

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

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS MEDIADORAS DA SINALIZAÇÃO DE  
CÁLCIO NO PATÓGENO *Cryptococcus neoformans*

TESE DE DOUTORADO

**Eamim Daidrê Squizani**

Porto Alegre, setembro de 2020

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

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS MEDIADORAS DA SINALIZAÇÃO DE  
CÁLCIO NO PATÓGENO *Cryptococcus neoformans*

Tese 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 Doutora em Ciências.

**Eamim Daidrê Squizani**

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

Porto Alegre, setembro de 2020.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e financiado pela CAPES, CNPq e FAPERGS.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e todas as forças do Universo que contribuíram para que eu estivesse aqui e agora, com saúde e alegria.

À minha orientadora Lívia Kmetzsch Rosa e Silva, por toda a atenção e compreensão, por não medir esforços para que nosso trabalho seja o melhor possível, pela imensa dedicação e por ser um exemplo de pessoa íntegra e mulher forte.

Ao meu co-orientador Charley Staats, pela sua dedicação e paciência, por ser sempre gentil e presente a todos os seus alunos.

À professora Marilene Henning Vainstein, por nos oportunizar estrutura excepcional para realização de todos os experimentos, por abrir as portas de seu laboratório para mim, e por ser também um exemplo mulher forte que possui ética e sucesso na área acadêmica.

Ao professor Augusto Schrank pelos ensinamentos, por sempre me incentivar e acreditar que seus alunos terão lugar de destaque.

Aos professores Augusto Schrank e Diego Bonatto por comporem minha comissão de acompanhamento.

Aos meus colegas de laboratório 222, 220 e 219 e 217.

À minha colega e amiga Vanessa Barcellos por estar sempre presente e ser uma voz de conforto nas horas difíceis.

À minha colega Julia Catarina Reuwsatt por ser sempre exigente, paciente, experiente, segura no laboratório e uma amiga querida.

Ao meu colega Heryk Motta Souza por alegrar meus dias, auxiliar nas etapas finais de minha tese, ser exigente e um bom amigo.

Ao meu colega Uriel Perin, por sempre estar disposto a filosofar sobre ciência e ser alguém tão gentil com um lindo coração e um grande amigo.

À Daiane Falcão, por sempre alegrar nossos dias seja com seu humor maravilhoso ou com seus doces deliciosos.

À Julianne Djordjevic por ser uma mentora maravilhosa, uma pessoa com um coração imenso, compreensiva e dedicada, por me receber em seu laboratório e confiar no meu trabalho.

À Sophie Lev por ser uma inspiração de pesquisadora e entusiasta da ciência, por estar sempre disposta a discutir meus resultados e sugerir novas ideias.

À Desmarini por todo o foco e dedicação e por ser um exemplo de força e uma ótima parceira e amiga.

À Keren Francis por ser tão gentil, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, por ser um exemplo de mulher forte e ter me recebido e cuidado de mim como sua família.

À minha mãe Rosana Garcia Fiunte Squizani por sempre acreditar em mim, por todo o apoio financeiro e pessoal, por todo o amor incondicional dedicado e todo o esforço para se tornar a melhor mãe que eu poderia desejar, por ser um exemplo de integridade e mulher forte.

Ao meu pai Benoni Luis Squizani, por ser meu maior exemplo profissional, pela sua integridade, por acreditar em mim, por todo o apoio financeiro durante esses longos anos de estudo, por todo o amor incondicional dedicado a mim e a nossa família.

À minha irmã Samia Squizani por todo o apoio, amor e dedicação, por ser minha companheira de vida, por estar sempre ao meu lado independentemente da situação e por acreditar em mim.

Ao meu namorado Savanel Chiafrino de Jesus, por todo o amor e companheirismo dedicados a mim, por me apoiar em todas as minhas decisões, por ser compreensivo com a distância e entender a importância de minha vida profissional.

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

<b>Lista de abreviaturas, símbolos e unidades</b>	<b>7</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>8</b>
<b>Resumo</b>	<b>10</b>
<b>Abstract</b>	<b>11</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Características gerais</b>	<b>13</b>
<b>1.2. Virulência de <i>C. neoformans</i></b>	<b>16</b>
<b>1.2.1. Adaptação ao hospedeiro</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2. Produção de determinantes de virulência</b>	<b>19</b>
<b>1.2.2.1. Cápsula polissacarídica</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2.2. Enzimas necessárias aos mecanismos de transmigração</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3. Interação com o sistema imune</b>	<b>26</b>
<b>1.3. Processos regulados por cálcio</b>	<b>29</b>
<b>1.3.1. Manutenção da homeostase de cálcio</b>	<b>30</b>
<b>1.3.2. Proteínas ligadoras de cálcio e transdutoras de sinal</b>	<b>33</b>
<b>1.4. Fatores de transcrição em <i>C. neoformans</i></b>	<b>36</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>40</b>
<b>2.1. Objetivos específicos</b>	<b>40</b>
<b>3. Resultados</b>	<b>41</b>
<b>3.1. CAPÍTULO 1: “Ncs1 is calcineurin-regulated in <i>Cryptococcus neoformans</i> and essential for cell division and virulence”</b>	<b>42</b>
<b>3.2. CAPÍTULO 2: A potencial associação entre a sinalização por Ca<sup>2+</sup> e a regulação da síntese de esteróis em <i>C. neoformans</i></b>	<b>88</b>
<b>3.2.1. Justificativa</b>	<b>88</b>
<b>3.2.2. Materiais e métodos</b>	<b>88</b>
<b>3.2.3 Resultados</b>	<b>91</b>
<b>4. Discussão geral</b>	<b>103</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>108</b>
<b>6. Perspectivas</b>	<b>108</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b>	<b>108</b>
<b>8. Anexo 1 -- Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1</b>	<b>133</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida do inglês AIDS
cAMP	adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
ATP	adenosina tri-fosfato
GTP	guanosina tri-fosfato
HIV	vírus da imunodeficiência humana
mRNA	RNA mensageiro
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
RNA	ácido ribonucléico
RNA-seq	sequenciamento de RNA
RT	transcriptase reversa
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
kb	1.000 pares de bases
Kg	quilograma
mg	miligramas
µg	microgramas
ng	nanogramas
pmol	picomol
mL	mililitros
µL	microlitros
µm	micrometros
g	força gravitacional
M	molar
min	minuto
nm	nanômetro
pb ou bp	pares de bases ou <i>base pairs</i>
var	variedade
WT	<i>wild type</i> (linhagem selvagem)
YPD	<i>yeast extract – peptone – dextrose</i>
MAPK	proteína ativada por mitógeno ou <i>mitogen-activated protein kinase</i>



## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo de infecção de <i>Cryptococcus neoformans</i>	15
Figura 2 - Esquema representativo de modelo proposto para transmigração de <i>C. neoformans</i> através da barreira hematoencefálica (BHE)	20
Figura 3 - Microscopias de cápsula polissacarídica de <i>C. neoformans</i>	22
Figura 4 - Esquema representativo das enzimas necessárias aos mecanismos de transmigração	25
Figura 5 - Esquema de interação entre <i>C. neoformans</i> e macrófagos	27
Figura 6 - Representação esquemática dos transportadores de cálcio em <i>C. neoformans</i>	31
Figura 7 - Imagem ilustrativa do domínio de ligação a $Ca^{2+}$ EF-hand	34
Figura 8 - Esquema representativo da via de sinalização de calcineurina em <i>C. neoformans</i>	35

### CAPÍTULO 2

Figura 1 - Avaliação da sensibilidade de mutantes selecionados à alta concentração de cálcio	92
Figura 2 - Quantificação de $Ca^{2+}$ intracelular em células de mutantes selecionados expostos à cálcio	94
Figura 3 - Hob1 não é essencial à virulência em modelo murino intranasal de infecção	95
Figura 4 - A presença de $Ca^{2+}$ diminui a sensibilidade de <i>C. neoformans</i> a FCZ	97
Figura 5 - $Ca^{2+}$ modula a síntese de ergosterol a nível transcricional	99
Figura 6 - A presença de $Ca^{2+}$ não influencia no perfil transcricional das bombas de efluxo	100

## **LISTA DE TABELAS**

### **Introdução**

**Tabela 1- Síntese de informações relevantes dos principais fatores de transcrição que serão abordados ao longo da Tese. 38**

### **Cápítulo 2**

**Tabela 1- Lista de oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para análise de expressão gênica. 91**

**Tabela 2: Apresenta média de intensidade de fluorescência. Realizado por citometria de fluxo utilizando o fluoróforo Efluor514. Os valores apresentados são referentes aos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dos mutantes nulos para fatores de transcrição de *C. neoformans*. 92**

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* é um fungo patogênico e oportunista que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, responsável por quadros de pneumonia e meningite. Para tanto, as células fúngicas devem se adaptar ao ambiente do hospedeiro pela expressão de diversos determinantes de virulência. A regulação desses determinantes pode ocorrer por intermédio de sinais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), o qual é capaz de ativar a via de sinalização mediada por calcineurina, necessária para a patogênese *C. neoformans*. Ainda, a manutenção da homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  nesse patógeno é imprescindível para os mecanismos de virulência, sendo regulada por transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , como Pmc1 e Vcx1. Na presente Tese, exploramos o papel de outras proteínas componentes da sinalização e da manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  em *C. neoformans*. A caracterização da atividade da proteína ortóloga Ncs1 (neuronal calcium sensor) revelou a influência de uma proteína ligadora de  $\text{Ca}^{2+}$  na adaptação de *C. neoformans* ao hospedeiro. Nossos dados demonstraram que Ncs1 é necessário para a tolerância e regulação da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo a expressão de *NCSI* positivamente regulada pela via da calcineurina. Ncs1 é essencial para o aparecimento do broto, divisão celular adequada, e correta expressão gênica de reguladores da progressão de ciclo celular. Ncs1 é indispensável para o desenvolvimento de *C. neoformans* em condições fisiológicas e para o estabelecimento da criptococose em um modelo de infecção *in vivo*. A proteína Ncs1 é sensora e responsiva a  $\text{Ca}^{2+}$  e, conjuntamente com a via da calcineurina, regula a adaptação ao hospedeiro e virulência de *C. neoformans*. Além disso, buscamos caracterizar fatores de transcrição que sejam responsivos a sinais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para tanto, investigamos uma biblioteca de mutantes nulos para fatores de transcrição de *C. neoformans*, a fim de identificar aqueles com alterações nos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . A partir disso, duas proteínas foram selecionadas: Sre1 e Hob1, os quais são reguladores da síntese de ergosterol. Reforçando a relação entre estes fatores de transcrição e a sinalização mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ , identificamos que a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de diminuir a sensibilidade de *C. neoformans* a antifúngicos azólicos. Adicionalmente, demonstramos que  $\text{Ca}^{2+}$  modula a síntese de ergosterol a nível transcricional.

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is an opportunistic pathogenic fungus that provokes disease mainly in immunocompromised patients, provoking pneumonia and meningoencephalitis. For that, the yeast cells must cope with the harsh host environment through the expression of several virulence determinants. The regulation of those determinants can be mediated by calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signals that are capable to activate the calcineurin signaling pathway, which by its turn is needed for cryptococcal pathogenesis. Besides, the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in this fungus is essential to the virulence mechanism and is regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  transporters such as Pmc1 and Vcx1. In this Thesis we explored the role of other proteins participants on the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and homeostasis maintenance in *C. neoformans*. The characterization of the ortholog protein activity Ncs1 (neuronal calcium sensor) revealed the influence of a  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein in *C. neoformans* adaptation to host. Our data demonstrated that Ncs1 is needed for tolerance and regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis; still, we verified that the expression of *NCS1* is positively regulated by calcineurin pathway. Ncs1 is essential to the bud emergence, adequate cell division pattern, and correct gene expression of cell cycle regulators. Ncs1 is indispensable for *C. neoformans* development in host conditions and the establishment of the disease in an *in vivo* model of infection. The Ncs1 is a sensor  $\text{Ca}^{2+}$  protein, that collectively with the calcineurin pathway regulates the host adaptation and virulence of *C. neoformans*. Furthermore, we sought to characterize transcription factors that are responsive to  $\text{Ca}^{2+}$  signals. For that, we investigated a mutant knockout library for transcription factors of *C. neoformans*, aiming to identify those mutants with altered intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels. From that, two proteins were selected: Sre1 and Hob1, which are regulators of the sterol biosynthesis pathway. Reinforcing this relation between the transcription factors of the sterol synthesis and the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, our data suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  availability can diminish *C. neoformans* susceptibility to azoles. Further, we demonstrate that  $\text{Ca}^{2+}$  can regulate ergosterol synthesis at the transcriptional level.

## 1. Introdução

Infecções fúngicas têm sido extensivamente subestimadas pelas autoridades de saúde pública, mesmo com números alarmantes de mortalidade. É estimado que mundialmente 10 milhões de indivíduos desenvolvam doenças de vias aéreas pela inalação de esporos fúngicos. Ainda, segundo GAFFI (*Global Action Fund for Fungal Infections*) em torno de 300 milhões de pessoas de todas as idades sofrem anualmente de alguma infecção fúngica severa (Rodrigues e Nosanchuk, 2020). A mortalidade por doenças fúngicas atinge globalmente mais de 1,6 milhões de pessoas, valores similares aos níveis de mortalidade de tuberculose e três vezes maiores do que o de malária (BONGOMIN *et al.*, 2017). Ademais, nas últimas duas décadas as infecções fúngicas no SNC (sistema nervoso central) têm ganhado relevância, principalmente devido ao surgimento da pandemia do HIV resultando na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (IDNURM *et al.*, 2005).

Os agentes etiológicos causadores de meningite fúngica podem ser leveduras, fungos filamentosos ou fungos dimórficos (GÓRALSKA; BLASZKOWSKA; DZIKOWIEC, 2018). Particularmente espécies do gênero *Cryptococcus* representam pelo menos 60 % de todos os casos de meningite em pacientes infectados por HIV (Rajasingham *et al.*, 2015). Estatísticas apontam que pelo menos 15 % de óbitos causados por meningite criptocócica ocorrem em pacientes HIV positivos. Além disso, estima-se que globalmente a criptococose atinja anualmente 220.000 novos casos em pacientes com SIDA, ocasionando aproximadamente 181 mil óbitos (RAJASINGHAM *et al.*, 2017a). Dados epidemiológicos no Brasil demonstram que para pacientes portadores de HIV em estado de AIDS, *C. neoformans* é o principal agente causador de micose sistêmica, sendo responsável por aproximadamente 51% dos óbitos nesses pacientes (PRADO *et al.*, 2009). Em 17 de fevereiro de 2020 foi publicada no Diário Oficial da União a portaria de nº 264, a qual inclui a criptococose na lista de doenças de notificação compulsória, com o objetivo de diminuir o número de subnotificações e auxiliar as autoridades no maior controle da doença. Devido a seu impacto global e alta taxa de mortalidade, *C. neoformans* tornou-se um importante alvo de estudo pela comunidade científica. Destaca-se, dessa forma, a necessidade pela busca de novos tratamentos que sejam eficazes para combater a criptococose.

Com a disponibilização da sequência genômica de *C. neoformans*, houve um grande progresso na caracterização de mecanismos moleculares deste patógeno (LOFTUS *et al.*, 2005). Dentre os mecanismos de manutenção da virulência, destacam-se os que são regulados pela sinalização mediada por cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e calcineurina. Diversos estudos demonstraram a importância da manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  para a fisiologia do patógeno fúngico (LIU *et al.*, 2015). Diante disto, a presente Tese aborda a elucidação da função de uma proteína ligadora de  $\text{Ca}^{2+}$  e fatores de transcrição que atuam na manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  contribuindo assim para a virulência de *C. neoformans*.

### 1.1. Características gerais

*C. neoformans* é uma levedura encapsulada, pertencente ao filo Basidiomycota. Foi inicialmente descrito em 1894, isolado de uma lesão de tíbia. A partir da recuperação deste fungo de lesões de humanos e de seu isolamento ambiental, foi possível determiná-lo como um patógeno humano com capacidade de vida livre (CASADEVALL; PERFECT, 1998; IDNURM *et al.*, 2005)

A classificação do agente etiológico *Cryptococcus* passou por alterações recentes significativas (KWON-CHUNG *et al.*, 2002, 2017). Inicialmente, as espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* eram classificadas de acordo com características antigênicas de sua cápsula polissacarídica (LIN; HEITMAN, 2006), pela qual *C. neoformans* e *C. gattii* eram diferenciados em sorotipos, mas pertencentes a mesma espécie (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999; SORRELL, 2001). Atualmente, é geralmente aceita a classificação dos isolados deste gênero em duas espécies (*C. neoformans* e *C. gattii*) com distintos tipos moleculares, o que ressalta a grande variabilidade genética deste gênero (KWON-CHUNG *et al.*, 2002, 2017).

Notavelmente, o complexo de espécie de *C. neoformans* acomete principalmente pacientes imunocomprometidos (KWON-CHUNG *et al.*, 2017; SORRELL, 2001). Em contrapartida, o complexo de espécies de *C. gattii* atinge também pacientes imunocompetentes, e geralmente está restrito às regiões subtropicais (KWON-CHUNG *et al.*, 2002). Porém, registrou-se o aparecimento de um surto de criptococose causada por *C. gattii* em regiões de clima temperado em Vancouver, Canadá (KIDD *et al.*, 2004).

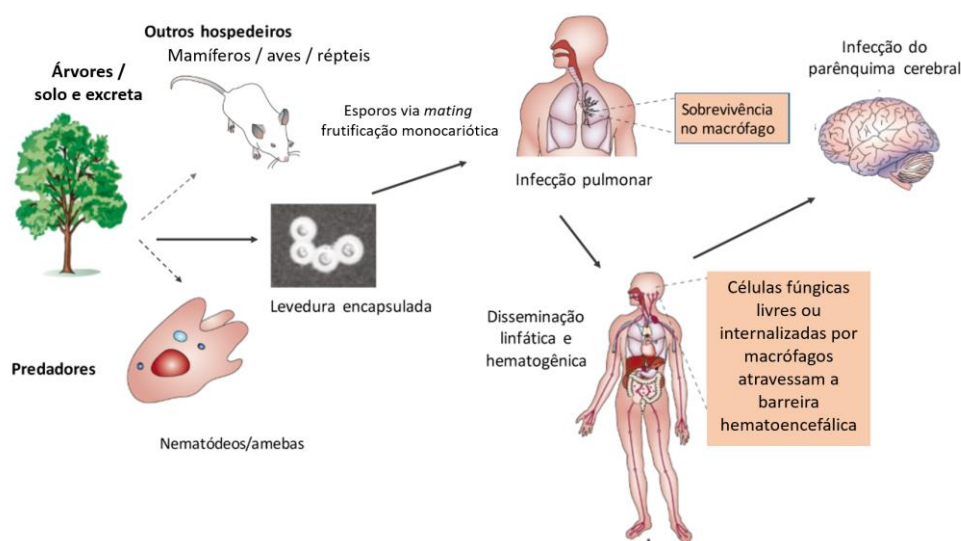
Quanto a diferenças e características exclusivas de cada espécie, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam diferenças significativas. Para *C. neoformans*, a principal fonte ambiental são o solo e excretas de pombo (CASADEVALL; PERFECT, 1998) Já *C. gattii* é isolado associado a árvores de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) e madeiras em decomposição (SORRELL, 2001; SORRELL *et al.*, 1996) Ademais, *C. neoformans* acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, causando uma infecção no tecido pulmonar, além de possuir tropismo para o SNC. Já *C. gattii* é capaz de infectar pacientes imunocompetentes, sendo principalmente associado a infecção pulmonar sem causar meningite (CHEN *et al.*, 2000; GALANIS, 2010; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012).

No ambiente, *C. neoformans* pode interagir com outros animais e predadores, como o protozoário *Acanthamoeba castellanii*. Sugere-se que a partir de interação com esses predadores fagocíticos, desenvolveu-se e sustentam-se vários de seus determinantes de virulência necessários para infecção do hospedeiro humano. Alguns fatores como a capacidade de replicação dentro de fagolisossomos, síntese de melanina e cápsula polissacarídica já foram apontados como importantes na interação entre *C. neoformans* e *A. castellanii*, indicando a manutenção desses determinantes de virulência (IDNURM *et al.*, 2005; MALIEHE *et al.*, 2020; STEENBERGEN *et al.*, 2003; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001; ZARAGOZA, 2019).

Apesar de *C. neoformans* ser isolado do hospedeiro e do ambiente na forma leveduriforme, este é capaz de passar por uma transição dimórfica, o que promove o desenvolvimento de sua forma filamentosa. Esta transição pode ocorrer a partir de duas vias, *mating* ou frutificação monocariótica. Ambas geram basidiósporos por meiose, potenciais partículas infecciosas (IDNURM *et al.*, 2005). O processo de *mating*, descrito como ciclo sexual, ocorre pela fusão de células haplóides de *mating types* distintos ( $\alpha$  e  $\alpha$ ) resultando em filamentos dicarióticos (KWON-CHUNG, 1976; NIELSEN *et al.*, 2003). O processo de frutificação monocariótica ocorre em resposta a uma limitação nutricional do ambiente, no qual estas leveduras sofrem diploidização de um mesmo *mating type* (LIN; HEITMAN, 2006).

A infecção humana inicia-se com a inalação de esporos ou células dessecadas, as quais se depositam no tecido pulmonar. O curso da doença vai depender do estado imunológico do paciente, sendo possível uma infecção assintomática, seguida de eliminação ou latência. Em situações de imunodeficiência, células deste patógeno

podem reativar causando um quadro de pneumonia, que pode ser seguido por disseminação por via hematogênica, alcançando o tecido cerebral (Figura 1) (LIN; HEITMAN, 2006; MA; MAY, 2009).



**Figura 1 - Esquema representativo do ciclo de infecção de *Cryptococcus neoformans*.** Células fúngicas sobrevivem no ambiente em distintos nichos (solo, casca de árvores e fezes de pombo), onde podem interagir com animais selvagens ou predadores naturais (ex: *A. castellani*), garantindo a manutenção dos mecanismos de virulência. Hospedeiros humanos inalam as células dessecadas da levedura ou esporos, instaurando-se então a forma infecciosa pulmonar. As células fúngicas podem sobreviver e replicar no interior de macrófagos, alcançando o SNC por meio de mecanismos específicos de transmigração. Adaptado de (IDNURM *et al.*, 2005).

Atualmente o diagnóstico de criptococose pode ser realizado por diferentes métodos, os quais incluem a análise direta do fungo a partir de materiais biológicos, utilizando coloração de tinta da China e observação sob microscópio óptico. Além disto, análises histopatológicas de tecidos infectados utilizando coloração específica podem ser aplicados para identificação de cápsula polissacarídica e detecção de melanina (PERFECT, 2013; PERFECT; TIHANA BICANIC, 2016). Métodos diagnósticos sorológicos, como o ensaio de aglutinação de Látex ou ELISA, detectam em amostras de soro e fluído cefalorraquidiano a presença de cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* (PERFECT; TIHANA BICANIC, 2016). Recentemente, também foi desenvolvido um método diagnóstico imunocromatográfico, conhecido como ensaio de fluxo lateral (EFL), o qual consiste em uma análise sorológica semiquantitativa, que facilita o diagnóstico em locais com menor acesso a equipamentos especializados, e possui baixo custo (HANSEN *et al.*, 2013; RUGEMALILA *et al.*, 2013). Complementarmente, ainda que pouco empregados na clínica, podem-se



utilizar métodos moleculares de diagnósticos específicos, como PCR e PCR multiplex (SIDRIM *et al.*, 2010). Ademais, é importante ressaltar que o rápido diagnóstico é fundamental em pacientes HIV positivos, visto que a antecedência no tratamento limita a infecção e a disseminação para o SNC (PERFECT; TIHANA BICANIC, 2016).

As abordagens terapêuticas e desenvolvimento de novas drogas para infecções fúngicas representam um desafio considerável, tendo em vista as semelhanças das maquinarias celulares eucarióticas de fungos e células humanas (ID; NOSANCHUK; CHAGAS, 2020). Atualmente, a abordagem terapêutica preconizada é dividida em etapas de indução, consolidação e manutenção. Na terapia de indução utiliza-se a administração intravenosa de anfotericina B (0,7 – 1 mg/kg/dia), anfotericina B lipossomal (3 – 4 mg/kg/dia) ou complexo lipídico de anfotericina B (5 mg/kg/dia) e 5-Flucitosina (5-FC) oral (100 mg/kg/dia) por pelo menos duas semanas. No entanto, em alguns países não há disponibilidade do fármaco 5-FC, incluindo o Brasil. Assim, a etapa de indução é realizada com anfotericina (conforme descrito acima) e fluconazol (800mg/dia). No período de consolidação, o fármaco fluconazol (400mg/dia) deve ser utilizado por pelo menos 8 semanas. Em pacientes HIV positivos a manutenção com fluconazol pode ser de 12 meses (LESTNER *et al.*, 2017; PERFECT *et al.*, 2010).

Apesar de existir uma terapêutica estabelecida, esta não se apresenta totalmente eficaz. Além disso, a existência de efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade da anfotericina B, demonstram a necessidade de desenvolvimento de alternativas terapêuticas, incluindo a busca por novos alvos (RAJASINGHAM *et al.*, 2017a).

## **1.2. Virulência de *C. neoformans***

Para o estabelecimento adequado do quadro infeccioso no hospedeiro, incluindo a migração do patógeno para o SNC, *C. neoformans* depende da expressão de diferentes fatores, os quais são denominados de determinantes de virulência (CASADEVALL; PIROFSKI, 2001). Durante o estabelecimento da infecção, existe uma complexa relação entre o hospedeiro e os microrganismos patogênicos. Estes patógenos devem ser capazes de perceber e confrontar os estresses locais, respondendo com mudanças celulares adaptativas (ALSPAUGH, 2015). Neste

ambiente complexo, *C. neoformans* apoia-se em três principais processos: adaptação ao ambiente do hospedeiro, a produção de determinantes de virulência, e interação com o sistema imune incluindo capacidade de evasão da resposta do hospedeiro.

### 1.2.1. Adaptação ao hospedeiro

Para então estabelecer a infecção, *C. neoformans* deve inicialmente adaptar suas maquinarias celulares para desenvolver-se em temperatura fisiológica do hospedeiro (37 °C), com diferentes fontes de nutrientes, variações de pH, e resistir aos mecanismos de estresse oxidativo (ZARAGOZA, 2019). A fim de responder aos diferentes estressores, o patógeno conta com redes complexas e reguladas de sinalização intracelular, incluindo a via de sinalização dependente de Ca<sup>2+</sup> calcineurina (KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2011).

A capacidade de desenvolvimento a 37 °C é uma característica essencial aos patógenos humanos. É importante ressaltar, que a maioria dos fungos ambientais não possuem a capacidade de se replicar em temperaturas altas, como a fisiológica humana (ZARAGOZA, 2019). *C. neoformans* possui ótimo e máximo crescimentos em temperaturas de 32 e 40 °C, respectivamente (PERFECT, 2006). Fatores que são necessários ao desenvolvimento na temperatura fisiológica são diversos, incluindo ativação de diferentes vias de sinalização (ZARAGOZA, 2019). Dentre essas, destaca-se a via de sinalização mediada pela fosfatase calcineurina. Estudos demonstraram que a inibição desta via, tanto por fármacos (FK506 e ciclosporina) (CRUZ *et al.*, 2000; ODOM *et al.*, 1997a), quanto pela deleção de seus componentes principais, como o mutante nulo para *CNA1*, gene codificador de calcineurina, resultam em linhagens incapazes de se desenvolver a 37 °C (ODOM *et al.*, 1997b). Também, o mutante nulo para *CTS1* (*calcineurin temperature supressor*) torna-se sensível ao crescimento a 37 °C (FOX; COX; HEITMAN, 2003). Outros fatores essenciais ao desenvolvimento à temperatura fisiológica em *C. neoformans* também englobam o metabolismo de trealose. Sugere-se que as enzimas que sintetizam trealose sejam essências para a viabilidade do fungo a 37 °C (PETZOLD *et al.*, 2006). Do mesmo modo, foi demonstrado que a capacidade de desenvolvimento do patógeno à temperatura fisiológica depende da atividade da enzima Superóxido desmutase 2 (Sod2), a qual também é fundamental para o sistema de defesa antioxidante de *C. neoformans* (GILES *et al.*, 2005).

Ademais, uma análise transcricional de genes regulados pela exposição a 37 °C obteve como resultado o total de 49 genes os quais são induzidos pela exposição à temperatura fisiológica. Dentre estes, destaca-se o fator de transcrição Mga2, envolvido na síntese de ácidos graxos. Diante disso, sugeriu-se que o remodelamento das membranas é indispensável para a adaptação para altas temperaturas (KRAUS *et al.*, 2004). Similarmente, outro estudo realizou uma análise de diferença representacional (RDA), para também identificar genes diferencialmente expressos a 37 °C. Identificaram-se 29 genes regulados positivamente, com algumas sobreposições com o estudo de Kraus *et al.*, 2004 (ROSA E SILVA *et al.*, 2008). Os genes identificados relacionam-se com resposta ao estresse, integridade de membrana e parede celular, e metabolismo celular básico (ROSA E SILVA *et al.*, 2008).

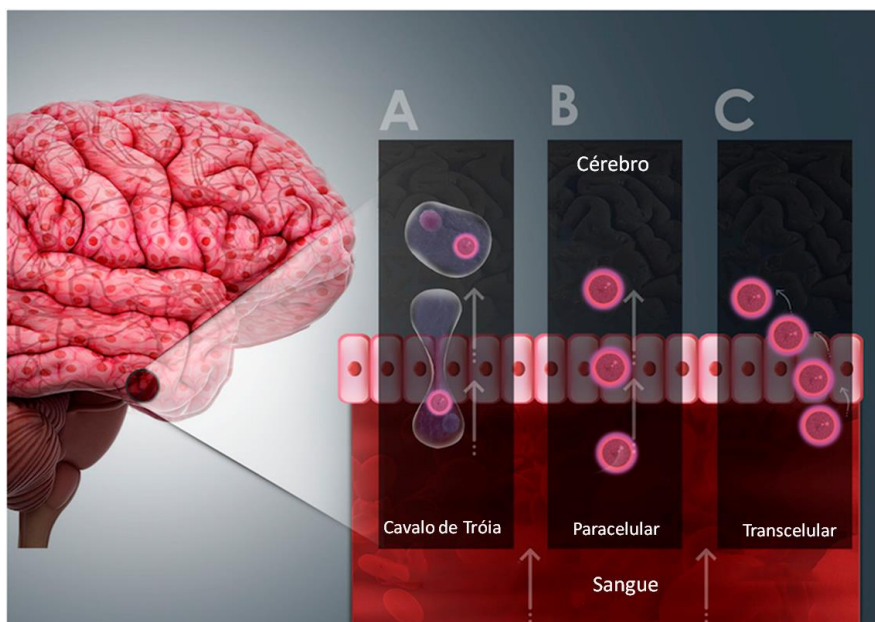
Outro mecanismo adaptativo que *C. neoformans* apresenta é referente ao microambiente do hospedeiro quanto às limitações nutricionais. Neste, destaca-se a necessidade de vias de captação de alguns metais, como o ferro, o qual é importante para a virulência de *C. neoformans* e necessário ao funcionamento de diversas enzimas (KRONSTAD; HU; JUNG, 2013). Para a obtenção de ferro dos tecidos do hospedeiro, *C. neoformans* compete pela disponibilidade do metal por meio da atividade de proteínas específicas, em especial pela glicoproteína Cig1, a qual é capaz de quelar grupamentos heme, para obtenção deste metal (CADIEUX *et al.*, 2013).

Ademais, *C. neoformans* tende a adaptar-se a variações de pH no microambiente dos tecidos do hospedeiro infectado, o qual pode variar de pH 2 a 10. Sabe-se que esta levedura é capaz de se replicar no fagolisossomo após fagocitose por macrófagos (pH 5), e em condições levemente alcalinas como soro e fluido cefalorraquidiano (pH 7,4), porém não tolera adequadamente ambiente com pH acima de 8 (SELVIG; ALSPAUGH, 2011). A principal proteína envolvida na adaptação ao pH neutro é Rim101, um fator de transcrição que é responsivo ao pH alcalino (OST *et al.*, 2015). Por fim, o estresse oxidativo e nitrosativo gerado pelo hospedeiro é uma das principais estratégias antimicrobianas. Dessa forma, estratégias antioxidantes são um dos principais mecanismos adaptativos adotado por *C. neoformans*, o qual responde a esses estressores por meio da atividade das enzimas glutatona peroxidase, tireodoxina e da atividade indireta de manitol para adaptar-se ao estresse oxidativo, e isocitrato desidrogenase no combate de estresse nitrosativo (BROWN *et al.*, 2010; CHATURVEDI; WONG; NEWMAN, 1996; MISSALL; CHERRY-HARRIS; LODGE, 2005; ZARAGOZA, 2019).

### 1.2.2. Produção de determinantes de virulência

A produção de determinantes ou fatores de virulência é um dos principais limitantes no estabelecimento e curso da infecção causada por *C. neoformans*, visto que a ausência desses fatores altera a capacidade do patógeno de causar a doença (CASADEVALL; PIROFSKI, 2001). Alguns desses fatores já estão muito bem estabelecidos, como a elaboração da cápsula polissacarídica e a capacidade de melanização (MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006; ZARAGOZA, 2019; ZHU *et al.*, 2001). Além disso, *C. neoformans* conta com a produção de um arsenal de enzimas, as quais se mostram indispensáveis à virulência, como a urease, fosfolipase B e a metaloprotease (AARON; GELLI, 2020; COX *et al.*, 2000, 2001; DJORDJEVIC *et al.*, 2005; SIAFAKAS *et al.*, 2007; VU *et al.*, 2014). Um aspecto muito importante da virulência é a secreção de enzimas, proteínas e RNAs, a qual pode ser mediada pela ação de vesículas extracelulares, conhecidas como *virulence bags*. Estas promovem a secreção de seus componentes para o meio extracelular, direcionando fatores de virulência para as células ou tecidos do hospedeiro (RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES; CASADEVALL, 2018).

A fim de estabelecer efetivamente a criptococose, e acessar o SNC causando meningoencefalite, *C. neoformans* necessita então da atividade específica de alguns destes fatores de virulência. O processo de transmigração pode ocorrer mediante três mecanismos distintos, o paracelular e transcelular, no qual as células do patógeno podem transmigrar livremente através das células endoteliais cerebrais, e o mecanismo de cavalo de Tróia, no qual *C. neoformans* acessa o SNC dentro de células fagocíticas infectadas (Figura 2) (CHANG *et al.*, 2004; CHARLIER *et al.*, 2009). Alguns destes serão discutidos com mais detalhes a seguir.



**Figura 2.** Esquema representativo de modelo proposto para transmigração de *C. neoformans* através da barreira hematoencefálica (BHE). A levedura patogênica é capaz de se disseminar pela via hematogênica livremente ou dentro de macrófagos. O acesso ao parênquima cerebral pode ocorrer por três mecanismos distintos propostos: Cavalos de Tróia (a), no qual células de *C. neoformans* transmigram dentro dos fagócitos; Paracelular (b), onde a levedura causa danos às junções aderentes da BHE, ou por junções aderentes frouxas; ou pelo mecanismo transcelular (c), na qual a levedura é endocitada pelas células endoteliais cerebrais. Adaptado de (OLIVEIRA; CASTELLI; KUCZERA, 2020).

### 1.2.2.1. Cápsula polissacarídica

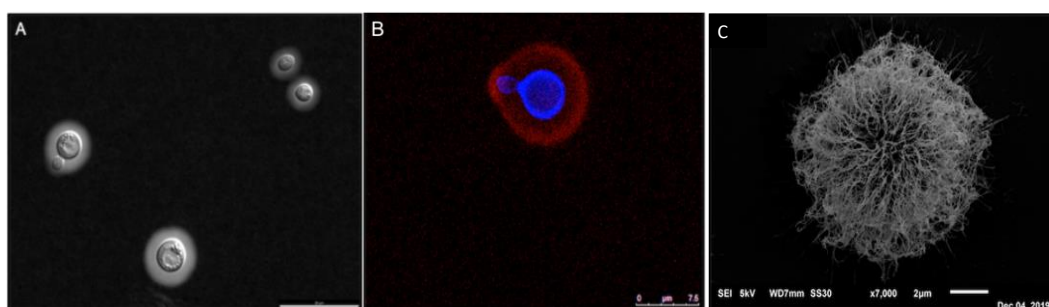
A característica mais evidente de *C. neoformans* é a presença de uma cápsula polissacarídica que associa-se à parede celular (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020; O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012). A elaboração desta estrutura é induzida por diversos fatores externos também associados ao hospedeiro, como pH neutro/alcalino, altos níveis de CO<sub>2</sub> e depleção nutricional de ferro. Porém a síntese dessa estrutura polissacarídica requer a atividade de redes metabólicas complexas, para disponibilização de energia e precursores de carboidratos (ALSPAUGH, 2015). Sugere-se que este alto gasto energético da via biossintética capsular está estritamente relacionado com a atividade mitocondrial (ALSPAUGH, 2015). Além disso, acredita-se que o crescimento capsular esteja acoplado ao ciclo celular, ocorrendo primeiramente durante a fase G<sub>1</sub>, fase na qual a célula está envolvida majoritariamente em processos de crescimento celular (ALSPAUGH, 2015; GARCÍA-RODAS *et al.*, 2014).

Dentre as principais funções da cápsula, destaca-se a proteção da levedura contra estressores ambientais como a desidratação, e o desempenho de uma barreira física contra fagocitose durante a infecção. Adicionalmente, esta cápsula atua como agente imunomodulador do hospedeiro, pois é capaz de diminuir a migração de leucócitos para o local da infecção, promovendo a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, e a inativação de componentes do sistema complemento (BOSE *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que a cápsula polissacarídica é capaz de modular o ambiente ácido do fagolisossomo de macrófagos, devido a presença da cápsula que se comporta como um ácido fraco, sendo este capaz de tamponar o ambiente (LEON-RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

A cápsula é formada por polissacarídeos, conferindo uma característica altamente hidrofílica, e também por resíduos de ácido glucurônico, o que atribui uma carga geral negativa à cápsula. Os componentes polissacarídicos majoritários são: glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM). GXM é formada por  $\alpha$  (1,3)-manose e resíduos de  $\beta$  (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  $\beta$  (1,2) ou  $\beta$  (1,4) laterais. Já GalXM é constituída de  $\alpha$  (1,6) galactose, a qual forma a estrutura principal, podendo demonstrar ramificações 3-O-ligadas de  $\alpha$  (1,3)-manose,  $\alpha$  (1,4)-manose,  $\beta$ -galactosidase trissacarídica e quantidades variáveis de cadeias laterais xilosiladas (VAISHNAV *et al.*, 1998; ZARAGOZA *et al.*, 2009). A massa capsular é composta predominantemente de GXM (90-95 %), GalXM apresenta-se na proporção de 5-8%, e uma pequena quantidade de manoproteínas (< 1 %) (Figura 3) (ZARAGOZA *et al.*, 2009).

A via biossintética da cápsula polissacarídica é complexa e depende da atuação de diversos produtos gênicos. Estudos demonstraram que a ausência dos genes *CAP 59*, *CAP 60*, *CAP 10*, *CAP 64*, resultam em linhagens com alterações na formação da cápsula e menor virulência (CHANG; KWON-CHUNG, 1994, 1998, 1999; CHANG; PENOYER; KWON-CHUNG, 1996; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012). Também, os genes *CAS* envolvidos na acetilação de GXM, mostram-se necessários a síntese da estrutura capsular e a manutenção da virulência (MOYRAND *et al.*, 2004). Ademais, a síntese dos polissacarídeos constituintes da cápsula se dá pela atividade de pelo menos 12 glicosiltransferases (KLUTTS *et al.*, 2006). Estas enzimas promovem a transferência de um monossacarídeo para uma molécula aceptora. Utiliza-se como moléculas aceptoras o UDP-ácido glucurônico, UDP-xilose

e GDP-manose. A síntese de GXM ocorre intracelularmente, no complexo de Golgi (YONEDA; DOERING, 2006). Posteriormente, esses polissacarídeos são transportados dentro de vesículas, as quais ultrapassam a parede celular e promovem a secreção de GXM para o meio extracelular (RODRIGUES *et al.*, 2007). Por fim, estudos demonstram que a montagem da cápsula ocorre pela auto-agregação de fibras de GXM por intermédio da ligação de cátions divalentes (NIMRICHTER *et al.*, 2007).



**Figura 3 - Microscopias de cápsula polissacarídica de *C. neoformans*.** Visualização da cápsula polissacarídica por diferentes métodos, em A. Célula de *C. neoformans* corada com tinta da china e visualizada em microscópio ótico. B. Microscopia de imunofluorescência demonstra a cápsula marcada com anticorpo específico (vermelho), em azul a parede celular marcada com *Calcofluor White*. C. Imagem realizada por microscopia eletrônica de varredura exibindo as fibras de polissacarídeo que compõe a cápsula. Adaptada de (OLIVEIRA; CASTELLI; KUCZERA, 2020).

O tamanho da cápsula polissacarídica é variável, podendo ser induzida por diferentes fatores como já mencionado, mesmo células de uma mesma linhagem podem apresentar tamanhos diferentes modulados por estímulos externos. Além disso, sabe-se que o tamanho capsular pode variar durante a infecção dependendo do tecido em que o patógeno se encontra. Logo, diversos estudos comprovaram que linhagens incapazes de estabelecer um aumento capsular durante a infecção possuíam a virulência atenuada, tendo em vista que estas linhagens promoviam uma resposta inflamatória no hospedeiro e eram rapidamente eliminadas do tecido pulmonar (BLACKSTOCK *et al.*, 1999; ZARAGOZA *et al.*, 2009).

Apesar de mutantes acapsulares possuírem fenótipo avirulento ou de hipovirulência, essas linhagens ainda são viáveis quando cultivadas *in vitro* (CHANG; KWON-CHUNG, 1994; ZARAGOZA *et al.*, 2009). Ainda é importante ressaltar que a presença da cápsula não influencia diretamente no mecanismo de transmigração (SABIITI; MAY, 2012; SHI *et al.*, 2010). Apesar disso, sabe-se que a cápsula polissacarídica exerce papel fundamental na proteção do fungo contra

agentes externos, fagocitose e possui atividade moduladora do sistema imune do hospedeiro (BOSE *et al.*, 2003; MONARI; BISTONI; VECCHIARELLI, 2006; VECCHIARELLI *et al.*, 2003; VILLENA *et al.*, 2008; ZARAGOZA *et al.*, 2009). E, sobretudo, a ausência dessa estrutura capsular faz com que os epítomos da parede celular fúngica estejam mais suscetíveis ao reconhecimento das células do sistema imune (ZARAGOZA, 2019). Além disto, sabe-se que tanto GXM como GalGXM são potentes indutores de apoptose em macrófagos (BARONETTI *et al.*, 2008; VILLENA *et al.*, 2008). Dessa forma, a presença da cápsula polissacarídica está intimamente relacionada com o desenvolvimento da doença inclusive no estabelecimento da meningite fúngica.

#### **1.2.2.2. Enzimas necessárias aos mecanismos de transmigração**

Os mecanismos de transmigração têm sido extensivamente estudados, tendo em vista que o estabelecimento da meningoencefalite gera o quadro mais agressivo da doença (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018). A elucidação de potenciais alvos terapêuticos que sejam impeditivos de disseminação é uma estratégia interessante para o combate à criptococose. Dessa maneira, a atividade de um grupo de enzimas têm se mostrado como imprescindível aos mecanismos de transmigração paracelular e transcelular (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018).

A atividade de urease é um fator de virulência amplamente distribuído, também descrito em bactérias (MA; MAY, 2009). Em *C. neoformans*, essa atividade parece estar presente na maior parte dos isolados clínicos (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Esta enzima apresenta-se na forma ativa de uma apoenzima, dependendo da atividade de outras proteínas acessórias: Ure4, Ure6 e Ure7, além de ser uma enzima metalocêntrica demandando a presença de Ni<sup>2+</sup> para seu funcionamento (SINGH *et al.*, 2013). A partir da atividade de urease, *C. neoformans* consegue hidrolisar ureia em amônia e carbamato, promovendo uma elevação do pH local (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003), o que reflete em uma estratégia vantajosa durante a infecção visto que o patógeno passa por microambientes acídicos (FU *et al.*, 2018).

A disrupção do gene *URE1*, que codifica para urease, resulta em uma linhagem hipovirulenta, como demonstrado em modelos *in vivo* (COX *et al.*, 2000). A importância da atividade de urease para os mecanismos de transmigração já está

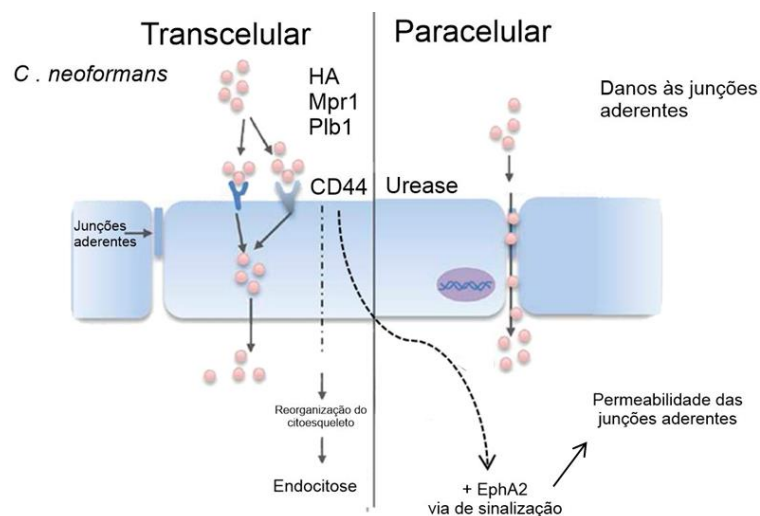


bem estabelecida. No entanto, esta não se faz necessária para a sobrevivência no parênquima cerebral. Sugere-se que a urease atue principalmente nos mecanismos paracelulares de transmigração, por possíveis danos causados as junções aderentes das células endoteliais cerebrais (OLSZEWSKI *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2010) (Figura 4). Isso ainda foi demonstrado pela técnica de *spinning disk confocal* de capilares de microcirculação cerebral de camundongos (SHI *et al.*, 2010).

Outra enzima que se faz essencial à virulência e possui papel importante nos mecanismos de transmigração é a fosfolipase B (Plb1), codificada em *C. neoformans* pelo gene *PLB1*. Fosfolipases compõe um grupo de enzimas heterogêneas capazes de hidrolisar ligações glicerofosfolipídeos, as quais são abundantes nas membranas celulares, dessa forma sua atividade pode provocar danos às membranas, promover lise celular e liberação de mensageiros lipídicos (COX *et al.*, 2001; GANENDREN *et al.*, 2006; GHANNOUM, 2000). Plb1 de *C. neoformans* apresenta um peptídeo sinal para secreção e ainda possui atividade de fosfolipase B, lisofosfolipase hidrolase e lisofosfolipase transacilase (COX *et al.*, 2001; DJORDJEVIC, 2010; GANENDREN *et al.*, 2006). A linhagem nula para *PBL1* resulta em um mutante hipovirulento em modelo murino, com menor capacidade de disseminação para o SNC e dificuldade de sobrevivência dentro de macrófagos (COX *et al.*, 2001; DJORDJEVIC, 2010; GANENDREN *et al.*, 2006). Ainda, foi demonstrado a partir de um estudo *in vitro* utilizando células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (HBMEC), que a participação de Plb1 no mecanismo de transmigração transcelular ocorra potencialmente pela ativação de Rac1 e STAT3 do hospedeiro pela Plb1 secretada. A proteína Rac1 é importante para o rearranjo de actina, promovendo a endocitose, já STAT3 citoplasmática auxilia e interage com GTP- Rac1 (Figura 4). Adicionalmente, sugere-se que Plb1 promova a liberação de mediadores lipídicos como fosfoinositóis, que promovam a ativação de Rac1 (MARUVADA *et al.*, 2015).

Outra enzima que possui relevância no mecanismo de transmigração transcelular é a fungolisina pertencente à classe de protease peptidase M36 (Mpr1). O mutante nulo para *MPRI* resulta em uma linhagem hipovirulenta com menor disseminação para o SNC. Apesar de não ser essencial, Mpr1 parece estar relacionada à adesão ao endotélio cerebral, facilitando a endocitose da levedura patogênica (Figura 4) (VU *et al.*, 2014). A enzima ácido hialurônico sintase, por sua vez, codificada pelo gene *CPSI*, sintetiza o ácido hialurônico (HA). HA está presente tanto na camada externa da parede celular quanto da cápsula polissacarídica, e sua

presença facilita a entrada da levedura no parênquima cerebral pelo mecanismo transcelular de transmigração, visto que promove adesão às células endoteliais cerebrais (JONG *et al.*, 2007). Essa adesão ocorre por meio do reconhecimento de HA por receptores específicos das células endoteliais, sendo o principal receptor CD44. Sugere-se que quando HA está aderido e ligado aos receptores CD44 ocorra o rearranjo e acúmulo de actina formando então *lipid rafts* e propiciando a endocitose da levedura (JONG *et al.*, 2007, 2012). Recentemente foi demonstrado por um estudo *in vitro* que os receptores CD44 mediante ligação ao HA do patógeno podem induzir a internalização dos receptores EphA2, receptor da via de sinalização EPH-Ephrin-A1 tirosina quinase, a qual por fim facilita a internalização de *C. neoformans* por aumentar a permeabilidade da BHE (Figura 4) (AARON *et al.*, 2019). Ainda, estudos utilizando camundongos *knockdown* para CD44, demonstraram que estes possuem uma maior sobrevivência frente à infecção por *C. neoformans* (JONG *et al.*, 2012), revelando a importância desse mecanismo de transmigração para o estabelecimento da meningoencefalite.



**Figura 4- Esquema representativo das enzimas necessárias aos mecanismos de transmigração.** Na imagem representam-se os dois mecanismos de transmigração de células livres de *C. neoformans*, transcelular e paracelular. Transcelular: as enzimas Mpr1 e P1b1 ou molécula HA (ácido hialurônico) que reveste a cápsula polissacarídica são importantes para transmigração transcelular e dependem do rearranjo de actina e posterior endocitose por parte das células endoteliais cerebrais (em azul). HA liga-se aos receptores do hospedeiro CD44, que ativa o rearranjo de actina facilitando a endocitose. Ainda CD44 induzidos por HA podem ativar a via de sinalização EphA2 que leva a uma maior permeabilidade das junções aderentes, facilitando assim o mecanismo paracelular. Paracelular: a atividade de urease causa danos às junções aderentes das células endoteliais cerebrais e promove a transmigração paracelular de *C. neoformans*. Adaptado de: (YANG; WANG; ZOU, 2017).

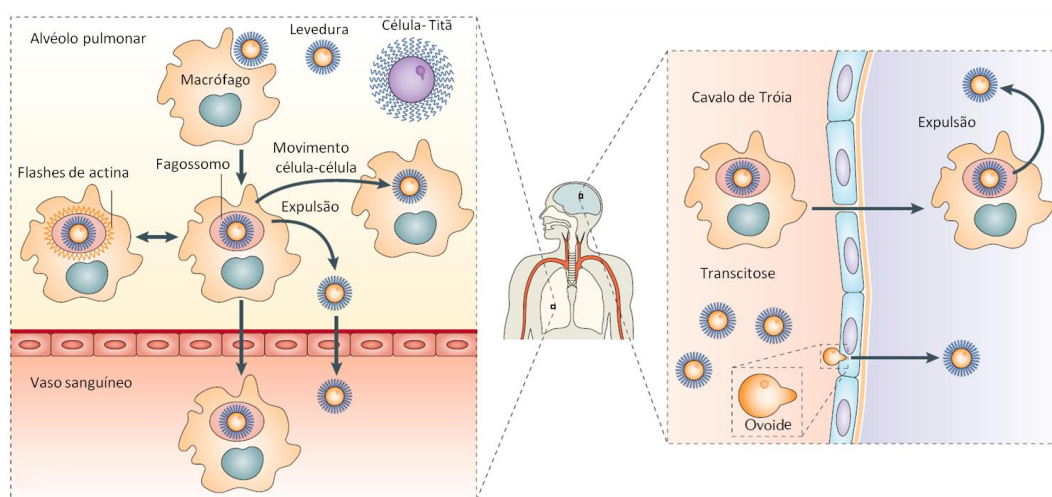
### 1.2.3. Interação com o sistema imune

*C. neoformans* desenvolveu mecanismos específicos de evasão do sistema imune, os quais garantem ao patógeno a capacidade de estabelecer o quadro infeccioso e permanecer por mais tempo nos tecidos do hospedeiro sem ser eliminado (ZARAGOZA, 2019). Essas estratégias de evasão vão desde mudanças morfológicas do fungo até a liberação de componentes que facilitem a interação patógeno-hospedeiro.

Após a inalação das partículas infecciosas, *C. neoformans* interage com a primeira linha de defesa do hospedeiro, que são os macrófagos alveolares (LUBERTO *et al.*, 2003; MA; MAY, 2009). A resposta imune mediada pelos macrófagos alveolares efetiva-se na ativação de um dos subtipos, sendo classicamente (M1) e alternativamente (M2) ativados. Os macrófagos M1 são responsivos ao interferon  $\gamma$ , participam da produção de citocinas do tipo Th1, as quais são capazes de limitar a disseminação de *C. neoformans* para o SNC. Em contrapartida, os macrófagos M2 são ativados por citocinas do tipo IL-4 e IL-13, e ainda contribuem com a produção de citocinas Th2, as quais estão relacionadas com a permanência do patógeno e posterior disseminação ao parênquima cerebral. A polarização da resposta imune é dessa maneira dependente do perfil de citocinas prevalentes durante a infecção criptocócica (CHATURVEDI; WORMLEY, 2013).

Como um patógeno intracelular facultativo, este fungo desenvolveu evolutivamente estratégias as quais o permitem replicar e sobreviver dentro dessas células fagocíticas (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). Uma das estratégias estabelecidas é a capacidade do fungo de alterar o pH do fagolisossomo de macrófagos, e como consequência o compartimento apresenta menor atividade antimicrobiana (DAVIS *et al.*, 2015; LEON-RODRIGUEZ *et al.*, 2018; LEVITZ *et al.*, 1999). Sugere-se que essa modulação do pH possa ocorrer pelo tamponamento mediado pelos ácidos fracos presentes na cápsula polissacarídica, ou também pela atividade da urease, a qual hidrolisa de ureia em amônia e CO<sub>2</sub> resultando em uma alcalinização deste ambiente (FU *et al.*, 2018; LEON-RODRIGUEZ *et al.*, 2018). Ademais, *C. neoformans* é capaz de permeabilizar e causar danos ao fagolisossomo, promovendo aumento da taxa de replicação fúngica intracelular (DAVIS *et al.*, 2015; TUCKER; CASADEVALL, 2002).

Essa interação do patógeno com células fagocíticas pode ser direcionada a diferentes cenários. Uma opção é o aumento massivo da replicação fúngica, levando a morte da célula fagocítica pela via lítica. Alternativamente, *C. neoformans* pode escapar da célula fagocítica sem causar danos a esta por uma via não-lítica, processo denominado de vomocitose (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006, 2007; JOHNSTON; MAY, 2013; MA *et al.*, 2006). Ainda dentro desse processo pode haver a transferência lateral do fungo entre os macrófagos (Figura 5).



**Figura 5 - Esquema de interação entre *C. neoformans* e macrófagos.** As células da levedura patogênica no tecido pulmonar são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos alveolares. Porém, uma subpopulação de célula- Titã (*Titan*, célula gigante) 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). A disseminação ocorre quando células de *C. neoformans* livres ou dentro de macrófagos acessam a via sanguínea, podendo alcançar o SNC. No quadro à direita estão representados dois mecanismos de transmigração: o transcelular, evidenciando possíveis modificações morfológicas (forma ovóide) no sítio de interação com as células endoteliais; e a transmigração pelo mecanismo de cavalo de Tróia, onde *C. neoformans* atravessa a BHE dentro dos fagócitos e torna-se livre após acessar o parênquima cerebral. Adaptado de (KRONSTAD *et al.*, 2011).

Alterações morfológicas das células fúngicas também têm sido utilizadas pelo patógeno como estratégia de evasão do sistema imune. A estrutura da cápsula polissacarídica é muito dinâmica, podendo passar por rearranjos e modificações (OKAGAKI *et al.*, 2010; ZARAGOZA, 2019; ZARAGOZA *et al.*, 2009). Sabe-se que uma das principais contribuições dessa estrutura na interação patógeno hospedeiro é o de camuflar os elementos de reconhecimento do fungo às células do

sistema imune, tendo em vista que esta apresenta superfícies não reconhecidas por fagócitos (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2012; KOZEL; GOTSCHLICH, 1982; POETA, 2004). Além disso, a secreção de GXM é capaz de inibir a atividade quimiotática do endotélio, limitando a migração de leucócitos, incluindo os neutrófilos (ELLERBROEK *et al.*, 2002, 2004; ZHAO MING DONG; MURPHY, 1993).

Propõe-se ainda que a atividade de macrófagos seja paradoxal durante a infecção por *C. neoformans*. Estudos demonstraram que a depleção dessas células fagocíticas limita a infecção, resultando em uma diminuição da carga fúngica no tecido cerebral, pulmonar e baço. Assim, macrófagos poderiam constituir um nicho seguro para o fungo, propiciando a evolução da infecção (CHARLIER *et al.*, 2009; ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; KECHICHIAN; SHEA; DEL POETA, 2007). Dentro desse cenário, *C. neoformans* se beneficia da interação com as células fagocíticas, o que facilita sua disseminação. É notável que macrófagos sejam capazes de atravessar a BHE e acessar o SNC (CHARLIER *et al.*, 2009; TSENG *et al.*, 2015). O ingresso ao parênquima cerebral é um processo complexo, tendo em vista que este órgão conta com um sistema imune distinto do resto do corpo (PAPADOPOULOS *et al.*, 2020), além de possuir uma barreira física designada de BHE, a qual é formada pelas células endoteliais cerebrais. Estas células possuem junções aderentes mais complexas quando comparadas às células endoteliais, além de possuírem uma alta resistência elétrica, o que compele que a transmigração das moléculas seja predominantemente transcelular ao invés de se utilizar do mecanismo paracelular (ABBOTT, 2002; STAMATOVIC; KEEP; ANDJELKOVIC, 2008). Dessa forma, macrófagos atravessam a BHE por um mecanismo sequencial bem estabelecido de rolamento, parada e diapedese, resultando no extravasamento de macrófagos. As células de *C. neoformans* utilizam esses fagócitos como veículos e obtêm acesso ao parênquima cerebral (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018). Diversos estudos já demonstraram e caracterizaram esse mecanismo de transmigração, denominado de cavalo de Tróia (Figura 2 e 5) (CHARLIER *et al.*, 2009; SANTIAGO-TIRADO *et al.*, 2017; SORRELL *et al.*, 2016), os quais propõem que esta migração ocorra através de poros transendoteliais (SANTIAGO-TIRADO *et al.*, 2017).

### 1.3. Processos regulados por cálcio

Um importante fator para a adaptação de *C. neoformans* ao ambiente do hospedeiro é o adequado funcionamento de diversas vias de sinalização, as quais regulam o *fitness* celular, proliferação e patogênese desta levedura. Diferentes vias de sinalização já foram caracterizadas, como a via da proteína quinase A, proteína quinase C (PKC) ativada por mitógeno (MAPK), as sinalizações dependentes de lipídeos (KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2011), a via da fosfolipase C (PLC) (LEV *et al.*, 2013, 2015), e a via de sinalização mediada por calcineurina, a qual é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e extremamente regulada em células eucarióticas (KRAUS; HEITMAN, 2003; PARK *et al.*, 2016).

Nas etapas iniciais dos processos evolutivos, íons  $\text{Ca}^{2+}$  foram adotados como um dos principais e mais versáteis reguladores intracelulares (CARAFOLI; KREBS, 2016). Este elemento possui ampla distribuição, sendo o terceiro metal mais abundante da natureza, e dispõe de uma coordenação química característica. As propriedades químicas conferem a este cátion a capacidade de ser aceito aos sítios com geometrias irregulares, como os que são exibidos por proteínas complexas, e isso o torna mais competente para interagir do que outros metais, como por exemplo o magnésio (CARAFOLI; KREBS, 2016). Ademais,  $\text{Ca}^{2+}$  é o principal segundo mensageiro de células eucarióticas, e em leveduras este é capaz de regular diversos processos, incluindo adaptação a estímulos estressores como o estresse osmótico e salino, pH alcalino, danos ao retículo endoplasmático (RE) e resposta à presença de feromônios (RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016). Ainda, em *S. cerevisiae* as sinalizações dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  são capazes de regular a progressão do ciclo celular (IIDA *et al.*, 1990; KAHL; MEANS, 2003; MIYAKAWA; MIZUNUMA, 2007; ZHANG; RAO, 2008).

Compreendendo a importância que os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  desempenham no metabolismo celular, este deve ser mantido a níveis estritamente controlados, a fim de evitar gastos energéticos desnecessários. É importante salientar que  $\text{Ca}^{2+}$  se complexa e precipita na presença de fosfatos e polifosfatos, caracterizando a porção de  $\text{Ca}^{2+}$  não livre. Considerando que as células possuem um metabolismo energético orientado por fosfato dependente de ATP, reforça-se a importância da manutenção dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainda, o desequilíbrio e alta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resultam em toxicidade celular, dado que se estabelece um cenário de ativação

permanente de vias de sinalização, envolvendo atividade de enzimas hidrolíticas como proteases, as quais podem causar danos às estruturas celulares. Na tentativa de reestabelecer o equilíbrio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ativa-se um processo de detoxificação pela atividade mitocondrial, o que por fim pode resultar na precipitação de fosfato de cálcio. Finalmente, o acúmulo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  acelera e ativa o processo de apoptose (CARAFOLI *et al.*, 2001).

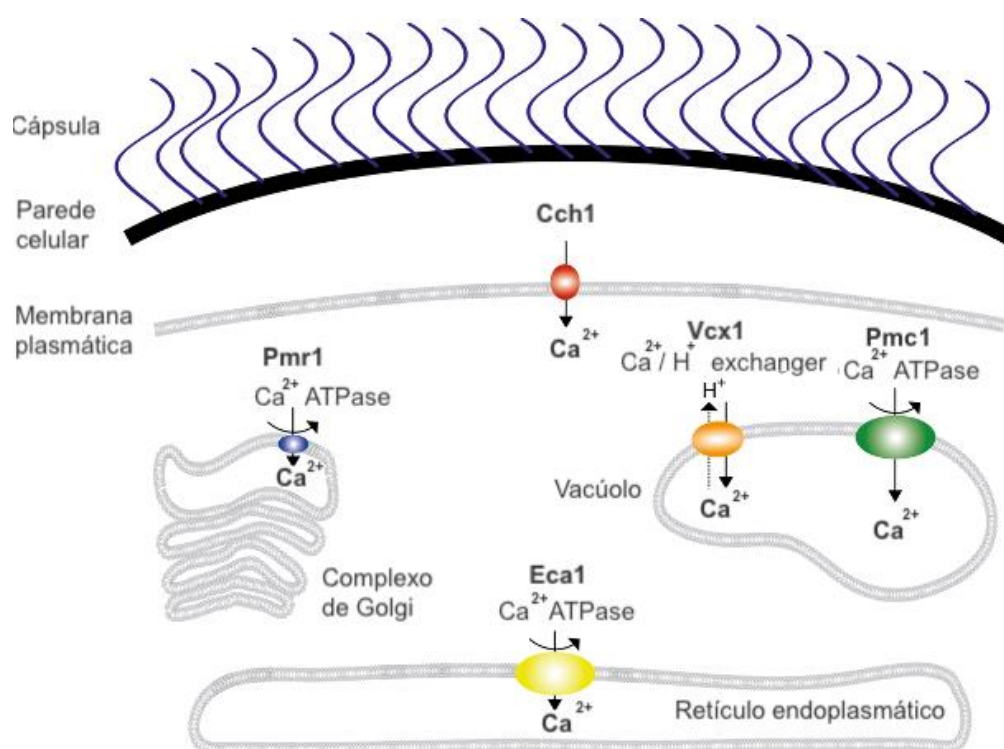
Para controle de entrada e manutenção dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , a célula conta com proteínas especializadas denominadas proteínas ligadoras de cálcio (PLC). Estas dividem-se entre proteínas de transporte, podendo estar ancoradas a membrana, e as transdutoras de sinais, que pela ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  sofrem modificação conformacional e assim efetuam e transmitem seus sinais (YÁÑEZ; GIL-LONGO; CAMPOS-TOIMIL, 2012). Algumas destas proteínas serão exploradas com mais detalhes nos tópicos seguintes.

### 1.3.1. Manutenção da homeostase de cálcio

A manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  em leveduras é mediada pela atividade de transportadores, canais e bombas os quais garantem que a concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  deve se manter entre 50-200 nM, porém a quantidade total intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  varia de 2-3 mM. Dessa forma, a maior parte do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fica estocado em vacúolos (RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016), no retículo endoplasmático (RE) (STRAYLE; POZZAN; RUDOLPH, 1999), no complexo de Golgi (PINTON; POZZAN; RIZZUTO, 1998; RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016), e em mitocôndrias (CUI *et al.*, 2009a; RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016; URIBE; RANGEL; PARDO, 1992).

Considerando que  $\text{Ca}^{2+}$  é incapaz de permear pelas membranas plasmáticas das células e que trata-se de um íon essencial para viabilidade celular, *C. neoformans* produz alguns transportadores de membrana para sua obtenção (CARAFOLI *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2015). Mais especificamente, Cch1 localiza-se na membrana plasmática e capta  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular para o intracelular (LIU *et al.*, 2006) (Figura 6). Este transportador se torna ativo quando há necessidade de restaurar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, respondendo ao estresse de RE ou quando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  nesta organela encontram-se baixos (VU; BAUTOS; GELLI, 2015). A atividade de Cch1 é essencial para a virulência de *C. neoformans* e necessário para a captação

adequada de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular em ambientes com baixa concentração do cátion (LIU *et al.*, 2006). Enquanto Cch1 funciona como o poro do canal permeável, a atividade de Mid1, uma proteína de canal de cálcio *stretch-activated*, ainda não está bem elucidada. Porém, sabe-se que Cch1 e Mid1 formam um complexo, conhecido como Cch1-Mid1 *channel complex* (CMC), e que participam conjuntamente da formação deste canal. Além disso, recentemente demonstrou-se que Cch1 e Mid1 independentemente são necessários aos mecanismos de tolerância ao estresse oxidativo (VU; BAUTOS; GELLI, 2015).



**Figura 6 - Representação esquemática dos transportadores de cálcio em *C. neoformans*.** A imagem representa a localização intracelular dos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . O canal Cch1 localiza-se na membrana plasmática. Eca1 está localizado no RE.  $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$  exchanger Vcx1 e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Pmc1 estão ambos localizados na membrana vacuolar. Pmr1  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase encontra-se no complexo de Golgi.

O RE requer uma quantidade elevada de  $\text{Ca}^{2+}$ , tendo em vista que este participa ativamente no processamento e tráfico de peptídeos e proteínas, sendo necessário para as vias de secreção (RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016). No RE de *C. neoformans* foi descrita a presença da proteína EcaI, uma bomba de  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ , necessária à manutenção da atividade adequada do RE (FAN *et al.*, 2007). Além disso, a inativação gênica de *ECAI* resultou em uma linhagem hipovirulenta. Apesar de o RE ser capaz de armazenar determinada quantidade de



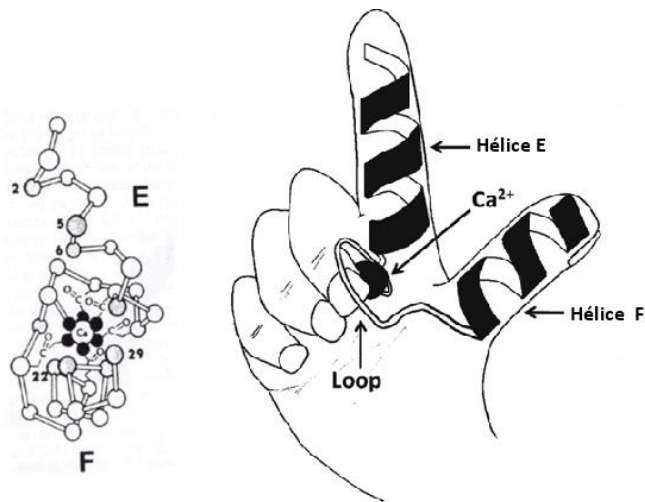
Ca<sup>2+</sup>, a maior parte deste cátion está contida em vacúolos (FAN *et al.*, 2007). Dentro desses vacúolos, íons Ca<sup>2+</sup> aparecem em dois estados, os reutilizáveis ou retornáveis ao citoplasma, que são os átomos de Ca<sup>2+</sup> livre, e os não retornáveis, ou complexados, que são aqueles que formaram complexos de precipitados com polifosfatos presentes no vacúolo (RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016). No patógeno *C. neoformans* dois transportadores vacuolares de cálcio foram identificados: Vcx1, um trocador H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; e Pmc1, uma bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Ambas proteínas possuem domínios transmembrana e são responsáveis pela captação do Ca<sup>2+</sup> citoplasmático para o interior dos vacúolos (KMETZSCH *et al.*, 2010, 2013).

O transportador Vcx1 possui domínios *antiporter* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> *exchanger*, além de apresentar de 10 a 11 domínios transmembrana. A inativação do gene *VCX1* originou uma linhagem com virulência atenuada em modelo murino de infecção, além de apresentar alterações no reconhecimento por células do sistema imune, como macrófagos. Vcx1 ainda é um componente da via de sinalização da calcineurina. Por fim, a linhagem mutante nula do gene *VCX1* apresenta acúmulo de Ca<sup>2+</sup> livre intracelular, reforçando sua importância na manutenção da homeostase de Ca<sup>2+</sup> (KMETZSCH *et al.*, 2010). Adicionalmente, análises *in silico* do transportador Pmc1 identificaram domínios de cátion/ATPase no domínio C, E1-E2 ATPase, hidrolase haloácida dealogenase-like e um transportador de cátion/ATPase no domínio N, sendo ainda preditos 10 domínios transmembrana. A inativação de *PMCI* resultou em uma linhagem (*pmc1*) hipovirulenta em modelo murino de infecção intranasal, a qual foi rapidamente eliminada do tecido pulmonar e incapaz de alcançar o SNC. Além disso, o mutante *pmc1* apresenta-se sensível à altas concentrações de Ca<sup>2+</sup> (KMETZSCH *et al.*, 2013). Estudos mais recentes de nosso grupo demonstram que a atividade de Pmc1 é requerida para o estabelecimento da infecção do parênquima cerebral, visto que o mutante nulo *pmc1* é incapaz de transmigrar pela BHE em um modelo de infecção sistêmica em camundongos, além de apresentar menor sobrevivência no parênquima cerebral em comparação ao selvagem (SQUIZANI *et al.*, 2018), potencialmente causado por um desequilíbrio geral na expressão de fatores requeridos para os processos de transmigração (SQUIZANI *et al.*, 2018). Por fim, tanto *VCX1* quanto *PMCI* são positivamente regulados pela via da calcineurina, e necessários para a manutenção da homeostase de Ca<sup>2+</sup> (SQUIZANI *et al.*, 2018).

### 1.3.2. Proteínas ligadoras de cálcio e transdutoras de sinal

Como mencionado anteriormente, e sugerido por Carafoli *et al.*, 2001, as PLC podem ser agrupadas em duas categorias: PLC de membrana, as quais modulam e regulam a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por meio do transporte do cátion; e as PLC moduladas por  $\text{Ca}^{2+}$  (CARAFOLI *et al.*, 2001; YÁÑEZ; GIL-LONGO; CAMPOS-TOIMIL, 2012). Neste último, existem diversas proteínas com domínios específicos de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , onde destaca-se o domínio de ligação *EF-hand* (YÁÑEZ; GIL-LONGO; CAMPOS-TOIMIL, 2012). Este domínio caracteriza-se pela presença de uma estrutura terciária hélice-*loop*-hélice, que usualmente dispõe de 12 resíduos flanqueados com as alfas hélices posicionadas frente a frente perpendicularmente, lembrando uma mão com o indicador para cima e o polegar para frente, e na porção do *loop* é onde se acomodam os átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 7) (CARAFOLI; KREBS, 2016). Inclusa na família de proteínas que contém os domínios EF-hand encontra-se a calmodulina, uma proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  e extensivamente estudada em células eucarióticas por participar da via de sinalização da calcineurina (YÁÑEZ; GIL-LONGO; CAMPOS-TOIMIL, 2012).

A via de sinalização da calcineurina é uma das principais vias de sinalização ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$  em uma grande diversidade de organismos (KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2011; PARK *et al.*, 2016). Em *C. neoformans*, a via da calcineurina é responsável pela manutenção da viabilidade da levedura diante de diferentes estressores e adaptação do patógeno ao ambiente do hospedeiro (ODOM *et al.*, 1997b; PARK *et al.*, 2016). Esta via dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de regular processos como, crescimento a 37 °C, o processo de *mating* e frutificação monocariótica, respostas ao estresse, integridade da parede celular, e virulência (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; FOX *et al.*, 2001; KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2011; LEV *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2016). Na intercorrência de um aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  esta oscilação é percebida pela proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulina, que ativa a serina / treonina fosfatase calcineurina por ligar-se à porção C-terminal da subunidade A deste heterodímero (KRAUS; HEITMAN, 2003; KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005), que sofre alterações conformacionais culminando na exposição do sítio catalítico (FOX *et al.*, 2001; KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005).

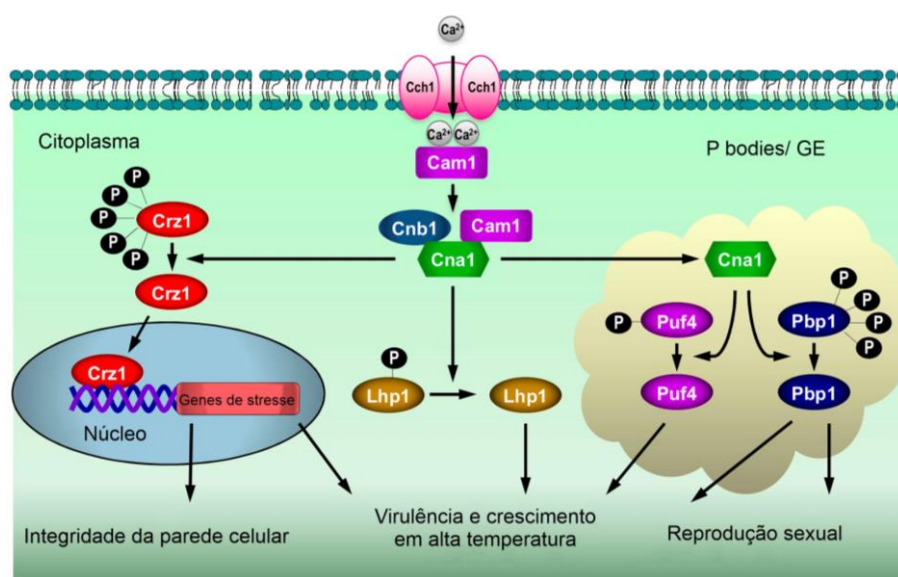


**Figura 7 - Imagem ilustrativa do domínio de ligação a  $\text{Ca}^{2+}$  EF-hand.** O motivo de ligação EF-hand proposto previamente (KRETSINGER *et al.*, 1988), a partir da estrutura cristalográfica de parvalbumina pode ser representada como um indicador (hélice E) e polegar (hélice F) contendo um átomo de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado ao loop. Adaptado de (KRETSINGER *et al.*, 1988; YÁÑEZ; GIL-LONGO; CAMPOS-TOIMIL, 2012).

Quando encontra-se na forma ativa, a fosfatase calcineurina é capaz de desfosforilar seus alvos, como por exemplo o fator de transcrição Crz1, o que leva à translocação desta proteína do citoplasma para o núcleo, ativando a transcrição de genes responsivos à calcineurina (Figura 9) (LEV *et al.*, 2012; STIE; FOX, 2008; YOSHIMOTO *et al.*, 2002). Estes genes possuem na sua região promotora uma sequência consenso de ligação denominada *calcineurin-dependent responsive elements* (CDRE) (CHOW *et al.*, 2017) e seus produtos são relacionados à homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ , como Pmc1 e Vcx1, tolerância ao estresse e integridade da parede celular, como *CHS6*, que codifica para quitina-sintase 6, um participante da síntese de quitina na parede celular (CHOW *et al.*, 2017; LEV *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2016; SQUIZANI *et al.*, 2018).

Em *C. neoformans*, o único fator de transcrição responsivo à calcineurina identificado é Crz1, sendo também o único alvo conservado de calcineurina quando comparado com a via de  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina da levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Todavia, foi demonstrado que, em *C. neoformans*, calcineurina atua de maneira ramificada, controlando eventos a nível transcricional com auxílio de Crz1, e paralelamente a isso, a nível pós-transcricional, pela ativação de outros alvos, como Pbp1, Puf4 e Lhp1. Os referidos alvos são proteínas ligadoras de RNAs que são capazes de controlar a estabilidade, função e localização de mRNAs (Figura 8) (PARK *et al.*, 2016). Ainda, foi demonstrado que em decorrência da ativação

mediada por estresse, ocorre a translocação da subunidade A da calcineurina do citoplasma para o RE, onde se co-localiza com *P bodies* (PB) e grânulos de estresse (GE). Essas estruturas representam um módulo de regulação de expressão gênica em eucariotos, visto que, estes armazenam mRNAs não traduzidos, repressores de tradução e agregados de RNA. Sugere-se então, que a translocação da calcineurina para locais de processamento de mRNA seja mais um mecanismo de regulação a nível pós-transcricional da calcineurina, e que conjuntamente auxilie na resposta ao estresse e virulência de *C. neoformans* (KOZUBOWSKI *et al.*, 2011).



**Figura 8 – Esquema representativo da via de sinalização de calcineurina em *C. neoformans*.** Calcineurina ativa seus alvos de maneira ramificada para regular o desenvolvimento a 37 °C, virulência e reprodução sexual. Seus alvos incluem 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, é obtida a ativação transcricional e pós-transcricional necessárias para a termotolerância, virulência e reprodução sexual. Adaptado de (PARK *et al.*, 2016).

Como importante componente na virulência, a modulação da via da calcineurina se torna um alvo atraente como potencial estratégia terapêutica para a criptococose. Inibidores da via da calcineurina estão disponíveis comercialmente, como os imunossuppressores Ciclosporina A (CsA) e FK506, os quais possuem atividade antifúngica. Estes fármacos difundem-se nas células de *C. neoformans* e se ligam à proteína ciclofilina A e à imunofilina FKBP12, respectivamente. Os complexos formados mediante a ligação dos fármacos às proteínas promovem um potente efeito inibitório da calcineurina. Porém, apesar de estudos *in vitro* terem demonstrado atividade antifúngica desses inibidores, estudos *in vivo* evidenciam uma

exacerbação do quadro infeccioso, sugerindo que os efeitos imunomodulatórios sobrepõem à atividade antifúngica destes fármacos (CRUZ *et al.*, 2000; ODOM *et al.*, 1997a). Ainda assim, os componentes da via da calcineurina, ou da manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  continuam atraentes alvos para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas (LIU *et al.*, 2015).

Dentro da família das proteínas com domínio EF-hand, encontra-se outra importante proteína ligadora e sensora de  $\text{Ca}^{2+}$ : *neuronal calcium sensor 1* (Ncs1). Esta proteína é amplamente distribuída e conservada em células eucarióticas, caracterizada pela presença de 4 domínios EF-hands em *tandem*, assim como de um sítio de miristoilação na sua porção N-terminal, o qual sofre uma modificação estrutural mediante a ligação a átomos de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando a hidrofobicidade de Ncs1 e servindo de ancoramento da proteína à membrana (LEMIRE; JEROMIN; BOISSELIER, 2016; TAMULI; KUMAR; DEKA, 2011). Ortólogos fúngicos de Ncs1 foram identificados, os quais foram relacionados ao crescimento celular, viabilidade e tolerância a  $\text{Ca}^{2+}$  e pH alcalino (AMES *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2012; GOHAIN; DEKA; TAMULI, 2016; HAMASAKI-KATAGIRI *et al.*, 2004; HAMASAKI-KATAGIRI; AMES, 2010; HENDRICKS *et al.*, 1999; MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008; SAITOH *et al.*, 2003; TAMULI; KUMAR; DEKA, 2011). Levando em consideração a miríade de processos que  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de regular, e os potenciais e atrativos alvos relacionados à homeostase e regulação de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , percebe-se a necessidade de serem elucidados novos componentes envolvidos na sinalização regulação e transdução de sinais dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  em *C. neoformans*.

#### **1.4. Fatores de transcrição associados à virulência de *C. neoformans***

Uma diversidade de estudos realizados com *C. neoformans* elucidaram importantes vias de sinalização associada à virulência desta espécie, como as vias da calcineurina, da MAPK, do cAMP e de Rim101 (JUNG *et al.*, 2015; KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2011). Normalmente, estas vias dependem da ativação alvos como fatores de transcrição (FTs), os quais mediante a ligação aos sítios reguladores promovem a ativação ou repressão da transcrição de genes específicos. Usualmente os componentes gerais das vias de sinalização são evolutivamente mais conservados quando comparados aos FTs, os quais possuem uma maior variação entre espécies (JUNG *et al.*, 2015). Em um estudo elaborado por

(JUNG *et al.*, 2015), realizou-se a construção de uma biblioteca de mutantes nulos para genes codificantes de 155 fatores de transcrição de *C. neoformans*. Dezenas destas proteínas apresentam associação com virulência, avaliado em modelo invertebrado de criptococose, assim como de outros fenótipos associados. Recentemente, outro estudo do mesmo grupo (LEE *et al.*, 2020) realizou uma análise geral de FTs que sejam necessários ao estabelecimento da infecção no tecido pulmonar e parênquima cerebral. Nove FTs foram essenciais e centrais para a manutenção da virulência de *C. neoformans*, onde se incluem Sre1 e Hob1, ambos envolvidos na via de biossíntese de ergosterol, Hx11 presente na via da resposta às proteínas mal-dobradas (UPR, do inglês *unfolded protein response*), Gat201 e Nrg1 envolvidos na via biossintética da cápsula, e Pdr802, Fzc1, Fzc9 e Fzc31 os quais possuem domínios de ligação ao DNA (LEE *et al.*, 2020).

Alguns outros fatores de transcrição já haviam sido extensivamente caracterizados, como o anteriormente mencionado Crz1, o qual é essencial para a integridade da parede celular por ativar a transcrição de genes envolvidos com a síntese de quitina, e manutenção da virulência em *C. neoformans* (LEV *et al.*, 2012). Este fator de transcrição é responsivo a estímulos estressores, principalmente à temperatura de 37 °C, a qual estimula a translocação de Crz1 para o núcleo (LEV *et al.*, 2012). É importante ressaltar que Crz1 depende de calcineurina para exercer a ativação de genes específicos, porém, paralelamente Crz1 possui alguns alvos gênicos independentes da via da calcineurina, como *FKS1*, o qual codifica para uma  $\beta$ -1,3 glucana sintase, e *MPK1*, que codifica a proteína *downstream* da via de sinalização da proteína *kinase* 1 (Pkc1). Ambos os genes são ativados por Crz1 em resposta ao estresse térmico, reforçando a ideia de que FTs podem ser ativados paralelamente por múltiplas vias de sinalização (CHOW *et al.*, 2017). Adicionalmente, um estudo recente de nosso grupo demonstrou que Crz1 ainda está envolvido com a potencial ativação de *URE1*, que possui papel de relevância nos mecanismos de transmigração pela BHE (SQUIZANI *et al.*, 2018).

Outro FT que possui grande influência na adaptação do patógeno é o *sterol regulator element binding protein* (Sre1). Em *C. neoformans*, um estudo utilizando microarranjos e análise de expressão por *northern blot* revelou que este fator de transcrição está envolvido com a ativação de genes relacionados com a biossíntese de ergosterol e de captação de ferro (CHANG *et al.*, 2007). Sre1 é responsivo a ambientes com limitação de oxigênio, e a linhagem nula para o gene *SRE1* é

hipovirulenta em modelo murino, não sendo capaz de acessar o SNC, demonstrando a relevância desse FT para a adaptação do patógeno no hospedeiro. Além disso, o mutante *sre1Δ* apresenta maior sensibilidade a azoles, tendo em vista que essas drogas inibem a síntese de ergosterol, e não é capaz de se desenvolver em ambientes com baixa disponibilidade de ferro (CHANG *et al.*, 2007). Ainda, foi demonstrado que a clivagem de SREBP, o precursor de Sre1 para sua forma ativa, ocorre em resposta a hipóxia (CHUN; LIU; MADHANI, 2007). Em *Schizosaccharomyces pombe*, o ortólogo SREBP é clivado em resposta aos baixos níveis de oxigênio, visto que hipóxia resulta na inibição da síntese de esterol, todavia SREBP de *S. pombe* também pode ser ativado pela liberação de Ca<sup>2+</sup> do RE, que promove a translocação de Sre1 para o núcleo (HUGHES *et al.*, 2007). Novamente demonstra-se uma forma alternativa de ativação de FTs.

Recentemente foi descrito o FT *homeobox* Hob1, regulador da via de biossíntese de ergosterol, e também regulador indireto da biossíntese de melanina, por intermédio da ativação da transcrição de Bzp4 e Usv101, FTs diretamente ligados à síntese de melanina (LEE *et al.*, 2019, 2020). Em decorrência do conjunto de genes dos quais este FT regula a expressão, Hob1 parece exercer importante papel na regulação da transmigração de *C. neoformans* e habilidade de sobrevivência no parênquima cerebral. A inativação de *HOB1* resulta em uma linhagem hipovirulenta em modelo murino intranasal. Adicionalmente, propõe-se que Hob1 seja responsável pela regulação da transcrição de *ITR3* e *ITR4*, que codificam transportadores de inositol, e também de *MPRI*, que codifica para metaloprotease. Estas proteínas são essenciais para a habilidade de transmigração pela BHE e sobrevivência no parênquima cerebral (LEE *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2013; VU *et al.*, 2014). Conjuntamente, esses estudos demonstram a importância da atividade dos FTs na adaptação de *C. neoformans* ao hospedeiro, e evidenciam algumas características exclusivas deste organismo.

**Tabela 1** – Síntese de informações relevantes dos principais fatores de transcrição que serão abordados ao longo da Tese.

Fator de transcrição	Contribuição para virulência	Processos regulados	Responsivo à
Crz1	Importante	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vias de resposta a estresse</li> <li>• Integridade de parede celular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altas temperaturas</li> <li>• Aumento intracelular de</li> </ul>

		• Homeostase de Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Sre1	Essencial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crescimento em ambientes com baixa oxigenação</li> <li>• Síntese de ergosterol</li> <li>• Captação de ferro</li> </ul>	• Hipóxia
Hob1	Importante	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntese de ergosterol</li> <li>• Processos de melanização</li> <li>• Transmigração pela BHE</li> </ul>	-----



## 2. Objetivos

Caracterizar proteínas potencialmente envolvidas com a homeostase e sinalização dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  na patogênese de *C. neoformans* e na disseminação para o sistema nervoso central.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Selecionar potenciais proteínas codificadas pelo genoma de *C. neoformans* que contenham domínios EF-hand;
- Avaliar o papel da proteína selecionada Ncs1 na via de sinalização mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina, produção de determinantes de virulência e na virulência de *C. neoformans*;
- Descrever e caracterizar a função de fatores de transcrição não canônicos potencialmente envolvidos na homeostase de cálcio em *C. neoformans*;
- Avaliar a associação entre a homeostase de cálcio e a síntese de esteróis em *C. neoformans*.

### 3. Resultados

Os resultados obtidos na presente Tese estão organizados em dois capítulos. O primeiro capítulo trata da caracterização funcional do gene codificante da proteína Ncs1, que contém domínios *EF-hand*, assim como a associação da mesma com a via da sinalização de Ca<sup>2+</sup>-calcineurina e virulência em *C. neoformans*. Os resultados foram compilados no artigo intitulado “Ncs1 is calcineurin-regulated in *Cryptococcus neoformans* and essential for cell division and virulence”, aceito para publicação no periódico mSphere. O segundo capítulo trata da avaliação de uma biblioteca de mutantes nulos para fatores de transcrição de *C. neoformans* em relação a alterações na homeostase de cálcio e sua potencial associação com o metabolismo de esteróis.

**3.1. CAPÍTULO 1: Ncs1 is calcineurin-regulated in *Cryptococcus neoformans* and essential for cell division and virulence**

**Calcium binding protein Ncs1 is calcineurin-regulated in *Cryptococcus neoformans* and essential for cell division and virulence**

Eamim Daidrê Squizani <sup>a</sup>, Júlia Catarina Vieira Reuwsaat <sup>a</sup>, Sophie Lev <sup>b,c,d</sup>, Heryk Motta <sup>a</sup>, Julia Sperotto <sup>a</sup>, Keren Kaufman-Francis <sup>b,c,d</sup>, Desmarini Desmarini <sup>b,c,d</sup>, Marilene Henning Vainstein <sup>a</sup>, Charley Christian Staats <sup>a</sup>, Julianne T. Djordjevic <sup>b,c,d,Ω,\*</sup>, Lívia Kmetzsch <sup>a,Ω,\*</sup>

\*Corresponding authors: [julianne.djordjevic@sydney.edu.au](mailto:julianne.djordjevic@sydney.edu.au),  
[liviak@cbiot.ufrgs.br](mailto:liviak@cbiot.ufrgs.br)

<sup>Ω</sup> These authors share senior authorship.

**Running title:** Ncs1 as a novel cryptococcal calcium sensor protein.

Key words: calcium binding protein, calcium sensor, *Cryptococcus neoformans*, calcium signalling.

<sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>b</sup> Centre for Infectious Diseases and Microbiology, The Westmead Institute for Medical Research, Sydney, NSW, Australia.

<sup>c</sup> Sydney Medical School-Westmead, University of Sydney, Sydney NSW, Australia.

<sup>d</sup> Marie Bashir Institute for Infectious Diseases and Biosecurity, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia.

**Word count for abstract:** 237; **Word count for text:** 4790.

## Abstract

Intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is crucial for signal transduction in *Cryptococcus neoformans*, the major cause of fatal fungal meningitis. The calcineurin pathway is the only  $\text{Ca}^{2+}$ -requiring signalling cascade implicated in cryptococcal stress adaptation and virulence, with  $\text{Ca}^{2+}$ -binding mediated by the EF-hand domains of the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor protein calmodulin. In this study, we identified the cryptococcal ortholog of neuronal calcium sensor-1 (Ncs1) as a member of the EF-hand superfamily. We demonstrated that Ncs1 has a role in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis under stress and non-stress conditions, as the *ncs1Δ* mutant is sensitive to a high  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and has an elevated basal  $\text{Ca}^{2+}$  level. Furthermore, *NCS1* expression is induced by  $\text{Ca}^{2+}$ , with the Ncs1 protein adopting a punctate subcellular distribution. We also demonstrate that, in contrast to *Saccharomyces cerevisiae*, *NCS1* expression in *C. neoformans* is regulated by the calcineurin pathway via the transcription factor Crz1, as *NCS1* expression is reduced by FK506 treatment and *CRZ1* deletion. Moreover, the *ncs1Δ* mutant shares a high temperature and high  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity phenotype with the calcineurin and calmodulin mutants (*cna1Δ* and *cam1Δ*) and the *NCS1* promoter contains two calcineurin/Crz1-dependent response elements (CDRE1). Ncs1-deficiency coincided with reduced growth, characterized by delayed bud emergence and aberrant cell division, and hypovirulence in a mouse infection model. In summary, our data show that Ncs1 has a significant role as a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor in *C. neoformans*, working with calcineurin to regulate  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and, consequently, promote fungal growth and virulence.

## **Importance**

*Cryptococcus neoformans* is the major cause of fungal meningitis in HIV infected patients. Several studies have highlighted the important contribution of Ca<sup>2+</sup> signalling and homeostasis to the virulence of *C. neoformans*. Here, we identify the cryptococcal ortholog of neuronal calcium sensor-1 (Ncs1) and demonstrate its role in Ca<sup>2+</sup> homeostasis, bud emergence, cell cycle progression and virulence. We also show that Ncs1 function is regulated by the calcineurin/Crz1 signalling cascade. Our work provides evidence of a link between Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell cycle progression in *C. neoformans*.

## **Introduction**

*Cryptococcus neoformans* is a basidiomycetous pathogenic yeast, found mostly in soil and bird droppings (MA; MAY, 2009; PARK *et al.*, 2009a; THINYANE; MOTSEMME; COOPER, 2015). This pathogen is the etiological agent of cryptococcosis, which affects mainly immunocompromised individuals. This disease affects more than 220,000 HIV-infected patients per year, resulting in more than 180,000 deaths worldwide (RAJASINGHAM *et al.*, 2017a; THINYANE; MOTSEMME; COOPER, 2015). The lung infection is initiated following the inhalation of small desiccated cells or spores. The infection can then spread via the bloodstream to the central nervous system, causing meningoencephalitis, which is the primary cause of death (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; MA; MAY, 2009). To survive within the host environment, *C. neoformans* produces several virulence determinants, including a polysaccharide capsule, the pigment melanin, secreted enzymes (AARON; GELLI, 2020; DJORDJEVIC *et al.*, 2005; SIAFAKAS *et al.*, 2007; VU *et al.*, 2014) and extracellular vesicles (RODRIGUES *et*

*al.*, 2008). *C. neoformans* survival in the host is only possible due to its ability to grow at 37 °C and also aided by its capacity to survive within phagocytic mammalian cells (CHARLIER *et al.*, 2009; LEVITZ *et al.*, 1999; MA; MAY, 2009; MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2020; TUCKER; CASADEVALL, 2002).

Fungal fitness and survival in the host environment is controlled by numerous signaling pathways including those that are regulated by intracellular Ca<sup>2+</sup>, which is an essential second messenger in eukaryotic cells (CUI *et al.*, 2009a, 2009b; ODOM *et al.*, 1997a; RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016). An increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> is monitored by Ca<sup>2+</sup> sensor proteins that, upon binding to Ca<sup>2+</sup>, change their conformation and transduce signals onto downstream targets (D. BURGOYNE, 2004; PARYS; DE SMEDT, 2012). An important Ca<sup>2+</sup> sensor in fungal cells is calmodulin, which is a component of the calcineurin signaling pathway. Ca<sup>2+</sup>-induced conformational change in calmodulin activates the serine-threonine phosphatase, calcineurin. Calcineurin then mediates the regulation of several cellular responses by initiating changes in the phosphorylation status of its downstream targets (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2011; ODOM *et al.*, 1997a). A major target of cryptococcal calcineurin is the transcription factor Crz1, which regulates the expression of genes involved in stress response and in the maintenance of cell wall integrity (LEV *et al.*, 2012; ODOM *et al.*, 1997b). In *C. neoformans*, the calcineurin pathway is also essential for growth at 37 °C, sexual reproduction and virulence (PARK *et al.*, 2016); in *Saccharomyces cerevisiae*, it is required for cell cycle progression (MIYAKAWA; MIZUNUMA, 2007).

Given that high levels of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  can be toxic,  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is strictly regulated by several proteins acting as transporters, channels or pumps (CARAFOLI *et al.*, 2001). In *C. neoformans*, these proteins include Cch1, a  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-gated channel essential for virulence and Mid1, a stretch-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -channel, both found in the plasma membrane (LIU *et al.*, 2006; RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016). Other cryptococcal calcium transporters that also promote virulence include the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Ecal, found in sarcoplasmic/endoplasmic reticulum, the  $\text{H}^+$ /  $\text{Ca}^{2+}$  exchanger protein Vcx1 and the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase Pmc1, both localized on vacuolar membranes and responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  storage (FAN *et al.*, 2007; KMETZSCH *et al.*, 2010, 2013; SQUIZANI *et al.*, 2018). Pmc1 is also required for *C. neoformans* transmigration through the blood-brain barrier (BBB), proving that Pmc1-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is crucial for disease progression (SQUIZANI *et al.*, 2018).

Despite the importance of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis-related proteins in fungal cell fitness and virulence, with the exception of calmodulin, little is known about the function of other calcium binding proteins (CBPs) that act as  $\text{Ca}^{2+}$  sensors in *C. neoformans*. One such protein is the neuronal calcium sensor 1 (Ncs1). Ncs1 orthologs in other fungi have roles in cell growth and viability, tolerance to  $\text{Ca}^{2+}$  (AMES *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2012; GOHAIN; DEKA; TAMULI, 2016; HAMASAKI-KATAGIRI *et al.*, 2004; HAMASAKI-KATAGIRI; AMES, 2010; MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008; SAITOH *et al.*, 2003; TAMULI; KUMAR; DEKA, 2011), membrane sterol distribution and expression of  $\text{Ca}^{2+}$  transporter genes (MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008). Here, we identify and characterize the Ncs1 ortholog in *C. neoformans*. Using gene deletion and *in silico* analysis, we investigate the role of Ncs1 in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis,



growth, stress tolerance and virulence, and whether Ncs1 function is linked to the calcineurin pathway.

## Results

***Identification of the neuronal calcium sensor 1 (Ncs1) ortholog in C. neoformans.*** CBPs are either predominantly intrinsic membrane proteins that transport  $\text{Ca}^{2+}$  through membranes or  $\text{Ca}^{2+}$  modulated proteins, mainly represented by  $\text{Ca}^{2+}$  sensors involved in signal transduction (CARAFOLI *et al.*, 2001; PARYS; DE SMEDT, 2012). The later includes calmodulin and calcineurin, which harbor the calcium-binding (EF-hand) domain. Both proteins have been well studied in eukaryotic cells, including *C. neoformans* (KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005; ODOM *et al.*, 1997b; PARK *et al.*, 2016). However, calmodulin is the only intracellular calcium sensor characterized so far in *C. neoformans*. Considering the number and complexity of processes regulated by  $\text{Ca}^{2+}$ , we sought to identify other CBPs in the EF-hand superfamily with  $\text{Ca}^{2+}$  sensor functions. In this context, we searched for the Ncs1 homologue in *C. neoformans*, given that this protein is important for  $\text{Ca}^{2+}$  regulated processes in a variety of eukaryotic cells (LEMIRE; JEROMIN; BOISSELIER, 2016).

**For this purpose, we performed an *in silico* analysis at FungiDB** to identify the *NCS1* coding sequence in the *C. neoformans* H99 genome (accession number CNAG\_03370). Ncs1 is well conserved in eukaryotes, with orthologs sharing common regions, such as EF hand domains and a myristoylation motif. Our analysis revealed that *C. neoformans* Ncs1 contains four predicted EF-hand domains that span the full length of the protein (Fig. 1). Moreover, the presence of an N-terminal myristoylation motif was identified using the NMT-themyr predictor database. Myristoylation, a lipid modification conserved among

eukaryotic Ncs1 proteins (Burgoyne, 2004), is important for cell signaling, protein–protein interaction and protein targeting to endomembrane systems and the plasma membrane (UDENWOBELE *et al.*, 2017). Comparative analysis of the *C. neoformans* Ncs1 protein sequence with *Aspergillus fumigatus* NCSA (Afu6g14240), *Schizosacharomyces pombe* NCS1 (SPAC18B11.04) and *S. cerevisiae* FRQ1 (YDR373W), which are already functionally characterized (AMES *et al.*, 2000; HAMASAKI-KATAGIRI *et al.*, 2004; MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008), revealed a high amino acid sequence similarity (86, 87 and 81%, respectively) (Fig. 1).

**Disruption of the *NCS1* gene affects *C. neoformans* traits associated with calcium homeostasis.** Calcium sensor proteins measure fluctuations in free cytosolic Ca<sup>2+</sup> and transduce the signal to downstream effectors (KRAUS; HEITMAN, 2003; KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005; MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008). To determine whether Ncs1 plays a similar role in *C. neoformans*, we obtained a *NCS1* gene knockout strain (*ncs1Δ*) from the Madhani's mutant collection (LIU *et al.*, 2012) and generated a *NCS1* reconstituted (*ncs1Δ::NCS1*) strain (Fig. S1) using the *ncs1Δ* background. We then evaluated the ability of these mutant strains to grow under different stresses. We initially chose high Ca<sup>2+</sup> concentration (to alter Ca<sup>2+</sup> homeostasis) and high temperatures (37 °C and 39 °C), as the calcineurin (*cna1Δ*) and calmodulin (*cam1Δ*) mutants were shown to be sensitive under these growth conditions (KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005; LEV *et al.*, 2012; ODOM *et al.*, 1997b). We observed impaired *ncs1Δ* growth in high Ca<sup>2+</sup> levels and at 39 °C, but not at 37 °C; these growth defects were restored to WT levels in the *ncs1Δ::NCS1* strain (Fig. 2). Lower Ca<sup>2+</sup> concentrations (ranging from 1 to 20 mM CaCl<sub>2</sub>) did not influence *ncs1Δ* growth (data not shown). Other traits associated

with Ca<sup>2+</sup>-calcineurin pathway, such as growth in the presence of cell wall perturbing agents (Calcofluor white and Congo red) and osmotic stress (1 M NaCl) were evaluated in the *ncs1Δ* null mutant, with no effect observed (Fig S2).

We also evaluated whether the level of free intracellular Ca<sup>2+</sup> in *C. neoformans* is affected in the absence of Ncs1. Relative to the WT strain, the *ncs1Δ* mutant had a higher basal level of free cytosolic Ca<sup>2+</sup>, which was reduced to WT levels in the *ncs1Δ::NCS1* strain. This high Ca<sup>2+</sup> level phenotype was shared with that observed for the *cna1Δ* and *cam1Δ* mutant strains (Fig 3A). In *S. pombe*, Ncs1 physically interacts with the Mid1 ortholog, Yam8, which is a stretch-activated Ca<sup>2+</sup>-channel. *S. pombe* *YAM8* gene disruption in the *ncs1Δ* background restored the Ca<sup>2+</sup> sensitive phenotype (HAMASAKI-KATAGIRI; AMES, 2010). In this study, the authors proposed that Ncs1 negatively regulates the Yam8 calcium channel. We therefore investigated whether the high affinity Mid1-Cch1 calcium channel complex (HONG *et al.*, 2013; VU; BAUTOS; GELLI, 2015) is responsible for the increased intracellular Ca<sup>2+</sup> observed in the *ncs1Δ* mutant. Specifically, we used real-time RT-qPCR to compare the expression of *MID1* and *CCH1* in WT and *ncs1Δ* grown in YPD with or without 100 mM CaCl<sub>2</sub> for 24 hours. The transcript levels of both genes increased by approximately 3-fold in the *ncs1Δ* mutant strain, but only following growth in the presence of 100 mM CaCl<sub>2</sub> (Fig 3B). No differences in *CCH1* and *MID1* expression was observed in WT and *ncs1Δ* grown in YPD without CaCl<sub>2</sub> (Fig 3B), suggesting that the Mid1-Cch1 complex, which imports Ca<sup>2+</sup> into the cytosol (LIU *et al.*, 2006; VU; BAUTOS; GELLI, 2015), is not the source of extra Ca<sup>2+</sup> in the *ncs1Δ* mutant. In further support of this, we generated a *mid1Δncs1Δ* double mutant in *C. neoformans* and found that increased intracellular Ca<sup>2+</sup> accumulation and Ca<sup>2+</sup> sensitivity persisted in this mutant (Fig. S3). Despite these

findings, we cannot rule out the involvement of other low affinity calcium channels in contributing to the increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  observed in the *nsc1Δ* mutant.

We also C-terminally tagged Ncs1 with GFP (*NCS1::GFP*) to assess Ncs1 subcellular localization. Faint, predominantly cytosolic, Ncs1 fluorescence was observed when the strain was cultured in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . However, the fluorescence was higher than that observed for the non-fluorescent WT control strain (Fig. 3C). Ncs1 fluorescence became more intense following culture in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (100mM  $\text{CaCl}_2$ ), with Ncs1 adopting a more punctate staining pattern:  $24.5 \pm 1.1$  % and  $36.3 \pm 3.0$  % of the cell population displayed puncta in the absence (MM) and presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (MM +  $\text{CaCl}_2$ ), respectively ( $p = 0.013$  Welch's test with  $n \geq 200$  cells per sample) (Fig. 3C). Increased Ncs1 fluorescence in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  correlated with higher expression of *NCS1* by *NCS1::GFP* strain in the same condition (Fig. 3D). Taken together, these results suggest that Ncs1 responds to increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels and participates in the regulation of calcium homeostasis in *C. neoformans*.

***NCS1* is a calcineurin-Crz1 responsive gene.** Given that *NCS1* is a  $\text{Ca}^{2+}$ -responsive gene in *C. neoformans* (Fig. 3D), we investigated whether *NCS1* expression is regulated by the calcineurin signaling pathway via the transcription factor Crz1. *NCS1* expression was analyzed in the presence and absence of the calcineurin inhibitor FK506 (Fig. 4A), and in the WT and *crz1Δ* mutant (Fig. 4B). The results demonstrated that FK506-treatment reduced *NCS1* transcription in the WT (Fig 4A), and that *NCS1* expression was downregulated in the *crz1Δ* mutant at 25 °C and 37 °C (Fig. 4B). In further support of *NCS1* being a Crz1 target, we identified two Crz1-binding consensus motifs (CHOW *et al.*, 2017) in the

putative *NCS1* regulatory region encompassing the 1,000 nucleotides sequence upstream of the transcription start site (Fig. 4C). These findings provide evidence that Ncs1 and calcineurin work together to regulate Ca<sup>2+</sup> homeostasis.

***Ncs1 activity is essential for C. neoformans virulence.*** As proven in other studies, the disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis components is important for cryptococcal pathogenicity (FAN *et al.*, 2007; KMETZSCH *et al.*, 2010, 2013; LIU *et al.*, 2006, 2015; SQUIZANI *et al.*, 2018). To determine whether disruption of Ncs1-mediated calcium homeostasis also contributes to pathogenicity, we compared the virulence of the *ncs1Δ* mutant strain to that observed for the WT and *ncs1Δ::NCS1* strains in a mouse inhalation model of cryptococcosis. In a Kaplan-Meier survival study, the *ncs1Δ* null mutant strain was found to be hypovirulent (Median Lethal Time -LT<sub>50</sub> 32.7 days) when compared to WT (LT<sub>50</sub> 18.9, p < 0.0001) and the *ncs1Δ::NCS1* strains (LT<sub>50</sub> 17.4 days, p < 0.0001) (Fig. 5A). Although the disruption of *NCS1* prolonged mouse survival, no difference in the fungal burdens in lung and brain were observed at time of death when infected mice had lost 20% of their pre-infection weight (Fig. 5B). Thus the *ncs1Δ* null mutant strain is capable of infecting the lung and brain tissue but potentially grows at a slower rate compared to WT and the *ncs1Δ::NCS1* strains.

***Ncs1 is necessary for growth under host mimicking conditions.*** We also analyzed the capability of *ncs1Δ* mutant to synthesize the polysaccharide capsule, since this is the main cryptococcal virulence factor (MA; MAY, 2009; MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006). We observed that when the *ncs1Δ* strain is grown under capsule inducing conditions (DMEM at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>), mutant cells produce smaller capsules in comparison to WT and *ncs1Δ::NCS1* strain (Fig. 6A). However, capsule size was not affected following

growth in mouse serum (data not shown). Next, we compared growth of the *Δncs1* mutant to that of the *WT* and *ncs1Δ::NCS1* strains in the capsule induction condition utilized and found that the mutant growth was drastically compromised (Fig. 6B). Similarly, growth of *ncs1Δ* was severely impaired in mouse serum over a 24-hour period at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> (Fig. 6C). Collectively, these results suggest that hypovirulence of the *ncs1Δ* mutant is most likely associated with the observed growth defects, with reduced capsule size playing only a minor contribution to this virulence phenotype.

**Ncs1 is important for the release of daughter cells.** Microscopic analysis to evaluate the size of the polysaccharide capsule and the growth rate in mouse serum revealed that some *ncs1Δ* cells displayed aberrant morphology and cell division (Fig. 7A), suggesting that Ncs1 could play a role in cell cycle progression. We therefore investigated the growth defect further by determining the time it took for buds to emerge using time-lapse microscopy (Fig. 7B and Movies S1 and S2). Given that the mutant was severely attenuated in growth when cultured in DMEM or exposed to mouse serum, we chose YPD medium for this analysis, as it is a richer medium where mutant growth is not as compromised. To avoid bias due to lack of synchronization, we only measured the time of bud emergence in cells after the bud of the first daughter cell had separated from the mother or, in the case of the mutant cells, where progeny did not detach from mother cell, after the second bud emergence. The results demonstrate that it took ~70 min for buds to emerge in the *WT* cells and more than 140 min for buds to emerge in isolated and clumped *ncs1Δ* mutant cells (Fig. 7C). Furthermore, buds were slow to be released in some *ncs1Δ* mutant cells, resulting in more extensive cell clumping.

As cell division is linked to the cell cycle, we evaluated whether cells lacking *NCS1* displayed defects in cell cycle regulation by measuring the levels of two transcripts associated with different stages of the cell cycle: the G<sub>1</sub> cyclin encoded by *CNL1* (GARCÍA-RODAS *et al.*, 2014) and the S phase DNA replication licensing factor encoded by *MCM2* (KELLIHER *et al.*, 2016; KELLIHER; HAASE, 2017). We also measured the transcript levels of the G protein coupled receptor encoded by *GPA2*, which displays oscillatory expression during the cell cycle (KELLIHER *et al.*, 2016; KELLIHER; HAASE, 2017). All three genes were upregulated in the *ncs1Δ* strain compared to WT after 4 h of growth in YPD (Fig. 7D), reinforcing that cell cycle progression is altered in the *ncs1Δ* mutant strain.

## Discussion

Our results indicate that *NCS1* expression in *C. neoformans* is regulated by Ca<sup>2+</sup> and the calcineurin/Crz1 pathway and corroborate findings on the Ncs1 ortholog in fission yeast (HAMASAKI-KATAGIRI; AMES, 2010). In contrast to our conclusions and those made in studies using *S. pombe*, the *S. cerevisiae* Ncs1 ortholog, Frq1, was found to be essential for viability and the level of *FRQ1* expression was not influenced by the calcineurin/Crz1 pathway as revealed by microarray analysis (YOSHIMOTO *et al.*, 2002). This suggests that distinct calcium sensing mechanisms exist in fungal species despite wide-spread functional conservation of Ncs1 and other regulators of Ca<sup>2+</sup> homeostasis.

An interesting feature of the *ncs1Δ* mutant is its attenuated virulence in a murine model of cryptococcosis. In contrast, attenuated virulence was not observed for the null Ncs1 ortholog mutant (*NCSA*) in *A. fumigatus* (MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008) reaffirming that processes regulated by Ncs1 orthologs in pathogenic fungi differ, or that other genes can compensate in the absence of *NCSA*.

Moreover, cryptococcal *ncs1Δ* took longer to achieve the growth densities associated with debilitating infection in the tissues of WT-infected mice. This slower growth phenotype *in vivo* correlated with the reduced rate of proliferation of *ncs1Δ* in mouse serum and impaired bud emergence and release. These results confirm that Ncs1 is important for fungal adaptation to the host environment and for the establishment of disease and reaffirm the importance of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and Ca<sup>2+</sup> signaling in cryptococcal virulence. Our findings also extend the set of calcium-related genes involved in virulence to include Ncs1.

Given that expression of ~40 virulence-associated genes is linked to the cell cycle in *C. neoformans*, the control of this process is fundamental to disease progression (KELLIHER; HAASE, 2017). In *S. cerevisiae*, Ca<sup>2+</sup> homeostasis is linked to cell cycle regulation as a decrease in intracellular Ca<sup>2+</sup> leads to transient arrest in the G<sub>1</sub> phase, followed by interruption in the G<sub>2</sub>/M phase (IIDA *et al.*, 1990; KAHL; MEANS, 2003; MIYAKAWA; MIZUNUMA, 2007; ZHANG; RAO, 2008). Moreover, bud emergence and the cell cycle depend on calcineurin activity, which regulates the availability of proteins involved in cell cycle regulation. These proteins include Swe1, a negative regulator of Cdc28/Clb complex; Cln2, a protein kinase required for cell cycle progression, and a G<sub>2</sub> cyclin (MIYAKAWA; MIZUNUMA, 2007). In this context, we speculate a potential role for calcineurin signaling in cell cycle regulation in *C. neoformans*. Our new data demonstrate that Ncs1 interferes with the transcription profile of genes associated with cell cycle progression (*CLN1*, *GPA2* and *MCM2*). Notably, overexpression of the *S. cerevisiae* G<sub>1</sub>/S cyclin, Cln1, led to a filamentation phenotype (KRON; GOW, 1995). In our study, we showed that the cryptococcal *ncs1Δ* mutant was impaired in bud emergence and release as seen in time-lapse microscopy. Furthermore, the *C.*



*neoformans* *cln1Δ* mutant exhibited aberrant bud emergence and cell division and a consistent delay in budding (VIRTUDAZO *et al.*, 2010), which are phenotypes also observed in cryptococcal *ncs1Δ* mutant cells. Additional experiments to confirm the impact of Ca<sup>2+</sup> homeostasis on cryptococcal cell cycle regulation are necessary to support this hypothesis.

We hypothesize that Ca<sup>2+</sup> excess, or even other types of stress, leads to activation of the calcineurin pathway, which ultimately drives the expression of Ncs1 in a Crz1-dependent fashion. Therefore, Ca<sup>2+</sup>-activated Ncs1 would participate in a diverse array of cellular processes to cope with Ca<sup>2+</sup> excess, including the regulation of cell division via its potential association with Pik1, a protein implicated in cell septation in fission yeast (PARK *et al.*, 2009b). Two lines of evidences support this hypothesis: (i) yeast Pik1 forms puncta consistent with its localization in the Golgi apparatus (STRAHL *et al.*, 2005) and we observed that cryptococcal Ncs1 also forms puncta, particularly when Ca<sup>2+</sup> is present; and (ii) yeast Frq1 physically interacts with Pik1 (STRAHL *et al.*, 2005). Structural studies performed on Ncs1 reveal that the myristoyl group flips out following Ca<sup>2+</sup> binding, allowing Ncs1 to anchor reversibly to membranes (AMES *et al.*, 2000; D. BURGOYNE, 2004; TAMULI; KUMAR; DEKA, 2011). Thus, it is possible that Ca<sup>2+</sup> binding to Ncs1 exposes the hydrophobic N-myristoylation domain, promoting Ncs1 association with Pik1 in Golgi membranes and, hence, proper cell septation and division. Further experiments are required to confirm that the puncta assumed by Ncs1 upon addition of calcium colocalizes with Golgi.

In summary, we have characterized the Ncs1 homologue in *C. neoformans*, demonstrating its importance in Ca<sup>2+</sup> homeostasis and virulence. We showed that, in contrast to *S. cerevisiae*, *NCS1* is a calcineurin-responsive gene in *C. neoformans*,

with calcineurin and Ncs1 working together to regulate calcium homeostasis and, hence, promote fungal growth and virulence. To our knowledge, this is the first report of a role for Ncs1 in fungal virulence using a mammalian infection model, and of a potential correlation between Ca<sup>2+</sup> signaling and cell cycle progression in *C. neoformans*.

## **Material and methods**

**Fungal strains and media.** The *C. neoformans* serotype A strain Kn99 was chosen to conduct the study as wild type (WT). The *NCS1* gene (CNAG\_03370) deletion mutant (*ncs1Δ*), *cna1Δ* mutant and *cam1Δ* mutant were obtained from Dr. H. Madhani's library (LIU *et al.*, 2012). The *ncs1Δ* reconstituted strain (*ncs1Δ::NCS1*), the *mid1Δncs1Δ* double mutant and the *NCS1::GFP* strains were all constructed using overlapping PCR as previously described (LEV *et al.*, 2013), and site directed homologous recombination was performed. Transformation was carried out using biolistic transformation, as previously described (TOFFALETTI *et al.*, 1993). The primer list is presented at Table S1, and the confirmations of the cassette's insertions are demonstrated in Fig. S1. Fungal cells were maintained on solid YPD medium (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose and 1.5 % agar). YPD plates containing hygromycin (200 μg/mL) or G418 (100 μg/mL) were used to select *C. neoformans* transformants.

***In silico* analysis.** To evaluate Ncs1 protein conserved domains we used the protein sequences and annotations retrieved from FungiDB database (<http://fungidb.org>) (BASENKO *et al.*, 2018), applying FungiDB tools and InterproScan database (MITCHELL *et al.*, 2015). The same was performed for NMT-themyr predictor database to identify the N-terminal myristoylation

consensus sequence. Conservation was assessed using BLASTp against target proteins. Finally, the presence of the Crz1-binding motif on the promoter region of the *NCS1* gene was made by manually search. We recovered the putative regulatory regions of cryptococcal genes from FungiDB (<http://fungidb.org>), selecting 1,000 bp upstream of the transcription start site of *NCS1* gene. The sequences utilized for Crz1-binding motif search are already described (CHOW *et al.*, 2017).

**Virulence assays** were performed as previously described (Lev *et al.*, 2015). Briefly, female C57BL/6 mice (10 per infection group) were anesthetized by inhalation of 3% isoflurane in oxygen and infected with  $5 \times 10^5$  fungal cells (WT, *ncs1Δ* or *ncs1Δ::NCS1* strains) via the nasal passages. Mice were monitored daily and euthanized by CO<sub>2</sub> asphyxiation when they had lost 20% of their pre-infection weight, or prior in case of debilitating symptoms of infection. Median survival differences were estimated using a Kaplan-Meier Log-rank Mantel-Cox test. Post euthanasia, lungs and brain were removed, weighed, and homogenized in 2 ml sterile PBS using a BeadBug (Benchmark Scientific). Organ homogenates were serially diluted and plated onto Sabouraud dextrose agar plates. Plates were incubated at 30 °C for 2 days. Colony counts were performed and adjusted to reflect the total number of colony-forming units (CFU) per gram of tissue or ml of blood. For fungal burden analysis, Two-way ANOVA with Tukey post-hoc was utilized to determine the statistical significance.

***C. neoformans* replication in mice serum.** A total of ten BALB/c mice (10-week-old) were obtained from Biotechnology Center, UFRGS, Brazil. Mice were anaesthetized using isoflurane (in a chamber), and blood was collected from

mice's retro-orbital space, using a glass capillary. Next, mice were euthanized using an overdose of thiopental (140 mg/kg). Serum was obtained from total blood after centrifugation (3000 x *g*, 15 min at room temperature). A total of 1,000 cells in 100  $\mu$ L suspension of the WT, *ncs1 $\Delta$*  and *ncs1 $\Delta$ ::NCS1* strains were inoculated at heat-inactivated mice serum in a 96-well plate and incubated at 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> for 24 h. Thereon, yeast cells were collected and plated on YPD plates for CFU determination. Separate wells were conducted to cell morphology analysis, where yeast cells were firstly fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes at 37  $^{\circ}$ C, and then analyzed using light microscopy.

**Yeast growth in DMEM.** A total of  $1 \times 10^6$  cells in 1000  $\mu$ L suspension of the WT, *ncs1 $\Delta$*  and *ncs1 $\Delta$ ::NCS1* strains were inoculated at DMEM media in a 24-well plate and incubated at 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> for 24 and 48 h. Next, yeast cells were gathered and plated on YPD plates for CFU determination. Separate wells were conducted to cell morphology analysis, where fungal cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes at 37  $^{\circ}$ C, and then analyzed using India ink counterstaining in a light microscopy.

**Intracellular calcium measurements.** Free intracellular Ca<sup>2+</sup> in *C. neoformans* was quantified by flow cytometry (Millipore Guava-soft) following cellular staining with the Calcium Sensor Dye Fluo-4- AM (Termofisher Scientific) at a final concentration of 2  $\mu$ M. Briefly, yeast cells were cultured overnight on YPD at 30  $^{\circ}$ C with shaking. Next, cells were centrifuged (6000 rpm for 3 minutes) and washed twice with phosphate buffer. After adjusting the cell density (OD<sub>600nm</sub>= 1.0), the Fluo-4-AM dye was added to each tube and incubated at 37  $^{\circ}$ C for 1 h. The flow was adjusted to pass < 500 cells/ $\mu$ L, and a total of 5,000 events were

evaluated.

**Phenotypic characterization assays.** For phenotypic characterization, WT, *ncs1Δ* mutant, and *ncs1Δ::NCS1* complemented strains were grown overnight on YPD at 30 °C with shaking. Further, cells were centrifuged and washed twice with deionized water, and adjusted to 10<sup>8</sup> cells/mL. The cell suspensions were then subjected to serial dilution (10-fold), and 3 μL of each dilution was spotted onto YPD agar supplemented with different stressors, including CaCl<sub>2</sub> (200 mM and 300mM). Cell wall perturbation was assessed using Congo red (0.1 %) and Calcofluor white (0.5 mg/ mL), as previously described (LEV *et al.*, 2012). The sensitivity to osmotic stress was evaluated utilizing NaCl 1M. Moreover, menadione (30 μM) was used as an oxidative stressor, and low phosphate environment was used as a starvation condition (LEV *et al.*, 2019). All the plates were incubated for 48 hours at 30 °C and photographed, with the exception of plates incubated at high temperatures (37 °C or 39 °C).

**Fluorescence and light microscopy.** Fluorescence microscopy assays were accomplished using a DeltaVision fluorescence microscope. WT and *NCS1::GFP* cells were incubated at minimal media (2 g/L L-asparagine, 1 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 6 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/L thiamine) without or supplemented with 100 mM CaCl<sub>2</sub> for 16 h at 30 °C with shaking. Thereafter, cells were washed once with PBS and analyzed. For light microscopy, WT, *ncs1Δ* mutant, and *ncs1Δ::NCS1* cells were grown in DMEM or minimal media, at 37 °C, and 5% CO<sub>2</sub> for 72 h. Next, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 37 °C, washed with PBS and then analyzed under light microscopy, using counterstaining with India ink. To define the relative capsule sizes, measures of the distance between the cell wall

and the capsule outer border were determined and divided by each cell diameter, through IMAGEJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). At least 50 cells of each strain were measured.

**Time-lapse microscopy.** Cellular division was followed using confocal microscopy. The experimental design was performed as already described (GARCÍA-RODAS *et al.*, 2014), with few modifications. Briefly, WT or *ncs1Δ* mutant cells were cultured overnight on liquid YPD medium at 30 °C with shaking. Further, cells were washed twice with PBS and adjusted to 10<sup>6</sup> cells/mL with YPD medium at pH=7.45. One hundred μL of cell suspension was inoculated on a cell culture dish, 35/10 mm glass bottom (Greiner Bio-one). The culture dish was previously treated with 100 μL of poli-L-lysine (0.1mg/mL) for 1 h, washed 3 times with PBS, and then incubated with 10 μg/mL MAb 18B7 for 1 h. Thereon, the culture dishes were incubated in a temperature-controlled microscope chamber adjusted to 37 °C, and 5 % CO<sub>2</sub>. Image acquisition was done in a 30-seconds interval, using differential interference contrast (DIC) objective in a confocal microscope FV1000, at Microscopy and Microanalysis Center (CMM) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). The statistical analysis was done by timing how long each mother cell took to originate a bud. Measurements were performed at the beginning of the second budding in order to avoid errors associated with the lack of tools to synchronize cells.

**Quantitative RT-qPCR analysis.** For gene expression analysis, strains were subjected to different conditions, as described on figures legends. RT-qPCR technique was performed for all experiments as follows. Cryptococcal cells were washed once with PBS, and then frozen in liquid nitrogen and lyophilized. Cell

lysis was performed by vortexing the tubes with the dry pelleted cells using acid-washed glass beads (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Three independent sets of RNA samples for each strain were prepared using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Next, RNA samples were treated with DNase (Promega, Madison, WA, USA), and a total of 300 ng treated-RNA was used for reverse transcription reaction with ImProm-II Reverse transcriptase (Promega, Madison, WA, USA). The RT-qPCR was assessed on a Real-time PCR StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR thermal cycling conditions had an initial step at 94 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s. Platinum SYBR green qPCR Supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as reaction mix, with 1 µL of the cDNA (16 ng) template, in a final volume of 20 µL. Each cDNA sample was done in technical triplicates. Melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm a single PCR product. Thereon, the data were normalized to the actin cDNA levels. Relative expression was determined by the  $2^{-\Delta CT}$  method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

### **Ethics statement**

The animals were obtained at the Animal Resource Centre, Floreat Park, Western Australia, Australia. The *in vivo* procedures were performed under the protocol number 4254, approved by Western Sydney Local Health District Animal Ethics Committee, accomplished according to the current guidelines of The National Health and Medical Research Council of Australia. The Animal Use Ethics Committee (CEUA/UFRGS) approved the animal experimentation under reference 22488.

## **Acknowledgements**

We are grateful to Leonardo Nimrichter, Kildare Miranda and Augusto Schrank for helpful discussions. We also thank Hiten Madhani for providing the *ncs1Δ*, *cna1Δ* and *cam1Δ* mutant strains, obtained from the Madhani knockout library (<http://www.fgsc.net/crypto/crypto.htm>), which was created using NIH funding (R01AI100272). We thank Arturo Casadevall for providing mAb 18B7.

## **Funding Information**

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). CAPES fully supported E.D.S scholarship in Brazil and during her studies at The Westmead Institute, Australia (Advanced Network of Computational Biology – (RABICÓ) – Grant number 23038.010041/2013-13). This work was also supported by a project grant from the National Health and Medical Research Council of Australia (APP1058779), and a career development award from the Westmead Institute for Medical Research to Dr Sophie Lev. The funding agencies had no participation on the decision of the study subject, data collection and analysis or on the submission of this work for publication.

## **Authors Contribution**

Conceived and designed the experiments: E.D.S; C.C.S.; J.T.D.; L.K.

Performed the experiments: E.D.S; J.C.V.R; S.L; H.M; J.S; K.F; D.D.



Analyzed the data: E.D.S; S.L; M.H.V; C.C.S; J.T.D; L.K.

Contributed reagents and materials: M.H.V; C.C.S; J.T.D; L.K.

Wrote the paper: E.D.S; J.T.D; L.K.

## References

1. Ma H, May RC. 2009. Chapter 5 Virulence in *Cryptococcus* Species Advances in Applied Microbiology, 1st ed. Elsevier Inc.
2. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids* 23:525–530.
3. Thinyane KH, Motsemme KM, Cooper VJL. 2015. Clinical Presentation, Aetiology, and Outcomes of Meningitis in a Setting of High HIV and TB Prevalence. *J Trop Med* 2015:1-7.
4. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, Denning DW, Loyse A, Boulware, R D. 2017. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Physiol Behav* 176:139–148.
5. Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA. 2018. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain 113:1–15.
6. Djordjevic JT, Del Poeta M, Sorrell TC, Turner KM, Wright LC. 2005. Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. *Biochem J* 389:803–812.
7. Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, Wilson C, Larsen M, Boadle R, Williamson PR, Djordjevic JT. 2007. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell

- wall integrity. *J Biol Chem* 282:37508–37514.
8. Aaron PA, Gelli A. 2020. Harnessing the Activity of the Fungal Metalloprotease, Mpr1, to Promote Crossing of Nanocarriers through the Blood-Brain Barrier. *ACS Infect Dis* 6:138–149.
  9. Vu K, Tham R, Uhrig JP, Thompson GR, Na Pombejra S, Jamklang M, Bautos JM, Gelli A. 2014. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *mBio* 5:1–13.
  10. Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A. 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7:58–67.
  11. Rodrigues ML, Pontes B, Viana NB, Deleon- CM, Martinez R, Schnaar RL, Nosanchuk JD, Nimrichter L. 2020. Host membrane glycosphingolipids and lipid microdomains facilitate *Histoplasma capsulatum* internalization by macrophages. 21:1–31.
  12. McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A. 2006. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infect Immun* 74:1500–1504.
  13. Tucker SC, Casadevall A. 2002. 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* 99:3165–3170.
  14. Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER. 1999. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun* 67:885–890.

15. Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. 2009. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77:120–127.
16. Cui J, Kaandorp JA, Sloot PMA, Lloyd CM, Filatov M V. 2009. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res* 9:1137–1147.
17. Cui J, Kaandorp JA, Ositelu OO, Beaudry V, Knight A, Nanfack YF, Cunningham KW. 2009. Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast. *Cell Calcium* 45:123–132.
18. Odom A, Del Poeta M, Perfect J, Heitman J. 1997. 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* 41:156–161.
19. Ramos J, Sychrová H, Kschischo M. 2016. Yeast Membrane Transport, p. 11–31. *In* *Medicine and Biology*.
20. D. Burgoyne R. 2004. The neuronal calcium-sensor proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1742:59–68.
21. Parys JB, De Smedt H. 2012. Calcium Signaling: Chapter 11 Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Its Receptors 740:1267.
22. Cruz MC, Fox DS, Heitman J. 2001. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 20:1020–1032.
23. Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. 2011. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol* 23:1–7.
24. Lev S, Desmarini D, Chayakulkeeree M, Sorrell TC, Djordjevic JT. 2012. The

- Crz1/Sp1 Transcription Factor of *Cryptococcus neoformans* Is Activated by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. PLoS One 7:e51403.
25. Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J. 1997. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. EMBO J 16:2576–2589.
  26. Park HS, Chow EWL, Fu C, Soderblom EJ, Moseley MA, Heitman J, Cardenas ME. 2016. Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. PLoS Pathog 12:1–28.
  27. Miyakawa T, Mizunuma M. 2007. Physiological roles of calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with special emphasis on its roles in G2/M cell-cycle regulation. Biosci Biotechnol Biochem 71:633–645.
  28. Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M. 2001. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. Crit Rev Biochem Mol Biol 36:107–260.
  29. Liu M, Du P, Heinrich G, Cox GM, Gelli A. 2006. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. Eukaryot Cell 5:1788–1796.
  30. Fan W, Idnurm A, Breger J, Mylonakis E, Heitman J. 2007. Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 75:3394–3405.
  31. Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, de Oliveira DL, Sobrino L, Rodrigues J, Leal AL, Nimrichter L, Rodrigues ML, Schrank A, Vainstein MH. 2010. The Vacuolar Ca<sup>2+</sup> Exchanger Vcx1 Is Involved in Calcineurin-Dependent Ca<sup>2+</sup> Tolerance and Virulence in *Cryptococcus neoformans*.

- Eukaryot Cell 9:1798–1805.
32. Kmetzsch L, Staats CC, Cupertino JB, Fonseca FL, Rodrigues ML, Schrank A, Vainstein MH. 2013. The calcium transporter Pmc1 provides Ca<sup>2+</sup> tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. FEBS J 280:4853–4864.
  33. Squizani ED, Oliveira NK, Reuwsaat JCV, Marques BM, Lopes W, Gerber AL, de Vasconcelos ATR, Lev S, Djordjevic JT, Schrank A, Vainstein MH, Staats CC, Kmetzsch L. 2018. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. Cell Microbiol 20:e12803.
  34. Hamasaki-Katagiri N, Molchanova T, Takeda K, Ames JB. 2004. Fission Yeast Homolog of Neuronal Calcium Sensor-1 (Ncs1p) Regulates Sporulation and Confers Calcium Tolerance. J Biol Chem 279:12744–12754.
  35. Hamasaki-Katagiri N, Ames JB. 2010. Neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) is up-regulated by calcineurin to promote Ca<sup>2+</sup> tolerance in fission yeast. J Biol Chem 285:4405–4414.
  36. Fan Y, Ortiz-Urquiza A, Kudia RA, Keyhani NO. 2012. A fungal homologue of neuronal calcium sensor-1, Bbcsa1, regulates extracellular acidification and contributes to virulence in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Microbiol (United Kingdom) 158:1843–1851.
  37. Gohain D, Deka R, Tamuli R. 2016. Identification of critical amino acid residues and functional conservation of the *Neurospora crassa* and *Rattus norvegicus* orthologues of neuronal calcium sensor-1. Genetica 144:665–674.
  38. Saitoh KI, Arie T, Teraoka T, Yamaguchi I, Kamakura T. 2003. Targeted gene

- disruption of the neuronal calcium sensor 1 homologue in rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:651–653.
39. Tamuli R, Kumar R, Deka R. 2011. Cellular roles of neuronal calcium sensor-1 and calcium/calmodulin-dependent kinases in fungi. *J Basic Microbiol* 51:120–128.
  40. Ames JB, Hendricks KB, Strahl T, Huttner IG, Hamasaki N, Thorner J. 2000. Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 39:12149–12161.
  41. Mota Júnior AO, Malavazi I, Soriani FM, Heinekamp T, Jacobsen I, Brakhage AA, Savoldi M, Goldman MHS, Da Silva Ferreira ME, Goldman GH. 2008. Molecular characterization of the *Aspergillus fumigatus* NCS-1 homologue, NcsA. *Mol Genet Genomics* 280:483–495.
  42. Kraus PR, Nichols CB, Heitman J. 2005. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryot Cell* 4:1079–1087.
  43. Lemire S, Jeromin A, Boisselier É. 2016. Membrane binding of Neuronal Calcium Sensor-1 (NCS1). *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 139:138–147.
  44. Burgoyne RD. 2007. Neuronal Calcium Sensor Proteins: Generating Diversity in Neuronal Ca<sup>2+</sup> Signalling. *Nat Rev Neurosci* 8:1–25.
  45. Udenwobele DI, Su R, Good S V, Ball TB. 2017. Myristoylation: An Important Protein Modification in the Immune Response. *Front Immunol* 8:1–16.
  46. Kraus PR, Heitman J. 2003. Coping with stress: Calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1151–1157.
  47. Liu OW, Chun CD, Chow ED, Chen C, Madhani HD, Noble SM. 2008.

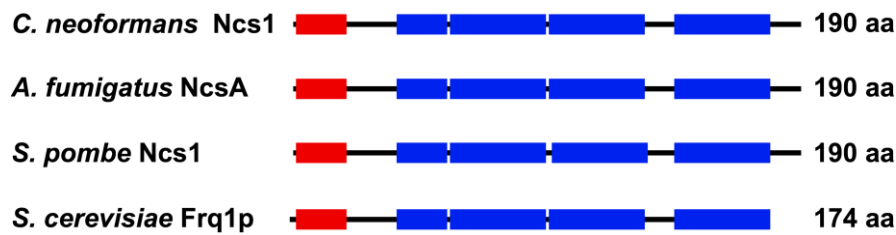
- Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell* 23:1–7.
48. Vu K, Bautos JM, Gelli A. 2015. The Cch1-Mid1 High-Affinity Calcium Channel Contributes to the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Mitigating Oxidative Stress 14:1135–1143.
  49. Hong MP, Vu K, Bautos JM, Tham R, Jamklang M, Uhrig JP, Gelli A. 2013. Activity of the calcium channel pore Cch1 is dependent on a modulatory region of the subunit Mid1 in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 12:142–150.
  50. Chow EWL, Clancey SA, Billmyre RB, Averette AF, Granek JA, Mieczkowski P, Cardenas ME, Heitman J. 2017. Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLOS Genet* 13:e1006667.
  51. Liu S, Hou Y, Liu W, Lu C, Wang W, Sun S. 2015. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryot Cell* 14:324–334.
  52. García-Rodas R, Cordero RJB, Trevijano-Contador N, Janbon G, Moyrand F, Casadevall A, Zaragoza O. 2014. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. *mBio* 5:1–13.
  53. Kelliher CM, Haase SB. 2017. Connecting virulence pathways to cell-cycle progression in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Curr Genet* 63:803–811.
  54. Kelliher CM, Leman AR, Sierra CS, Haase SB. 2016. Investigating Conservation of the Cell-Cycle-Regulated Transcriptional Program in the Fungal Pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Genet* 12:1–23.

55. Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS. 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:31079–31088.
56. Kahl CR, Means AR. 2003. Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways. *Endocr Rev* 24:719–736.
57. Zhang YQ, Rao R. 2008. A spoke in the wheel: Calcium spikes disrupt yeast cell cycle. *Cell Cycle* 7:870–873.
58. Iida H, Sakaguchi S, Yagawa Y, Anraku Y. 1990. Cell cycle control by Ca<sup>2+</sup> in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265:21216–21222.
59. Kron SJ, Gow NA. 1995. Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 7:845–855.
60. Virtudazo E V., Kawamoto S, Ohkusu M, Aoki S, Sipiczki M, Takeo K. 2010. The single Cdk1-G1 cyclin of *Cryptococcus neoformans* is not essential for cell cycle progression, but plays important roles in the proper commitment to DNA synthesis and bud emergence in this yeast. *FEMS Yeast Res* 10:605–618.
61. Park J, Steinbach SK, Desautels M, Hemmingsen SM. 2009. Essential Role for *Schizosaccharomyces pombe* pik1 in Septation. *PLoS ONE* 4:e6179.
62. Strahl T, Hama H, Dewald DB, Thorner J. 2005. Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus. *J Cell Biol* 171:967–979.
63. Lev S, Desmarini D, Li C, Chayakulkeeree M, Traven A, Sorrell TC, Djordjevic JT. 2013. Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a

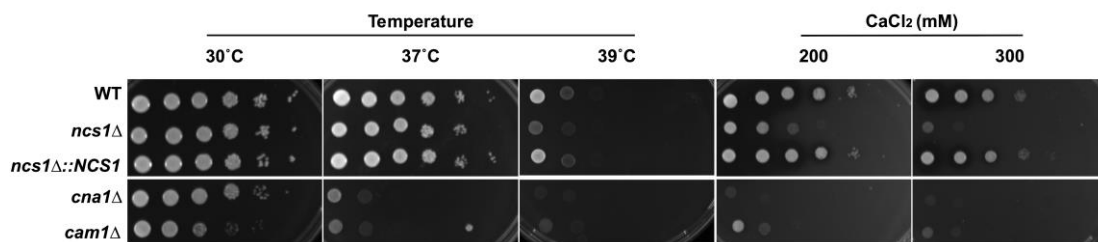


- substrate for Arg1 kinase. *Infect Immun* 81:1245–1255.
64. Toffaletti DL, Rude TH, Johnston SA, Durack DT, Perfect JR. 1993. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol* 175:1405–1411.
  65. Basenko EY, Pulman JA, Shanmugasundram A, Harb OS, Crouch K, Starns D, Warrenfeltz S, Aurrecochea C, Stoeckert CJ, Kissinger JC, Roos DS, Hertz-Fowler C. 2018. FungiDB: An integrated bioinformatic resource for fungi and oomycetes. *J Fungi* 4:39.
  66. Mitchell A, Chang H, Daugherty L, Fraser M, Hunter S, Lopez R, Mcanulla C, Mcmenamin C, Nuka G, Pesseat S, Sangrador-vegas A, Scheremetjew M, Rato C, Yong S, Bateman A, Punta M, Attwood TK, Sigrist CJA, Redaschi N, Rivoire C, Xenarios I, Kahn D, Guyot D, Bork P, Letunic I, Gough J, Oates M, Haft D, Huang H, Natale DA, Wu CH, Orengo C, Sillitoe I, Mi H, Thomas PD, Finn RD. 2015. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res* 43:213–221.
  67. Lev S, Li C, Desmarini D, Saiardi A, Fewings NL, Schibeci SD, Sharma R, Sorrell TC, Djordjevic JT. 2015. Fungal inositol pyrophosphate IP7 is crucial for metabolic adaptation to the host environment and pathogenicity. *mBio* 6:1–15.
  68. Lev S, Rupasinghe T, Desmarini D, Kaufman K, Sorrell TC, Roessner U, Teresa J, Id D. 2019. The PHO signaling pathway directs lipid remodeling in *Cryptococcus neoformans* via DGTS synthase to recycle phosphate during phosphate deficiency. *PLoS ONE* 14:e0212651.
  69. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25:402–408.

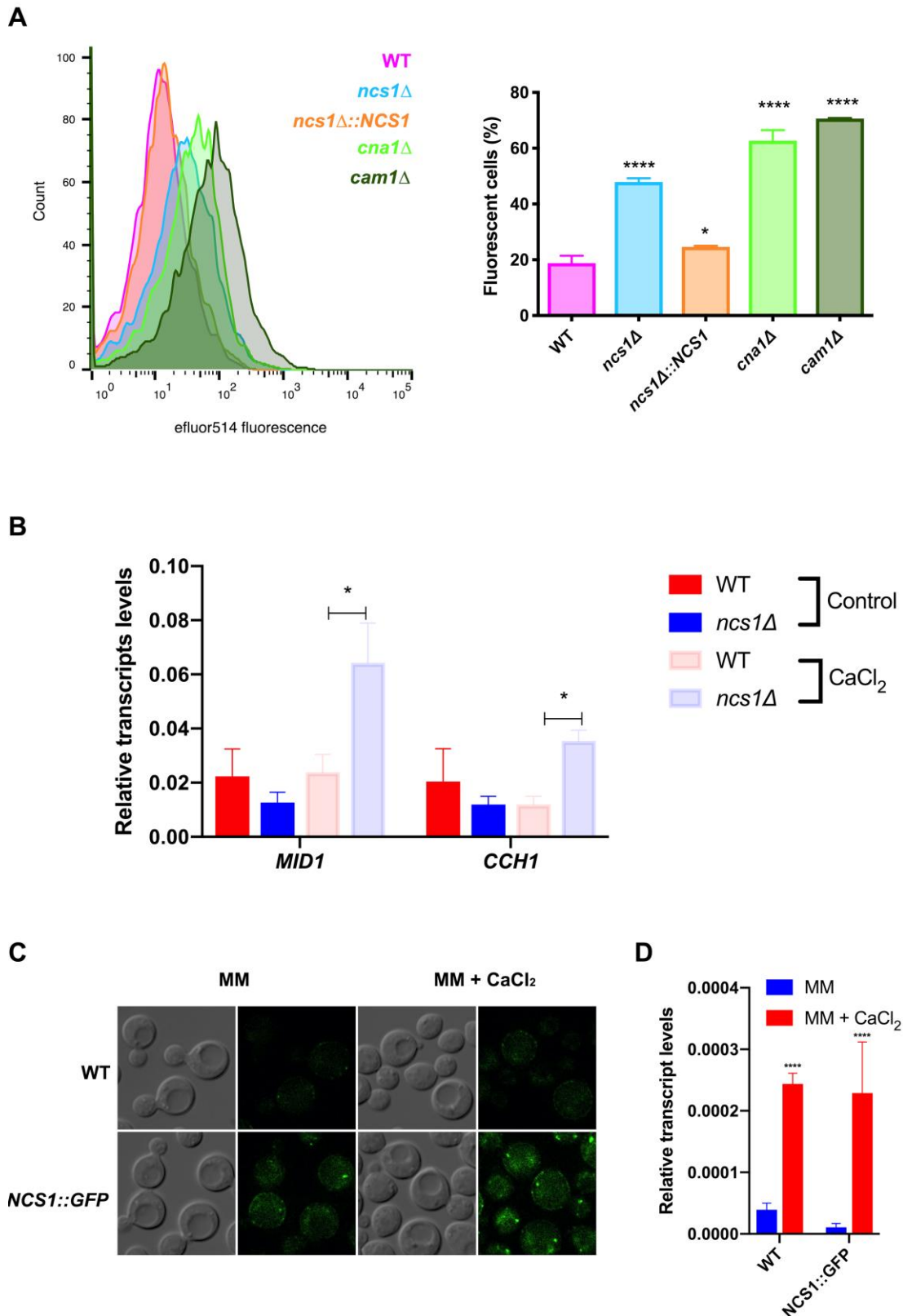
## Figures and Supplementary Figures



**Figure 1. Identification of Ncs1 as a putative calcium binding protein in *C. neoformans*.** Comparative *in silico* analysis of *C. neoformans* Ncs1 (CNAG\_03370), *Aspergillus fumigatus* NcsA (Afu6g14240), *Schizosacharomyces pombe* Ncs1 (SPAC18B11.04) and *S. cerevisiae* Frq1 (YDR373W) amino acid sequences indicates the presence and position of the four EF-hand domains (blue bars) and the N-terminal myristoylation domain (red bars).

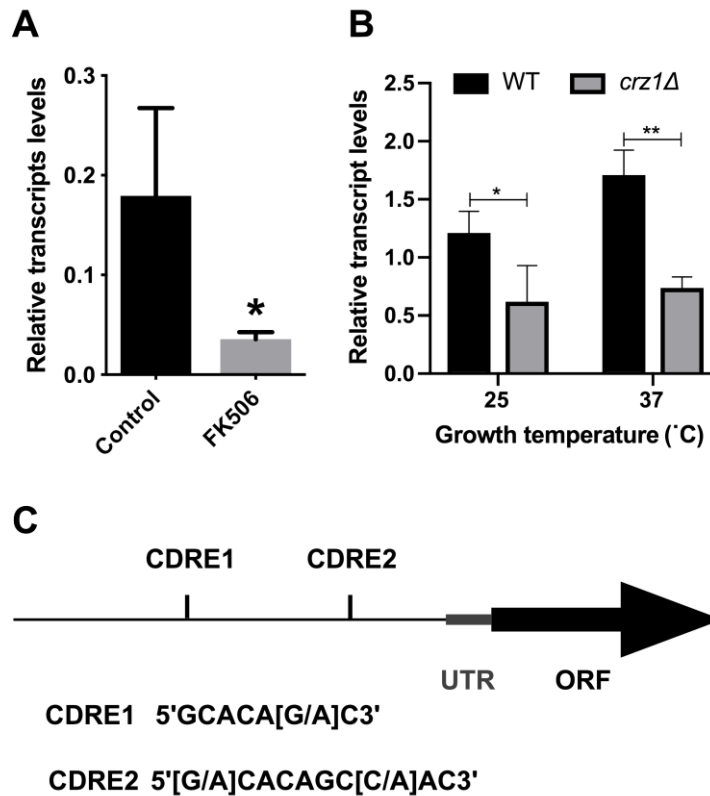


**Figure 2. Disruption of NCS1 leads to stress sensitivity in *C. neoformans*.** Spot plate assays of the WT, *ncs1*Δ mutant and *ncs1*Δ::NCS1 complemented cells were performed on YPD agar. The plates were incubated at 30 °C (control for normal growth), 37 °C or 39 °C, and under stress induced by Ca<sup>2+</sup> (200 mM or 300mM CaCl<sub>2</sub>, at 30 °C). The calcineurin (*cna1*Δ) and calmodulin (*cam1*Δ) mutants were included as controls, separated by a thin white line that indicates noncontiguous portions of the same image. All assays were conducted for 48 h.



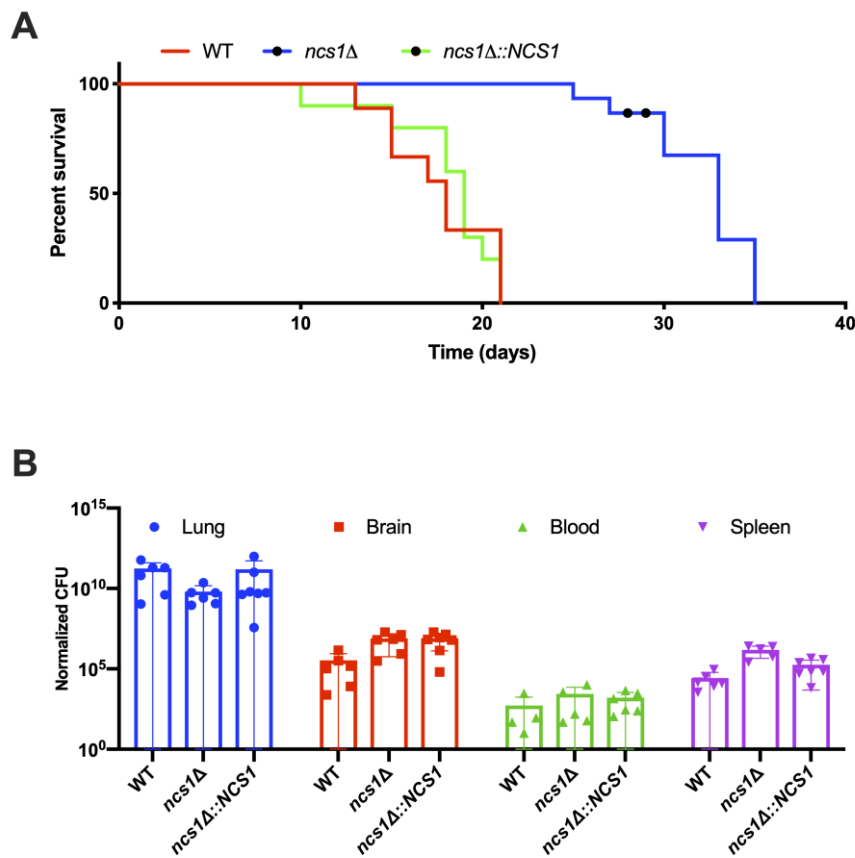
**Figure 3. Cryptococcal Ncs1 is associated with  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.** (A) The basal levels of free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in WT, *ncs1Δ*, *ncs1Δ::NCS1*, *cna1Δ*, and *cam1Δ* mutant cells were quantified by flow cytometry following staining with the

calcium specific dye, Fluo-4-AM. Left panel represents the histogram of Fluo-4-AM emitted fluorescence of indicated strains cultivated in YPD medium at 30 °C. Right panel represents the percentage of gated fluorescent cells  $\pm$  standard deviation (three biological replicates). Mean values were compared using one-way-ANOVA and Dunnet's as a *post hoc* test. Statistical significance is represented as \*\*\*\*  $p < 0.0001$  and \*  $p < 0.05$ . (B) The transcript levels of genes encoding the calcium transporters, *CCH1* and *MID1*, were evaluated using RT-qPCR. The WT and *nsc1Δ* strains ( $10^6$  cells/mL) were incubated in YPD for 16 h with shaking, either at 37 °C (control), or 37 °C supplemented with  $\text{Ca}^{2+}$  (100 mM  $\text{CaCl}_2$ ). RNA was extracted and cDNA synthesized. Each bar represents the mean  $\pm$  the standard deviation (n=3) for each gene in each strain normalized to actin. Statistical analysis was performed using a *Student's t test* (\*  $p < 0.05$ ). (C) *Ncs1* was tagged with GFP (*NCS1::GFP*) and the effect of  $\text{CaCl}_2$  supplementation on *Ncs1* production and subcellular localization was assessed by fluorescence microscopy. YPD overnight cultures of WT (autofluorescence background control) and the *NCS1::GFP* strain were washed twice with water and used to seed on minimal media (MM) or MM supplemented with  $\text{Ca}^{2+}$  (100mM  $\text{CaCl}_2$ ) at  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ . The cultures were further incubated for 4 hours at 30 °C prior to visualization. DIC and green fluorescent images were included. (D) The cultures prepared in (C) were also used to extract RNA and perform RT-qPCR to assess the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the transcript levels of *NCS1*, normalized to actin. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test. Comparisons were conducted between WT cells grown in the absence or in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  or between *NCS1::GFP* cells grown in the absence or in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Statistical significance is indicated as  $p^{****} < 0.0001$ .



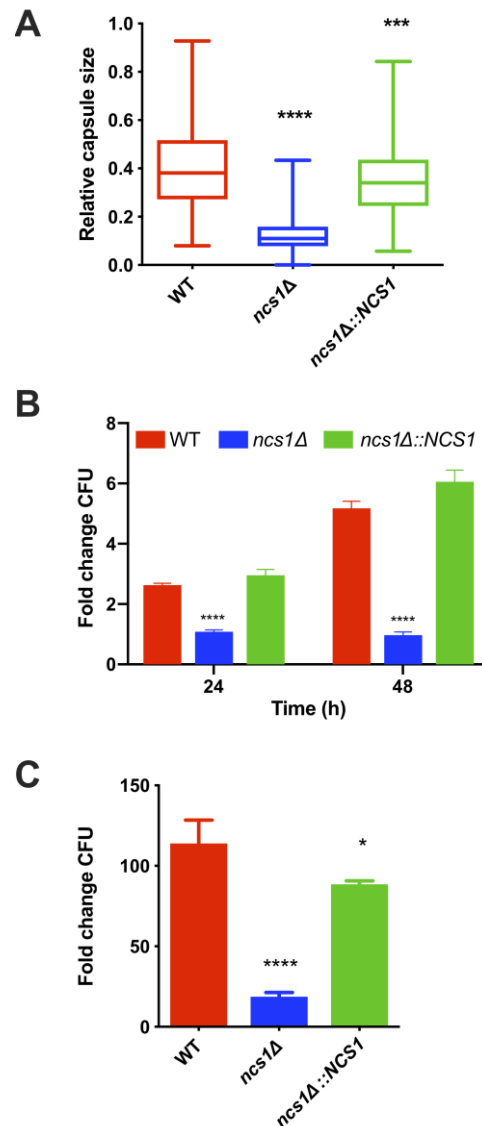
**Figure 4. *NCS1* gene expression is regulated by *Crz1*.** (A) The transcript levels of *NCS1* were determined in conditions of calcineurin inhibition. Yeast cells were incubated in YPD media at 37 °C in the absence or presence of FK506 (1 μg/mL) for 1 h. *NCS1* expression was normalized to *ACT1* transcript levels. Bars represent the mean ± standard deviation (three biological replicates). Statistics were conducted using *Student's t-test*. (\* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). (B) *NCS1* gene expression in WT and *crz1Δ* null mutant cells were assessed by RT-qPCR. Yeast cells were incubated in YPD at 25 °C or 37 °C, for 16 h. *NCS1* expression was normalized to *ACT1* transcript levels. Each bar represents the mean ± the standard deviation (three biological triplicates). Statistical analysis was performed using *Student's t-test* (\* $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ ). (C) The *NCS1* regulatory sequence contains two *Crz1* binding motifs (CDRE1 and CDRE2). CDRE,

calcineurin dependent response element, UTR, untranslated region, ORF, open reading frame.



**Figure 5. *Ncs1* is required for full virulence in a mouse inhalation model of cryptococcosis.** C57BL/6J mice (10 mice per group) were infected with 500,000 cells of WT, *ncs1Δ* or *ncs1Δ::NCS1* strains. Mice were monitored daily and euthanized by CO<sub>2</sub> asphyxiation when they had lost 20% of their pre-infection weight. In (A), median mouse survival differences were estimated using a Kaplan-Meier Log-rank Mantel-Cox test. The increase in median survival of *ncs1Δ*-infected mice relative to the other two infection groups was statistically significant ( $p < 0.0001$ ). In (B) lungs, brain and spleen were removed post euthanasia, weighed, homogenized, serially diluted and plated onto Sabouraud dextrose agar plates to determine fungal burden by quantitative culture (CFUs) following 3 days growth

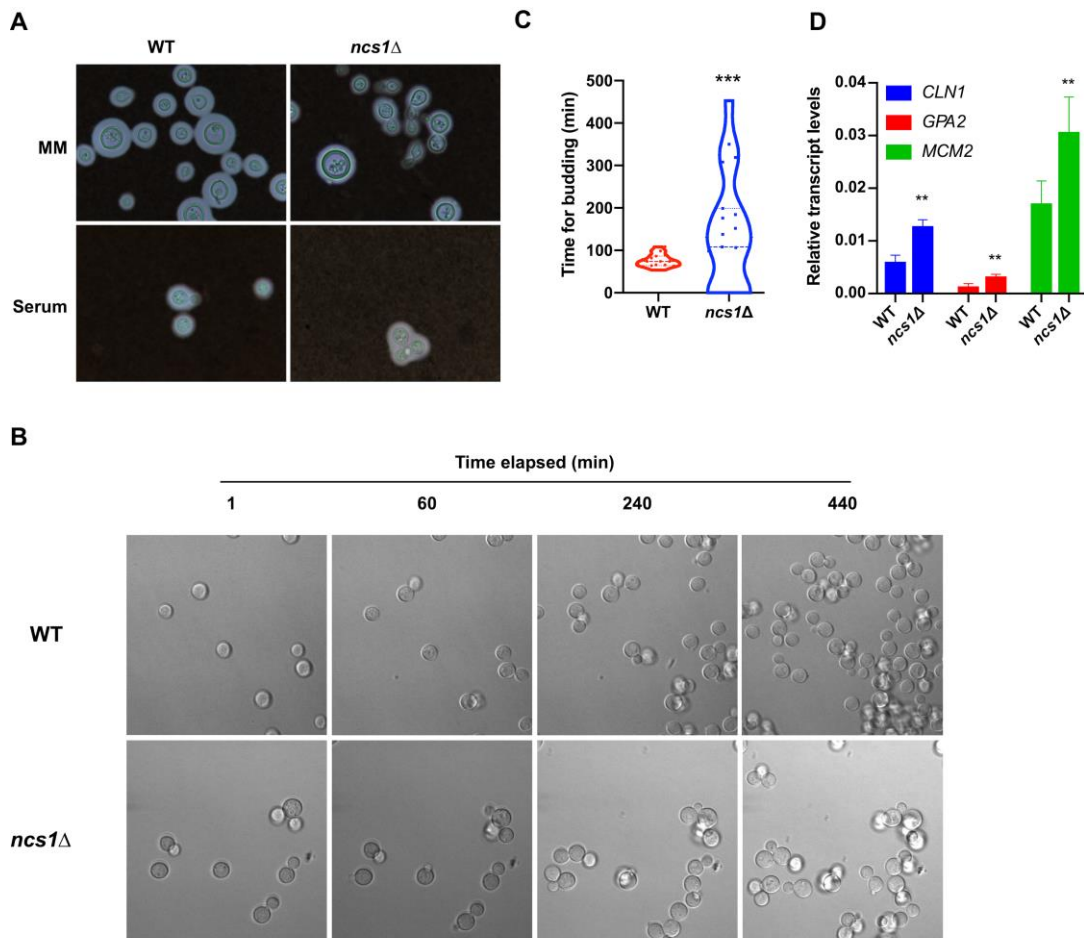
at 30 °C. CFUs were adjusted to reflect CFU/gram of tissue and CFU/mL blood (normalized CFU). Statistical significance was determined using one-way ANOVA. However, no differences in organ burden were found.



**Figure 6. Ncs1 is necessary for growth under host mimicking conditions.** (A) Capsule size of WT, *nsc1*Δ and *nsc1*Δ::*NCS1* cells was determined following incubation in capsule inducing media (DMEM) for 72 h (37 °C 5% CO<sub>2</sub>). Capsules were visualized by India ink staining and light microscopy, and measurements were performed using Image J software for at least 50 cells of each strain. Relative capsule size was defined as the distance between the cell wall and the capsule

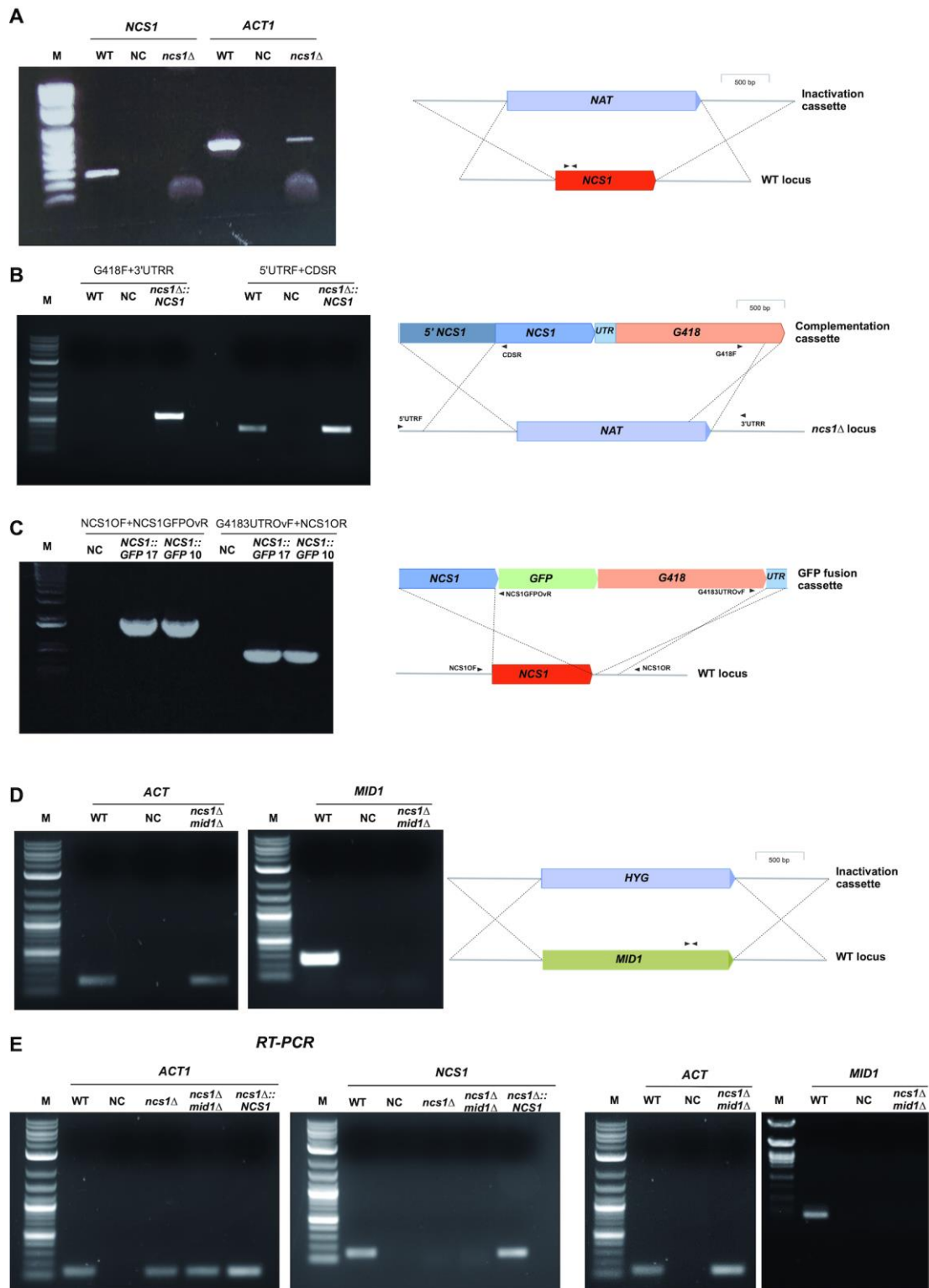
outer border by cell diameter. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, with Tukey *post-hoc* test. Statistical significance is represented as \*\*\*\*  $p < 0.0001$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , as compared to the WT. (B) Growth of the WT, *ncs1Δ* and *ncs1Δ::NCS1* cells in DMEM (37 °C 5% CO<sub>2</sub>) for 24 or 48 h was assessed by quantitative culture (CFU). The results represent the mean ± standard deviation (three biological replicates) of each strain normalized to the CFU of the inoculum, described as fold change. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Dunnet's *post-hoc* test. Significant differences compared to WT are marked (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). (C) Growth of the WT, *ncs1Δ* and *ncs1Δ::NCS1* cells for 24 h at 37 °C 5% CO<sub>2</sub> in heat-inactivated mouse serum was indicated by quantitative culture (CFU). The results are expressed as a fold change relative to the initial inoculum (10<sup>4</sup> cells/mL), and represent the mean ± standard deviation (three biological replicates). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Dunnet's *post-hoc* test (\*  $p < 0.05$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$  relative to WT).





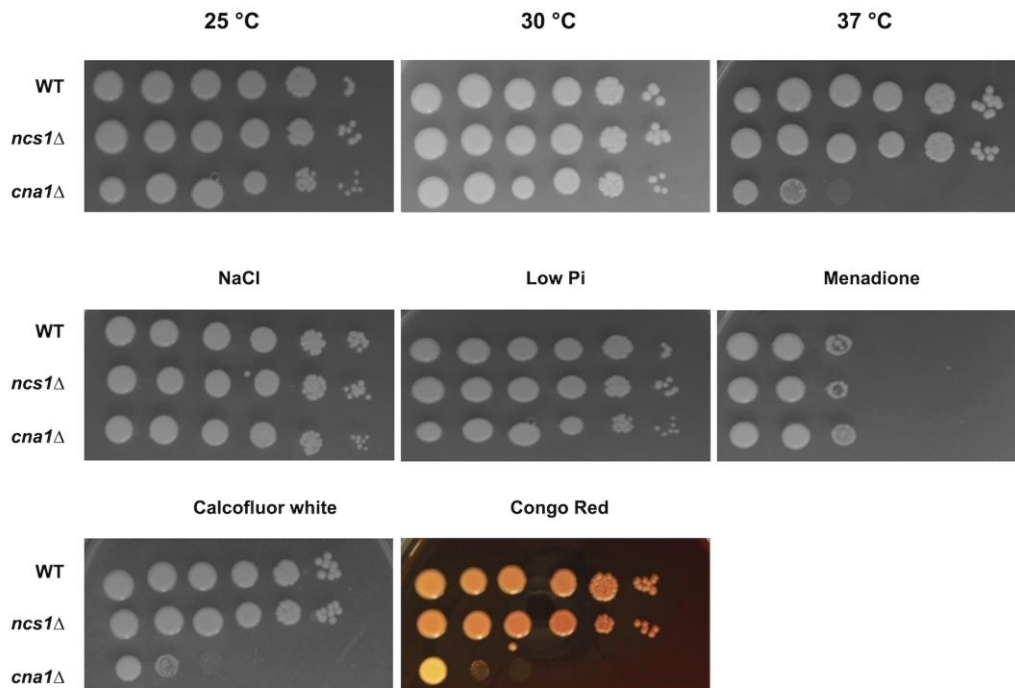
**Figure 7. The *ncs1Δ* null mutant strain displays aberrant cell division and morphology (A), delayed bud emergence (B, C) and altered cell cycle regulation (D).** (A) WT and *ncs1Δ* cells were grown in minimal media (MM) for 72 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> (upper panel) or in heat-inactivated mouse serum for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> (lower panel), stained with India ink and visualized by light microscopy. (B and C) Fungal cells were incubated in YPD medium for 16 h inside a chamber coupled to a confocal microscope (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), and bud emergence time was recorded using time-lapse microscopy. Time measurements were initiated after the first round of bud emergence to avoid errors associated with the lack of synchronization. Images were acquired every 30 seconds. The graph in (C) represents the mean time for buds to emerge (minutes) ± standard deviation of at least 15 cells per strain. Statistical analysis was performed using

the nonparametric Mann-Whitney *test* (\*\* $p < 0.0001$ ). (D) Transcript levels of genes encoding cell cycle regulators were assessed in WT and *ncs1Δ* cells by RT-qPCR. Cells were grown in YPD at 37 °C for 4 hours. Results represent the mean transcript level  $\pm$  standard deviation (three biological triplicates) with each gene normalized *ACT1* transcript levels. Statistical analysis was performed using *Student's t-test* (\*\*  $p < 0.01$ ).



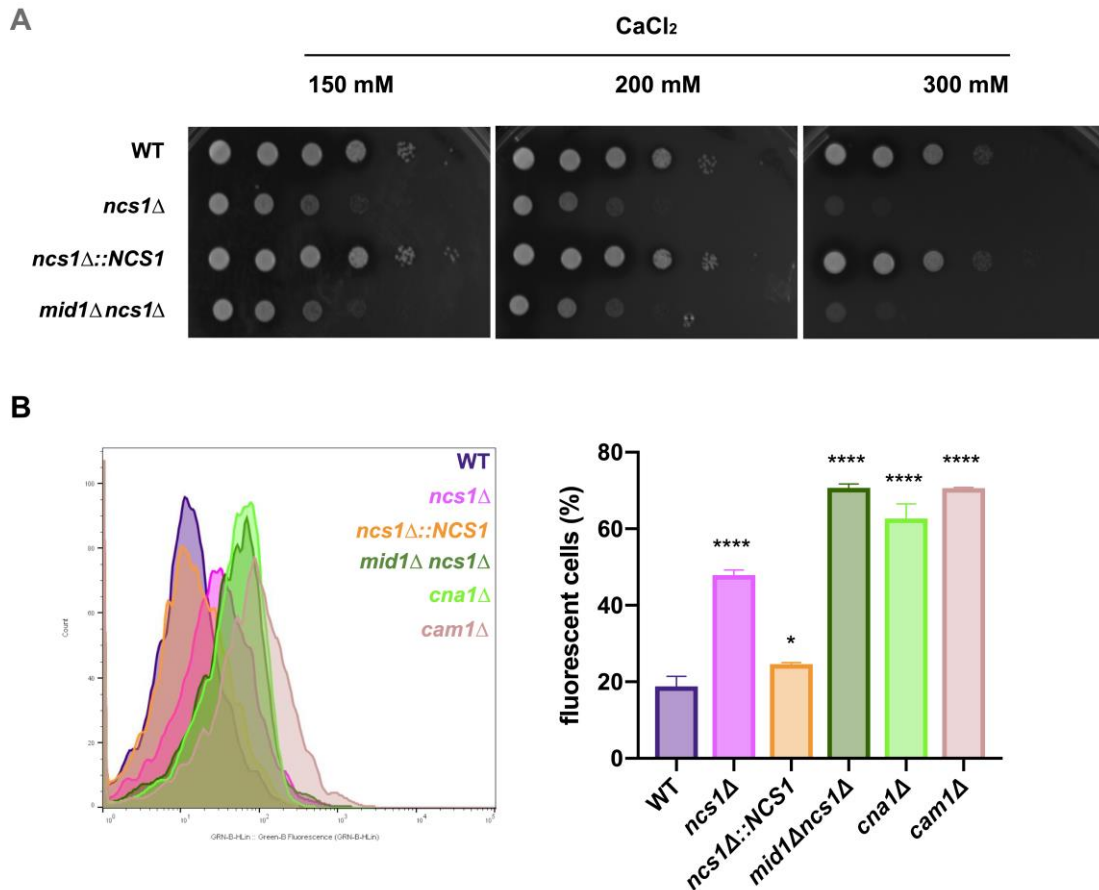
**Supplementary Figure 1. Confirmation of mutant genotypes.** (A) The corrected integration of inactivation cassette to generate *ncs1* $\Delta$  null strain was evaluated employing PCR with a primer pair that amplify a portion inside the coding region. As loading control, a fragment of the *ACT* gene was amplified. Left

panel: confirmatory PCR analysis. NC, negative control. Right panel, diagram representing the double cross-over at WT *NCS1* locus. (B) Integration of the complementation cassette into the inactivated *ncs1Δ* locus was evaluated with PCR using primers that hybridize inside the complementation cassette (CDSR and G418F primers) and at chromosomal sites outside the double recombination location (5'UTRF and 3'UTRR primers). Each primer pair was used independently to evaluate correct integration at *NCS1* CDS upstream site (5'UTRF and CDSR primers), as well as *NCS1* CDS downstream site (G418F and 3'UTRR primers). Left panel: confirmatory PCR analysis. NC, negative control. Right panel, diagram representing the double cross-over at *ncs1Δ* locus. (C) Evaluation of the correct integration of *NCS1::GFP* cassette into the WT *NCS1* locus was performed using two primer pairs (*NCS10F* + *NCS1GFPovR* and *G4183UTRovF* + *NCS10R*) independently to assess correct integration at *NCS1* CDS upstream site as well as *NCS1* CDS downstream site, respectively. Left panel: confirmatory PCR analysis. NC, negative control. Right panel, diagram representing the double cross-over at WT *NCS1* locus. (D) Evaluation of the correct integration of the inactivation cassette of *MID1* gene in the *ncs1Δ* strain was performed using PCR with a primer pair that amplify a region inside the coding region. As loading control, a fragment of the *ACT* gene was amplified. Left panel: confirmatory PCR analysis. NC, negative control. Right panel, diagram representing the double cross-over at *MID1* locus. (E) Evaluation of transcript levels of *NCS1* (left gels) or *MID1* (right gels) in distinct mutants and in the WT strain was conducted using RT-PCR with RNA isolated from yeast strains grown in YPD for 24 h. As loading control, the transcript levels of *ACT1* gene were also evaluated. NC, negative control.



**Supplementary Figure 2. Phenotypic analysis of the *ncs1Δ* null mutant strain.**

The indicated strains were evaluated by spot plate assay under different stress conditions: altered temperature, saline stress (NaCl 1M), low phosphate and oxidative (menadione) stresses, and cell wall (Calcofluor white and Congo red) stress. Pictures were taken after 48 h of incubation. The calcineurin mutant, *cna1Δ*, was included to assess the degree of phenotypic overlap with *ncs1Δ*.



**Supplementary Figure 3. Disruption of *MID1* does not rescue the *ncs1Δ* calcium sensitive phenotype.** (A) Spot dilution assay was performed for WT, *ncs1Δ* and *mid1Δncs1Δ* strains in the presence of increasing CaCl<sub>2</sub> concentrations. Pictures were taken after 48 hours of incubation at 30 °C. (B) The basal level of free intracellular Ca<sup>2+</sup> in WT, *ncs1Δ*, *ncs1Δ::NCS1*, *mid1Δncs1Δ*, *cna1Δ*, *cam1Δ* was quantified by flow cytometry following staining with the calcium specific dye, Fluo-4-AM. Left panel represents the histogram of Fluo-4-AM emitted fluorescence of the strains cultivated in YPD medium at 30 °C. Right panel represents the percentage of gated fluorescent cells ± standard deviation (three biological replicates). Mean values were compared using one-way-ANOVA and Dunnet's as a post-hoc for statistical analysis. Statistical significance is represented as \*\*\*\* p< 0.0001 and \* p< 0.05.

**Supplementary Movie 1.** Time lapse video microscopy demonstrating WT bud emergence profile.

**Supplementary Movie 2.** Time lapse video microscopy demonstrating ncs1 $\Delta$  bud emergence profile.

tratadas com inibidores de ergosteróis. Inferimos que o mecanismo mais provável de regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorra mediante a ativação do fator de transcrição Sre1. Contudo, mais evidências são necessárias a fim de confirmar esta interação em *C. neoformans*.



#### 4. Discussão geral

Nas últimas décadas, infecções fúngicas têm se tornado mais frequentes, sendo ocasionadas por leveduras, fungos filamentosos ou dimórficos (GÓRALSKA; BLASZKOWSKA; DZIKOWIEC, 2018). Apesar de comumente negligenciadas, as doenças fúngicas severas representam anualmente pelo menos 300 milhões de casos. *Cryptococcus* desponta como o principal fungo patogênico causador de morte em pacientes imunocomprometidos, sendo responsável por 15 % dos óbitos por meningoencefalite em pacientes portadores de HIV (RAJASINGHAM *et al.*, 2015, 2017a). A meningite criptocócica representa o quadro mais severo da doença, e estratégias que limitem a disseminação podem representar um aumento na taxa de recuperação dos pacientes (MA; MAY, 2009; PERFECT; TIHANA BICANIC, 2016). Dessa forma, a elucidação dos mecanismos pelos quais *C. neoformans* transmigra pela BHE, e coloniza o tecido cerebral, têm sido extensivamente estudados. Ainda, atualmente investigam-se quais fatores são capazes de modular esse tropismo e a habilidade de disseminação do patógeno, a fim de identificar potenciais novos alvos terapêuticos que impeçam a migração do fungo para o SNC.

A via da calcineurina têm sido foco de muitos estudos, por ser capaz de desempenhar uma regulação ampla de diversas atividades necessárias à adaptação de *C. neoformans* ao hospedeiro. Sendo conhecidamente reguladora do crescimento a 37 °C, resposta ao estresse, e essencial à virulência de *C. neoformans*, além de ser a principal via de transdução de sinais de Ca<sup>2+</sup> (LEV *et al.*, 2012; ODOM *et al.*, 1997b; PARK *et al.*, 2016). Na presente tese ampliamos a compreensão dos processos regulados por Ca<sup>2+</sup> e de suas proteínas efetoras. Identificamos que a homeostase de Ca<sup>2+</sup> é dependente de Pmc1 e responsável pela manutenção da patogênese e da ativação adequada de determinantes de virulência relacionados à transmigração. Ainda, caracterizamos mais uma proteína intracelular sensora de Ca<sup>2+</sup>, o ortólogo de *C. neoformans* de *neuronal calcium sensor Ncs1*, a qual é necessária aos mecanismos de virulência, a adaptação de *C. neoformans* ao hospedeiro e também estritamente relacionada com o aparecimento do broto e divisão celular adequada. Também, apresentamos evidências de fatores de transcrição potencialmente responsivos a Ca<sup>2+</sup>, e comprovações do envolvimento da sinalização de Ca<sup>2+</sup> com a biossíntese de ergosterol a nível transcricional.

A manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  em células eucarióticas é um mecanismo vital, sabendo que  $\text{Ca}^{2+}$  constitui o principal segundo mensageiro celular, e um desequilíbrio em seus níveis têm como consequência a ativação desnecessária de vias de sinalização, gasto energético, *folding* incorreto de proteínas e morte celular (CARAFOLI *et al.*, 2001). A fim de evitar esses eventos indesejados, as células devem possuir proteínas que sejam capazes de monitorar as flutuações nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  (CARAFOLI *et al.*, 2001; CARAFOLI; KREBS, 2016). Em *C. neoformans*, a única proteína intracelular sensora de  $\text{Ca}^{2+}$ , até então descrita, era a calmodulina, componente da via da calcineurina (KRAUS; HEITMAN, 2003; KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005). Na presente tese, acrescentamos a proteína ligadora de  $\text{Ca}^{2+}$  Ncs1 ao conjunto de proteínas sensoras intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  em *C. neoformans*. Ncs1 de *C. neoformans* é muito conservada quando comparada aos seus ortólogos fúngicos de *A. fumigatus*, *S. cerevisiae* e *S. pombe*, o que vai de encontro com as outras proteínas Ncs (*neuronal calcium sensor*) de células eucarióticas, que em geral possuem alto grau de conservação (HAMASAKI-KATAGIRI; AMES, 2010; HENDRICKS *et al.*, 1999; MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008). Ainda, a Ncs1 de *C. neoformans* é necessária à manutenção dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , e na tolerância a altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e altas temperaturas (39 °C). Ncs1 demonstrou ser relevante no desenvolvimento do patógeno em condições que mimetizam o hospedeiro, e importante no estabelecimento da doença em modelo de infecção *in vivo*. Apesar do alto grau de conservação com seus ortólogos patogênicos, apenas Ncs1 de *C. neoformans* parece ser necessário à virulência. Em *A. fumigatus*, além de NcsA não ser relevante na patogênese, o mutante nulo para NcsA apresenta maior resistência a altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e sua localização intracelular parece não ser influenciada pela disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  (MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008). Isso reforça que apesar de alta similaridade, a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por Ncs apresenta traços específicos de cada espécie.

Outra característica importante atribuída a Ncs1 em nosso estudo foi seu envolvimento com o aparecimento do broto, dificuldade de separação das células e potencial participação na progressão do ciclo celular. É importante ressaltar, que o ciclo celular de *C. neoformans* possui algumas particularidades. Durante a fase de crescimento exponencial a replicação de DNA e o brotamento ocorrem simultaneamente, assim como em Ascomycetos. Entretanto, quando no final da fase exponencial ou início da fase estacionária a célula de *C. neoformans* é capaz de atrasar

o brotamento e separar esses dois processos, dessa forma o brotamento somente ocorrerá após a replicação de DNA, ou seja eles ocorrerão isoladamente (OHKUSU; HATA; TAKEO, 2001; VIRTUDAZO *et al.*, 2010). Também, as células de *C. neoformans* podem ficar paradas tanto em G<sub>1</sub> quanto em G<sub>2</sub> na forma não brotada. Em *S. cerevisiae* uma vez iniciado o processo de START, o qual representa o ponto regulatório para divisão celular, as células completarão todo seu ciclo mitótico. Adicionalmente, *C. neoformans* é capaz de atrasar o brotamento e proceder com a replicação de DNA quando a célula encontra-se em condições desfavoráveis, isso reforça a presença de mecanismos regulatórios específicos e uma transição de G<sub>1</sub>/S mais flexível (OHKUSU; HATA; TAKEO, 2001; VIRTUDAZO *et al.*, 2010).

Em *C. neoformans* apenas uma *cyclin dependente kinase 1* (CDK) de G<sub>1</sub> foi identificada e denominada Cln1 (VIRTUDAZO *et al.*, 2010), CDKs são proteínas que funcionam como reguladoras centrais da progressão do ciclo celular (LIU; KIPREOS, 1999). Cln1 parece não ser essencial para a progressão do ciclo celular em *C. neoformans*, apesar de ser a única CDK presente em G<sub>1</sub>. Porém, o mutante nulo para *CLN1* (*cln1Δ*) apresentou um fenótipo celular visivelmente anormal, exibindo dificuldade de separação das células e formação de um septo largo. A linhagem *cln1Δ* ainda manifesta atraso no início da replicação de DNA, e também atraso no início do brotamento, destacando sua importância para a progressão correta do ciclo (VIRTUDAZO *et al.*, 2010). Fenótipos semelhantes foram observados no mutante *ncs1Δ*, o qual apresenta atraso no brotamento, células com dificuldades de se separar e um septo alargado. Ainda, a linhagem *ncs1Δ* apresenta uma maior expressão de *CLN1* quando comparada ao selvagem, dessa maneira denota-se que existe uma relação entre Ncs1 e a atividade de Cln1 de *C. neoformans*. Notavelmente, esta é a primeira vez que a homeostase de Ca<sup>2+</sup> é vinculada a progressão do ciclo celular em *C. neoformans*. Contudo, essa relação já está bem estabelecida para *S. cerevisiae* e em células mamíferas (IIDA *et al.*, 1990; KWASNIK *et al.*, 2018). Em *S. cerevisiae* baixos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular resultam em uma parada transitória do ciclo celular em G<sub>1</sub> (IIDA *et al.*, 1990). Também, a via da calcineurina apresenta-se envolvida na regulação das ciclinas nesta levedura (KAHL; MEANS, 2003; MIYAKAWA; MIZUNUMA, 2007). Além disso, é relevante ressaltar que dados de um RNA-seq de *S. cerevisiae* tratado com amiodarona (droga antiarrítmica utilizada clinicamente), a qual promove um aumento rápido de Ca<sup>2+</sup> intracelular, resulta na menor expressão de 134 genes, onde 33 % desses são genes relacionados com o ciclo celular, incluindo *CLN1* (ZHANG;

RAO, 2008), mais uma vez salienta a interação dos níveis de  $Ca^{2+}$  com a progressão do ciclo celular em fungos.

Quanto aos possíveis mecanismos de ação de Ncs1, ainda que nossos resultados sejam inconclusivos diante de sua interação com Mid1 (*stretch activated  $Ca^{2+}$  channel*), presumimos que esta interação seja mais indireta do que direta. O que vai em oposição ao que é descrito para *S. pombe*, no qual é relatada uma interação física entre Ncs1 e Yam8 (ortólogo de Mid1) (HAMASAKI-KATAGIRI; AMES, 2010). Tendo em vista que nosso mutante nulo duplo *mid1Δncs1Δ* não apresentou alteração de fenótipo em relação ao *ncs1Δ*.

Ademais, frente ao padrão de fluorescência *punctate* que *NCS1::GFP* desempenha na presença de  $Ca^{2+}$ , inferimos que este se assemelha com o padrão de fluorescência demonstrado pelas linhagens fluorescentes de Ncs de *S. pombe* (HAMASAKI-KATAGIRI; AMES, 2010) e da Frq1 de *S. Cerevisiae* (AMES *et al.*, 2000; STRAHL *et al.*, 2005). Frq1 se co-localiza com a Pik1 (*phosphatidil inositol -4 kinase*) no complexo de Golgi, e para *S. cerevisiae* propõe-se que Frq1 e Pik1 interajam fisicamente (STRAHL *et al.*, 2005). Ainda, é importante ressaltar que Pik1 é uma quinase envolvida na sinalização de fosfoinositóis, responsável pela fosforilação de fosfatidilinositol em fosfatidilinositol-4-fosfato (AUDHYA; EMR; PKC, 2002; WANG *et al.*, 2012).

Em *S. cerevisiae*, Pik1 é essencial para viabilidade, e sua atividade no complexo de Golgi está relacionada com a via de secreção de vesículas e exocitose, além de estar envolvida na divisão celular e citocinese (GARCIA-BUSTOS *et al.*, 1994; STRAHL *et al.*, 2005). Adicionalmente, células de *S. cerevisiae* com menor expressão de Pik1 demonstram brotos grandes os quais não se separam da célula “mãe” (GARCIA-BUSTOS *et al.*, 1994). Padrão este também visto em nossa linhagem nula de *ncs1Δ* para *C. neoformans*. Pik1 ainda é essencial à viabilidade de *S. pombe*, e parece estar envolvida com os processos de septação (PARK *et al.*, 2009b). Em contrapartida, Pik1 em *C. neoformans* não é essencial à viabilidade celular, porém é necessária a manutenção da virulência.

A linhagem mutante nula *pik1Δ* de *C. neoformans* é viável e não apresenta problemas no desenvolvimento celular, entretanto demonstra maior sensibilidade aos estressores de membrana plasmática, osmótico e estresse oxidativo, além de defeitos na melanização (LEE *et al.*, 2016). Ainda Pik1 de *C. neoformans* parece estar envolvida com a modulação do sistema imune do hospedeiro (HE *et al.*, 2012). Essas

evidências indicam diferenças na função dessa quinase entre Ascomicetos e Basidiomicetos, e ainda sugere a presença de uma quinase redundante em *C. neoformans*. Por fim, dados de expressão realizado para acompanhar o perfil de expressão ao longo do ciclo celular de *C. neoformans*, revelaram que *NCS1* e *PIK1* apresentam um pico de expressão exatamente juntos, em 150 min de crescimento, o que pode ser outro indicativo de uma atividade conjunta (KELLIHER *et al.*, 2016; KELLIHER; HAASE, 2017).

Finalmente, dados coletados nesse estudo comprovam a regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  sob a via biossintética de ergosterol a nível transcricional, ainda revela dois FTs, Sre1 e Hob1 potencialmente responsivos a  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudos anteriores embasam tal relação, um RNA-seq de *C. neoformans* tratado com FCZ demonstra haver um aumento de pelo menos duas vezes na expressão de *PMR1*, que codifica para um transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  putativo presente em golgi (FLORIO *et al.*, 2011), o que pode sugerir uma potencial resposta celular de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do complexo de golgi para enfrentar a atividade citotóxica de FCZ. Além disso, diferentes estudos sugerem que  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de ativar a translocação de Sre1 do RE para o núcleo (HUGHES *et al.*, 2007; WANG; AGELLON; MICHALAK, 2018). E em concordância com essa possibilidade, nossos dados revelam que aumento na disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  e o mutante nulo *pmc1*, possuem alteração no perfil transcricional de *SRE1*.

Em síntese, a presente Tese contribuiu ativamente com a elucidação de novas proteínas e mecanismos de manutenção da homeostase e da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainda, atribuiu à regulação da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  importantes funções celulares, como a progressão do ciclo celular, adaptação ao hospedeiro, habilidade de transmigração e desenvolvimento de resistência a antifúngicos. Dessa maneira, o presente trabalho cumpre com seu objetivo por colaborar com a geração de conhecimento acerca dos mecanismos que mantêm a patogênese de *C. neoformans*.

## 5. Conclusões

- A proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  Ncs1 é importante para a virulência de *C. neoformans*;
- Ncs1 é indispensável para a adaptação de *C. neoformans* a condições fisiológicas;
- Ncs1 é uma proteína ligadora e responsiva a  $\text{Ca}^{2+}$ , e necessária para manutenção da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- O ciclo celular de *C. neoformans* é potencialmente influenciado pela sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- A proteína sensora Ncs1, é fundamental para o aparecimento adequado do broto e separação da célula filha.
- A proteína Ncs1 influencia na regulação de genes relacionados com a progressão do ciclo celular, e a disrupção de *NCS1* resulta em uma linhagem com alterações na progressão ciclo celular;
- Dos 155 fatores de transcrição descritos para *C. neoformans*, apenas 3 são responsivos a  $\text{Ca}^{2+}$ , Crz1, Sre1 e Hob1;
- A disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de diminuir a sensibilidade de *C. neoformans* a azoles;
- A sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de regular a biossíntese de ergosteróis a nível transcricional.

## 6. Perspectivas

- Verificar se estímulos de  $\text{Ca}^{2+}$  são capazes de ativar a translocação de Sre1 do RE ao núcleo, com o intuito de avaliar de a atividade de Sre1 pode ser responsiva a  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- Confirmar se células de *C. neoformans* tratadas com FCZ e suplementadas com  $\text{Ca}^{2+}$  apresentam alterações nos perfis de esteróis de membrana;
- Estabelecer mediante qual mecanismo(s)  $\text{Ca}^{2+}$  consegue promover a resistência de *C. neoformans* a azoles.

## 7. Referências bibliográficas

AARON, P. A. *et al.* The Human Blood-Brain Barrier Internalizes *Cryptococcus neoformans* via the EphA2-Tyrosine Kinase Receptor. v. 20, n. 3, p. 1–38, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.12811>.The

AARON, P. A.; GELLI, A. Harnessing the Activity of the Fungal Metalloprotease, Mpr1, to Promote Crossing of Nanocarriers through the Blood-Brain Barrier. **ACS Infectious Diseases**. v. 6, n. 1, p. 138–149, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acinfecdis.9b00348>

ABBOTT, N. J. Astrocyte – endothelial interactions and blood – brain barrier permeability \***J anat.** p. 629–638, 2002.

AGUSTINHO, D. P. *et al.* Peeling the onion: The outer layers of *Cryptococcus neoformans*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180040>

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, n. 919, p. 55–58, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.09.004>

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2161–2165, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.061>

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC Immunology**, v. 8, p. 1–7, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-16>

AMES, J. B. *et al.* Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 39, n. 40, p. 12149–12161, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi0012890>

AUDHYA, A.; EMR, S. D.; PKC, C. Stt4 PI 4-Kinase Localizes to the Plasma Membrane and Functions in the Pkc1-Mediated MAP Kinase Cascade. v. 2, p. 593–

605, 2002.

BARONETTI, L. *et al.* *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. v. 20, n. 12, p. 1527–1541, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn112>

BASSO, L. R. *et al.* Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1396–1407, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dku554>

BLACKSTOCK, R. *et al.* Differential Regulation of Immune Responses by Highly and Weakly Virulent *Cryptococcus neoformans* Isolates. **Infection imun**, v. 67, n. 7, p. 3601–3609, 1999.

BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof3040057>

BOSE, I. *et al.* MINIREVIEW A Yeast under Cover : the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 4, p. 655–663, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.2.4.655>

BROWN, S. M. *et al.* Isocitrate dehydrogenase is important for nitrosative stress resistance in *Cryptococcus neoformans*, but oxidative stress resistance is not dependent on glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Eukaryotic Cell**, , v. 9, n. 6, p. 971–980, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00271-09>

CADIEUX, B. *et al.* The mannoprotein *cig1* supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1339–1347, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jit029>

CARAFOLI, E. *et al.* Generation, control, and processing of cellular calcium signals. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 107–260, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20014091074183>



CARAFOLI, E.; KREBS, J. Why calcium? How calcium became the best communicator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 40, p. 20849–20857, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.735894>

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 30, n. 1, p. 86, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0026-2692\(98\)00089-5](https://doi.org/10.1016/s0026-2692(98)00089-5)

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 3, p. 337–344, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/322044>

CHANG, Y. C. *et al.* Erratum: Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier (Infection and Immunity (2004) 72, 9 (4985-4995)). **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6753, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6753.2004>

CHANG, Y. C. *et al.* Sre1p , a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis , is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol microbiolog**, v. 64, p. 614–629, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05676.x>

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 7, p. 4912–4919, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.14.7.4912>

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2230–2236, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.66.5.2230-2236.1998>

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 18, p. 5636–5643, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.181.18.5636-5643.1999>

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene

of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 1977–1983, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.1977-1983.1996>

CHARLIER, C. *et al.* Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, , v. 77, n. 1, p. 120–127, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01065-08>

CHATURVEDI, A. K.; WORMLEY, F. L. *Cryptococcus* antigens and immune responses: Implications for a vaccine. **Expert Review of Vaccines**, , v. 12, n. 11, p. 1261–1272, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.840094>

CHATURVEDI, V.; WONG, B.; NEWMAN, S. L. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 156, n. 10, p. 3836–40, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621921>

CHEN, S. *et al.* Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of Infection Due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 499–508, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/313992>

CHOW, E. W. L. *et al.* Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 4, p. 1–29, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006667>

CHUN, C. D.; LIU, O. W.; MADHANI, H. D. A Link between Virulence and Homeostatic Responses to Hypoxia during Infection by the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. v. 3, n. 2, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030022>

COX, G. M. *et al.* Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443–448, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.443-448.2000>

COX, G. M. *et al.* Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166–175, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x>

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 143–149, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.143-149.2000>

CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **EMBO Journal**, v. 20, n. 5, p. 1020–1032, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.1020>

CUI, J. *et al.* Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p. 1137–1147, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00552.x>

DAVIS, M. J. *et al.* *Cryptococcus neoformans*– Induced Macrophage Lysosome Damage Crucially Contributes to Fungal Virulence . **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 5, p. 2219–2231, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402376>

DE CASTRO, P. A. *et al.* *Aspergillus fumigatus* calcium-responsive transcription factors regulate cell wall architecture promoting stress tolerance, virulence and caspofungin resistance. **Plos Genetics**. n. 15 , 2019 Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008551>

DJORDJEVIC, J. T. *et al.* Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. **Biochemical Journal**, v. 389, n. 3, p. 803–812, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20050063>

DJORDJEVIC, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. NOV, p. 1–13, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00125>

EDLIND, T. *et al.* Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signalling. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 257–268, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03165.x>

ELLERBROEK, P. M. *et al.* Cryptococcal glucuronoxylomannan inhibits adhesion of neutrophils to stimulated endothelium *in vitro* by affecting both neutrophils and endothelial cells. **Infection and Immunity**, , v. 70, n. 9, p. 4762–4771, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4762-4771.2002>

ELLERBROEK, P. M. *et al.* Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 581–592, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00384.x>

ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: A dangerous trip from the environment to the brain. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180057>

FAN, W. *et al.* Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p. 3394–3405, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01977-06>

FAN, Y. *et al.* A fungal homologue of neuronal calcium sensor-1, Bbcsa1, regulates extracellular acidification and contributes to virulence in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 158, n. 7, p. 1843–1851, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.058867-0>

FLORIO, A. R. *et al.* Genome-wide expression profiling of the response to short-term exposure to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* serotype A. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 97, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-97>

FOX, D. S. *et al.* Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 835–849, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02295.x>

FOX, D. S.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Phospholipid-binding protein *cts1* controls septation and functions coordinately with calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 1025–1035, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.2.5.1025-1035.2003>

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838–840, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.37.3.838-840.1999>

FU, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **Plos pathogens**, n 14 p. , 2018 v. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144>

GALANIS, E. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 251–257, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1601.090900>

GANENDREN, R. *et al.* Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes infection**. v. 8, p. 1006–1015, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.018>

GARCIA-BUSTOS, J. F. *et al.* PIK1, an essential phosphatidylinositol 4-kinase associated with the yeast nucleus. v. 13, n. 10, p. 2352–2361, 1994.

GARCÍA-RODAS, R. *et al.* Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–13, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00945-14>

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: Phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 147–161, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00871.x>

GARCIA-RUBIO, R. *et al.* The Fungal Cell Wall: *Candida* , *Cryptococcus* , and *Aspergillus* Species., **Frontiers in Microb**, v. 10, n. January, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis, **Clin Microbiol.** v. 13, n. 1, p. 122–143, 2000.

GILES, S. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: An essential link between antioxidant function and high-temperature growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.46-54.2005>

GOHAIN, D.; DEKA, R.; TAMULI, R. Identification of critical amino acid residues and functional conservation of the *Neurospora crassa* and *Rattus norvegicus* orthologues of neuronal calcium sensor-1. **Genetica**, v. 144, n. 6, p. 665–674, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10709-016-9933-y>

GÓRALSKA, K.; BLASZKOWSKA, J.; DZIKOWIEC, M. Neuroinfections caused by fungi. **Infection**, v. 46, n. 4, p. 443–459, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1152-2>

HAMASAKI-KATAGIRI, N. *et al.* Fission Yeast Homolog of Neuronal Calcium Sensor-1 (Ncs1p) Regulates Sporulation and Confers Calcium Tolerance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12744–12754, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M311895200>

HAMASAKI-KATAGIRI, N.; AMES, J. B. Neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) is up-regulated by calcineurin to promote Ca<sup>2+</sup> tolerance in fission yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4405–4414, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058594>

HANSEN, J. *et al.* Large-scale evaluation of the immuno-mycologics lateral flow and enzyme-linked immunoassays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 1, p. 52–55, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CVI.00536-12>

HE, X. *et al.* Virulence Factors Identified by *Cryptococcus neoformans* Mutant Screen Differentially Modulate Lung Immune Responses and Brain Dissemination. v. 181, n. 4, p. 1356–1366, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.012>

HENDRICKS, K. B. *et al.* Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of

phosphatidylinositol-4-OH kinase. **Nature Cell Biology**, v. 1, n. 4, p. 234–241, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/12058>

HUGHES, A. L. *et al.* 4-Methyl Sterols Regulate Fission Yeast SREBP-Scap under Low Oxygen and Cell Stress \*. **J Biochem.** v. 282, n. 33, p. 24388–24396, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M701326200>

IDNURM, A. *et al.* Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 10, p. 753–764, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1245>

IIDA, H. *et al.* Cell cycle control by Ca<sup>2+</sup> in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 34, p. 21216–21222, 1990.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: Evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 403–411, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.12067>

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. 1486–1496, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00120-07>

JONG, A. *et al.* Hyaluronic acid receptor CD44 deficiency is associated with decreased *Cryptococcus neoformans* brain infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 19, p. 15298–15306, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353375>

JUNG, K. *et al.* Systematic functional profiling of transcription factor networks in *Cryptococcus neoformans*. **Nature Communications**, p. 1–14, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms7757>

KAHL, C. R.; MEANS, A. R. Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways. **Endocrine Reviews**, , v. 24, n. 6, p. 719–736, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2003-0008>

KANO, R. *et al.* Multi-azole-resistant strains of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolated from a FLZ-resistant strain by culturing in medium containing voriconazole. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p. 877–882, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myw101>

KECHICHIAN, T. B.; SHEA, J.; DEL POETA, M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4792–4798, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00587-07>

KELLIHER, C. M. *et al.* Investigating Conservation of the Cell-Cycle-Regulated Transcriptional Program in the Fungal Pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 12, p. 1–23, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006453>

KELLIHER, C. M.; HAASE, S. B. Connecting virulence pathways to cell-cycle progression in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Current Genetics**, v. 63, n. 5, p. 803–811, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0688-5>

KIDD, S. E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **PNAS** v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0402981101>

KLUTTS, J. S. *et al.* Glycosyltransferases and their products : cryptococcal variations on fungal themes. v. 6, p. 499–512, 2006. **FEMS** Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00054.x>

KMETZSCH, L. *et al.* The vacuolar Ca<sup>2+</sup> exchanger *vcx1* is involved in calcineurin-dependent Ca<sup>2+</sup> tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 11, p. 1798–1805, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00114-10>

KMETZSCH, L. *et al.* The calcium transporter *Pmc1* provides Ca<sup>2+</sup> tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **FEBS Journal**, v. 280, n. 19, p. 4853–4864, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/febs.12458>

KOZEL, T. R.; GOTSCHLICH, C. The capsule of *cryptococcus neoformans* passively



inhibits phagocytosis of the yeast. **J Immunology**, n 4 p 1675-1680, 1982

KOZUBOWSKI, L. *et al.* Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, , v. 10, n. 11, p. 1396–1402, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.05087-11>

KOZUBOWSKI, L.; LEE, S. C.; HEITMAN, J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus* Lukasz. **Bone**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>

KRAUS, P. R. *et al.* Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryotic Cell**, , v. 3, n. 5, p. 1249–1260, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1249-1260.2004>

KRAUS, P. R.; HEITMAN, J. Coping with stress: Calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, n. 4, p. 1151–1157, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01528-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01528-6)

KRAUS, P. R.; NICHOLS, C. B.; HEITMAN, J. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 6, p. 1079–1087, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.4.6.1079-1087.2005>

KRETSINGER, R. H. *et al.* Homology of Calcium-Modulated Proteins: Their Evolutionary and Functional Relationships. The calcium channel structure, Function and Implications. Bayer AG Centenary Symposium. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-73914-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-73914-9_3) 1988.

KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193–203, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2522>

KRONSTAD, J. W.; HU, G.; JUNG, W. H. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

KWASNIK, A. *et al.* Potential mechanisms of calcium dependent regulation of the mammalian cell cycle revealed by comprehensive unbiased label-free nLC-MS/MS quantitative proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 170, p. 151–166, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.08.006>

KWON-CHUNG, A. K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the Sexual State of *Cryptococcus neoformans*. **Mycological Society of America**, , v. 68, n. 4, p. 821–833, 1976.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae). **Taxon**, , v. 51, n. 4, p. 804–806, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/1555045>

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of *Cryptococcosis*. **mSphere** v. 2, n. 1, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msphere.00357-16>

LEE, D. *et al.* Unraveling Melanin Biosynthesis and Signaling Networks in *Cryptococcus neoformans* **Mbio**. v. 10, n. 5, p. 1–21, 2019.

LEE, K. *et al.* Fungal kinases and transcription factors regulating brain infection in *Cryptococcus neoformans*. **Nature Communications**, n. 2020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15329-2>

LEE, K. T. *et al.* Systematic functional analysis of kinases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Nature Communications**, v. 7, n. May, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms12766>

LEMIRE, S.; JEROMIN, A.; BOISSELIER, É. Membrane binding of Neuronal Calcium Sensor-1 (NCS1). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 139, p. 138–147, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.065>

LEON-RODRIGUEZ, C. M. De *et al.* The Capsule of *Cryptococcus neoformans* Modulates Phagosomal pH through Its Acid-Base Properties. **MSphere** v. 3, n. 5, p. 1–8, 2018.

LESTNER, J. *et al.* Experimental models of short courses of liposomal amphotericin b for induction therapy for cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00090-17>

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, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051403>

LEV, S. *et al.* Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p. 1245–1255, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01421-12>

LEV, S. *et al.* Fungal inositol pyrophosphate IP7 is crucial for metabolic adaptation to the host environment and pathogenicity. **mBio**, v. 6, n. 3, p. 1–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00531-15>

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

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex . **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 69–105, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>

LIU, J.; KIPREOS, E. T. Evolution of Cyclin-Dependent Kinases ( CDKs ) and CDK-Activating Kinases ( CAKs ): Differential Conservation of CAKs in Yeast and Metazoa. **Mol Biol Evol**, n. 1, p. 1061–1074, 1999.

LIU, M. *et al.* Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1788–1796, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00158-06>

LIU, S. *et al.* Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 4, p. 324–334, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00271-14>

LIU, T. B. *et al.* Brain Inositol Is a Novel Stimulator for Promoting *Cryptococcus* Penetration of the Blood-Brain Barrier. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 4, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003247>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LOFTUS, B. J. *et al.* The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *i Science*, v. 307, n. 5713, p. 1321–1324, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1103773>

LUBERTO, C. *et al.* Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 7, p. 1080–1094, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI18309>

LUPETTI, A. *et al.* Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 76–81, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02280-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02280-3)

MA, H. *et al.* Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2156–2160, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.032>

MA, H.; MAY, R. C. **Chapter 5 Virulence in Cryptococcus Species**. 1. ed. Elsevier Inc., 2009. v. 67E-book. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)01005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)01005-8)

MALIEHE, M. *et al.* Environmental Factors That Contribute to the Maintenance of *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Microorganism**, n 28 v 2, 2020. Disponível em: [10.3390/microorganisms8020180](https://doi.org/10.3390/microorganisms8020180).

MARUVADA, R. *et al.* *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the blood brain barrier. v. 34, n. 3, p. 474–476, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303112.ApoA-I>

MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Estimating the

relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1500–1504, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1500-1504.2006>

MISSALL, T. A.; CHERRY-HARRIS, J. F.; LODGE, J. K. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2573–2581, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28132-0>

MIYAKAWA, T.; MIZUNUMA, M. Physiological roles of calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with special emphasis on its roles in G2/M cell-cycle regulation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 3, p. 633–645, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.60495>

MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 537–542, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00072.x>

MOTA JÚNIOR, A. O. *et al.* Molecular characterization of the *Aspergillus fumigatus* NCS-1 homologue, NcsA. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 280, n. 6, p. 483–495, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0381-y>

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

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, p. 1–9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-12>

NIELSEN, K. *et al.* Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and Virulence of congenic  $\alpha$  and  $\alpha$  isolates. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4831–4841, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4831-4841.2003>

NIMRICHTER, L. *et al.* Self-Aggregation of *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Is Dependent on Divalent Cations. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 8, p. 1400–1410, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00122-07>

O'MEARA, T. R.; ANDREW ALSPAUGH, J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-12>

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 156–161, 1997 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aac.41.1.156>

ODOM, A. *et al.* Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2576–2589, 1997 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2576>

OHKUSU, M.; HATA, K.; TAKEO, K. Bud emergence is gradually delayed from S to G2 with progression of growth phase in *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 194, n. 2, p. 251–255, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00501-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00501-2)

OKAGAKI, L. H. *et al.* Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000953>

OLIVEIRA, H. C. De; CASTELLI, R. F.; KUCZERA, D. Fungal Infections of the Central Nervous System. *Encyclopedia of Mycology Elsevier Ltd.*, 2020.. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21019-4>

OLSZEWSKI, M. A. *et al.* Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63734-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63734-0)

OST, K. S. *et al.* The *Cryptococcus neoformans* Alkaline Response Pathway: Identification of a Novel Rim Pathway Activator. **PLoS Genetics**, , v. 11, n. 4, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005159>

PAPADOPOULOS, Z. *et al.* Meningeal Lymphatics: From Anatomy to Central Nervous System Immune Surveillance. *J Immunol*, v2 n 15, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900838>

PARK, H. S. *et al.* Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. **PLoS Pathogens**, , v. 12, n. 9, p. 1–28, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005873>

PARK, J. *et al.* Essential Role for *Schizosaccharomyces pombe* pik1 in Septation. **PLOS one** v. 4, n. 7, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006179>

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: The yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 463–468, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00051.x>

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, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/649858.Clinical>

PERFECT, J. R. Fungal diagnosis: How do we do it and can we do better? **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, n. SUPPL4, p. 3–11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1185/03007995.2012.761134>

PERFECT, J. R.; TIHANA BICANIC. Cryptococcosis Diagnosis and Treatment: What Do We Know Now. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

PETZOLD, E. W. *et al.* Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5877–5887, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00624-06>

PINTON, P.; POZZAN, T.; RIZZUTO, R. The Golgi apparatus is an inositol functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. **EMBO J**, v. 17, n. 18, p. 5298–5308, 1998.

POETA, M. del. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*.

**Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067–1075, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1067>

PRADO, M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000300019>

RAJASINGHAM, R. *et al.* Epidemiology of Meningitis in an HIV-Infected Ugandan Cohort. **Am J Trop Med Hyg**, v. 92, n. 2, p. 274–279, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0452>

RAJASINGHAM, R. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

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

RAMOS, J.; SYCHROVÁ, H.; KSCHISCHO, M. Yeast Membrane Transport. **Yeast Membrane Transporter**, v. 892, p. 11–31, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6>

RODERO, L. *et al.* G484S Amino Acid Substitution in Lanosterol 14- $\alpha$  Demethylase (ERG11) Is Related to Fluconazole Resistance in a Recurrent *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3653–3656, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3653-3656.2003>

RODRIGUES, M. L. *et al.* Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell wall. v. 6, n. 1, p. 48–59, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00318-06>

RODRIGUES, M. L. *et al.* Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 1, p. 58–67, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00370-07>



RODRIGUES, M. L.; CASADEVALL, A. A two-way road: novel roles for fungal extracellular vesicles. **Molecular Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 11–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.14095>

RODRIGUES, M.; NOSANCHUK, J. D.; CHAGAS, I. C. Fungal diseases as neglected pathogens : A wake-up call to public health officials. **PLoS Negl Trop Dis** p. 1–9, 2020. Disponível em: . <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007964>

ROSA E SILVA, L. K. *et al.* Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 221–229, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.006>

RUGEMALILA, J. *et al.* Cryptococcal antigen prevalence in HIV-infected Tanzanians: A cross-sectional study and evaluation of a point-of-care lateral flow assay. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 9, p. 1075–1079, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tmi.12157>

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, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035455>

SAITOH, K. I. *et al.* Targeted gene disruption of the neuronal calcium sensor 1 homologue in rice blast fungus, magnaporthe grisea. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, , v. 67, n. 3, p. 651–653, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.67.651>

SANGUINETTI, M. *et al.* Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1352–1359, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1352-1359.2006>

SANTIAGO-TIRADO, F. H. *et al.* Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a eukaryotic pathogen. **mBio**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02183-16>

SELVIG, K.; ALSPAUGH, J. A. pH response pathways in fungi: Adapting to host-

derived and environmental signals. **Mycobiology**, v. 39, n. 4, p. 249–256, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.4.249>

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, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI41963DS1>

SIAFAKAS, A. R. *et al.* Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 52, p. 37508–37514, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M707913200>

SIDRIM, J. J. C. *et al.* Molecular methods for the diagnosis and characterization of *cryptococcus*: A review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 445–458, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/W10-030>

SINGH, A. *et al.* Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, p. 1–11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00220-13>

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: Emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5127–5130, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00694-13>

SORRELL, T. C. *et al.* Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1261–1263, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1261-1263.1996>

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Mycology**, v. 39, p. 155–168, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/714031012>

SORRELL, T. C. *et al.* Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: Evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 57–67, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.08.017>

SQUIZANI, E. D. *et al.* Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.12803>

STAMATOVIC, S.; KEEP, R.; ANDJELKOVIC, A. Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: the Blood Brain Barrier. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 3, p. 179–192, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157015908785777210>

STEENBERGEN, J. N. *et al.* *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4862–4872, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4862-4872.2003>

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. v. 5, p. 667–675, 2003.

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

STIE, J.; FOX, D. Calcineurin regulation in fungi and beyond. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 2, p. 177–186, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00326-07>

STRAHL, T. *et al.* Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus. v. 171, n. 6, p. 967–979, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200504104>

STRAYLE, J.; POZZAN, T.; RUDOLPH, H. K. Steady-state free Ca<sup>2+</sup> in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 μM and is mainly controlled by the secretory pathway pump Pmr1. **EMBO J** v. 18, n. 17, p. 4733–4743, 1999.

TAMULI, R.; KUMAR, R.; DEKA, R. Cellular roles of neuronal calcium sensor-1 and calcium/calmodulin-dependent kinases in fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51,

n. 2, p. 120–128, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jobm.201000184>

TSENG, H. K. *et al.* How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. **Future Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 1669–1682, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.15.83>

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. **PNAS**, v. 99, n. 5, p. 3165–3170, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.052702799>

URIBE, S.; RANGEL, P.; PARDO, J. P. Interactions of calcium with yeast mitochondria. [*S. l.*], n. 1882, p. 211–217, 1992.

VAISHNAV, V. V *et al.* Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Carbohyd res** p. 315–330, 1998.

VECCHIARELLI, A. *et al.* The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation . **Journal of Leukocyte Biology**, [v. 74, n. 3, p. 370–378, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.1002476>

VILLENA, S. N. *et al.* Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1274–1285, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01125.x>

VIRTUDAZO, E. V. *et al.* The single Cdk1-G1 cyclin of *Cryptococcus neoformans* is not essential for cell cycle progression, but plays important roles in the proper commitment to DNA synthesis and bud emergence in this yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 5, p. 605–618, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00633.x>

VU, K. *et al.* Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–13, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.01101-14>

VU, K.; BAUTOS, J. M.; GELLI, A. The Cch1-Mid1 High-Affinity Calcium Channel Contributes to the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Mitigating Oxidative Stress. v. 14, n. 11, p. 1135–1143, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00100-15.Address>

WANG, K. *et al.* Phosphatidylinositol 4-Kinases Are Required for Autophagic Membrane Trafficking. **J Biol Chem**, v. 287, n. 45, p. 37964–37972, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371591>

WANG, W. A.; AGELLON, L. B.; MICHALAK, M. Endoplasmic reticulum calcium dictates the distribution of intracellular unesterified cholesterol. **Cell Calcium**, v. 76, p. 116–121, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.11.002>

YÁÑEZ, M.; GIL-LONGO, J.; CAMPOS-TOIMIL, M. Calcium Binding Proteins. **Adv exp med biol** p. 461–482, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2>

YANG, C. L.; WANG, J. U. N.; ZOU, L. I. L. I. Innate immune evasion strategies against Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans*. **Exp Ter Med.** n. 16, p. 5243–5250, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5220>

YONEDA, A.; DOERING, T. L. Intracellularly and Secreted via Exocytosis. **MBoC**. v. 17, n. December, p. 5131–5140, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>

YOSHIMOTO, H. *et al.* Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 31079–31088, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M202718200>

ZARAGOZA, O. *et al.* The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. v. 2164, n. 09, p. 1–64, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01204-0.The](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01204-0.The)

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

ZHANG, Y. Q.; RAO, R. A spoke in the wheel: Calcium spikes disrupt yeast cell cycle. **Cell Cycle**, v. 7, n. 7, p. 870–873, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.7.7.5616>

ZHAO MING DONG; MURPHY, J. W. Mobility of human neutrophils in response to *Cryptococcus neoformans* cells, culture filtrate antigen, and individual components of the antigen. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5067–5077, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.61.12.5067-5077.1993>

ZHU, X. *et al.* Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5589–5596, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5589-5596.2001>

**8.**

**8. Anexo I--** Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1

## **Currículo**

### **Eamim Daidrê Squizani**

**Endereço residencial:** St. Dionísio Erthal, 69/ II – 503. Niterói- RJ- Brazil

**Telephone:** + 55 55 996194949

**e-mail:** eamimsquizani@gmail.com

**Data de nascimento:** 05/30/1991

**RG:** 2066576841 – SSP

**CPF:** 023.321.500-05

Farmacêutica generalista e mestre em biologia molecular e celular. Possui experiência em extensa experiência em diversas técnicas moleculares, incluindo análise de RNA e DNA, construção de cassetes e clonagem. Também possui experiência na área de ciências farmacêuticas, estudo de mecanismo de drogas, biologia molecular de microrganismos, principalmente em fungos patogênicos, assim como parasitas.

### **Qualificações**

- Português- Língua materna
- Inglês- Fluente (entendimento, leitura, fala e escrita)
- Espanhol- Fluente (entendimento e leitura) Intermediário (escrita e fala)

### **Prêmios**

**2017-** Young investigator award, 10<sup>th</sup> international conference on *cryptococcus* and cryptococcosis.

### **Educação formal**

**2020-Presente-** Pesquisador bolsista 011/2020 SENAI –CETIQT- PROGRAMA PARA ESTÍMULO À PRÁTICA DA PESQUISA, DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO E DE INOVAÇÃO, DO SENAI CETIQT.

**2016-presente-** Estudante de doutorado em **Biologia molecular e Celular.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, RS- Brazil. Título da Tese: Identification and characterization of



proteins related to the calcium dependent signalling on *Cryptococcus neoformans*. Orientadora: Livia Kmetzsch Rosa e Silva. Bolsa de estudos CAPES.

**2015-2016-** Mestrado em Biologia molecular e celular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, RS- Brazil. Título da tese: The role of calcium homeostasis in pathogenesis and cell signaling of *Cryptococcus neoformans*. Orientadora: Livia Kmetzsch Rosa e Silva. Bolsa de estudos CAPES.

**2009-2014-** Graduação em Ciências Farmacêuticas. Graduada na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. Título da Tese: The effect of gallic acid in the apoptosis control of neutrophils and the immunomodulation of mononuclear cells of peripheral human blood. Orientador: Jarbas Rodrigues de Oliveira. Bolsa de estudos CAPES.

**2011-2012-** Intercâmbio em Ciências farmacêuticas na Univesidade de Coimbra , Coimbra, Portugal. Mestrado integrado de Ciências Farmacêuticas.

**2006-2008** – Ensino médio- Colégio Marista Santo Ângelo, CSA, Santo Ângelo, RS- Brazil.

### **Experiência Profissional**

- **2018-2019-** Estudante de doutorado no Westmead Research Institute- Laboratory of Microbiology, The University of Sydney, Sydney- NSW- Australia. Bolsa de estudos CAPES.
- **2016- atualmente-** Estudante de doutorado em Biologia celular e molecular no Laboratório de fungos patogênicos. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS- Brazil. Tempo integral, bolsista CAPES.
- **2014- 2016-** Mestrado em Biologia celular e molecular no Laboratório de fungos patogênicos. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS- Brazil. Tempo integral, bolsista CAPES.
- **2013-** Estagiária de pesquisa (iniciação científica). Centre hospitalier de l'Université Laval – CHUQ, Quebec, Quebec –Canada. Bolsista Cnpq – MITACS (canada government grant).
- **2012-2014-** Iniciação científica. PUCRS. Bolsista CAPES.

### Estágios curriculares e extracurriculares

- 2010- **Estágio Curricular**- Farmácia comercial, Panvel, Porto Alegre- RS.
- 2010- **Iniciação científica**. Genetic Laboratory – Labgen. PUCRS.
- 2011- **Estágio Extracurricular – Controle de qualidade no** Laboratório SUPLAN – Laboratório de Suplementos Alimentares Ltda– Santo Ângelo, RS. Activities: Análise Microbiologica da água e de probióticos. Controle de qualidade de matéria prima e de produtos acabados.
- 2011- **Estágio Extracurricular**- Farmácia de manipulação. Farmashop, Rua Andradas, Porto Alegre, RS- Brazil.
- 2012- **Estágio Extracurricular- Laboratório de Química medicinal** , University of Zagreb, UNIZIG. Zagreb, Croatia. Atividades: Análise dos components de plantas, como antioxidantes- usando Espectrometria e cromatografia de camada delgada automatizada.
- 2013- **Iniciação científica** Centre hospitalier de l'Université Laval – CHUQ, Quebec, Quebec –Canada. Bolsista Cnpq – MITACS (canada government grant). Atividades realizadas no projeto: Analysis of Malaria parasite focusing on phosphoinositol signaling.
- 2014- **Estágio Curricular**- LAIF, Laboratório de Insumos Farmacêuticos. Tecnopuc-PUCRS, Porto Alegre, RS- Brazil. Atividades: Análise de qualidade de matéria prima. Usando: HPTLC, Gas chromatography, X-ray analysis, infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, DSC.
- 2015- **Estágio Curricular final**- Análises Clínicas- Hospital Santa Casa da Misericórdia, Porto Alegre, RS. Atividades: Hematologia, bioquímica, imunologia e análise microbiológica para diagnóstico.

### Educação complementar

- **2018- Estágio didático**- Ministrando a disciplina de Técnicas em Biologia molecular. Curso de graduação de Biotecnologia UFRGS. (200 h)
- 2018 – **Curso de extensão**. Animal handling, small laboratory animal. practical and theoretical Westmead Research Institute- The University of Sydney. Sydney , NSW, Austrália.
- 2018 – **Curso de extensão**. Flow cytometry. practical and theoretical Westmead Research Institute- The University of Sydney. Sydney , NSW, Austrália.

- 2018 – **Curso de extensão.** Tissue culture. practical and theoretical Westmead Research Institute- The University of Sydney. Sydney , NSW, Austrália.
- 2017- **Estágio didático-** Ministrando aula prática de Técnicas em biologia molecular. Curso de graduação de biomedicina UFRGS. (100 h)
- 2017 – **Disciplina de pós-graduação-** Inovação e empreendimento multidisciplinar. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Com apresentação de projeto final (200 h)
- 2016- **Estágio didático-** Ministrando curso de férias. Para alunos de escola pública e atualização para professores de Biologia. Tema: Ciências e a célula. (300 h)
- 2014- **Curso de extensão.** XXIII Escola de verão – Fisiologia e farmacologia. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brazil. (100 h)
- 2014- **Projeto de extensão**– Projeto comunitário voluntário RONDON. (200h).
- 2013- **Monitoria-** Controle de qualidade de drogas. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. (80 h)
- 2013- **Workshop.** Introduction to Foundations of Project Management. Introduction to Foundations of Project Management. Quebec, Canada.
- 2012- **Projeto de extensão** in Biochemistry. University of Zagreb, UNIZIG. Zagreb, Croatia. (100 h)
- 2012- **Monitoria-** Química medicinal. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. (80 h)
- 2011- **Curso de extensão -** Clinical Laboratory hormonal analysis. (50 h)
- 2011- **Voluntária na semana da saúde comunitária.** Porto Alegre, RS.
- 2010- **Monitoria-** Fisiologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. (80 h)

### Congressos

- 2018- **Workshop-** Myeloid Workshop. Cabaret, Westmead Education Conference Centre (WECC) lower level, Education Block, Westmead Hospital. The University of Sydney. Sydney , NSW, Austrália.
- 2017- 10 th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis.
- 2016- 62º Congresso Brasileiro De Genética, Caxambu, MG- Brazil.

- 2015- 28º Congresso Brasileiro De Microbiologia. Null Mutations For Vacuolar Ca<sup>2+</sup> Transporters Strongly Attenuate Cryptococcal Virulence In A Systemic Model Of Cryptococcosis.
- 2013- The 88th annual meeting of the American Society of parasitologists and the 13th annual Québec molecular parasitology meeting.
- 2012- I Comunitary Pharmacy Simposium (Immunomodulation and systemic immunological reaction), Coimbra, Portugal.
- 2011- Vitafoods Europe Conference- The global nutraceutical events. 10-12 May 2011 – Geneve Switzerland.

### Produção bibliográfica

#### Artigos publicados em revistas científicas

1. Reuwsaat, Julia Catarina Vieira; Motta, Heryk; Garcia, Ane Wichine Acosta; Vasconcelos, Carolina Bettker; Marques, Bárbara Machado; Oliveira, Natália Kronbauer; Rodrigues, Jéssica; Ferrareze, Patrícia Aline Gröhns; Frases, Susana; Lopes, William; Barcellos, Vanessa Abreu; **Squizani, Eamim Daidrê**; Horta, Jorge André; Schrank, Augusto; Rodrigues, Marcio Lourenço; Staats, Charley Christian; Vainstein, Marilene Henning; Kmetzsch, Lívia  
A Predicted Mannoprotein Participates in *Cryptococcus gattii* Capsular Structure. mSphere. , v.3, p.e00023-18 - , 2018.
2. Barcellos, Vanessa A.; Martins, Liliane M. S.; Fontes, Alide C. L.; Reuwsaat, Julia C. V.; **Squizani, Eamim D.**; De Sousa Araújo, Glauber R.; Frases, Susana; Staats, Charley C.; Schrank, Augusto; Kmetzsch, Livia; Vainstein, Marilene H.  
Genotypic and Phenotypic Diversity of *Cryptococcus gattii* VGII Clinical Isolates and Its Impact on Virulence. Frontiers in Microbiology. v.9, p.6 - 12, 2018.
3. **Squizani, Eamim D.**; Oliveira, Natália K.; Reuwsaat, Júlia C.V.; Marques, Bárbara M.; Lopes, William; Gerber, Alexandra L.; De Vasconcelos, Ana Tereza R.; Lev, Sophie; Djordjevic, Julianne T.; Schrank, Augusto; Vainstein, Marilene H.; Staats, Charley C.; Kmetzsch, Lívia. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. CELLULAR MICROBIOLOGY. v.1, p.e12803 - 22, 2017.
4. Dias, Henrique Bregolin; Krause, Gabriele Catyana; **Squizani, Eamin Daidrê**; Lima, Kelly Goulart; Schuster, Aline Daniele; Pedrazza, Leonardo; Basso, Bruno De Souza; Martha, Bianca Andrade; De Mesquita, Fernanda Cristina; Nunes, Fernanda Bordignon; Donadio, Márcio Vinicius Fagundes; De Oliveira, Jarbas Rodrigues  
Fructose-1,6-bisphosphate reverts iron-induced phenotype of hepatic stellate cells by chelating ferrous ions. BIOMETALS. , v.30, p.549 - 558, 2017.
5. Haute, Gabriela Viegas; Caberlon, Eduardo; **Squizani, Eamim**; De Mesquita, Fernanda Cristina; Pedrazza, Leonardo; Martha, Bianca Andrade; De Melo, Denizar;

Cassel, Eduardo; Czepielewski, Rafael Sanguinetti; Bitencourt, Shanna; Goettert, Márcia Inês; De Oliveira, Jarbas Rodrigues

Gallic acid reduces the effect of LPS on apoptosis and inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *Toxicology in Vitro.* , v.03651, p.1-9 - , 2015.

6. Dos Santos, R. S.; Donadio, M. V.; Da Silva, G. V.; Blattner, C. N.; Melo, D. A.; Nunes, F. B.; Dias, F. S.; Squizani, E. D.; Pedrazza, L.; Gadegast, I.; De Oliveira, J. R. Immediate Effects of Chest Physiotherapy on Hemodynamic, Metabolic, and Oxidative Stress Parameters in Subjects With Septic Shock. *Respiratory Care.* , v.59, p.1025 - 1033, 2014.

#### *Apresentações em eventos*

**Squizani, E. D.;** Staats, C. C.; Oliveira, N. K.; Reuwsaat, J. C.; Schrank, A.; Vainstein, M. H.; Marques, B. M; Kmetzsch, L. **The role of calcium transporters cryptococcal pathogenesis**, 2017. (Congress, Presentations in Events)