosen for conduct the study as wild type (WT). The *pmc1* mutant strain, *pmc1vcx1* mutant
320 strain and *vcx1* mutant strain constructed and described in (33, 34) were utilized. Fungal
321 cells were maintained on YPD medium (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose and
322 1.5 % agar). YPD plates containing nourseothricin (100 µg/mL) or hygromycin (200

323 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used to select *C. neoformans* *PMCI* and *VCXI* knockout transformants
324 (*pmc1*, *pmc1vcx1* and *vcx1* strains). YPD plates supplemented with hygromycin (200
325 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used to select *C. neoformans* *PMCI* complementation transformants
326 (*pmc1::PMCI* strain).

327 **Cell line and cultures.** HUVEC cells were grown and maintained in RPMI 1640 medium
328 supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
329 at 37 °C in 5 % CO_2 . When cells reach ~ 80 % confluence, they were detached by trypsin-
330 EDTA treatment and subcultured on sealed PET capillary pore membrane ThinCert TM
331 insert (8 μm pore size, $0.15 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$ pore density) (Greiner bio-one). The BALB/c
332 monocyte macrophage J774.A1 cell line was used to perform the phagocytic assay. The
333 cells were routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10 %
334 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) in a humidified incubator at 37 °C and 5 % CO_2 .

335 **Virulence assay.** Virulence studies for systemic infection were conducted according to a
336 previously described intravenous infection protocol (61) using 7 female BALB/c mice
337 (approximately 5 weeks old) for each tested strain. Fungal cells were cultured at 30 °C
338 overnight with shaking in 50 ml of YPD medium, washed twice, and suspended in
339 phosphate-buffered saline (PBS). Intravenous challenges were conducted with 5×10^4
340 yeast cells of WT, *pmc1* mutant, *pmc1vcx1* mutant, *vcx1* mutant delivered in 0.2 mL
341 injected via the retro-orbital sinus. Kaplan-Meier analysis of survival was performed using
342 GraphPad Prism software. To access fungal burden, mice (n = 3) were infected as
343 described above. At days 3 and 6 post-infection, the animals were euthanized, and the
344 lungs and brain were aseptically excised. These tissues were macerated in PBS, and after
345 removal of host cell debris the resulting suspensions were plated on YPD for CFU

346 determination. Two-way ANOVA with Tukey post-hoc was utilized to determine the
347 statistical significance. The use of animals in this work was performed with approval of the
348 Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ethics Committee for Use of Animals (CEUA
349 project number 22488). Mice were housed in groups of four and kept in filtered top
350 ventilated cages with food and water *ad libitum*. The animals were cared for according to
351 the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA). All
352 efforts to minimize animal suffering were made. Before infection assays, mice were
353 intraperitoneally anesthetized with 100 mg.kg⁻¹ ketamine and 16 mg.kg⁻¹ xylazine. Mice
354 were analyzed twice a day for any signs of suffering, defined by weight loss, weakness or
355 inability to obtain feed or water. At the first signs of suffering, mice were humanely
356 sacrificed.

357 **Transmigration *in vitro* assay.** Transmigration assay was performed in an *in vitro* model
358 of BBB as previously described by (62) using HUVEC to mimic the BBB as previously
359 described (63). Briefly, a total of 1 x 10⁵ HUVEC cells were cultured overnight in
360 ThinCert™ insert to create a monolayer. This apparatus confers two separate
361 environments, top side for luminal (blood) and bottom side abluminal (brain). HUVEC
362 cells were grown in the ThinCert™ chamber on top of microporous membrane (8 μm).
363 Fungal cells of WT or mutants (*pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1*, *pmc1::PMC1*) (1 x 10⁶ cells) were
364 added to the top chamber. Top chamber accommodates 100 μL volume while bottom 600
365 μL of media. After 2 hours of incubation at 37 °C, 5 % CO₂, media and cells were
366 collected from the bottom chamber for CFU determination.

367 **Macrophage infection assay.** The susceptibility of fungal cells to phagocytic activity of
368 macrophage was determined as described previously (33). Fungal cells of WT, *pmc1*

369 mutant, *pmc1vcx1* mutant, *vcx1* mutant, and *pmc1::PMc1*-complemented strains, were
370 opsonized with monoclonal antibody 18B7 (1 µg/ml). Murine macrophage-like cell line
371 J774.A1 were cultured at a density of 10⁵ cells/well in a 96-well cell culture plate and
372 incubated overnight. Macrophages were activated with phorbol myristate acetate (PMA, 50
373 nM) for 1 hour. Next, 10⁶ fungal cells were inoculated in each well, and after 2 h of
374 incubation (37 °C and 5 % CO₂) the wells were washed with warm PBS to remove
375 unattached extracellular fungal cells, then macrophage were lysed with sterile ice-cold
376 distilled H₂O to gain access to intracellular fungal cells. Fungal viability was made through
377 CFU determination by plating the lysates on YPD agar. All the assay was performed with
378 biological and technical triplicate for each strain. One-way ANOVA with post-hoc
379 Dunnet's was conducted for determination of statistical significance.

380 **Transcriptome analysis.** For RNA-seq assay, WT or *pmc1* mutant fungal cell were
381 incubated within Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 %
382 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) supplemented with 1mM l-glutamine, 1mM
383 sodium pyruvate, and 1 % nonessential amino acids, at 37 °C with 5 % CO₂ during 3 hours,
384 all the experiment was conducted with biological and technical triplicates. Then the yeast
385 cells were washed three times with PBS and lyophilized, subsequently RNA extraction
386 from *C. neoformans* cells were made through RNeasy® Mini kit (Quiagen), and Poly (A)
387 RNA were purified with Dynabeads® mRNA purification kit (Thermofisher Scientific),
388 the RNA quality was accessed with Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies) and
389 the cDNA libraries were sequenced on Ion PGM System in LNCC laboratory –
390 Petrópolis/RJ. All the samples were performed in triplicate.

391 The resulting fastq files were aligned to the *C. neoformans* var. *grubii* H99 reference

392 genome sequence available on Broad Institute website
393 ([https://data.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.h](https://data.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.htm)
394 [tm](https://data.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.htm)) using TMAP aligner. Aligned transcripts were quantified using cufflinks (64) with the
395 current annotation of the *C. neoformans var. grubii* H99 genome supplied by the Broad
396 Institute. Differential expression was evaluated by the cuddiff module of cufflinks with a
397 False Discovery Rate (FDR) set at 10 %. Genes with a FDR corrected p-value < 0.05 and
398 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 0.58$ were considered to be statistically significant and differentially
399 expressed. Subsequently functional classification of differentially expressed genes was
400 performed by Blast2GO (37, 65).

401 **Urease activity assay.** Evaluation of urease activity was conducted as described elsewhere
402 (66) with few modifications. Briefly, we inoculated 1×10^7 cells of WT or mutants (*pmc1*,
403 *vcx1*, *pmc1vcx1*, *pmc1::PMCI*) in Roberts Urea Broth. The cells were kept in the media
404 through 4 h at 37 °C with shaking, after the fungal cells were centrifuged and the
405 supernatant was collected to be measured in a spectrophotometer at 560 nm, an optical
406 density ≥ 0.3 is considered positive for urease activity.

407 **Quantitative real time RT-PCR analysis.** For RNA extraction, cultures of WT, *pmc1*
408 mutant cells were grown overnight at 30 °C in YPD with shaking, thereafter the cells were
409 washed with PBS and 4×10^7 cells were incubated in DMEM at the same conditions
410 mentioned above for RNA-seq analysis. Three independent sets of RNA samples for each
411 strain were prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's
412 protocol. After DNase treatment (Promega) was conducted, total RNA samples (300 ng)
413 were used for reverse transcription reaction with ImProm-II Reverse transcriptase
414 (Promega). qRT-PCR were performed on a Real-time PCR StepOne Real-Time PCR

415 System (Applied Biosystems). PCR thermal cycling conditions had an initial step at 94 °C
416 for 5 min followed by 40 cycles at 94 °C for 15 s, 60 °C for 20 s, and 72 °C for 20 s.
417 Platinum SYBR green qPCR Supermix (Invitrogen) was used as reaction mix, and 1 µL of
418 the cDNA (4 ng) template in a final volume of 20 µL. Each cDNA sample was analyzed in
419 triplicate with each primer pair (5 pmol). Melting curve analysis was performed at the end
420 of the reaction to confirm a single PCR product. Data were normalized to actin cDNA
421 levels. Relative expression was determined by the $2^{-\Delta CT}$ method (67).

422 **Scanning Electron microscopy and light microscopy.** The yeast cells were grown in
423 inducing capsule conditions cultivated in minimal medium composed of dextrose (15 mM),
424 MgSO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (29.4 mM), glycine (13 mM) and thiamine-HCl (3 mM) (pH
425 5.5) at 37 °C 5 % CO₂ under 72 h of incubation. Thereafter the cells were washed twice
426 with PBS and fixed. Fixation and dehydration were made as described previously (68) with
427 few modifications at critical point drying that was performed at BAL-TEC Critical point
428 dryer using liquid CO₂ (eleven exchanges) and ethanol. The coverslips were placed on a
429 stub covered with a PELCO Carbon Conductive Tab and gold coated. Visualization was
430 conducted at Centro de Microscopia Eletrônica – UFRGS (CME) with EVO MA-10 Zeiss
431 microscope operating at 10 kv.

432 To define the relative capsule sizes it was measured the distance between the cell wall and
433 the capsule outer border and divided by cells diameters through IMAGEJ software
434 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) using light microscopy counterstaining with india ink. At least
435 50 cells of each strain were measured.

436

437

438 FUNDING INFORMATION

439 This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de
440 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de
441 Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Rio
442 Grande do Sul (FAPERGS). The funding agencies had no participation on the decision of
443 the study subject, data collection and analysis or on the submission of this work for
444 publication.

445 ACKNOWLEDGMENTS

446 We thank Arturo Casadevall for providing the monoclonal antibody 18B7. We also thank
447 the Electron Microscopy Center of the Federal University of Rio Grande do Sul (CME,
448 UFRGS) for scanning microscopy analysis.

449 REFERENCES

- 450 1. **Horgan M, Boothman S, Keane CT, Temperley IJ, Mulcahy F, Jackson F.** 1990.
451 Cryptococcal meningitis occurring in HIV infected individuals. *Ir Med J* **83**:157-158.
- 452 2. **Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM.** 2009.
453 Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with
454 HIV/AIDS. *AIDS* **23**:525-530.
- 455 3. **Thinyane KH, Motsemme KM, Cooper VJ.** 2015. Clinical Presentation, Aetiology, and
456 Outcomes of Meningitis in a Setting of High HIV and TB Prevalence. *J Trop Med*
457 **2015**:423161.
- 458 4. **Hetiman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A.** 2010. *Cryptococcus*:
459 from human pathogen to model yeast, 1 ed, vol 1. American society for Microbiology,
460 Washington, DC.
- 461 5. **McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A.** 2006. Estimating the relative contributions of
462 virulence factors for pathogenic microbes. *Infect Immun* **74**:1500-1504.
- 463 6. **Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR.** 2000. Urease as a virulence
464 factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun* **68**:443-448.

- 465 7. **Casadevall A, Nosanchuk JD, Williamson P, Rodrigues ML.** 2009. Vesicular transport
466 across the fungal cell wall. *Trends Microbiol* **17**:158-162.
- 467 8. **Ma H, May RC.** 2009. Virulence in *Cryptococcus* species, vol 67. *Advances in Applied*
468 *Microbiology*.
- 469 9. **Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, Paul-Satyaseela M,**
470 **Kim KS, Kwon-Chung KJ, Paul-Satyasee M.** 2004. Cryptococcal yeast cells invade the
471 central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun*
472 **72**:4985-4995.
- 473 10. **Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F.** 2009. Evidence of a
474 role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect*
475 *Immun* **77**:120-127.
- 476 11. **Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB.**
477 2004. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration,
478 thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* **164**:1761-1771.
- 479 12. **Shi M, Li SS, Zheng C, Jones GJ, Kim KS, Zhou H, Kubes P, Mody CH.** 2010. Real-time
480 imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in
481 mouse brain. *J Clin Invest* **120**:1683-1693.
- 482 13. **Stie J, Fox D.** 2012. Blood-brain barrier invasion by *Cryptococcus neoformans* is enhanced
483 by functional interactions with plasmin. *Microbiology* **158**:240-258.
- 484 14. **Vu K, Tham R, Uhrig JP, Thompson GR, Na Pombejra S, Jamklang M, Bautos JM, Gelli**
485 **A.** 2014. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a
486 secreted fungal metalloprotease. *MBio* **5**:e01101-01114.
- 487 15. **Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell TC,**
488 **Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum MA, Perfect JR.** 2001. Extracellular phospholipase
489 activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **39**:166-175.
- 490 16. **Maruvada R, Zhu L, Pearce D, Zheng Y, Perfect J, Kwon-Chung KJ, Kim KS.** 2012.
491 *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the
492 blood-brain barrier. *Cell Microbiol* **14**:1544-1553.
- 493 17. **Jong A, Wu CH, Gonzales-Gomez I, Kwon-Chung KJ, Chang YC, Tseng HK, Cho WL,**
494 **Huang SH.** 2012. Hyaluronic acid receptor CD44 deficiency is associated with decreased
495 *Cryptococcus neoformans* brain infection. *J Biol Chem* **287**:15298-15306
- 496 18. **Jong A, Wu CH, Shackelford GM, Kwon-Chung KJ, Chang YC, Chen HM, Ouyang Y,**
497 **Huang SH.** 2008. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of
498 brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* **10**:1313-1326.
- 499 19. **Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** 2000. The versatility and universality of calcium

- 500 signalling. Nat Rev Mol Cell Biol **1**:11-21.
- 501 20. **Kraus PR, Heitman J.** 2003. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and
502 pathogenic fungi. Biochem Biophys Res Commun **311**:1151-1157.
- 503 21. **Aramburu J, Rao A, Klee CB.** 2000. Calcineurin: from structure to function. Curr Top Cell
504 Regul **36**:237-295.
- 505 22. **Chin D, Means AR.** 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. Trends Cell Biol
506 **10**:322-328.
- 507 23. **Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert
508 MS.** 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p
509 signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem **277**:31079-31088.
- 510 24. **Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS.** 1999. Yeast calcineurin regulates nuclear
511 localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. Genes Dev **13**:798-
512 803.
- 513 25. **Lev S, Desmarini D, Chayakulkeeree M, Sorrell TC, Djordjevic JT.** 2012. The Crz1/Sp1
514 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell
515 wall integrity. PLoS One **7**:e51403.
- 516 26. **Park HS, Chow EW, Fu C, Soderblom EJ, Moseley MA, Heitman J, Cardenas ME.** 2016.
517 Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. PLoS Pathog
518 **12**:e1005873.
- 519 27. **Kozubowski L, Lee SC, Heitman J.** 2009. Signalling pathways in the pathogenesis of
520 *Cryptococcus*. Cell Microbiol **11**:370-380.
- 521 28. **Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J.** 1997. Calcineurin is required
522 for virulence of *Cryptococcus neoformans*. EMBO J **16**:2576-2589.
- 523 29. **Kozubowski L, Aboobakar EF, Cardenas ME, Heitman J.** 2011. Calcineurin colocalizes
524 with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot
525 Cell **10**:1396-1402
- 526 30. **Cruz MC, Fox DS, Heitman J.** 2001. Calcineurin is required for hyphal elongation during
527 mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. EMBO J **20**:1020-1032.
- 528 31. **Liu M, Du P, Heinrich G, Cox GM, Gelli A.** 2006. Cch1 mediates calcium entry in
529 *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. Eukaryot Cell
530 **5**:1788-1796.
- 531 32. **Fan W, Idnurm A, Breger J, Mylonakis E, Heitman J.** 2007. Eca1, a
532 sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, is involved in stress tolerance and
533 virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun **75**:3394-3405.
- 534 33. **Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, de Oliveira DL, Sobrino L, Rodrigues J,**

- 535 **Leal AL, Nimrichter L, Rodrigues ML, Schrank A, Vainstein MH.** 2010. The vacuolar
536 Ca²(+) exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²(+) tolerance and virulence in
537 *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot
- 538 34. **Kmetzsch L, Staats CC, Cupertino JB, Fonseca FL, Rodrigues ML, Schrank A,**
539 **Vainstein MH.** 2013. The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences
540 the progression of murine cryptococcal infection. FEBS J **280**:4853-4864.
- 541 35. **Liu S, Hou Y, Liu W, Lu C, Wang W, Sun S.** 2015. Components of the calcium-calcineurin
542 signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. Eukaryot Cell
543 **14**:324-334.
- 544 36. **Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, Heitman J,**
545 **Dromer F, Nielsen K.** 2010. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and
546 pathogenicity. PLoS Pathog **6**:e1000953..
- 547 37. **Consortium GO.** 2001. Creating the gene ontology resource: design and implementation.
548 Genome Res **11**:1425-1433.
- 549 38. **Singh A, Panting RJ, Varma A, Saijo T, Waldron KJ, Jong A, Ngamskulrunroj P,**
550 **Chang YC, Rutherford JC, Kwon-Chung KJ.** 2013. Factors required for activation of
551 urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. MBio **4**:e00220-00213.
- 552 39. **Chang YC, Bien CM, Lee H, Espenshade PJ, Kwon-Chung KJ.** 2007. Sre1p, a regulator
553 of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus*
554 *neoformans*. Mol Microbiol **64**:614-629.
- 555 40. **Jung KW, Yang DH, Maeng S, Lee KT, So YS, Hong J, Choi J, Byun HJ, Kim H, Bang**
556 **S, Song MH, Lee JW, Kim MS, Kim SY, Ji JH, Park G, Kwon H, Cha S, Meyers GL,**
557 **Wang LL, Jang J, Janbon G, Adedoyin G, Kim T, Averette AK, Heitman J, Cheong E,**
558 **Lee YH, Lee YW, Bahn YS.** 2015. Systematic functional profiling of transcription factor
559 networks in *Cryptococcus neoformans*. Nat Commun **6**:6757.
- 560 41. **Missall TA, Lodge JK.** 2005. Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus*
561 *neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators.
562 Mol Microbiol **57**:847-858.
- 563 42. **Orsi CF, Colombari B, Ardizzoni A, Peppoloni S, Neglia R, Posteraro B, Morace G,**
564 **Fadda G, Blasi E.** 2009. The ABC transporter-encoding gene AFR1 affects the resistance of
565 *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal
566 maturation. FEMS Yeast Res **9**:301-310.
- 567 43. **Chayakulkeeree M, Johnston SA, Oei JB, Lev S, Williamson PR, Wilson CF, Zuo X,**
568 **Leal AL, Vainstein MH, Meyer W, Sorrell TC, May RC, Djordjevic JT.** 2011. SEC14 is a

- 569 specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus*
570 *neoformans*. Mol Microbiol **80**:1088-1101.
- 571 44. **Charlier C, Chrétien F, Baudrimont M, Mordelet E, Lortholary O, Dromer F.** 2005.
572 Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-
573 brain barrier. Am J Pathol **166**:421-432.
- 574 45. **Fries BC, Taborda CP, Serfass E, Casadevall A.** 2001. Phenotypic switching of
575 *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. J Clin
576 Invest **108**:1639-1648.
- 577 46. **Sabiiti W, May RC.** 2012. Capsule independent uptake of the fungal pathogen *Cryptococcus*
578 *neoformans* into brain microvascular endothelial cells. PLoS One **7**:e35455.
- 579 47. **Bojarczuk A, Miller KA, Hotham R, Lewis A, Ogryzko NV, Kamuyango AA, Frost H,**
580 **Gibson RH, Stillman E, May RC, Renshaw SA, Johnston SA.** 2016. *Cryptococcus*
581 *neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage
582 Control of Infection. Sci Rep **6**:21489.
- 583 48. **Sabiiti W, Robertson E, Beale MA, Johnston SA, Brouwer AE, Loyse A, Jarvis JN,**
584 **Gilbert AS, Fisher MC, Harrison TS, May RC, Bicanic T.** 2014. Efficient phagocytosis
585 and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. J Clin Invest
586 **124**:2000-2008.
- 587 49. **O'Meara TR, Alspaugh JA.** 2012. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a
588 shield. Clin Microbiol Rev **25**:387-408.
- 589 50. **Griffiths EJ, Kretschmer M, Kronstad JW.** 2012. Aimless mutants of *Cryptococcus*
590 *neoformans*: failure to disseminate. Fungal Biol Rev **26**:61-72.
- 591 51. **Wilder JA, Olson GK, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Lipscomb MF.** 2002.
592 Complementation of a capsule deficient *Cryptococcus neoformans* with CAP64 restores
593 virulence in a murine lung infection. Am J Respir Cell Mol Biol **26**:306-314.
- 594 52. **Moyrand F, Fontaine T, Janbon G.** 2007. Systematic capsule gene disruption reveals the
595 central role of galactose metabolism on *Cryptococcus neoformans* virulence. Mol Microbiol
596 **64**:771-781.
- 597 53. **Shea JM, Kechichian TB, Luberto C, Del Poeta M.** 2006. The cryptococcal enzyme
598 inositol phosphosphingolipid-phospholipase C confers resistance to the antifungal effects of
599 macrophages and promotes fungal dissemination to the central nervous system. Infect Immun
600 **74**:5977-5988.
- 601 54. **Santangelo R, Zoellner H, Sorrell T, Wilson C, Donald C, Djordjevic J, Shounan Y,**
602 **Wright L.** 2004. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in
603 dissemination of cryptococcosis in a murine model. Infect Immun **72**:2229-2239.

- 604 55. **Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Olszewski MA, Mueller M, Wormley FL.**
605 2015. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against
606 *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **83**:4513-4527.
- 607 56. **Nimrichter L, Frases S, Cinelli LP, Viana NB, Nakouzi A, Travassos LR, Casadevall A,**
608 **Rodrigues ML.** 2007. Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular
609 glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryot Cell* **6**:1400-1410.
- 610 57. **Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, Dyakopu N, Meintjes G.** 2006. Symptomatic relapse
611 of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of
612 fluconazole resistance and immune reconstitution. *Clin Infect Dis* **43**:1069-1073.
- 613 58. **Smith KD, Achan B, Hullsiek KH, McDonald TR, Okagaki LH, Alhadab AA,**
614 **Akampurira A, Rhein JR, Meya DB, Boulware DR, Nielsen K, Team A-CC.** 2015.
615 Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in
616 Uganda. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:7197-7204.
- 617 59. **Courchesne WE.** 2002. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the
618 antiarrhythmic drug amiodarone. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:195-199.
- 619 60. **Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S.** 2016. Synergistic Effect of Fluconazole and
620 Calcium Channel Blockers against Resistant *Candida albicans*. *PLoS One* **11**:e0150859.
- 621 61. **Aguirre KM, Sayles PC, Gibson GW, Johnson LL.** 1996. Resistance to *Cryptococcus*
622 *neoformans* is associated with an inflammatory response to *Toxoplasma gondii* in the central
623 nervous system of mice. *Infect Immun* **64**:77-82.
- 624 62. **Chen SH, Stins MF, Huang SH, Chen YH, Kwon-Chung KJ, Chang Y, Kim KS, Suzuki**
625 **K, Jong AY.** 2003. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of
626 human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **52**:961-970.
- 627 63. **Ibrahim AS, Filler SG, Alcouloumre MS, Kozel TR, Edwards JE, Ghannoum MA.** 1995.
628 Adherence to and damage of endothelial cells by *Cryptococcus neoformans* in vitro: role of
629 the capsule. *Infect Immun* **63**:4368-4374.
- 630 64. **Roberts A, Pimentel H, Trapnell C, Pachter L.** 2011. Identification of novel transcripts in
631 annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics* **27**:2325-2329.
- 632 65. **Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M,**
633 **Talón M, Dopazo J, Conesa A.** 2008. High-throughput functional annotation and data
634 mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* **36**:3420-3435.
- 635 66. **Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennett JE.** 1987. Urease
636 inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **55**:1751-
637 1754.

- 638 67. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time
639 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
- 640 68. **Araújo GR, Fontes GN, Leão D, Rocha GM, Pontes B, Sant'Anna C, de Souza W,**
641 **Frases S.** 2016. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides form branched and
642 complex filamentous networks viewed by high-resolution microscopy. *J Struct Biol* **193**:75-
643 82.

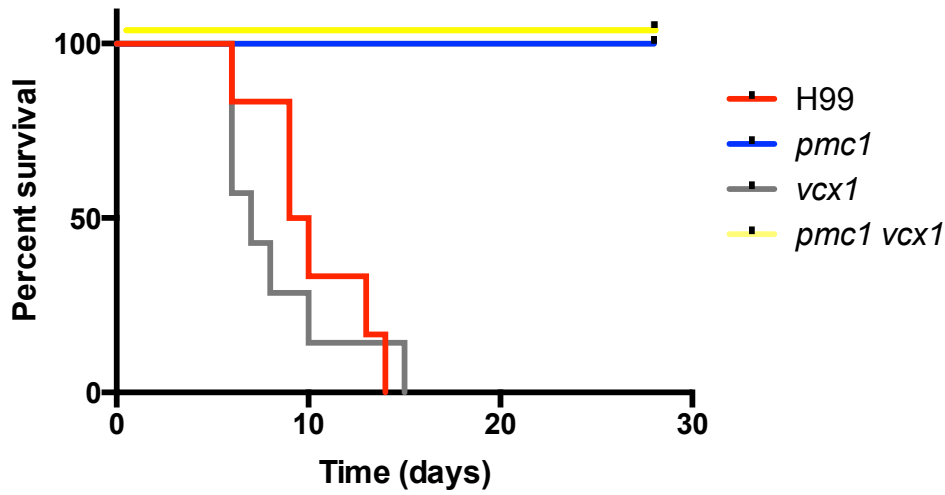
Table

Table 1- Pmc1-dependent genes. Represented genes that are differentially expressed, all had $|\log_2 \text{ fold change}| \geq 0.58$ (FC with a FDR-corrected p-value ≤ 0.05). Table exhibits the coding access, gene name, protein description, \log_2 fold change and the corrected p-value represented ($q_value \leq 0.05$). Upregulated genes in *pmc1* mutant are in light gray (FC ≥ 1.5 or $\log_2 \text{ FC} \geq 0.58$). Downregulated genes in *pmc1* mutant are in dark grey (FC ≤ 0.58 or $\log_2 \text{ FC} \leq -0.58$).

Accession number	Gene	Protein functional description	Log 2 fold change	q_value
Transmigration mechanisms				
CNAG_00730	<i>AFR1</i>	ATP-binding cassette transporter	-0,619555	0,000218604
CNAG_02057	<i>URE6</i>	Component of complex apourease	1,19578	0,00312535
CNAG_03664	<i>NIC1</i>	Nickel transporter	-0,651765	0,000413564
CNAG_04090	<i>ATF1</i>	Activating transcription factor	-0,955097	0,000218604
CNAG_04804	<i>SRE1</i>	Transcription factor	1,39092	0,000218604
CNAG_05540	<i>URE1</i>	Urease	-0,784538	0,000218604
CNAG_06085	<i>PLB1</i>	Phospholipase B	-0,717626	0,000218604
Calcium signaling and homeostasis				
CNAG_03805	<i>VCX1</i>	Calcium/proton exchanger	1,10986	0,000218604
CNAG_05592	<i>ECA1</i>	Potassium/sodium efflux P-type ATPase, fungal-type	0,683049	0,000218604
CNAG_00156	<i>CRZ1</i>	Calcineurin responsive zinc finger	0,598983	2,18534
CNAG_01557	<i>CAM1</i>	Calmodulin	-0,836183	0,000218604
Capsule biosynthesis				
Upregulated in $\Delta pmc1$				
CNAG_00996	<i>PMT4</i>	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase	0,731782	0,0307745
CNAG_02581	<i>CAS33</i>	Hypothetical protein	1,07106	0,000218604
CNAG_03735	<i>CAP3</i>	Hypothetical protein	0,740374	0,000601677
CNAG_05139	<i>UGT1</i>	UDP-sugar transporter	0,865545	0,000413564
Downregulated in $\Delta pmc1$				
CNAG_00701	<i>CAS31</i>	Hypothetical protein	-0,643515	0,0499896
CNAG_00721	<i>CAP59</i>	alpha-1,3-mannosyltransferase	-1,14744	0,000218604
CNAG_00746	<i>CAS35</i>	Hypothetical protein	-0,740914	0,000218604
CNAG_01283	<i>CAP59</i>	Hypothetical protein	-0,614751	0,052312
CNAG_01664	<i>CAS34</i>	CMGC/CDK/CDC2 protein kinase	-0,617591	0,0725753
CNAG_03096	<i>UGE1</i>	UDP-glucose 4-epimerase	-0,503057	0,0692492
CNAG_03322	<i>UXS1</i>	UDP-glucuronate decarboxylase	-1,36096	0,000218604
CNAG_03438	<i>HXT1</i>	hexose transporter	-1,17114	0,000218604
CNAG_03695	<i>CAS41</i>	Hypothetical protein	-1,07391	0,0196805
CNAG_04969	<i>UGD1</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	-0,666386	0,000218604

FIGURES

A



B

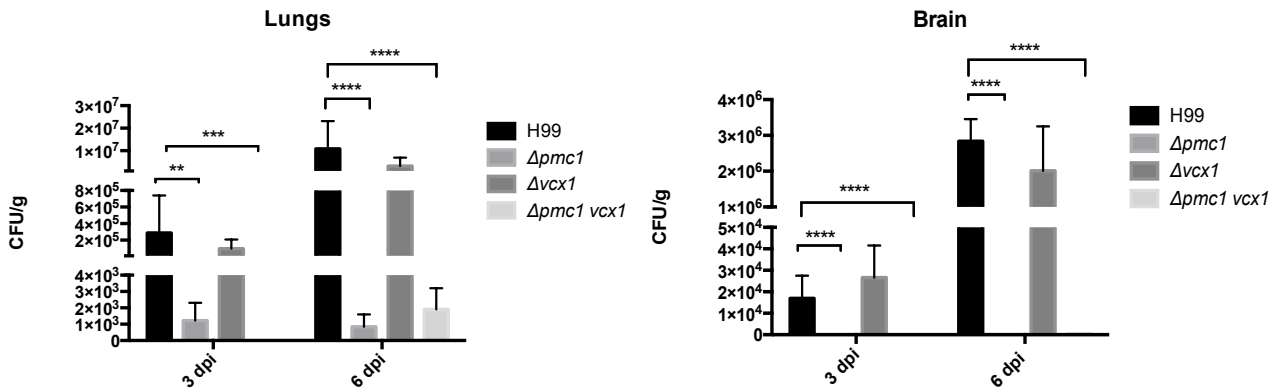


Fig. 1 – *Pmc1* is required for cryptococcal virulence and transmigration events. Mice were infected with WT, *pmc1* mutant, *vcx1* mutant or *pmc1vcx1* mutant strains. (A) Kaplan-Meier survival curve, *pmc1* and *pmc1vcx1* mutants strains were avirulent $p < 0.0001$. Statistical significance was evaluated through Log-rank Mantel-Cox (B) Fungal burden in lungs and brain, 3 and 6 days post infection (dpi). Mice were infected with WT, *pmc1* mutant, *vcx1* mutant or *pmc1vcx1* mutant strains. Error bars indicate SD. Mean values were compared using Two-way ANOVA with a post hoc Tukey. Statistical significance marked as * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.005$. and **** $p < 0.001$.

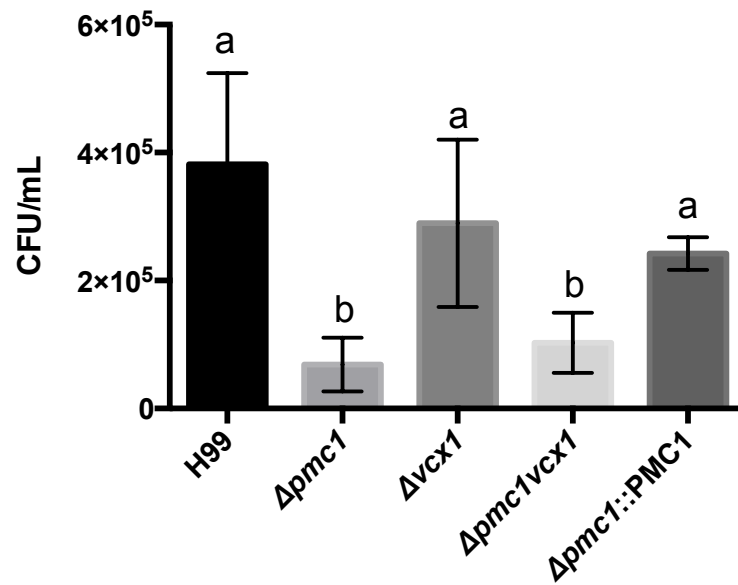


Fig. 2 – Disruption of Pmc1 impairs the transmigration profile *in vitro*. *In vitro* transmigration assay with ThinCert™ accessory covered with HUVEC cells to mimic BBB. Yeast cells were collected from bottom chamber and plated for CFU determination. Error bars indicate SD. Mean values were compared using one-way ANOVA with a post hoc Dunnett's.

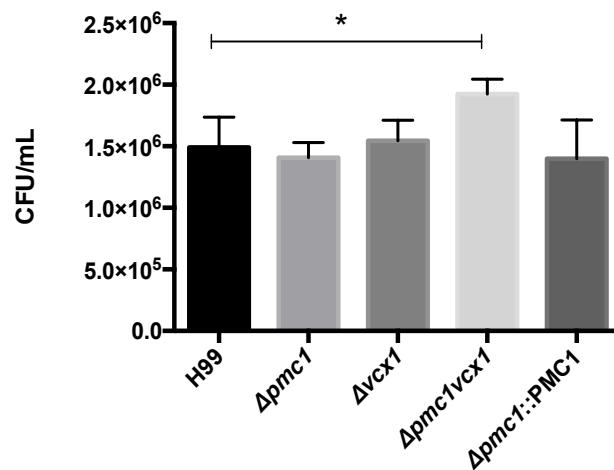


Fig. 3 – The double knockout of Vcx1 and Pmc1 yields a phenotype more susceptible to phagocytosis by murine macrophages. The *pmc1vcx1* mutant cells were more efficiently phagocytosed than WT cells. Error bars indicate SD. Mean values were compared using one-way ANOVA with a post hoc Dunnett's. Statistical significance marked as * $p < 0.05$

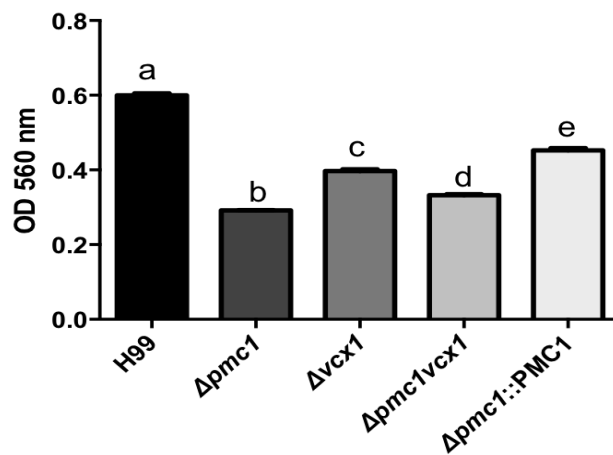
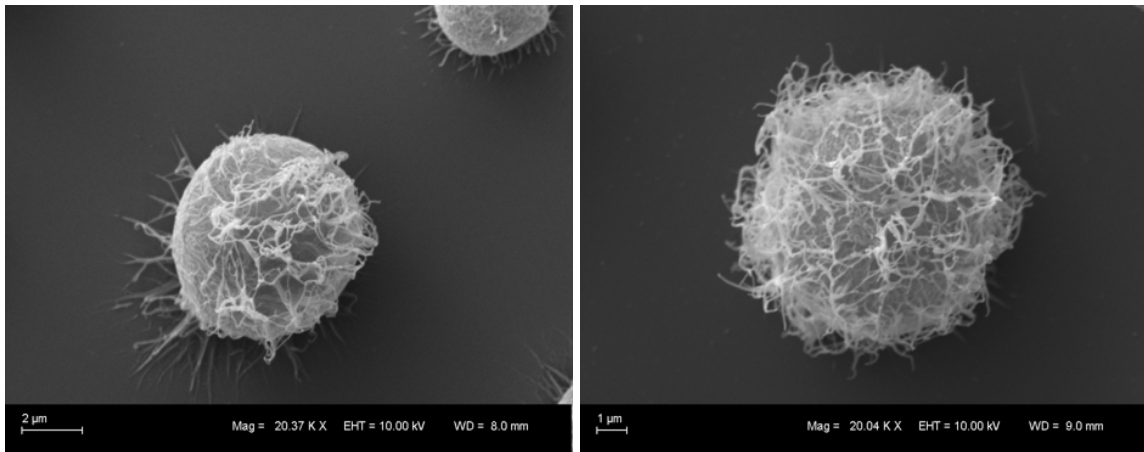


Fig. 4– Loss of Pmc1 interferes and strongly decreases urease activity. WT and *pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1*, and *pmc1::PMC1* mutant strains incubated in Roberts urea broth. Urease activity was measured by optical density in 560 nm. Error bars indicate SD. Mean values were compared using one-way ANOVA with a post-hoc Tukey. Mean with the same letter don't have statistical difference.

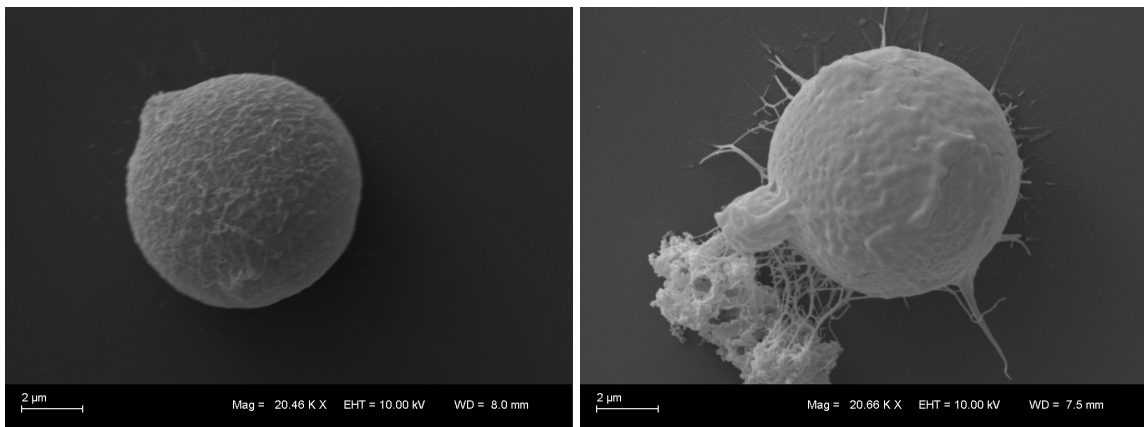
A



H99

Δpmc1

B



H99

Δpmc1

Fig. 6 – Scanning electron microscopy was conducted to assess the polysaccharide capsule ultrastructure. The *pmc1* mutant strain had no apparent differences on capsule ultrastructure in relation to WT. Rich calcium environment weakens capsule ultrastructure, as seen by the loss of this structure on both strains. (A) WT and *pmc1* mutant in inducing capsule conditions on minimal media. (B) WT and *pmc1* mutant in minimal media supplemented with 50 μ M of CaCl_2 .

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1- (A) Table with discrimination of total number of reads, trimmed reads and aligned reads for each sample of the triplicate data from RNA-seq. (B) Table representing differentially expressed genes quantity in *pmc1* mutant and WT. (C) Table shows 2 genes only expressed in WT.

A

Strains	H99 1	H99 2	H99 3	$\Delta pmc1$ 1	$\Delta pmc1$ 2	$\Delta pmc1$ 3
Total reads	727186	575302	696556	470128	792095	913773
Trimmed reads	393027	54250	506627	173009	566092	705938
Aligned reads	382099	527310	493807	168770	550114	687448

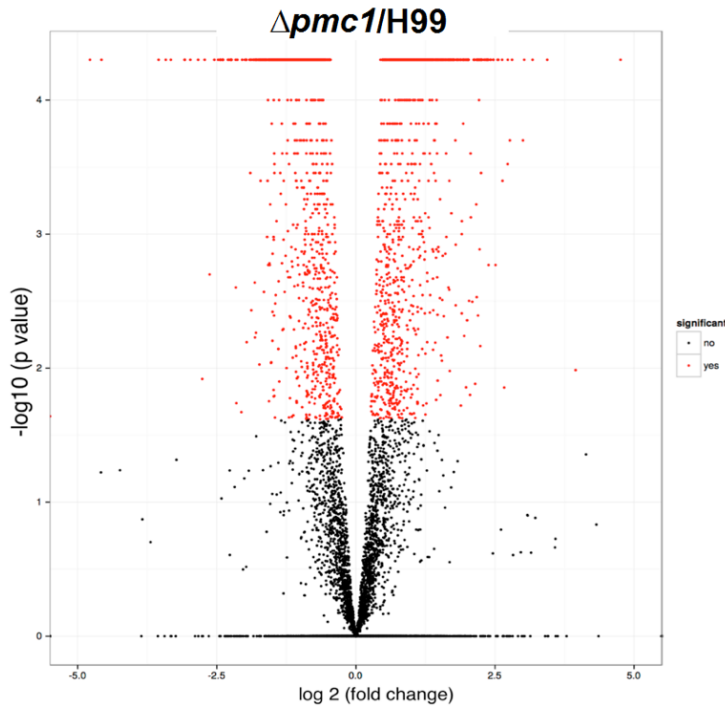
B

Strains	Upregulated	Expressed only	Total no of genes differentially expressed
H99	1028	2	1946
$\Delta pmc1$	916	0	1946

C

Access number	Protein functional description
CNAG_0648	ATP synthase subunit 9, mitochondrial
CNAG_00868	Hypothetical protein

A



B

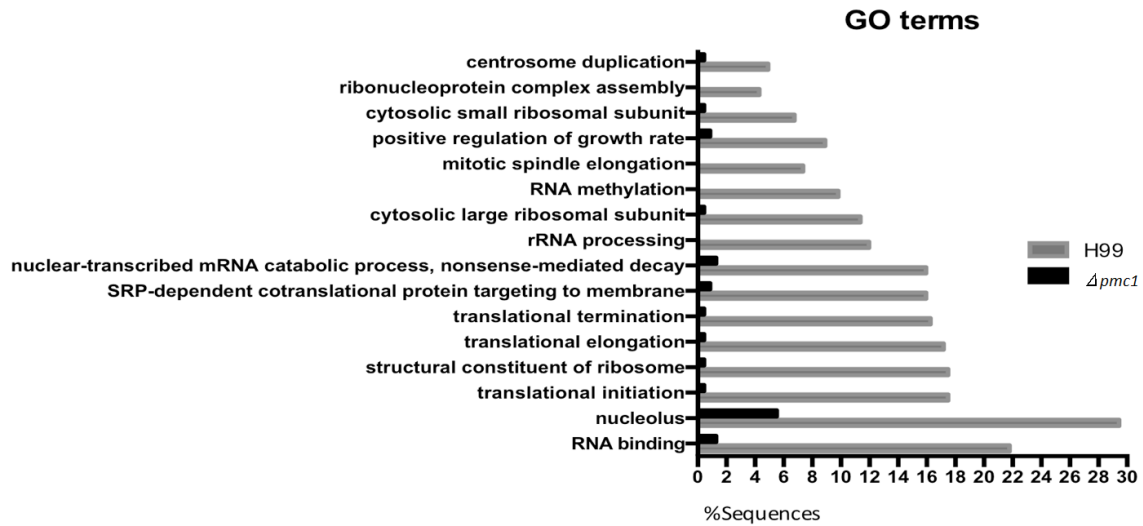


Fig. S1- Transcriptome analysis (RNA-Seq) comparing *pmc1* mutant global gene expression with WT. (A) Log₂ fold change in gene expression, red dots significantly differentially expressed and black dots not significantly, cutoff utilized was $|\log_2 \text{ fold change}| \geq 0.58$ with a FDR-corrected p-value ≤ 0.05 . (B) Graph represents comparison of

mutant *pmc1* and WT through the percentage of sequence collected from the RNA-seq analysis annotated as functional terms on Gene Ontology. All the experiment was conducted with biological and technical triplicate.

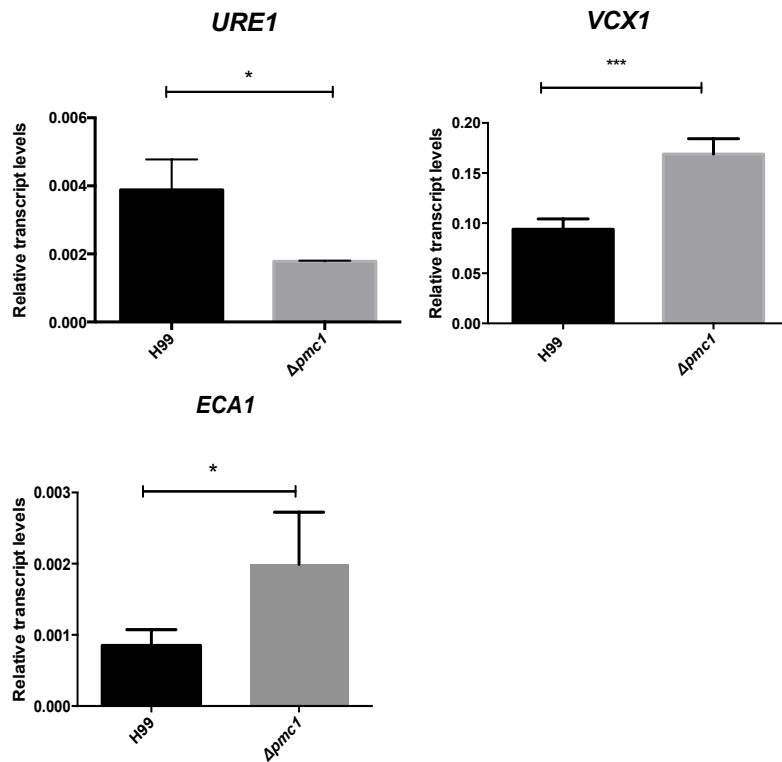


Fig. S2- Genes selected on RNA-seq validated through qRT-PCR on the same conditions. Error bars indicate SD. Student's *t* test was used to determine the statistical significance marked as * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.005$. and **** $p < 0.001$.

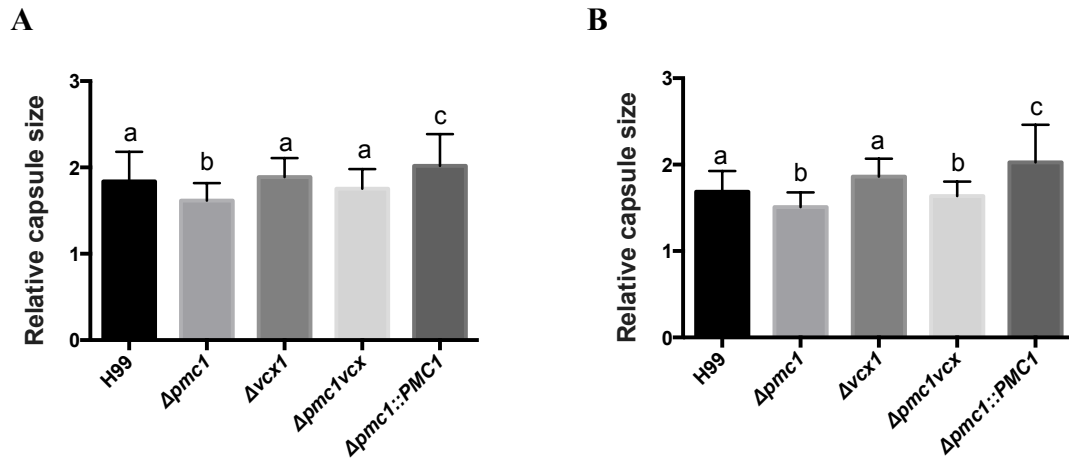


Fig S3- Assessment of capsule size on the same inducing capsule conditions of SEM. (A) Cells growth on minimal media (B) cells on minimal media supplemented with 50 μ M $CaCl_2$. Error bars indicate SD. Mean with the same letter don't have statistical difference.

4. Discussão

A homeostase de Ca^{2+} em *C. neoformans* é mantida por transportadores específicos, os quais têm como função captar Ca^{2+} para o citosol e direcionar seu estoque em organelas, coordenando os níveis intracelulares deste metal. Esta regulação tem como finalidade manter níveis adequados de Ca^{2+} para a célula, visto que este é um importante mensageiro secundário que regula respostas ao estresse (Liu *et al.*, 2015). A ausência de transportadores de Ca^{2+} como Cch1, Eca1, Vcx1 e Pmc1 resultou em linhagens com virulência atenuada, o que reforça a importância da regulação adequada dos níveis de Ca^{2+} para o estabelecimento da criptococose (Liu *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007; Kmetzsch *et al.*, 2010; Kmetzsch *et al.*, 2013). No presente estudo pode-se observar por um modelo *in vivo* de infecção sistêmica que os mutantes nulos *pmc1* e *pmc1vcx1* foram completamente avirulentos e apresentaram inabilidade de disseminação para o SNC e diminuição de CFU no tecido pulmonar, o que é característico de uma resposta imune com eliminação adequada das células fúngicas do tecido pulmonar. No entanto, o mutante nulo *vcx1* foi tão virulento quanto o selvagem e demonstrou total capacidade de disseminação. Apesar de Pmc1 e Vcx1 possuírem papéis complementares na homeostase de Ca^{2+} , apresentam funcionamentos distintos. Em *S. cerevisiae* a regulação desses transportadores é coordenada pela via de sinalização mediada por calcineurina, que regula positivamente o transportador Pmc1 e negativamente Vcx1. Além disso, em *S. cerevisiae* o transportador Vcx1 possui resposta a curto prazo, quando após breve desafio com altas concentrações de Ca^{2+} consegue restaurar seus níveis intracelulares rapidamente, já o transportador Pmc1 parece atuar a longo prazo, sustentando o crescimento em ambientes com altos níveis de Ca^{2+} e mantendo sua concentração ótima intracelular (Miseta *et al.*, 1999; Forster e Kane, 2000; Liu *et al.* 2015). É possível que em *C. neoformans* a regulação dos transportadores Pmc1 e Vcx1, assim como a atuação de Vcx1 a curto prazo na homeostase de cálcio, sejam similares à *S. cerevisiae*. Isso poderia explicar o motivo de o transportador Vcx1 não apresentar tanto impacto na virulência e na disseminação quanto o transportador Pmc1. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de elucidar essa regulação.

Dentre os órgãos que *C. neoformans* pode acessar por via hematogênica, ressalta-se um notável tropismo para o sistema nervoso central, o que o diferencia de outras espécies fúngicas. Meningoencefalite não tratada é invariavelmente letal e, mesmo nos casos em

que há a utilização de terapia antifúngica, as reincidências de meningite frequentemente ocorrem (Bicanic *et al.*, 2006; Del poeta e Casadevall, 2012). Portanto, se faz necessário o melhor entendimento dos mecanismos moleculares que propiciam a disseminação para o SNC. Dessa maneira, na presente pesquisa avaliamos os mecanismos de disseminação e sobrevivência no SNC alterados pela ausência de Pmc1. Através da análise transcriptômica identificamos a expressão diferencial de genes relacionados à transmigração, comparando o mutante *pmc1* ao selvagem. O mutante *pmc1* apresentou expressão gênica alterada na via relacionada com atividade de urease, a qual é necessária para a transmigração paracelular da levedura. O próprio gene *URE1* é menos expresso pelo mutante *pmc1*, assim como o transportador de níquel *NIC1*, necessário para a atividade da apoenzima urease (Singh *et al.*, 2013). Além disso, *SRE1*, que codifica para um fator de transcrição, é regulado positivamente no mutante em relação ao selvagem. Esse fator de transcrição possibilita a sobrevivência da levedura em ambientes com baixos níveis de O₂, como no tecido cerebral, mas também é um regulador positivo da atividade de urease. Por outro lado, o mutante *pmc1* possui menor expressão do *ATF1*, que codifica para um fator de transcrição necessário à indução de estresse oxidativo, além de ser um regulador negativo da atividade de urease. Provavelmente a maior expressão de *SRE1* e menor expressão de *ATF1* sejam mecanismos compensatórios dada a atividade de urease no mutante nulo *pmc1*. Ademais, o mutante *pmc1* apresentou menor expressão de *ATP-binding cassette transporter gene AFRI*. A superexpressão desse gene está relacionada com resistência a antifúngicos da classe dos azoles e propicia a sobrevivência da levedura dentro das células de glia no SNC (Olszewski *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2014)

Não somente a expressão de genes relacionados à atividade de urease apresentaram alteração no mutante *pmc1* como também a própria atividade de urease. Foi evidenciado no presente estudo que os mutantes *pmc1* e *pmc1vcx1* apresentam atividade de urease reduzida comparadas à linhagem selvagem. Considerando que a atividade de urease é capaz de causar danos as junções aderentes das células endoteliais cerebrais promovendo a disseminação da levedura e que é um dos principais representantes do mecanismo de transmigração paracelular (Olszewski *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010), podemos afirmar que o transportador Pmc1 é necessário para a atividade adequada do mecanismo paracelular dependente de urease. Além disso, a atividade de urease detém um papel importante na interação patógeno-hospedeiro no tecido pulmonar, visto que possui a capacidade de

alterar a maturação das células dendríticas levando à polarização da resposta imune para Th2. Essa por sua vez é uma resposta não protetora caracterizada por um processo defeituoso de eliminação das células de levedura do tecido pulmonar. A menor expressão de *URE1* resulta em menores níveis de polarização da resposta imune (Osterholzer *et al.*, 2009). Levando em consideração os resultados obtidos, pode-se afirmar que a inabilidade de disseminação para o SNC dos mutantes *pmc1* e *pmc1vcx1* é explicada em parte por um mecanismo paracelular defeituoso. Paralelamente a isso, na infecção causada pelos mutantes *pmc1* e *pmc1vcx1* houve a diminuição da carga fúngica do tecido pulmonar, o que pode ter diminuído a carga fúngica de disseminação. É possível que essa eliminação das células fúngicas do tecido pulmonar seja consequência de uma menor polarização da resposta imune resultante da menor atividade de urease que os mutantes apresentam.

A ausência do transportador *Pmc1* resulta no aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular (Kmetzsch *et al.*, 2013). Esse aumento pode ser percebido pela calmodulina, que consequentemente ativa a via de sinalização de calcineurina. Essa via é conhecida como via de resposta ao estresse e virulência, propicia o desenvolvimento a 37 °C e é necessária para a adaptação ao hospedeiro (Kozubowski *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015). Nossos dados de análise transcriptômica mostraram que o mutante *pmc1* apresenta menor expressão do gene de calmodulina e maior expressão do gene codificante para o fator de transcrição *Crz1*, recentemente identificado como o principal alvo da via da calcineurina na regulação transcricional. Essa alteração é plausível considerando o desequilíbrio nos níveis intracelulares de Ca^{2+} na ausência de *Pmc1* o que pode provocar a ativação inapropriada da via da calcineurina, isso comprova o envolvimento de *Pmc1* nessa via de sinalização. Ademais, houve um aumento de expressão dos genes codificantes de *Eca1* e *Vcx1*, o que representa uma tentativa de compensar a atividade de *Pmc1* e minimizar o desequilíbrio de Ca^{2+} intracelular.

O mecanismo de transmigração “cavalo de tróia”, no qual a levedura ganha acesso ao SNC dentro de células fagocíticas (Charlier *et al.*, 2009), foi avaliado através da interação das células de *C. neoformans* com linhagens celulares de macrófagos murinos. O mutante *pmc1vcx1* mostrou-se mais suscetível à fagocitose e é possível que também seja mais vulnerável a atividade antifúngica dos macrófagos (Chaturvedi e Wormely, 2013; Leopold Wager *et al.*, 2015), o que reduziria a quantidade de leveduras que chegam ao

SNC. No entanto, devido às limitações da técnica relacionadas à diminuição da viabilidade dos mutantes em meio DMEM por períodos superiores a 4 horas não foi possível avaliar o índice de proliferação intracelular, que nos revelaria a capacidade de sobrevivência das leveduras dentro dos macrófagos. Outro fator que tem influência na fagocitose é a cápsula polissacarídica, além de ser o fator de virulência mais proeminente de *C. neoformans* (Del Poeta, 2004; García-Rodas e Zagarza, 2012). No ensaio de microscopia eletrônica de varredura percebeu-se que a ultraestrutura da cápsula polissacarídica do mutante *pmc1* não apresenta diferenças em relação à estrutura capsular da linhagem selvagem. Não obstante, quando as ultraestruturas capsulares das duas linhagens foram avaliadas em um meio suplementado de CaCl_2 , surpreendentemente ambos perdem a cápsula polissacarídica, evidenciando uma estrutura capsular fragilizada. Isso pode ser explicado pela capacidade que cátions divalentes como Ca^{2+} têm de se ligar à resíduos de ácido glucorônico pertencentes à GXM, o que promove a formação de ligações cruzadas entre fibras polissacarídicas diferentes, no entanto, Ca^{2+} em excesso pode saturar as ligações impedindo essa ligação cruzada (Nimrichter *et al.*, 2007). Essa saturação foi descrita como bloqueadora do aumento do volume capsular por Nimrichter *et al.*, 2007. Em nosso estudo demonstramos que a saturação por Ca^{2+} também é capaz de fragilizar a ultraestrutura polissacarídica.

Considerando a atual disponibilidade de fármacos antifúngicos utilizados na infecção criptocócica, os eventos de toxicidade e resistência relacionados a essas terapias (Bicanic *et al.*, 2006; Laniado-Laborín *et al.*, 2009; Hamill, 2013; Smith *et al.*, 2015) e a taxa de mortalidade de 30% devido a infecção com *C. neoformans* em pacientes imunocomprometidos, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de novas terapias e alvos. Apesar de algumas tentativas com fármacos terem alcançado o estágio de ensaios clínicos, a mais recente classe de compostos antifúngicos, aprovada há 25 anos, foi a dos azoles (Coelho e Casadevall, 2016). Dessa forma, a elucidação de fatores que propiciam a sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro e o desenvolvimento da meningite criptocócica podem ser utilizados como potenciais alvos para terapia antifúngica. Para tanto, estudos dos mecanismos moleculares, regulação gênica, vias de sinalização e respostas ao estresse de *C. neoformans* são cruciais, assim como o entendimento dos fundamentos da infecção no hospedeiro e no patógeno. O bloqueio do mecanismo de transmigração é uma alternativa interessante para terapia antifúngica. Recentemente a

flurofamida (EU-4534), inibidor de urease, foi utilizada como tratamento em camundongos infectados com *C. neoformans* e esses camundongos apresentaram sobrevivência prolongada e diminuição de CFU no tecido cerebral. Esse composto já foi proposto para uso na clínica (Shi *et al.*, 2010). Outro estudo recente identificou dois compostos que inibem o esfingolípido glucosilceramida do fungo, necessários para virulência de *C. neoformans*, esses compostos também causam a acumulação de vesículas, responsáveis por secretar fatores de virulência como urease, fosfolipase B e melanina. Estudos *in vivo* comprovaram sua eficácia e seu sinergismo com antifúngicos já utilizados na clínica (Mor *et al.*, 2015). Ademais, os componentes da via de sinalização da calcineurina têm sido descritos como potenciais alvos para terapia antifúngica (revisado em Liu *et al.*, 2015). O redirecionamento de fármacos já utilizados na clínica também têm sido explorado. Compostos como amiodarona e outros bloqueadores de canais de cálcio apresentam propriedades antifúngicas sozinhos ou em associação com fluconazol (Courchesne, 2002; Liu *et al.*, 2016). Assim sendo, no presente estudo demonstramos que o transportador Pmc1 é necessário para os eventos de transmigração e conseqüentemente para o estabelecimento da doença e do quadro de meningite criptocócica. Por conseguinte, consideramos que a regulação da homeostase de Ca^{2+} e seus transportadores possuem potencial como novos alvos para terapia antifúngica, no entanto, mais estudos e avanços devem ser feitos para o melhor entendimento mecanístico da atenuação da virulência relacionada à desregulação na homeostase de Ca^{2+} .

5. Conclusões

- O transportador de cálcio vacuolar Pmc1 é necessário para a virulência e para o processo de transmigração.
- A ausência dos transportadores Pmc1 e Vcx1 no mutante nulo *pmc1vcx1* resulta em um fenótipo de levedura mais suscetível à fagocitose.
- A deleção de *PMCI* resulta em grandes alterações no perfil transcricional da célula. Nota-se alterações na expressão gênica de produtos relacionados com a transmigração, via da sinalização da calcineurina e homeostase de cálcio .
- O transportador Pmc1 é necessário para que *C. neoformans* apresente uma atividade de urease adequada e, conseqüentemente, um perfil de transmigração paracelular adequado.
- A ultraestrutura capsular de *C. neoformans* sofre alterações quando encontra-se em meio rico de CaCl_2 , levando à formação de uma estrutura polissacarídica fragilizada que pode ser observada por microscopia eletrônica de varredura.

6. Perspectivas

- Avaliar o potencial imunogênico do mutante nulo *pmc1* em ensaio de imunização de camundongos.
- Verificar o conteúdo das vesículas extracelulares secretadas pelo mutante nulo *pmc1* em comparação com o selvagem.
- Acessar o índice de proliferação intracelular dos mutantes nulos *pmc1*, *pmc1vcx1* em relação ao selvagem através de citometria de fluxo.
- Realizar tratamento das células de *C. neoformans* com inibidor de calcineurina (FK506) e avaliar o perfil diferencial de expressão gênica relacionado à transmigração e à homeostase de cálcio.
- Acessar, através de microscopia eletrônica de varredura, os danos que *C. neoformans* selvagem e mutante nulo *pmc1* causam à uma monocamada de células endoteliais que mimetizam a BHE.

7. Referências Bibliográficas

1. AKHTER, S. *et al.* Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 71, n. 10, p. 5794-802, Oct 2003.
2. 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.
3. 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.
4. ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends Microbiol**, v. 22, n. 3, p. 120-7, Mar 2014.
5. BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 11-21, Oct 2000.
6. BICANIC, T. *et al.* Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 8, p. 1069-73, Oct 2006.
7. BOJARCZUK, A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. **Sci Rep**, v. 6, p. 21489, 2016.
8. BOSE, I. *et al.* A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 4, p. 655-63, Aug 2003.
9. BRATTON, E. W. *et al.* Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 6, p. 2485-95, Jun 2013.
10. BROWN, G. D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, Dec 2012.
11. CASADEVALL, A.; PERFECT, J. **Cryptococcus neoformans**. ASM Press, 1998.
12. CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J Infect Dis**, v. 184, n. 3, p. 337-44, Aug 2001.
13. CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 7, p. 4912-9, Jul 1994.

14. CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 66, n. 5, p. 2230-6, May 1998.
15. CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 181, n. 18, p. 5636-43, Sep 1999.
16. CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infect Immun**, v. 64, n. 6, p. 1977-83, Jun 1996
17. CHANG, Y. C. *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.
18. CHARLIER, C. *et al.* Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. **Am J Pathol**, v. 166, n. 2, p. 421-32, Feb 2005.
19. CHARLIER, C. 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.
20. CHATURVEDI, A. K.; WORMLEY, F. L. Cryptococcus antigens and immune responses: implications for a vaccine. **Expert Rev Vaccines**, v. 12, n. 11, p. 1261-72, Nov 2013.
21. CHEN, S. *et al.* Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 499-508, Aug 2000.
22. CHEN, S. C. *et al.* Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **J Infect Dis**, v. 175, n. 2, p. 414-20, Feb 1997.
23. CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1507-12, May 1994.
24. COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 219-38, 2014.
25. COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 6, p. 792-9, Jun 2016.
26. COENJAERTS, F. E. *et al.* The Skn7 response regulator of *Cryptococcus neoformans*

- is involved in oxidative stress signalling and augments intracellular survival in endothelium. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 652-61, Jun 2006.
27. COURCHESNE, W. E. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300, n. 1, p. 195-9, Jan 2002.
 28. COX, G. M. *et al.* Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 166-75, Jan 2001.
 29. COX, G. M. *et al.* Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 443-8, Feb 2000.
 30. CRUZ, M. C. *et al.* Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 1, p. 143-9, Jan 2000.
 31. CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, v. 20, n. 5, p. 1020-32, Mar 2001.
 32. CUI, J. *et al.* Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. **FEMS Yeast Res**, v. 9, n. 8, p. 1137-47, Dec 2009.
 33. DAVIS, M. J. *et al.* *Cryptococcus neoformans*-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. **J Immunol**, v. 194, n. 5, p. 2219-31, Mar 2015.
 34. DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067-75, Oct 2004.
 35. DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 303-10, Jun 2012.
 36. DELEON-RODRIGUEZ, C. M.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: Tripping on Acid in the Phagolysosome. **Front Microbiol**, v. 7, p. 164, 2016.
 37. DJORDJEVIC, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Front Microbiol**, v. 1, p. 125, 2010.
 38. FAN, W. *et al.* Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**,

- v. 75, n. 7, p. 3394-405, Jul 2007.
39. FORSTER, C.; KANE, P. M. Cytosolic Ca²⁺ homeostasis is a constitutive function of the V-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 49, p. 38245-53, Dec 2000.
 40. 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.
 41. FOX, D. S. *et al.* Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 835-49, Feb 2001.
 42. FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin-binding protein Cbp1 directs the specificity of calcineurin-dependent hyphal elongation during mating in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 9, p. 1526-38, Sep 2005.
 43. FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. grubii: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 838-40, Mar 1999.
 44. FRIES, B. C. *et al.* Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection. **J Clin Invest**, v. 108, n. 11, p. 1639-48, Dec 2001.
 45. GALANIS, E. *et al.* Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 251-7, Feb 2010.
 46. GANENDREN, R. *et al.* 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919-34, Jun 2013.
 50. HE, X. *et al.* CD44-mediated monocyte transmigration across *Cryptococcus*

- neoformans*-infected brain microvascular endothelial cells is enhanced by HIV-1 gp41-I90 ectodomain. **J Biomed Sci**, v. 23, p. 28, 2016.
51. HORGAN, M. *et al.* Cryptococcal meningitis occurring in HIV infected individuals. **Ir Med J**, v. 83, n. 4, p. 157-8, Dec 1990.
 52. IDNURM, A. *et al.* Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 753-64, Oct 2005.
 53. JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 8, p. e1001041, 2010.
 54. 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.
 55. JONG, A. *et al.* Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 8, p. 1486-96, Aug 2007.
 56. JONG, A. *et al.* Hyaluronic acid receptor CD44 deficiency is associated with decreased *Cryptococcus neoformans* brain infection. **J Biol Chem**, v. 287, n. 19, p. 15298-306, May 2012.
 57. KIDD, S. E. *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 2004.
 58. KLUTTS, J. S. *et al.* Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 499-512, Jun 2006.
 59. KMETZSCH, L. *et al.* The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **FEBS J**, v. 280, n. 19, p. 4853-64, Oct 2013.
 60. KMETZSCH, L. *et al.* The vacuolar Ca²⁺(+) exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺(+) tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 11, p. 1798-805, Nov 2010.
 61. KOZEL, T. R.; GOTSCHLICH, E. C. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. **J Immunol**, v. 129, n. 4,

- p. 1675-80, Oct 1982.
62. KOZUBOWSKI, L. *et al.* Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 11, p. 1396-402, Nov 2011.
 63. KOZUBOWSKI, L.; LEE, S. C.; HEITMAN, J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 3, p. 370-80, Mar 2009.
 64. KRAUS, P. R. *et al.* Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249-60, Oct 2004.
 65. KRAUS, P. R.; NICHOLS, C. B.; HEITMAN, J. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 6, p. 1079-87, Jun 2005.
 66. KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011.
 67. KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 68, n. 4, p. 821-33, 1976 Jul-Aug 1976.
 68. KWON-CHUNG, K. J. *et al.* (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus*. **Taxon**, 51. 51: 804-806 p. 2002.
 69. LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev Iberoam Micol**, v. 26, n. 4, p. 223-7, Dec 2009.
 70. LEOPOLD WAGER, C. M. *et al.* STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 83, n. 12, p. 4513-27, Dec 2015.
 71. LEV, S. *et al.* The Crz1/Sp1 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51403, 2012.
 72. LEVITZ, S. M. *et al.* *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infect Immun**, v. 67, n. 2, p. 885-90, Feb 1999.
 73. LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006
 74. LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 1017-21,

Apr 2005.

75. LIU, M. *et al.* Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 10, p. 1788-96, Oct 2006.
76. LIU, S. *et al.* Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 4, p. 324-34, Apr 2015.
77. LIU, T. B. *et al.* Brain inositol is a novel stimulator for promoting *Cryptococcus* penetration of the blood-brain barrier. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 4, p. e1003247, 2013.
78. LIU, T. B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 173-81, 2012 Mar-Apr 2012.
79. LIU, X. *et al.* Role of a VPS41 homologue in starvation response, intracellular survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 1132-46, Sep 2006.
80. LOCKE, E. G. *et al.* A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 18, p. 6686-94, Sep 2000.
81. LOFTUS, B. J. *et al.* The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1321-4, Feb 2005.
82. LUBERTO, C. *et al.* Identification of Appl as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest**, v. 112, n. 7, p. 1080-94, Oct 2003.
83. MA, H. *et al.* Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2156-60, Nov 2006.
84. MA, H.; MAY, R. C. **Virulence in Cryptococcus species**. Advances in Applied Microbiology, 2009.
85. 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. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3365-7, Sep 2001.
86. MARUVADA, R. *et al.* *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the blood-brain barrier. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 10, p.

1544-53, Oct 2012

87. MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. **Infect Immun**, v. 74, n. 3, p. 1500-4, Mar 2006.
88. MISETA, A. *et al.* The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 451, n. 2, p. 132-6, May 1999.
89. MOR, V. *et al.* Identification of a New Class of Antifungals Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e00647, 2015.
90. MOYRAND, F. *et al.* Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 6, p. 1513-24, Dec 2004
91. NGAMSKULRUNGROJ, P. *et al.* The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, 2012.
92. NIELSEN, K. *et al.* Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. **Infect Immun**, v. 71, n. 9, p. 4831-41, Sep 2003.
93. NIMRICHTER, L. *et al.* Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 8, p. 1400-10, Aug 2007.
94. ODOM, A. *et al.* The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685, 818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 1, p. 156-61, Jan 1997.
95. ODOM, A. *et al.* Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, v. 16, n. 10, p. 2576-89, May 1997.
96. OKAGAKI, L. H. *et al.* Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, p. e1000953, 2010.
97. OLSZEWSKI, M. A. *et al.* 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.
98. OSTERHOLZER, J. J. *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.

99. PARK, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009.
100. PARK, H. S. *et al.* Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 9, p. e1005873, Sep 2016.
101. PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 463-8, Jun 2006.
102. PERFECT, J. R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010.
103. RODRIGUES, M. L. *et al.* Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, Jan 2008.
104. ROSA E SILVA, L. K. *et al.* Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Res Microbiol**, v. 159, n. 3, p. 221-9, Apr 2008.
105. SABIITI, W.; MAY, R. C. Capsule independent uptake of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* into brain microvascular endothelial cells. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35455, 2012.
106. SABIITI, W. *et al.* Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **J Clin Invest**, v. 124, n. 5, p. 2000-8, May 2014.
107. SANTANGELO, R. T. *et al.* 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.
108. SHEA, J. M. *et al.* The cryptococcal enzyme inositol phosphosphingolipid-phospholipase C confers resistance to the antifungal effects of macrophages and promotes fungal dissemination to the central nervous system. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5977-88, Oct 2006.
109. SHI, M. *et al.* 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.
110. SINGH, A. *et al.* Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013.

111. SMITH, K. D. *et al.* Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 12, p. 7197-204, Dec 2015.
112. SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety gattii. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001
113. SORRELL, T. C. *et al.* Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. gattii. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1261-3, May 1996.
114. STATHOPOULOS-GERONTIDES, A.; GUO, J. J.; CYERT, M. S. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. **Genes Dev**, v. 13, n. 7, p. 798-803, Apr 1999.
115. 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.
116. STIE, J.; BRUNI, G.; FOX, D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5780, 2009.
117. STIE, J.; FOX, D. Calcineurin regulation in fungi and beyond. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 2, p. 177-86, Feb 2008.
118. STIE, J.; FOX, D. Blood-brain barrier invasion by *Cryptococcus neoformans* is enhanced by functional interactions with plasmin. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 240-58, Jan 2012a.
119. STIE, J.; FOX, D. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49402, 2012b.
120. TSENG, H. K. *et al.* How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. **Future Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 1669-82, 2015.
121. 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.
122. VAISHNAV, V. V. *et al.* Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. **Carbohydr Res**, v. 306, n. 1-2, p. 315-30, Jan 1998.

123. VU, K. *et al.* Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e01101-14, 2014.
124. WANG, H.; SUN, J.; GOLDSTEIN, H. Human immunodeficiency virus type 1 infection increases the in vivo capacity of peripheral monocytes to cross the blood-brain barrier into the brain and the in vivo sensitivity of the blood-brain barrier to disruption by lipopolysaccharide. **J Virol**, v. 82, n. 15, p. 7591-600, Aug 2008.
125. YOSHIMOTO, H. *et al.* Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 277, n. 34, p. 31079-88, Aug 2002
126. ZARAGOZA, O. *et al.* The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009.
127. 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.