

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

Estudo de novos componentes da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em *Cryptococcus neoformans*

Dissertação de Mestrado

Andrea Gomes Tavanti

Porto Alegre, fevereiro de 2021

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

Estudo de novos componentes da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em *Cryptococcus neoformans*

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

Andrea Gomes Tavanti

Orientadora: Profa. Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Porto Alegre, fevereiro de 2021

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Biologia Teórica e Computacional e no Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos, ambos situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Não está em uma ordem específica porque todas as pessoas que quero agradecer contribuíram de formas diferentes e não menos importantes.

Começo com a minha família, que em todos os dias da minha vida me deu todas as condições necessárias para ter uma educação de qualidade. Obrigada a minha mãe e meu pai, Niara e Ricardo, pelo amor, carinho e compreensão, por sempre me escutarem e me aconselharem nas horas mais difíceis, por serem fontes inesgotáveis de sabedoria. Obrigada aos meus irmãos Umberto, Márcio e Marcelo por compartilharem suas vivências e por serem amigos incondicionais. Obrigada aos meus tios Maristela, Nestor e Renato que são acima de tudo grandes amigos que acalmam o meu coração sempre que eu preciso. Obrigada ao meu marido Lucas, que sempre forneceu apoio, conselhos, otimismo, amor e carinho. Nas piores horas, tua energia me impulsionou para caminhos melhores. As minhas outras famílias, Fialho e Zawacki que são mais uma fonte de amor e apoio familiar na minha vida. A minha amiga Tuti, que me escuta, que me aconselha estando disposta a ajudar sempre, sendo uma irmã de coração!

Obrigada a minha orientadora Prof^a Dra. Livia Kmetzsch que me acolheu como orientada em um momento pessoal extremamente desafiador. Por tirar cada uma das minhas dúvidas, ser aberta ao diálogo, compreensiva e um grande exemplo do tipo de profissional que quero me tornar.

Obrigada ao meu co-orientador Prof. Dr. Charley Staats por me apoiar e guiar dentro das etapas do projeto e ainda por ser muito compreensivo com as minhas dificuldades.

Aos meus colegas bioinformatas da UBTEC que deram apoio incondicional, transmitindo seus conhecimentos adquiridos e somando para um ambiente de trabalho divertido e enriquecedor.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos por também passarem os seus conhecimentos, tirarem as minhas dúvidas e me auxiliarem nos experimentos de bancada sempre com muito bom humor!

A todos os colegas e professores do Centro de Biotecnologia que colaboraram com suas perspectivas e conhecimentos na minha formação.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	7
1. Introdução.....	1
1.1 Criptococose: uma doença fúngica aguda e invasiva.....	1
1.2 O agente etiológico da criptococose em indivíduos imunocomprometidos.....	2
1.3 Mecanismos de disseminação e invasão de <i>C. neoformans</i>.....	3
1.3.1 Escape e disseminação do ambiente pulmonar.....	3
1.3.2 Invasão do parênquima cerebral.....	5
1.4 Determinantes de virulência.....	6
1.4.1 Desenvolvimento em temperatura fisiológica de 37°C.....	6
1.4.2 Cápsula polissacarídica.....	7
1.4.3 Melanina.....	8
1.4.4 Urease.....	9
1.4.5 Fosfolipase B.....	9
1.5 Via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina.....	10
1.6 Atuais tratamentos para criptococose e suas limitações.....	14
1.7 Biologia de sistemas e a exploração de alvos.....	15
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
4. Discussão.....	18
5. Conclusões.....	21
6. Perspectivas.....	22
7. Referências.....	23

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

°C: graus Celsius

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

BHE: Barreira hematoencefálica

CDRE: elemento de resposta dependente da calcineurina

DNA: ácido desoxirribonucléico

GalXM: galactoxilomanana

GXM: glucoronoxilomanana

HBMEC: células endoteliais microvasculares cerebrais humanas

HIV: vírus da imunodeficiência humana

MC: meningoencefalite criptocócica

mRNA: RNA mensageiro

NFAT: fator nuclear de células T ativadas

NTD: doenças tropicais negligenciadas

PCR: reação em cadeia da DNA polimerase

RNA: ácido ribonucléico

RNA-seq: sequenciamento de RNA

SNC: sistema nervoso central

WHO: Organização Mundial da Saúde

Resumo

Cryptococcus neoformans é uma levedura basidiomicética, principal agente etiológico da criptococose em humanos. A forma mais grave desta doença, denominada meningoencefalite criptocócica, tem incidência global de 220.000 casos e causa aproximadamente 181.000 mortes anualmente. A via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina tem papel essencial na adaptação criptocócica às condições encontradas no hospedeiro durante o desenvolvimento da doença. O objetivo deste trabalho foi explorar esta via de sinalização em busca de novos possíveis componentes que impactam a virulência de *C. neoformans*. Inicialmente, realizamos uma análise *in silico* de dados brutos transcritômicos de RNA-seq relacionados a três mutantes nulos para produtos gênicos chave desta via: fosfatase calcineurina, fator de transcrição Crz1, e transportador de cálcio Pmc1. Após uma análise integrada de redes de interação entre os genes diferencialmente expressos por biologia de sistemas, selecionamos CNAG_00522 como um novo potencial membro da via cálcio-calcineurina. Este gene é comum às redes geradas para os mutantes *pmc1Δ* e *cna1Δ*, e é regulado positivamente por esses componentes. Buscas por domínios conservados revelaram a presença de um domínio relacionado a *C2B_Tricalbin*, o qual tem conexão a módulos de direcionamento de membrana dependentes de Ca^{2+} que ligam diferentes moléculas, como fosfolipídios, polifosfatos de inositol e proteínas intracelulares. No intuito de aprofundar a caracterização funcional de CNAG_00522, avaliamos os níveis de transcritos deste gene por RT-qPCR em amostras de cDNA de *C. neoformans* obtidas de linhagens selvagem (WT) e mutantes (*pmc1Δ* e *crz1Δ*) cultivadas em diferentes condições de temperatura e presença e ausência de cálcio. Observamos que a expressão de CNAG_00522 é regulada positivamente a 37°C, e o fator de transcrição Crz1 é um potencial regulador negativo da expressão deste gene. Análises funcionais baseadas na deleção de CNAG_00522 devem ser conduzidas no intuito de confirmar a participação deste gene na via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina, assim como avaliar o papel deste componente na virulência de *C. neoformans*.

Abstract

Cryptococcus neoformans is a basidiomycetous yeast and the main etiological agent of cryptococcosis in humans. The most severe form of this disease, called cryptococcal meningoencephalitis, has a global incidence of 220,000 cases and causes approximately 181,000 deaths annually. The calcium and calcineurin-mediated signaling pathway plays an essential role in cryptococcal adaptation to host conditions during disease development. The aim of this work was to explore this signaling pathway to search for new possible components that impact the virulence of *C. neoformans*. Initially, we performed an *in silico* analysis of RNA-seq transcriptomic data related to three null mutants for key gene products of this pathway: calcineurin phosphatase, Crz1 transcription factor, and Pmc1 calcium transporter. After an integrated analysis of interaction networks between genes differentially expressed using systems biology, we selected CNAG_00522 as a new potential member of the calcium-calcineurin pathway. This gene is common to the networks generated for the *pmc1*Δ and *cna1*Δ mutants, and it is positively regulated by these components. Analysis of conserved domains in the primary sequence of this protein revealed the presence of a C2B_Tricalbin related domain, which is associated with Ca²⁺ dependent membrane targeting modules that bind to different molecules, such as phospholipids, inositol polyphosphates and intracellular proteins. In order to further characterize the CNAG_00522 gene, we evaluated its transcript levels by RT-qPCR in *C. neoformans* cDNA samples obtained from wild (WT) and mutant strains (*pmc1*Δ and *crz1*Δ) grown under different conditions of temperature and in the presence and absence of calcium. We observed that CNAG_00522 expression is positively regulated at 37°C, and that the transcription factor Crz1 is a potential negative regulator of the expression of this gene. Functional analysis based on the CNAG_00522 deletion should be conducted in order to confirm the participation of this gene in the signaling pathway mediated by calcium and calcineurin, as well as to evaluate the role of this component in the virulence of *C. neoformans*.

1. Introdução

1.1 Criptococose: uma doença fúngica aguda e invasiva

Doenças graves de etiologia fúngica tem um profundo impacto na saúde humana com estimativas de mais de 150 milhões de indivíduos afetados (Bongomin et al., 2017). Além das consequências causadas na rotina de indivíduos acometidos, muitas dessas enfermidades podem levar a óbito, com estimativa de mortalidade mundial de 1,6 milhões anuais (Bongomin et al., 2017).

Entre as doenças fúngicas classificadas como agudas e invasivas destaca-se a criptococose (Bongomin et al., 2017). Esta doença possui diversas manifestações clínicas, podendo afetar diferentes órgãos e, em sua forma mais grave, causar infecção no Sistema Nervoso Central (SNC) culminando em um quadro de meningoencefalite criptocócica (MC) (Zavala & Baddley, 2020). Indivíduos imunocomprometidos são os principais afetados pela MC, com uma maior frequência em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Zavala & Baddley, 2020).

A MC é responsável por mais de 220.000 casos e aproximadamente 181.000 mortes anuais (Rajasingham et al., 2017). Os países com maior prevalência da doença são os que se encontram na África Subsaariana e Sudeste Asiático, como também a Índia. Contudo, países da África Subsaariana são os mais afetados, com 72% do número de casos e 75% do número de mortes do total para a doença. A MC é responsável mundialmente por aproximadamente 15% das mortes relacionadas à AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) (Rajasingham et al., 2017). No Brasil, um estudo epidemiológico relacionado à MC, o qual abrange o período de 2000 a 2012, constatou que 75% das 5.755 mortes no período pela doença eram relacionadas com a AIDS (Soares et al., 2019).

Recentemente foi proposta a inclusão da MC na lista de doenças tropicais negligenciadas (NTD) (Molloy et al., 2017). A doença se enquadra nos critérios de

definição de NTDs definidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO): afeta principalmente populações pobres causando significativa morbidade e mortalidade; afeta principalmente populações vivendo em regiões tropicais e subtropicais; é passível de amplo controle, eliminação ou erradicação; e tem pouco investimento em pesquisa. Rodrigues & Albuquerque (2018) reforçam que, de acordo com o mais recente relatório da *Global Funding of Innovation for Neglected Diseases* (G-Finder), é evidente a falta de investimento em pesquisa relacionada à MC.

1.2 O agente etiológico da criptococose em indivíduos imunocomprometidos

O gênero *Cryptococcus* compreende espécies dentro do filo Basidiomycota as quais são isoladas em diferentes nichos ambientais, sendo consideradas agentes etiológicos da criptococose em humanos (May et al., 2016). Recentemente, Kwon-Chung et al. (2017) propuseram a classificação das espécies patogênicas desse gênero em dois grandes complexos: o complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e o complexo de espécies *Cryptococcus gattii*. *C. neoformans* é o principal agente etiológico da criptococose em indivíduos imunocomprometidos, acometendo principalmente indivíduos portadores de HIV que desenvolvem a AIDS (May et al., 2016).

A infecção humana ocorre pela inalação de basidiósporos ou da levedura dessecada presentes principalmente em excretas de pombos (May et al., 2016). Existem alguns possíveis cenários de interação patógeno-hospedeiro após a infecção. Em indivíduos imunocompetentes, a levedura é eliminada pelo sistema imunitário ou estabelece uma infecção latente assintomática. Em indivíduos imunocomprometidos, células fúngicas causam uma pneumonia sintomática, podendo transmigrar para outros locais. Por disseminação via corrente sanguínea, atinge principalmente o SNC pela transmigração da barreira hematoencefálica (BHE), o que desencadeia um quadro de MC (Figura 1) (Lin & Heitman, 2006, Mitchell et al. 2011).

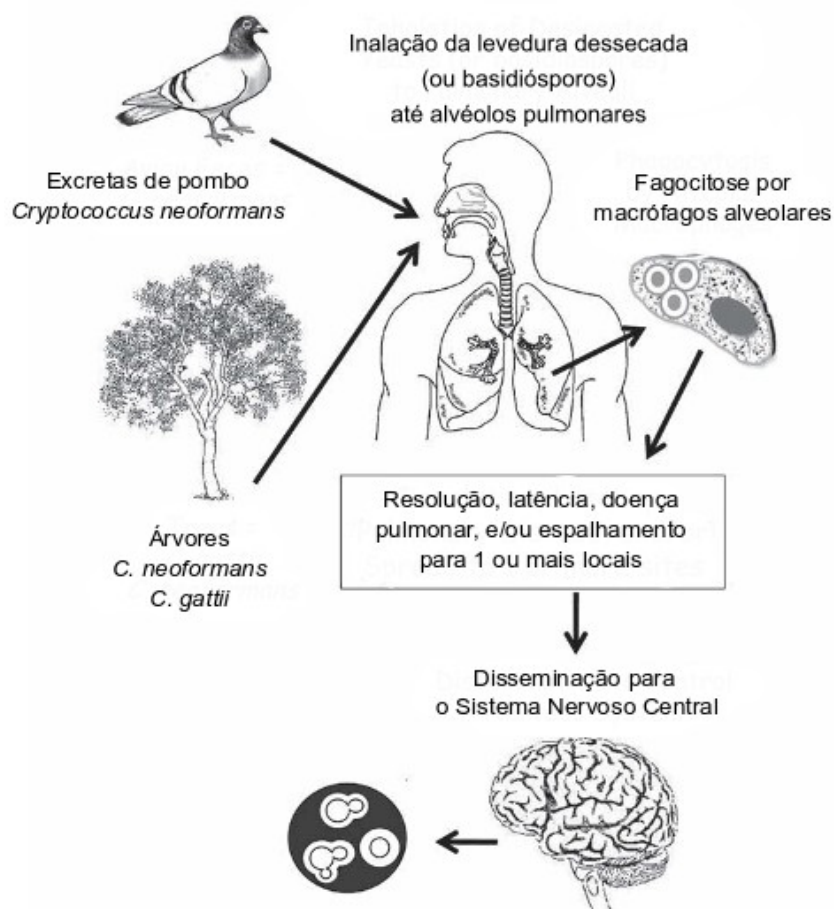


Figura 1: Nichos ambientais de *Cryptococcus* e estabelecimento da infecção. Células de levedura dessecada ou basidiósporos presentes nos nichos indicados são inalados pelo hospedeiro humano. No ambiente pulmonar, células fúngicas são expostas à resposta imunológica inata do hospedeiro, a qual pode eliminar a infecção, controlar a infecção (mantendo a latência) ou permitir a transmigração. Um dos principais sítios de disseminação da levedura é o SNC, onde ocorrerá o estabelecimento da MC. Figura adaptada de Mitchell et al. 2011.

1.3 Mecanismos de disseminação e invasão de *C. neoformans*

1.3.1 Escape e disseminação do ambiente pulmonar

Para *C. neoformans* disseminar e invadir com sucesso o SNC, a levedura deve ser capaz de manter um número mínimo de células viáveis no ambiente pulmonar, escapar da resposta imunológica do hospedeiro, atingir a corrente sanguínea para transmigrar pela BHE, levando à invasão efetiva do parênquima cerebral (Griffiths et al., 2012; May et al., 2016; Denham & Brown, 2018). Células de *C. neoformans* mantêm sua viabilidade no ambiente hospedeiro pela expressão

de determinantes de virulência (May, et al. 2016). Adicionalmente, a levedura forma células gigantes denominadas *Titan cells* que têm um diâmetro total celular acima de 30µm, sendo o tamanho de uma célula típica de *C. neoformans* de 5-7µm (Zaragoza & Nielsen, 2013) . Essas células representam um morfotipo de resistência que, por serem gigantes, conseguem escapar da ação fagocitária da resposta imunitária inata e que também contribuem para a manutenção do reservatório de células viáveis através da replicação. (Zaragoza & Nielsen, 2013; Denham & Brown, 2018).

C. neoformans consegue disseminar do ambiente pulmonar para outros sítios por mecanismos de entrada na corrente sanguínea: no interior de macrófagos, e por cruzamento paracelular ou transcitose de células epiteliais pulmonares (Figura 2) (Denham & Brown, 2018).

O mecanismo de saída das células criptocócicas dos macrófagos mais bem descrito atualmente é o de forma não lítica, denominado vomocitose, processo de extrema importância para o estabelecimento de uma MC no SNC (Denham & Brown, 2018). A levedura pode ainda escapar da ação antifúngica do macrófago de forma lítica, levando a inviabilidade da célula de defesa. Ainda, as células de *C. neoformans* podem se transferir lateralmente entre macrófagos (García-Rodas & Zaragoza, 2012; Johnston & May, 2013; Denham & Brown, 2018).

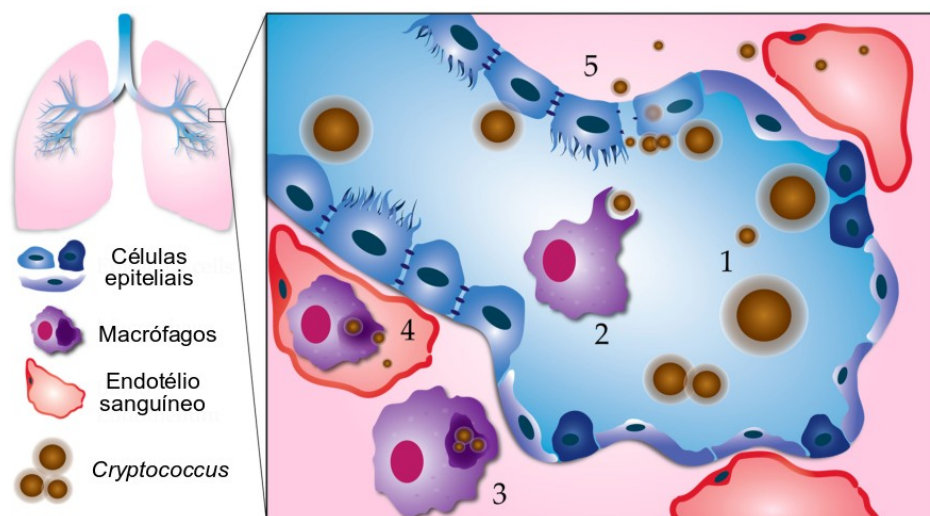


Figura 2: Sobrevivência e mecanismos de disseminação de *Cryptococcus spp.* do ambiente pulmonar. 1 – Formação de células gigantes para manutenção do reservatório de células viáveis. 2 – Fagocitose de células fúngicas menores. 3 – Sobrevivência das células dentro de fagolisossoma de macrófagos pela expressão de determinantes de virulência. 4 – Células de *C. neoformans* viáveis sendo liberadas por macrófagos, em um mecanismo denominado vomocitose. 5 – Escape das células criptocócicas do ambiente pulmonar pelos mecanismos de travessia paracelular ou transcitose. Adaptado de Denham & Brown (2018).

1.3.2 Invasão do parênquima cerebral

Existem três mecanismos descritos de passagem das células de *C. neoformans* pela BHE para a invasão do parênquima cerebral: por cavalo de troia, por transcitose e por paracitose (Liu et al., 2012; May et al., 2016; Taylor-Smith & May, 2016; Denham & Brown, 2018). O artifício do cavalo de troia se refere a leveduras que foram fagocitadas no ambiente pulmonar, as quais são transportadas até a BHE por células de macrófagos. Estas células imunes transpassam a BHE, e as células fúngicas escapam do macrófago para o parênquima cerebral através de vomocitose. A transcitose se refere as células fúngicas que transpassam a BHE por endocitose de células endoteliais cerebrais. A paracitose se refere ao enfraquecimento das junções de células endoteliais para que células de levedura transpassem pela BHE entre as conexões célula-célula. Acredita-se que esses mecanismos ocorram simultaneamente para a levedura estabelecer uma infecção no parênquima cerebral, porém o mecanismo cavalo de troia parece ser essencial para o estabelecimento da MC, uma vez que a depleção de macrófagos em modelo murino reduziu significativamente a infecção do SNC (Figura 3) (Kechichian et al., 2007; May et al., 2016)

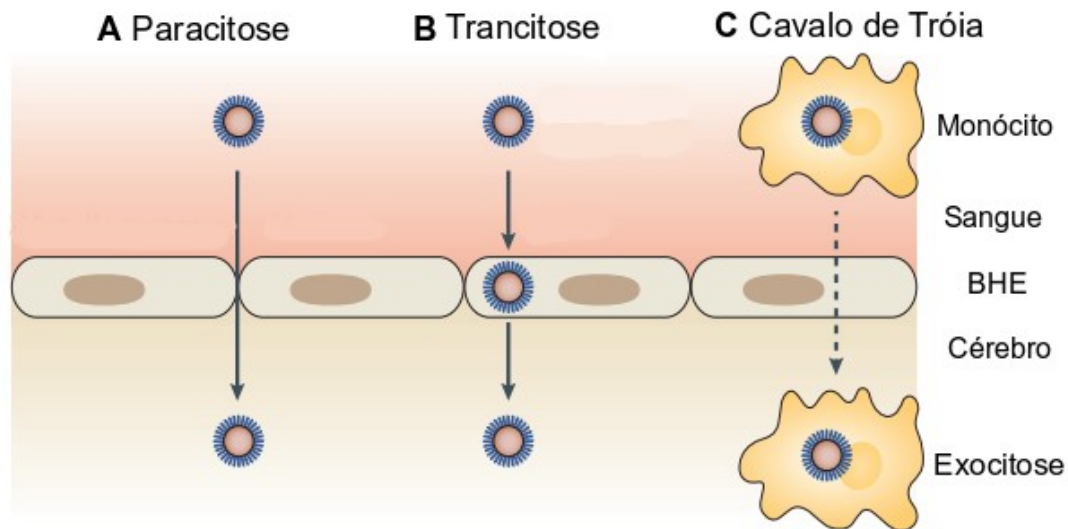


Figura 3: Mecanismos de invasão do SNC. A – Paracitose, enfraquecimento das junções de células endoteliais permitindo que as células fúngicas invadam o CNS. B – Trancitose, invasão das células endoteliais e passagem para parênquima cerebral. C - Cavalo de troia, passagem de macrófagos contendo células de levedura pela BHE para o cérebro. Figura adaptada de May et al. (2016).

1.4 Determinantes de virulência

C. neoformans necessita sobrepor mecanismos de defesa e limitações impostas pelo hospedeiro mamífero ao longo do estabelecimento da infecção. Desafios como as limitações nutricionais, um ambiente com pH ácido e radicais livres são enfrentados principalmente com o auxílio da produção de determinantes de virulência (Zaragoza, 2019). A expressão destes determinantes é regulada por diferentes rotas de sinalização, as quais são ativadas para a adaptação da levedura ao ambiente hospedeiro (Kozubowski et al., 2009; Zaragoza, 2019). Nessa seção terão destaque alguns dos mais importantes determinantes de virulência de *C. neoformans*.

1.4.1 Desenvolvimento em temperatura fisiológica de 37°C

A capacidade de sobrevivência na temperatura fisiológica humana é uma característica fundamental para a patogenicidade de *C. neoformans* (Buchanan & Murphy, 1998). Mutantes nulos para calcineurina, uma fosfatase fundamental para o processo de termotolerância, são incapazes de causar infecção em modelo murino (Odom et al., 1997; Fox et al., 2001). Genes que sofrem alteração de

expressão mediante exposição à temperatura do hospedeiro vêm sendo investigados. Um estudo de expressão diferencial através de microarranjos demonstrou que 49 genes têm a sua expressão induzida pela temperatura do hospedeiro. Entre eles, está o fator de transcrição Mga2, que possui como alguns de seus potenciais alvos, genes codificantes de enzimas biossintéticas de ácidos graxos, indicando que a remodelação de membrana é importante para o desenvolvimento em altas temperaturas (Kraus et al., 2004). Outro estudo usando análise da diferença representacional identificou 29 genes induzidos em temperatura de 37°C. Esses genes estão relacionados a integridade de parede celular, resposta ao estresse, filamentação, metabolismo oxidativo, metabolismo de ácidos graxos e transporte de proteínas (Rosa e Silva et al., 2008). Recentemente, a análise de um ensaio de gradiente de temperatura identificou 46 genes envolvidos em desenvolvimento em altas temperaturas (Stempinski et al., 2020). Os autores realizaram adicionalmente um estudo utilizando o banco de dados STRING, o qual evidenciou a potencial interação entre produtos gênicos relacionados à via de sinalização mediada por cálcio-calcineurina, vias secretórias, processamento de RNA, e divisão celular.

1.4.2 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica envolve o corpo celular de *C. neoformans*, sendo de fundamental importância para a virulência deste patógeno. Esta estrutura é composta principalmente pelos polissacarídeos glicuroxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), e também em menor proporção por manoproteínas, ácido hialurônico e ácido siálico (Zaragoza et al., 2009; Kwon-chung et al., 2014). A cápsula é altamente hidrofílica e fica ancorada à parede celular, sendo organizada em fibras ramificadas. Ainda, essa estrutura de proteção é complexa e dinâmica, podendo mudar de tamanho de acordo com estímulos do ambiente (Zaragoza et al., 2009; Zaragoza, 2019).

Os principais papéis desempenhados pela cápsula são: maior resistência a fagocitose, maior resistência a estresse oxidativo e desidratação, e modulação da resposta imunológica (Zaragoza, 2019). A estrutura capsular age como barreira

física para a levedura, através da ocultação de epítomos específicos da parede celular que permitem o reconhecimento do patógeno por macrófagos e, como consequência, o engolfamento de células de *C. neoformans* com cápsulas mais robustas é menor (Kozel & Mastroianni, 1976; Kozel & Gotschlich, 1982; García-Rodas & Zaragoza, 2012). Pela sua natureza hidrofílica, a cápsula também confere proteção ao dessecamento (Aksenov et al. 1973). Além disso, a cápsula está relacionada à resistência a alguns antifúngicos, como anfotericina B, e também confere um efeito protetor aos mecanismos microbicidas presentes em células macrofágicas, conferindo resistência ao estresse oxidativo e a peptídeos antimicrobianos (Zaragoza et al., 2008). Por fim, a estrutura capsular tem ainda um papel muito importante na regulação da resposta imunitária do hospedeiro, pela inibição de migração de leucócitos, diminuição da expressão de receptores de quimiocinas, inibição da produção de anticorpos, alteração da produção de citocinas e indução de apoptose celular em leucócitos (revisado por Zaragoza, 2019).

1.4.3 Melanina

A melanina é um pigmento escuro produzido por células de *C. neoformans* pela ação da atividade de difenol oxidase da enzima lacase, a qual oxida substratos fenólicos em quinonas (Nurudeen & Ahearn, 1979; Pukkila-Worley et al., 2005). A enzima lacase (Lac1) é codificada principalmente pelo gene *LAC1* (Pukkila-Worley et al., 2005). Em *C. neoformans*, a melanina produzida é depositada na parede celular, e possui uma miríade de funções ligadas a sobrevivência e adaptação desse patógeno. Um exemplo está na maior resistência de *C. neoformans* em condições de baixas e altas temperaturas (Rosas & Casadevall, 1997). Além disto, recentemente foi demonstrado que o pigmento auxilia na captura de calor, caso a levedura esteja exposta a baixas temperaturas (Cordero et al., 2018). A melanina também tem um efeito protetivo com relação à radiação ultravioleta (Wang & Casadevall, 1994). Esse pigmento foi associado à modulação da resposta inflamatória do hospedeiro e proteção contra estresse oxidativo dentro de macrófagos (Liu et al., 1999; Mednick et al., 2005).

Além disso, a melanina produzida por *C. neoformans* confere resistência aos fármacos antifúngicos anfotericina B e caspofungina (van Duin et al., 2002; Ikeda et al., 2003). Linhagens com deficiência na produção desse pigmento mostraram significativa atenuação de virulência em modelo murino (Kwon-Chung et al., 1982). Por fim, esse efeito também foi observado em linhagens mutantes para o gene *LAC1*, evidenciando a importância da melanina na sobrevivência e adaptação ao ambiente hospedeiro (Salas et al., 1996).

1.4.4 Urease

Urease é uma metaloenzima que hidrolisa ureia em amônia e carbamato, sendo codificada pelo gene *URE1* em *C. neoformans* (Cox et al., 2000). A produção dessa enzima em altas concentrações é uma característica marcante de *C. neoformans*, fazendo com que sua detecção seja utilizada como ferramenta para o diagnóstico de doença (Zimmer & Roberts, 1979; Canteros et al., 1996). Foi extensamente demonstrado que essa enzima é um importante determinante de virulência de *C. neoformans*, apresentando influência significativa na disseminação da levedura do ambiente pulmonar para o cérebro (Cox et al., 2000; Olszewski et al., 2004; Shi et al., 2010; Fu et al., 2018). Finalmente, a urease também influencia no aumento do pH de fagolisossomos, o que está correlacionado com a proteção contra a resposta imunológica humoral, a persistência da infecção e a disseminação da levedura para o SNC (Fu et al., 2018).

1.4.5 Fosfolipase B

Fosfolipases são um grupo diversificado de enzimas que hidrolisam ligações ésteres de glicerofosfolipídeos que compõe membranas celulares e surfactante pulmonar. As suas funções estão ligadas a desestabilização e degradação de membranas, sinalização celular e influência na resposta imunitária do hospedeiro, e por esses motivos são enzimas extremamente importantes para a sobrevivência de diferentes fungos (Djordjevic, 2010). Plb1 é uma fosfolipase multifuncional de *C. neoformans*, apresentando atividades de fosfolipase B,

lisofosfolipase e lisofosfolipase transacilase (Chen et al., 1997; Cox et al., 2001). Para o ambiente pulmonar, a atividade dessa enzima foi correlacionada com uma maior adesão das células criptocócicas a células do epitélio pulmonar hospedeiro (Ganendren et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que mutantes nulos *plb1* tem defeitos de proliferação dentro de células de macrófagos e produzem um número maior de células gigantes durante a infecção (Evans et al., 2015). Estes mutantes são hipovirulentos em modelo murino, e falham em disseminar para o SNC. Ainda, no mesmo estudo, foi constatado que a proteína Sec14 é essencial para a secreção de Plb1, sendo Plb1 crucial para o processo de vomocitose (Chayakulkeeree et al., 2011). Finalmente, foi evidenciado que Plb1 ativa a proteína hospedeira Rac1 e estimula a sua associação com o fator de transcrição STAT3, o que por sua vez culmina em uma reorganização do citoesqueleto de células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (HBMEC). Esse rearranjo de citoesqueleto facilita a passagem pela BHE, sendo essencial para colonização do parênquima cerebral (Maruvada et al., 2012).

1.5 Via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina

A via mediada por cálcio e calcineurina está entre as principais vias de sinalização que são essenciais para a virulência e sobrevivência de *C. neoformans* (Kozubowski et al., 2009). Esta via de sinalização é ativada por íons de cálcio, um importante mensageiro que medeia respostas a diversos estímulos ambientais (Roy et al., 2020). Essa cascata de sinalização apresenta diversos componentes, e é ativada por estresses ambientais que ocasionam um aumento de cálcio intracelular (Liu et al., 2015).

A concentração de íons de cálcio no citosol das células fúngicas pode variar de 50nM a 200nM, sendo que concentrações extracelulares variam de 1µM a 100mM (Cui et al., 2009). O controle da homeostase de cálcio intracelular é orquestrado por diferentes transportadores e canais de Ca^{2+} localizados na membrana plasmática e em diferentes organelas. Em *C. neoformans*, entre os componentes já identificados responsáveis pelo equilíbrio desse íon estão: os canais de cálcio da membrana plasmática Cch1 e Mid1, os transportadores

vacuolares Pmc1 e Vcx1, e o transportador de retículo endoplasmático Eca1 (Liu et al., 2006; Fan et al., 2007; Kmetzsch et al., 2010; Kmetzsch et al., 2013). Frente a estímulo estressor, ocorre um influxo de cálcio intracelular. O aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} é detectado pela proteína sensora de cálcio calmodulina (CaM), que então ativa a enzima calcineurina, uma serino/treonino fosfatase. A calcineurina é composta por duas subunidades: subunidade A catalítica (Cna1), e B regulatória (Cnb1). O complexo cálcio-CaM se liga na região C-terminal regulatória da subunidade A da calcineurina. Como resultado, uma mudança conformacional libera o sítio ativo da enzima, até então oculto pelo domínio auto-inibitório (Kraus et al., 2005). A fosfatase calcineurina ativada atua de forma ramificada, regulando alvos e controlando processos em nível transcricional e pós-transcricional (Park et al., 2016, 2019; Chow et al., 2017). O principal alvo descrito para calcineurina em *C. neoformans* é o fator de transcrição Crz1. Em sua forma inativa, Crz1 encontra-se fosforilado no citoplasma celular; quando é defosforilado por calcineurina, é ativado e direcionado para o núcleo. Esse fator de transcrição regula a expressão de diversos genes, os quais possuem em sua região promotora sequências canônicas denominadas CDRE, elemento de resposta dependente da calcineurina. Os genes cuja expressão é dependente de calcineurina-Crz1 em *C. neoformans* estão ligados ao transporte de cálcio e de pequenas moléculas, à síntese e manutenção da parede celular, à sensibilidade a temperatura e à virulência (Lev et al., 2012; Park et al., 2016; Chow et al., 2017). Em nível pós-transcricional, foram identificados quatro potenciais alvos da calcineurina: as proteínas ligantes de RNA Pbp1, Puf4 e Lhp1, as quais reconhecem e se ligam a sequências específicas de RNA para controlar processos como localização, estabilidade e função de mRNA, sendo importantes para termotolerância, reprodução e virulência (Park et al., 2016); e a fosfatase Gpp2, a qual é fundamental para a via biossintética de aminoácidos sulfurados (de Melo et al., 2019) (Figura 4).

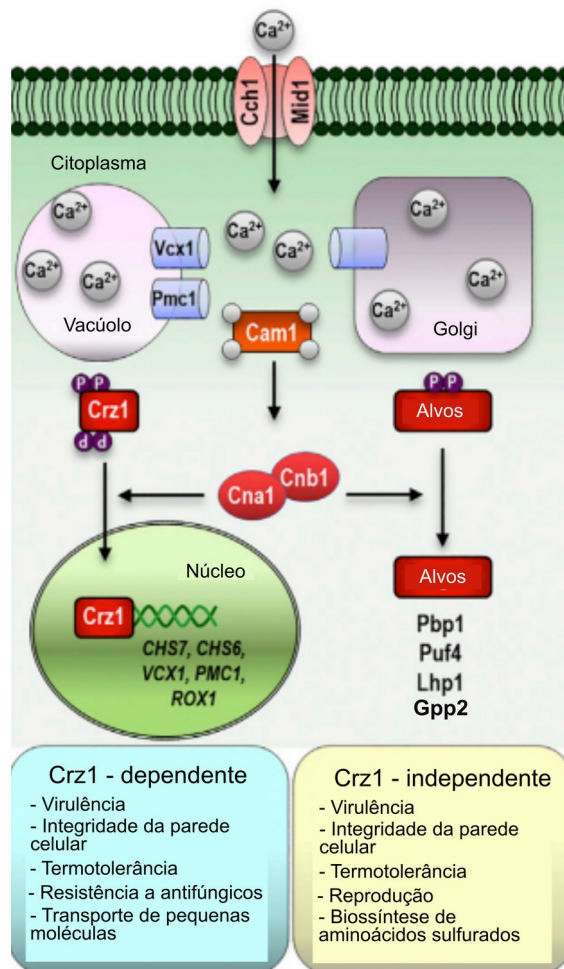


Figura 4: Principais componentes e funções da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em *C. neoformans*. Um influxo de cálcio ocorre para o citoplasma mediante um estímulo estressor. O aumento da concentração de Ca^{2+} é detectado pela proteína CaM, a qual ativa a fosfatase calcineurina (representada pelas suas subunidades Cna1 e Cnb1). Calcineurina atua de forma ramificada, regulando distintos alvos, sendo Crz1 o melhor caracterizado. Este fator de transcrição regula a homeostase de cálcio, síntese e manutenção da parede celular, transporte de pequenas moléculas, termotolerância e virulência. Pbp1, Puf4, Lhp1 e Gpp2 são potenciais alvos da calcineurina em nível pós-transcricional, independentes de Crz1. Adaptado de Park et al. 2019.

Há inúmeras evidências da importância dos componentes desta via de sinalização para a virulência e sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro (Odom et al., 1997; Liu et al., 2006; Fan et al., 2007; Kmetzsch et al., 2010; Kmetzsch et al., 2013; Chow et al., 2017; Squizani et al., 2018). Inicialmente, foi

demonstrado que mutantes nulos para a subunidade A da calcineurina apresentam defeitos de desenvolvimento e fenótipo de hipovirulência em modelo murino (Odom et al., 1997). Além disto, mutantes nulos para o transportador de cálcio *Cch1* são incapazes de replicar em meio de limitação de cálcio extracelular, e apresentam virulência atenuada em modelo murino de infecção intranasal (Liu et al., 2006). Mutantes nulos para o transportador de cálcio *Eca1* demonstram virulência atenuada, sendo também sensíveis a inibidores da calcineurina e ao estresse osmótico de retículo endoplasmático (Fan et al., 2007). Linhagens mutantes nulas para o transportador vacuolar de cálcio *Vcx1* apresentam menor secreção de GXM, alteração no perfil de fagocitose por macrófagos murinos, sendo hipovirulentas em modelo de infecção experimental (Kmetzsch et al., 2010). Mutantes duplos para os genes *VCX1* e *PMC1* acumulam cálcio intracelular e apresentam sensibilidade no desenvolvimento a temperatura do hospedeiro. Ainda, mutantes nulos *pmc1* tem a formação de cápsula e secreção de GXM reduzida em meio de cultura de células mamíferas, e redução na virulência e disseminação para o SNC (Kmetzsch et al., 2013). Uma investigação do perfil de expressão global do mutante *pmc1* foi realizada, constatando-se que genes relacionados a produção de urease e formação de cápsula são diferencialmente expressos. No mesmo estudo, foi ainda constatado que o fator de transcrição *Crz1* controla a expressão e atividade de urease. Estes dados se relacionam com a ineficiência de transmigração para o SNC observada para o mutante nulo *pmc1* (Squizani et al., 2018). Um dos estudos mais recentes envolvendo análise transcritômica de mutantes para os genes *CRZ1* e *CNA1* verificou que 102 genes são regulados de forma calcineurina-*Crz1* dependentes, sendo que 58% deles não possuem caracterização funcional, e o restante está ligado ao transporte de cálcio, produção de ferormônios e remodelagem da parede celular. Ainda, foi constatado que calcineurina e *Crz1* também controlam alvos de forma independente, com 393 e 59 genes diferencialmente expressos, respectivamente (Chow et al., 2017).

Os principais componentes dessa cascata de sinalização são conservados entre organismos eucariotos, porém existe variação de alvos dessa rota de sinalização entre diferentes organismos. Em humanos, a via de sinalização cálcio-calcineurina tem, entre várias funções, um papel fundamental na modulação da

resposta imunológica. De forma geral, em fungos e protistas parasitas a via está relacionada a sobrevivência e patogenicidade dos microrganismos. Em humanos, o principal fator de transcrição identificado é o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), o qual é homólogo a Crz1 em fungos (Park et al., 2019).

Alguns fármacos que não tem como principal função o controle de infecções fúngicas, mas interferem na via de sinalização cálcio-calcineurina, tem propriedades antifúngicas. Ciclosporina A e FK506 (tracolimus) são clássicos exemplos de moléculas que são usadas como imunossupressoras, mas que possuem atividade antifúngica. A sua ação acontece pela formação de complexo com as imunofilinas ciclofilina A e FKBP, respectivamente, e consecutiva inibição da calcineurina (Odom et al., 1997; Cruz et al., 2000; Liu et al., 2015; Park et al., 2019). Estudos com inibidores da calcineurina vem sendo conduzidos como possíveis tratamentos para MC. Porém, análogos desses inibidores têm sido investigados por mostrarem menor reatividade cruzada com o hospedeiro (revisado por Park et al., 2019). Os componentes da via de uma forma geral tem sido considerados alvos interessantes de investigação para o desenvolvimento de futuros tratamentos (Juvvadi et al., 2017; Park et al., 2019; Wall & Lopez-Ribot, 2020).

1.6 Atuais tratamentos para criptococose e suas limitações

O tratamento para indivíduos com criptococose e quadro de MC consiste em 3 fases: indução, consolidação e manutenção. Na fase de indução, o foco do tratamento é a esterilização do fluido cefalorraquidiano, onde os principais fármacos utilizados em conjunto são a anfotericina B e a flucitosina (Sloan & Parris, 2014; Abassi et al., 2015). Ambas as fases de consolidação e manutenção, cujo objetivo é impedir uma recidiva, utilizam principalmente fluconazol, o qual apresenta ação fungistática principal. As concentrações e combinações para o tratamento com os três fármacos principais podem variar dependendo da sua disponibilidade, efetividade e efeitos colaterais causados em pacientes (Sloan & Parris, 2014; Abassi et al., 2015).

Em países de média e baixa renda (MLICs) é comum o uso de fluconazol como monoterapia em todas as fases de tratamento da MC, justamente por serem países com recursos limitados, acarretando em grande dificuldade de acesso a fármacos mais efetivas (Sloan & Parris, 2014; Abassi et al., 2015; Rajasingham et al., 2017). Entretanto, o uso contínuo de fluconazol como único tratamento para MC está associado ao surgimento de linhagens resistentes (revisado em Bermas & Geddes-McAlister, 2020). Além disso, existem inúmeros efeitos adversos associados às medicações indicadas na fase de indução. A anfotericina B, por exemplo, tem alta nefrotoxicidade e pode ainda causar anemia, hipocalemia, hipomagnesemia e flebite (Sloan & Parris, 2014; Abassi et al., 2015). A administração desta medicação necessita de internação hospitalar, o que acarreta em maior custo e utilização de recursos (Abassi et al., 2015). Dentro desse cenário, é necessária a busca por tratamentos alternativos que combinem boa eficácia, baixa toxicidade, baixo custo e fácil acessibilidade (Juvvadi et al., 2017; Park et al., 2019; Wall & Lopez-Ribot, 2020). A exploração de vias de sinalização essenciais para a virulência de *C. neoformans* é uma alternativa muito interessante para definir novos alvos de fármacos que culminem em melhores tratamentos para MC. Como já mencionado, a via de sinalização cálcio-calcineurina vem sendo sugerida como uma excelente opção de exploração (Juvvadi et al., 2017; Park et al., 2019; Wall & Lopez-Ribot, 2020), justamente por ser conectada com a virulência e sobrevivência de *C. neoformans* (Odom et al., 1997; Liu et al., 2006; Fan et al., 2007; Kmetzsch et al., 2010; Kmetzsch et al., 2013; Chow et al., 2017; Squizani et al., 2018).

1.7 Biologia de sistemas e a exploração de alvos

Inicialmente, os tratamentos empregados em indivíduos acometidos por alguma enfermidade eram predominantemente baseados em tentativa e erro da aplicação de produtos naturais. Com o avanço científico na área, os princípios ativos presentes em fontes naturais puderam ser purificados e também novos químicos foram sintetizados (Butcher et al. 2004, Danhof et al., 2018). Na segunda metade do século 20, o avanço na pesquisa de novos tratamentos para doenças seguiu uma lógica de único alvo e único fármaco, resultando em considerável

progresso na área, como por exemplo, o desenvolvimento do anti-hipertensivo propranolol (Danhof et al. 2018). Atualmente, essa é ainda a abordagem mais utilizada para a seleção de drogas e delineamento de novos tratamentos, porém hoje é considerada reducionista (Martinez-Mayorga et al., 2020). Este tipo de abordagem tem se mostrado estagnada, com reduzido número de novos fármacos aprovados e novos alvos identificados (Butcher, 2005; Maggiora, 2011, Danhof et al. 2018). Tratamentos com um único fármaco e único alvo são muitas vezes ineficientes ou insuficientes frente à robustez de sistemas biológicos (Maggiora, 2011; Kell, 2013). Nesse sentido, uma visão mais abrangente de sistemas biológicos complexos se faz necessária para o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos (Kell, 2013, Danhof et al. 2018). A construção dessa visão mais completa tem avançado na última década pelo significativo aumento na geração de dados multi-ômicos, e integração de informação biológica pela aplicação de biologia de sistemas (Pinu et al., 2019). Uma mudança de perspectiva para análise de múltiplos fármacos e múltiplos alvos vem acontecendo, sendo a integração de ômicas e biologia de sistemas apontadas como importantes ferramentas neste contexto (Maggiora, 2011). Esta nova mudança de paradigma é denominada *systems therapeutics*, a qual tem como alvo redes biológicas com foco no estudo de processos da doença (Danhof et al., 2018).

O melhor entendimento de intrincadas redes biológicas se faz necessário para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Considerando os atuais tratamentos para a criptococose e suas limitações abordadas anteriormente, os componentes da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina representam potenciais alvos de investigação para delineamento de novos e eficientes tratamentos para a criptococose.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Explorar a via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina no intuito de caracterizar componentes não canônicos essenciais para a virulência de *C. neoformans*.

2.2 Objetivos específicos

- I. Análise de expressão diferencial de dados brutos de RNA-seq dos mutantes nulos *cna1*, *crz1* e *pmc1*, componentes da via de sinalização cálcio-calcineurina;
- II. Montagem de redes de interação das proteínas oriundas dos genes diferencialmente expressos por cada mutante selecionado;
- III. Análises topológicas e funcionais das redes de interação e seleção de alvo;
- IV. Análises de expressão diferencial do alvo selecionado como potencial novo componente da via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em *C. neoformans*.

4. Discussão

A importância e o impacto que análises integradas de dados ômicos e biologia de sistemas podem ter na compreensão de sistemas biológicos complexos é de grande relevância (Maggiora, 2011; Pinu et al., 2019). Esse tipo de abordagem conjunta tem sido considerada essencial para a procura de novos fármacos e desenvolvimento de tratamentos inovadores para diferentes doenças (Kell, 2013; Maggiora, 2011).

A via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina foi extensamente estudada e associada à sobrevivência e virulência de microrganismos eucariotos patogênicos (revisado por Park et al., 2019). Apesar da conservação dos principais componentes dessa via entre diferentes espécies fúngicas, há ampla variação de alvos (revisado por Park et al., 2019). Em *C. neoformans*, os produtos gênicos chave desta via são essenciais para a virulência em modelos murinos de infecção. Além disso, foi ainda constatado que a deleção de componentes específicos leva à desregulação da homeostase de cálcio, defeitos de formação capsular e secreção de GXM, menor sobrevivência em macrófagos murinos, sensibilidade a inibidores da calcineurina e a estresse osmótico de retículo endoplasmático (Odom et al., 1997; Liu et al., 2006; Fan et al., 2007; Kmetzsch et al., 2010; Kmetzsch et al., 2013; Chow et al., 2017; Squizani et al., 2018). Além disso, existem muitos genes calcineurina-Crz1 dependentes não caracterizados funcionalmente na cascata de sinalização em *C. neoformans* (Chow et al. 2017). Com relação aos atuais tratamentos para a meningoencefalite criptocócica, existem limitações que destacam a necessidade de desenvolvimento de novas intervenções eficientes que sejam mais acessíveis e com baixa toxicidade (Juvvadi et al., 2017; Rajasingham et al., 2017; Park et al., 2019; Wall & Lopez-Ribot, 2020).

Considerando-se esse cenário, o presente trabalho empregou um fluxo integrado de análises bioinformáticas e experimentais com o objetivo de explorar a complexa cascata de sinalização cálcio-calcineurina em *C. neoformans*. O presente estudo selecionou o gene *CNAG_00522* como um ponto de partida para análise de componentes não canônicos associados com a via de sinalização

cálcio-calcineurina que ainda não foram caracterizados. O resultado associado ao domínio conservado presente na região codificadora deste gene mostrou que, além de possivelmente ser responsivo a sinais de Ca^{2+} , também pode estar ligado a formação de vesículas (Lu et al., 2020). A cápsula polissacarídica tem função moduladora imunológica, sendo esse controle relacionado a secreção de um de seus principais componentes, a GXM (Rodrigues et al., 2008, 2007; Zaragoza et al., 2009). Mutantes dos transportadores vacuolares de cálcio Vcx1 e Pmc1 apresentam menor secreção de GXM comparado a linhagens selvagens (Kmetzsch et al., 2010, 2013). Levando em consideração o domínio conservado identificado na região codificadora de *CNAG_00522*, o papel dos polissacarídeos secretados como imunoreguladores, e a potencial conexão da via de estudo com a secreção desse polissacarídeo, é possível que o alvo selecionado possa desempenhar alguma função no processo de secreção que auxilie o patógeno na modulação da resposta imune hospedeira. Entretanto, estudos funcionais complementares ainda são necessários para avaliação do papel de *CNAG_00522* na formação e/ou secreção de vesículas contendo GXM. Os dados transcritômicos disponíveis no banco de dados FungiDB sugerem que este gene pode ser importante para a sobrevivência e adaptação de *C. neoformans* no ambiente hospedeiro (Derengowski et al., 2013; Chen et al., 2014; Trevijano-Contador et al., 2018). O alvo selecionado apresentou expressão positivamente regulada em meio de indução de células de gigantes (Trevijano-Contador et al., 2018). Este morfotipo é considerado um determinante de virulência, e confere resistência ao ambiente hospedeiro (Griffiths et al., 2012; Denham & Brown, 2018). *CNAG_00522* também apresentou modulação positiva de expressão em condições de interação com a ameba *Acanthamoeba castellanii*, um predador natural da levedura (Derengowski et al., 2013), bem como em condição *in vivo* no líquido cefalorraquidiano (CSF) de pacientes (Chen et al., 2014). Esses dados reforçam que *CNAG_00522* é potencialmente importante para a sobrevivência tanto no hospedeiro quanto no ambiente. A análise de centralidade revelou que *CNAG_00522* é um gene *bottleneck* na rede obtida para as análises do mutante *cna1*. Proteínas *bottleneck* normalmente representam conectores importantes que podem ter um papel essencial em redes biológicas (Yu et al., 2007). Nesse

sentido, é possível que esse gene conecte processos essenciais para a adaptação de *C. neoformans* a diferentes estresses. O ambiente hospedeiro impõe desafios à sobrevivência da levedura através de processos como estresse oxidativo e restrição nutricional (Griffiths et al., 2012). Os resultados das análises de enriquecimento funcional das redes evidenciaram ontologias relacionadas a esses tipos de estresse em relação ao alvo e seus interatores. Além disto, resultados preliminares de RT-qPCR evidenciaram que a expressão de *CNAG_00522* é possivelmente termoregulada, uma vez que os níveis de expressão desse gene são maiores em culturas a 37°C em comparação a 25°C. Ainda, os níveis transcricionais de *CNAG_00522* nos mutantes *crz1* são significativamente maiores em relação à linhagem selvagem, o que sugere que *Crz1* é um regulador negativo desse gene. Porém, *CNAG_00522* não foi identificado como diferencialmente expresso em nossas análises de expressão diferencial, possivelmente por variações nas condições de cultivo utilizadas. Constatamos ainda que a expressão de *CNAG_00522* depende da presença do transportador de cálcio vacuolar *Pmc1*, validando os resultados obtidos na análise de expressão diferencial.

Ensaio funcionais serão necessários para comprovar a participação de *CNAG_00522* na via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina e virulência de *C. neoformans*.

5. Conclusões

- A expressão de CNAG_00522 é modulada pela atividade de *PMC1* e *CNA1*;
- O produto gênico de CNAG_00522 e seus potenciais interatores diretos e indiretos estão relacionados a ontologias de processos basais celulares como estresse oxidativo, metabolismo de carboidratos e produção de energia;
- Crz1 é um regulador negativo da expressão de CNAG_00522, em condições dependentes de temperatura.
- A expressão de CNAG_00522 é positivamente regulada em temperatura fisiológica do hospedeiro humano.
- A potencial região regulatória de CNAG_00522 possui motivos de ligação para os fatores de transcrição Crz1 e Pdr802.

6. Perspectivas

Realizar a caracterização funcional completa de CNAG_00522 na via de sinalização cálcio calcineurina em *C. neoformans*, pela execução dos seguintes objetivos:

- Construir uma linhagem *knockout* e complementada para o gene CNAG_00522 em *C. neoformans* H99;
- Avaliar fenótipos de estresse associados com a deleção de CNAG_00522 e a via cálcio-calcineurina;
- Determinar o perfil de expressão de CNAG_00522 em condições de ativação e inibição da via cálcio-calcineurina;
- Verificar o papel de CNAG_00522 na formação de vesículas e células gigantes;
- Avaliar o perfil de virulência das linhagens selvagem e mutantes em modelo de *Galleria mellonella* e murino;
- Propor um mecanismo de ação de CNAG_00522 durante a interação com células hospedeiras por *dual* RNA-seq.

7. Referências

- Abassi, M., Boulware, D. R., & Rhein, J. (2015). Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(2), 90–99.
- Aksenov SI, Babyeva IP, Golubev VI. (1973). On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. *Life Sciences and Space Research.*;11:55-61.
- Bermas, A., & Geddes-McAlister, J. (2020). Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 114(5), 721–734. <https://doi.org/10.1111/mmi.14565>
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*, 3(4). <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
- Buchanan, K. L., & Murphy, J. W. (1998). What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerging Infectious Diseases*, 4(1), 71–83.
- Butcher, E.C., Berg, E.L., Kunkel, E.J. (2004). Systems biology in drug discovery. *Nat. Biotechnol.* 22, 1253–1259. <https://doi.org/10.1038/nbt1017>
- Canteros CE, Rodero L, Rivas MC, Davel G. (1996) A rapid urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*.136(1):21-3. doi: 10.1007/BF00436656. PMID: 9144954.
- Chayakulkeeree, M., Johnston, S. A., Oei, J. B., Lev, S., Williamson, P. R., Wilson, C. F., Zuo, X., Leal, A. L., Vainstein, M. H., Meyer, W., Sorrell, T. C., May, R. C., & Djordjevic, J. T. (2011). SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 80(4), 1088–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07632.x>
- Chen, S. C. A., Wright, L. C., Santangelo, R. T., Muller, M., Moran, V. R., Kuchel, P. W., & Sorrell, T. C. (1997). Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 65(2), 405–411. <https://doi.org/10.1128/iai.65.2.405-411.1997>
- Chen, Y., Toffaletti, D. L., Tenor, J. L., Litvintseva, A. P., Fang, C., Mitchell, T. G., McDonald, T. R., Nielsen, K., Boulware, D. R., Bicanic, T., & Perfect, J. R. (2014). The *Cryptococcus neoformans* transcriptome at the site of human meningitis. *MBio*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01087-13>
- Chow, E. W. L., Clancey, S. A., Billmyre, R. B., Averette, A. F., Granek, J. A., Mieczkowski, P., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2017). Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Genetics*, 13(4), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006667>

- Cordero, R. J. B., Robert, V., Cardinali, G., Arinze, E. S., Thon, S. M., & Casadevall, A. (2018). Impact of Yeast Pigmentation on Heat Capture and Latitudinal Distribution. *Current Biology*, 28(16), 2657-2664.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.034>
- Cox, G. M., McDade, H. C., Chen, S. C. A., Tucker, S. C., Gottfredsson, M., Wright, L. C., Sorrell, T. C., Eidich, S. D., Casadevall, A., Ghannoum, M. A., & Perfect, J. R. (2001). Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 39(1), 166–175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x>
- Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 68(2), 443–448. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.443-448.2000>
- Cruz, M. C., Del Poeta, M., Wang, P., Wenger, R., Zenke, G., Quesniaux, V. F. J., Movva, N. R., Perfect, J. R., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2000). Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1), 143–149. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.143-149.2000>
- Cui, J., Kaandorp, J. A., Ositelu, O. O., Beaudry, V., Knight, A., Nanfack, Y. F., & Cunningham, K. W. (2009). Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast. *Cell Calcium*, 45(2), 123–132.
- Danhof, M., Klein, K., Stolk, P., Aitken, M., Leufkens, H. (2018). The future of drug development: the paradigm shift towards systems therapeutics. *Drug Discov. Today* 23, 1990–1995. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.002>
- de Melo, A. T., Martho, K. F., Roberto, T. N., Nishiduka, E. S., Machado, J., Brustolini, O. J. B., Tashima, A. K., Vasconcelos, A. T., Vallim, M. A., & Pascon, R. C. (2019). The regulation of the sulfur amino acid biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans*: the relationship of Cys3, Calcineurin, and Gpp2 phosphatases. *Scientific Reports*, 9(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48433-5>
- Denham, S. T., & Brown, J. C. S. (2018). Mechanisms of pulmonary escape and dissemination by *cryptococcus neoformans*. *Journal of Fungi*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/jof4010025>
- Derengowski, L. da S., Paes, H. C., Albuquerque, P., Tavares, A. H. F. P., Fernandes, L., Silva-Pereira, I., & Casadevall, A. (2013). The transcriptional response of *cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. *Eukaryotic Cell*, 12(5), 761–774. <https://doi.org/10.1128/EC.00073-13>
- Djordjevic, J. T. (2010). Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, 1(NOV), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00125>

- Evans, R. J., Li, Z., Hughes, W. S., Djordjevic, J. T., Nielsen, K., & May, R. C. (2015). Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection. *Infection and Immunity*, 83(4), 1296–1304. <https://doi.org/10.1128/IAI.03104-14>
- Fan, W., Idnurm, A., Breger, J., Mylonakis, E., & Heitman, J. (2007). Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 75(7), 3394–3405. <https://doi.org/10.1128/IAI.01977-06>
- Fox, D. S., Cruz, M. C., Sia, R. A. L., Ke, H., Cox, G. M., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2001). Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 39(4), 835–849. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02295.x>
- Fu, M. S., Coelho, C., De Leon-Rodriguez, C. M., Rossi, D. C. P., Camacho, E., Jung, E. H., Kulkarni, M., & Casadevall, A. (2018). *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144>
- Ganendren, R., Carter, E., Sorrell, T., Widmer, F., & Wright, L. (2006). Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and Infection*, 8(4), 1006–1015. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.018>
- García-Rodas, R., & Zaragoza, O. (2012). Catch me if you can: Phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 64(2), 147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00871.x>
- Griffiths, E. J., Kretschmer, M., & Kronstad, J. W. (2012). Aimless mutants of *Cryptococcus neoformans*: Failure to disseminate. *Fungal Biology Reviews*, 26(2–3), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.02.004>
- Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E. S., & Shinoda, T. (2003). Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiology and Immunology*, 47(4), 271–277. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x>
- Johnston, S. A., & May, R. C. (2013). *Cryptococcus* interactions with macrophages: Evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cellular Microbiology*, 15(3), 403–411. <https://doi.org/10.1111/cmi.12067>
- Juvvadi, P. R., Lee, S. C., Heitman, J., & Steinbach, W. J. (2017). Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence*, 8(2), 186–197. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1201250>
- Kechichian, T. B., Shea, J., & Del Poeta, M. (2007). Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient

- mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infection and Immunity*, 75(10), 4792–4798. <https://doi.org/10.1128/IAI.00587-07>
- Kell, D. B. (2013). Finding novel pharmaceuticals in the systems biology era using multiple effective drug targets, phenotypic screening and knowledge of transporters: Where drug discovery went wrong and how to fix it. *FEBS Journal*, 280(23), 5957–5980. <https://doi.org/10.1111/febs.12268>
- Kmetzsch, Livia, Staats, C. C., Cupertino, J. B., Fonseca, F. L., Rodrigues, M. L., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2013). The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. *FEBS Journal*, 280(19), 4853–4864. <https://doi.org/10.1111/febs.12458>
- Kmetzsch, Lívia, Staats, C. C., Simon, E., Fonseca, F. L., de Oliveira, D. L., Sobrino, L., Rodrigues, J., Leal, A. L., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). The vacuolar Ca²⁺ exchanger vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺ tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 9(11), 1798–1805. <https://doi.org/10.1128/EC.00114-10>
- Kozel, T. R., & Mastroianni, R. P. (1976). Inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis. *Infection and Immunity*, 14(1), 62–67.
- Kozel TR, Gotschlich EC. (1982) The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol*. Oct;129(4):1675-80. PMID: 7050244.
- Kozubowski, L., Lee, S. C., & Heitman, J. (2009). Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cellular Microbiology*, 11(3), 370–380. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01273.x>
- Kraus, P. R., Boily, M. J., Giles, S. S., Stajich, J. E., Allen, A., Cox, G. M., Dietrich, F. S., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2004). Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1249–1260. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1249-1260.2004>
- Kraus, P. R., Nichols, C. B., & Heitman, J. (2005). Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryotic Cell*, 4(6), 1079–1087. <https://doi.org/10.1128/EC.4.6.1079-1087.2005>
- Kwon-chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z. A., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4, a019760.
- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I., & Popkin, T. J. (1982). Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *Journal of Bacteriology*, 150(3), 1414–1421. <https://doi.org/10.1128/jb.150.3.1414-1421.1982>

- Kwon-Chung, Kyung J., Bennett, J. E., Wickes, B. L., Meyer, W., Cuomo, C. A., Wollenburg, K. R., Bicanic, T. A., Castañeda, E., Chang, Y. C., Chen, J., Cogliati, M., Dromer, F., Ellis, D., Filler, S. G., Fisher, M. C., Harrison, T. S., Holland, S. M., Kohno, S., Kronstad, J. W., ... Casadevall, A. (2017). The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *MSphere*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1128/msphere.00357-16>
- Lev, S., Desmarini, D., Chayakulkeeree, M., Sorrell, T. C., & Djordjevic, J. T. (2012). The Crz1/Sp1 Transcription Factor of *Cryptococcus neoformans* Is Activated by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051403>
- Lin, X., & Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, 60, 69–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>
- Liu, L., Tewari, R. P., & Williamson, P. R. (1999). Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 67(11), 6034–6039. <https://doi.org/10.1128/iai.67.11.6034-6039.1999>
- Liu, M., Du, P., Heinrich, G., Cox, G. M., & Gelli, A. (2006). Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1788–1796. <https://doi.org/10.1128/EC.00158-06>
- 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. *Eukaryotic Cell*, 14(4), 324–334. <https://doi.org/10.1128/EC.00271-14>
- Liu, T. B., Perlin, D. S., & Xue, C. (2012). Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence*, 3(2), 173–181. <https://doi.org/10.4161/viru.18685>
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D265–D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
- Maggiora, G. M. (2011). The reductionist paradox: Are the laws of chemistry and physics sufficient for the discovery of new drugs? *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 25(8), 699–708. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9447-8>
- Martinez-Mayorga, K., Madariaga-Mazon, A., Medina-Franco, J. L., & Maggiora, G. (2020). The impact of chemoinformatics on drug discovery in the pharmaceutical industry. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(3), 293–306. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1696307>
- Maruvada, R., Zhu, L., Pearce, D., Zheng, Y., Perfect, J., Kwon-Chung, K. J., & Kim, K. S. (2012). *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host

- cell Rac1 for traversal across the blood-brain barrier. *Cellular Microbiology*, 14(10), 1544–1553. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01819.x>
- May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T., & Nielsen, K. (2016). Cryptococcus: From environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 106–117. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>
- Mednick, A. J., Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2005). Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infection and Immunity*, 73(4), 2012–2019.
- Mitchell T, Castañeda E, Nielsen K, Wanke B, Lazéra M. (2011). Environmental Niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, p 237-259. In Heitman J, Kozel T, Kwon-Chung K, Perfect J, Casadevall A (ed), *Cryptococcus*. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555816858.ch18
- Molloy, S. F., Chiller, T., Greene, G. S., Burry, J., Govender, N. P., Kanyama, C., Mfinanga, S., Lesikari, S., Mapoure, Y. N., Kouanfack, C., Sini, V., Temfack, E., Boulware, D. R., Dromer, F., Denning, D. W., Day, J., Stone, N. R. H., Bicanic, T., Jarvis, J. N., ... Loyse, A. (2017). Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(6), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005575>
- Nurudeen, T. A., & Ahearn, D. G. (1979). Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(5), 724–729. <https://doi.org/10.1128/jcm.10.5.724-729.1979>
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(1), 156–161. <https://doi.org/10.1128/aac.41.1.156>
- Odom, Audrey, Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D. L., Perfect, J., & Heitman, J. (1997). Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO Journal*, 16(10), 2576–2589. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2576>
- Olszewski, M. A., Noverr, M. C., Chen, G. H., Toews, G. B., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Huffnagle, G. B. (2004). Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *American Journal of Pathology*, 164(5), 1761–1771. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63734-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63734-0)
- Park, H. S., Chow, E. W. L., Fu, C., Soderblom, E. J., Moseley, M. A., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2016). Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. *PLoS Pathogens*, 12(9), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005873>
- Park, H. S., Lee, S. C., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2019). Calcium-Calmodulin-Calcineurin Signaling: A Globally Conserved Virulence Cascade in Eukaryotic Microbial Pathogens. *Cell Host and Microbe*, 26(4), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.004>

- Pinu, F. R., Beale, D. J., Paten, A. M., Kouremenos, K., Swarup, S., Schirra, H. J., & Wishart, D. (2019). Systems biology and multi-omics integration: Viewpoints from the metabolomics research community. *Metabolites*, 9(4), 1–31. <https://doi.org/10.3390/metabo9040076>
- Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q. D., Kraus, P. R., Boily, M. J., Davis, M. J., Giles, S. S., Cox, G. M., Heitman, J., & Alspaugh, J. A. (2005). Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. *Eukaryotic Cell*, 4(1), 190–201. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.190-201.2005>
- Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A., & Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(8), 873–881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
- Rodrigues, M. L., & Albuquerque, P. C. (2018). Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(6), 1–5.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., Casadevall, A., 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot. Cell* 7, 58–67. <https://doi.org/10.1128/EC.00370-07>
- Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M., Casadevall, A., 2007. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot. Cell* 6, 48–59. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-06>
- Rosa e Silva, L. K., Staats, C. C., Goulart, L. S., Morello, L. G., Pelegrinelli Fungaro, M. H., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2008). Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Research in Microbiology*, 159(3), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.006>
- Rosas, Á. L., & Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiology Letters*, 153(2), 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00239-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00239-5)
- Roy, A., Kumar, A., Baruah, D., & Tamuli, R. (2020). Calcium signaling is involved in diverse cellular processes in fungi. *Mycology*, 00(00), 1–15.
- Salas, S. D., Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., & Williamson, P. R. (1996). Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of experimental medicine*, 184(2), 377–386. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.377>

- Shi, M., Li, S. S., Zheng, C., Jones, G. J., Kim, K. S., Zhou, H., Kubes, P., & Mody, C. H. (2010). Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(5), 1683–1693. <https://doi.org/10.1172/JCI41963>
- Sloan, D. J., & Parris, V. (2014). Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. *Clinical Epidemiology*, *6*(1), 169–182. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S38850>
- Soares, E. A., Lazera, M. dos S., Wanke, B., Faria Ferreira, M. de, Carvalhaes de Oliveira, R. V., Oliveira, A. G., & Coutinho, Z. F. (2019). Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012 A descriptive epidemiological study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007569>
- Squizani, E. D., Oliveira, N. K., Reuwsaat, J. C. V., Marques, B. M., Lopes, W., Gerber, A. L., de Vasconcelos, A. T. R., Lev, S., Djordjevic, J. T., Schrank, A., Vainstein, M. H., Staats, C. C., & Kmetzsch, L. (2018). Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. *Cellular Microbiology*, *20*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1111/cmi.12803>
- Stempinski, P. R., Zielinski, J. M., Dbouk, N. H., Huey, E. S., McCormack, E. C., Rubin, A. M., Chandrasekaran, S., & Kozubowski, L. (2020). Genetic contribution to high temperature tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *Oxford University Press*.
- Taylor-Smith, L. M., & May, R. C. (2016). New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. *Current Opinion in Microbiology*, *34*(Figure 1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.018>
- Trevijano-Contador, N., de Oliveira, H. C., García-Rodas, R., Rossi, S. A., Llorente, I., Zaballos, Á., Janbon, G., Ariño, J., & Zaragoza, Ó. (2018). *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007007>
- van Duin, D., Casadevall, A., & Nosanchuk, J. D. (2002). Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(11), 3394–3400. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3394>
- Wall, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2020). Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. *Antibiotics*, *9*(8), 1–10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080445>
- Wang, Y., & Casadevall, A. (1994). Decreased Susceptibility of Melanized *Cryptococcus neoformans* to UV Light. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *60*(10), 3864–3866.
- Yu, H., Kim, P. M., Sprecher, E., Trifonov, V., & Gerstein, M. (2007). The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. *PLoS Computational Biology*, *3*(4), 713–720. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030059>

- Zaragoza, O. (2019). Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*, *10*(1), 490–501. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383>
- Zaragoza, O., Chrisman, C. J., Castelli, M. V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L., & Casadevall, A. (2008). Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cellular Microbiology*, *10*(10), 2043–2057.
- Zaragoza O, Nielsen K. (2013). Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr Opin Microbiol*. Aug;16(4):409-13. doi: 10.1016/j.mib.2013.03.006.
- Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., & Casadevall, A. (2009). Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 68, Issue 09). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01204-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01204-0)
- Zavala, S., & Baddley, J. W. (2020). Cryptococcosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *41*, 69–79.
- Zimmer, B. L., & Roberts, G. D. (1979). Rapid selective urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, *10*(3), 380–381. <https://doi.org/10.1128/jcm.10.3.380-381.1979>