

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

**Avaliação da modulação da atividade de macrófagos por infecção de
Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* – alterações na via de
sinalização mTOR**

Dissertação de Mestrado

Alícia Corbellini Piffer

Porto Alegre, março de 2017

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

**Avaliação da modulação da atividade de macrófagos por infecção de
Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* – alterações na via de
sinalização mTOR**

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.

Alícia Corbellini Piffer

Orientador: Dr. Charley Christian Staats

Porto Alegre, março de 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Charley, pelo auxílio ao longo deste trabalho, pelo apoio, paciência e por todos os ensinamentos. Tenho certeza que nossa colaboração não acaba neste trabalho.

A professora Marilene Henning Vainstein que me acolheu no laboratório e me apoiou desde o início da iniciação científica. Ao professor Augusto pelos ensinamentos e ideias desde o início da formação no laboratório.

A Lívia, que me acompanhou durante toda a minha formação, além de ser minha comissão de acompanhamento, por me ajudar em momentos que precisei de auxílio.

Ao professor Dr. Henrique Ferreira, membro da comissão de acompanhamento.

Aos amigos maravilhosos que encontrei no laboratório, Francine, Júlia, Nicole, Ane, Amanda, Heryk, Solon, Uriel, Ângela, Kullminho, Rafa, Thais, Vanessinha, Nico, Jack pela parceria de sempre, pelas risadas, por fazerem os dias ruins ficarem muito mais divertidos e por todos os ensinamentos de vida. Agradecimento especial a Fran, pelo apoio, paciência e auxílio na realização de todas as etapas deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório 220 e 217, pela ajuda sempre que precisei e pela convivência diária. Todos vocês contribuíram com a realização deste trabalho e acrescentaram muito em mim.

As minhas lindonas, Belisa e Djenifer, por estarem sempre presentes na minha vida. Vocês são demais e fazem parte especial nesta conquistas.

Aos meus pais e minha irmã, por acreditarem sempre em mim, me apoiarem em todas as minhas decisões e pelo amor incondicional que eu recebo todos os dias de vocês. Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao Paulo, pelo companheirismo de sempre, por tornar esta etapa muito mais tranquila e por acreditar sempre no meu potencial e me ajudar a voar mais longe.

Ao PPGBCM e CBIOT pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento da minha formação. As agências de fomento CNPq e CAPES.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e unidades	6
Lista de Figuras.....	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 Introdução	11
1.1 <i>Cryptococcus</i> spp.....	11
1.2 Criptococose	14
1.3 Fatores de virulência	18
1.3.1 Cápsula polissacarídica.....	21
1.4 Criptococose e resposta imune	23
1.4.1 Macrófagos.....	24
1.4.2 <i>C. neoformans</i> x <i>C. gattii</i> na resposta imune.....	27
1.5 Via de sinalização TOR	29
1.5.1 Via mTOR e imunidade.....	31
2 Objetivos	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA a BMC Genomics	35
4 Conclusões.....	80
5 Perspectivas.....	81
6 Referências	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
CCR2	receptor de quimiocina CC 2
cDNA	DNA complementar
CO ₂	dióxido de carbono
DEGs	genes diferencialmente expressos (<i>differentially expressed genes</i>)
DNA	ácido desoxirribonucléico
FDR	taxa de descoberta falsa (<i>false discovery rate</i>)
GalXM	galactoxilomanana
GM-CSF	fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
GXM	glucuronoxilomanana
HIV	vírus da imunodeficiência humana (<i>human immunodeficiency virus</i>)
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-17A	interleucina 17A
IL-18	interleucina 18
IL-21	interleucina 21
IL-22	interleucina 22
INF- γ	interferon gama
iNOS	óxido nítrico sintase induzível (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
LPS	lipopolissacarídeo
M1	macrófagos tipo 1

M2	macrófagos tipo 2
MHC	complex maior de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
mTOR	alvo mamífero da rapamicina (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
NO	óxido nítrico
PAMPs	padrões moleculares associados aos patógenos
pH	potencial hidrogeniônico
PRRs	receptores reconhecedores de padrões
RNA	ácido ribonucléico
ROS	espécies reativas de oxigênio
SNC	sistema nervoso central
Th1	linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2	linfócitos T auxiliares tipo 2
Th17	linfócitos T auxiliares tipo 17
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
TLR	receptor do tipo toll
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TORC1	complexo TOR 1
TORC2	complexo TOR 2
var	variedade
VG	variedade <i>gattii</i> (<i>variety gattii</i>)
VN	variedade <i>neoformans</i> (<i>variety neoformans</i>)
WT	tipo selvagem (<i>wild type</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução das espécies patogênicas do gênero <i>Cryptococcus</i> : sorotipos e subtipos moleculares.....	13
Figura 2: Rota de infecção de <i>Cryptococcus</i> spp.....	15
Figura 3: Possíveis resultados após a fagocitose de <i>Cryptococcus</i> spp.	17
Figura 4: Via de sinalização mTOR.....	29

RESUMO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são os agentes etiológicos da criptococose, micose sistêmica que afeta principalmente os pulmões e o sistema nervoso central. O processo infeccioso inicia com a inalação de células de *Cryptococcus* e deposição nos alvéolos pulmonares, onde uma complexa interação com macrófagos inicia. Esta interação normalmente resulta na inibição da função de macrófagos podendo acarretar em apoptose das células de defesa. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar vias e genes em macrófagos afetados pela infecção por *C. neoformans* e *C. gattii*. Para isso, foi realizada uma análise transcricional comparativa para avaliar mudanças em macrófagos expostos a *C. neoformans* e *C. gattii*. Macrófagos pré-ativados da linhagem J774.A1 foram infectados com *C. neoformans* linhagem H99 e *C. gattii* linhagem R265 por 6 horas. O RNA poli-adenilado destes macrófagos foi purificado e submetido a sequenciamento no sistema Ion PGM, no qual foi detectada a expressão alterada em cerca de 40 genes de J774.A1 pela presença de ambas leveduras. Esses genes diferencialmente expressos foram usados como dados de entrada no programa String 10, gerando duas diferentes redes com mais 700 proteínas. Essas redes foram analisadas no programa Cytoscape 2.8.3 e observamos que a maioria dos bioprocessos que apresentavam pelo menos um gene diferencialmente expresso estavam relacionadas com a via Akt/mTOR. Para a confirmação dos dados de RNAseq, nós realizamos qRT-PCRs dos genes dos macrófagos envolvidos com esta via. Todos os genes apresentaram redução da expressão após 24 horas de interação com as células fúngicas. Também realizamos análises de *Western blot* para avaliar a expressão de Akt total, S6K total e fosforilada e GSK-3 β fosforilada em macrófagos pré-ativados J774.A1 após a incubação com as linhagens fúngicas. Observamos uma diminuição nos níveis de S6k e GSK-3 β fosforiladas após 24 horas de interação sugerindo que o mTORC1 apresenta uma menor atividade em macrófagos infectados com *C. neoformans* e *C. gattii*. Nossos resultados indicam que *C. neoformans* e *C. gattii* conseguem explorar a modulação de várias vias para potencialmente reduzir a atividade antifúngica destas células, uma vez que essa via está envolvida em processos chaves da resposta imune.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are the etiological causes of cryptococcosis, systemic mycosis that mainly affects the lungs and central nervous system. The infectious process for both species starts with the inhalation of yeast cells and deposition in lung alveoli, where a complex interaction of cryptococcal cells with macrophages takes place. This interaction normally results in the inhibition of macrophage function or even apoptosis. Therefore, the aim of this project was to evaluate pathways and genes in macrophages affected by the *C. neoformans* and *C. gattii* infection. For that, a genome-scale comparative analysis of transcriptional changes in macrophages exposed to *C. neoformans* and *C. gattii* was conducted. Pre-activated J774.A1 macrophage cells were infected with *C. neoformans* H99 strain and *C. gattii* R265 strain for 6 hours. Poly(A) RNA was purified from macrophage cells and submitted to sequencing in an Ion PGM System. Transcriptome analysis revealed an altered expression of near 40 genes in j774.A1 by the presence of both yeasts. These differentially expressed genes were used as input in String 10, resulting in two different networks with more 700 proteins. These networks were analyzed in the Cytoscape 2.8.3 software and we notice that the major bioprocesses with at least one differentially expressed gene was related with de Akt/mTOR pathway. For the confirmation of the RNAseq data, we performed qRT-PCRs of macrophage genes that were involved in the mTOR pathway. All of the genes present reduction of the expression after 24 hours of incubation with the fungal cells. We also performed *Western blot* analysis for evaluate the expression of total AKT, total and phosphorylated S6K and phosphorylated GSK-3 β in pre-activated J774.A1 macrophages cells after the incubation with the same fungal strains. We observed a decrease in the levels of the phosphorylated proteins S6K e GSK-3 β after 24 hours of co-incubation suggesting that the mTORC1 present less activity in macrophages infected with *C. neoformans* and *C. gattii*. Our results indicate that *C. neoformans* and *C. gattii* can exploit the modulation of many pathways, between them the Akt/mTOR pathway. Using this strategy, fungal cells potentially reduce macrophage antifungal activities, once this pathway is involved in key processes in the immune response.

1 INTRODUÇÃO

A criptococcose é uma doença que acomete em torno de um milhão de indivíduos por ano em todo o mundo, causando cerca de 600.000 óbitos por ano, principalmente na África Sub-sahariana (Park *et al.*, 2009). No Brasil, o principal agente etiológico desta enfermidade, *Cryptococcus neoformans*, é isolado em torno de 51 % dos pacientes com AIDS que vão a óbito e apresentam micose sistêmica como condição associada, sendo que as regiões sul e sudeste apresentam predominância em casos de criptococcose (Prado *et al.*, 2009). A infecção, causada pelas leveduras *C. neoformans* e *Cryptococcus gattii*, tem início após a inalação de esporos ou leveduras dessecadas, encontradas em fontes ambientais, causando um foco primário no pulmão (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

No ambiente pulmonar, as leveduras de *C. neoformans* entram em contato com células epiteliais e macrófagos alveolares, considerados como a primeira linha de defesa contra este organismo (Osterholzer *et al.*, 2009; Brown, 2011). Neste contexto, os macrófagos, através da fagocitose e exposição a agentes microbicidas, tentam eliminar as células do patógeno e assim evitar a disseminação para o resto do organismo (Ghosn *et al.*, 2006; Leopold Wager *et al.*, 2016). Porém, as células patogênicas conseguem se replicar neste ambiente e, ainda, sair destas células sem causar alterações aparentes (Tucker e Casadevall, 2002; Alvarez e Casadevall, 2006).

Sendo assim, as células leveduriformes e os macrófagos do hospedeiro ficam em contato direto, o que já foi descrito que acarreta alguns danos a célula do hospedeiro (Coelho *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2015). Uma vez que essa interação causa modificações na célula fagocítica é de extrema importância tentar reconhecer mais profundamente as vias e genes que estão sendo alterados devido à presença das células leveduriformes de *C. gattii* e *C. neoformans*.

1.1 *Cryptococcus* spp.

Fungos são conhecidos causadores de enfermidades em humanos, tendo grande prevalência as infecções superficiais, as quais apresentam, geralmente, uma facilidade de cura (Havlickova et al., 2008). Entretanto, com um aumento na sobrevivência de pessoas com imunidade debilitada, tais como pacientes com AIDS e ou que fazem uso de imunossupressores, doenças fúngicas sistêmicas têm se tornado uma grande preocupação. Isto ocorre principalmente devido ao fato de sua alta mortalidade, a qual frequentemente está acima de 50 %, chegando a causar o óbito de 1,5 milhões de pessoas por ano. Dentre os gêneros dos fungos mais mortais estão: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* (Brown et al., 2012).

O gênero *Cryptococcus* inclui mais de 30 espécies ubiqüamente distribuídas no ambiente, sendo somente duas delas consideradas patogênicas: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* as quais são os agentes etiológicos da criptococose, doença sistêmica que tem como predileção os pulmões e sistema nervoso central (SNC) (Kwon-Chung et al., 2014). Este gênero pertence ao filo Basidimycota e já foi descrito apresentando diferentes morfologias – esporos, *shmoo*, pseudohifa, hifa, células gigantes e células leveduriformes de tamanho usual, sendo que células gigantes e predominantemente leveduras foram associadas à patogenicidade (Taylor-Smith e May, 2016). *C. neoformans* foi identificado como patógeno humano no final do século 19, mas somente a partir do final dos anos 70 passou a ser reconhecido como causa frequente de enfermidade humana (Knoke e Schwesinger, 1994; Maziarz e Perfect, 2016).

Sabe-se que *C. neoformans* e *C. gattii* emergiram de um ancestral comum e por muito tempo foram consideradas a mesma espécie, sendo *C. gattii* uma variedade de *C. neoformans* (Lin e Heitman, 2006). Entretanto, baseado em estudos filogenéticos e diferenças na ecologia, epidemiologia e biologia das mesmas, estas leveduras são agora consideradas espécies distintas (Kwon-Chung e Varma, 2006) (Figura 1).

A classificação das espécies é baseada em dois critérios: primeiro em subtipos sorológicos, na qual a separação é baseada nos antígenos presentes no polissacarídeo capsular das leveduras e, segundo, por critérios moleculares, tais como os padrões obtidos por PCR *fingerprinting* e análise por Polimorfismo de

tamanho de fragmento amplificado (AFLP) (Belay *et al.*, 1996; Sorrell *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2003). A espécie *C. neoformans* apresenta os sorotipos A e D e o híbrido AD. Isolados do sorotipo A podem ser ainda subclassificados em 3 tipos moleculares: VNI, VNII e VNB, representantes do sorotipo D são classificados como tipo molecular VNIV e aqueles associados ao sorotipo híbrido AD apresenta o tipo molecular VNIII. A espécie *C. gattii* apresenta os sorotipos B e C, sendo que representantes do sorotipo B são associados aos tipos moleculares VGI e VGII e do sorotipo C em VGIII e VGIV (Lin e Heitman, 2006) (Figura 1).

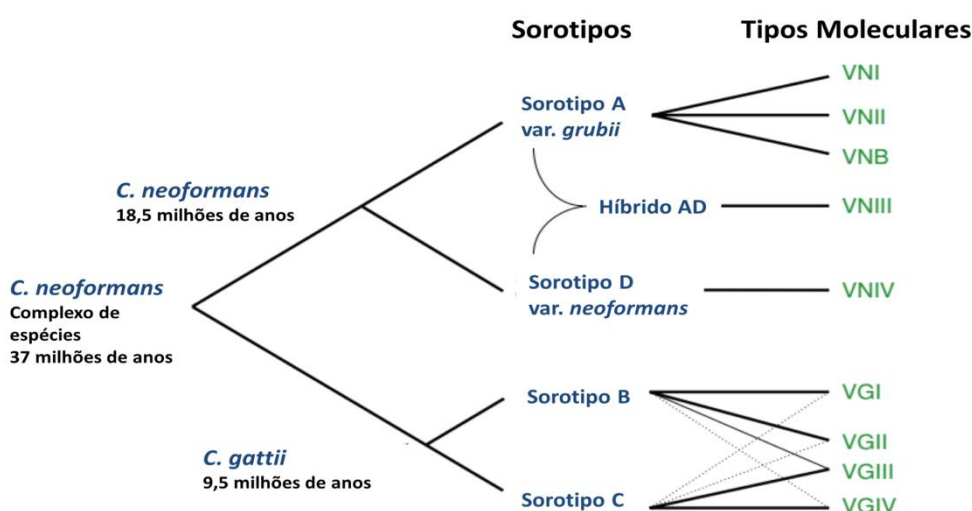


Figura 1: Evolução das espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus*: sorotipos e subtipos moleculares. As espécies patogênicas *C. neoformans* e *C. gattii* originaram-se de um ancestral comum. Elas são subdivididas em cinco sorotipos e nove genótipos. Adaptado de (Lin e Heitman, 2006).

Um novo estudo baseando-se em análises filogenéticas e na reconhecida heterogeneidade presente na virulência, preferência de hospedeiro e susceptibilidade a antifúngicos sugere que as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* sejam separadas em sete novas espécies. Sendo assim, *C. neoformans* var. *neoformans* passaria a ser chamada de *C. deneoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* seria *C. neoformans* e a espécie *C. gattii* seria separada conforme o tipo molecular: VGI seria *C. gattii*, VGIII seria *C. bacillisporus*, VGII seria *C. deuterogattii*, VGIV seria *C. tetragattii* e VGIV/VGIIIc seria *C. decagattii* (Hagen *et al.*, 2015). Entretanto, a comunidade científica tem manifestado contrária a esta nova nomenclatura (Kwon-Chung *et al.*, 2017). Durante a dissertação, será

utilizada a nomenclatura antiga, na qual a separação baseia-se em duas espécies.

Estes fungos apresentam distinções na sua ecologia e distribuições geográficas. O sorotipo A de *C. neoformans* apresenta uma distribuição mundial enquanto o sorotipo D foi primeiramente observado nos países Europeus (Maziarz e Perfect, 2016). Dentre os sorotipos de *C. neoformans*, o sorotipo A é o predominante entre as amostras clínicas, sendo responsável por mais de 95 % dos casos de criptococose ao redor do mundo (Lin e Heitman, 2006). Com relação a *C. gattii*, acreditava-se que este era um fungo endêmico apenas em regiões tropicais e subtropicais, tais como Austrália e América do Sul (Kwon-Chung e Bennett, 1984). Entretanto, em 1999, *C. gattii* foi responsável por um surto iniciado na ilha de Vancouver (Colúmbia Britânica, Canadá) que se disseminou para o Canadá e noroeste dos EUA (Oregon e Washington), as quais são regiões que apresentam um clima temperado (Macdougall *et al.*, 2007).

Entre os anos de 1999 – 2007 este surto foi responsável por atingir 218 indivíduos e causar a morte de 19 e entre os anos de 2004-2011, nos EUA, o surto afetou 100 pessoas e teve um índice de mortalidade de 33 % (Galanis *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2011). Dentre os casos documentados, 97 % destes foram causados pelo tipo molecular VGII, sendo que o subtipo VGIIa foi relacionado com 86,3 % dos casos na Colúmbia Britânica e 81 % dos casos em Oregon e Washington (Galanis *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2011). O subtipo VGIIa é considerado o mais virulento entre as espécies e com a mais baixa susceptibilidade a drogas antifúngicas (Trilles *et al.*, 2012; Lizarazo *et al.*, 2014).

1.2 Criptococose

A criptococose é uma doença sistêmica causada pelos fungos *C. neoformans* e *C. gattii*. Apesar de apresentar predileção pelo pulmão e sistema nervoso central, estes fungos também são capazes de afetar outros órgãos, tais como pele, ossos, glândula prostática, fígado, baço, nódulos linfáticos (Sabiiti e May, 2012). Esta enfermidade começou a tomar grandes proporções nos anos 70 por causa da sua associação com algumas malignidades, transplante de órgãos e

alguns tratamentos imunossupressivos e, nos anos 80 a incidência da doença aumentou devido a sua associação com HIV/AIDS (Hajjeh *et al.*, 1999; Maziarz e Perfect, 2016). Apesar da implementação da terapia antirretroviral ter diminuído a incidência de criptococose associada com HIV nas nações desenvolvidas, a prevalência, morbidade e mortalidade continuam altas em locais onde o acesso à terapia antirretroviral e outros cuidados médicos são escassos, especialmente na África Sub-sahariana e partes da Ásia (Bratton *et al.*, 2012; Maziarz e Perfect, 2016).

A rota de infecção inicia-se através da inalação de propágulos infecciosos, os quais são esporos ou leveduras dessecadas que, devido ao seu tamanho reduzido são capazes de alojar-se nos alvéolos pulmonares (Figura 2). Apesar do tamanho reduzido dos propágulos infecciosos, poucas células conseguem alcançar o alvéolo pulmonar, uma vez que precisam ultrapassar a barreira física do muco, ação ciliar e turbulência do ar (Shoham e Levitz, 2005). Mesmo assim, a inalação deste fungo por humanos é de grande ocorrência, sendo que 70 % das crianças com mais de cinco anos de idade em ambiente urbano, nos EUA, manifesta reatividade sorológica à *C. neoformans*, consistente com exposição primária (Goldman *et al.*, 2001).

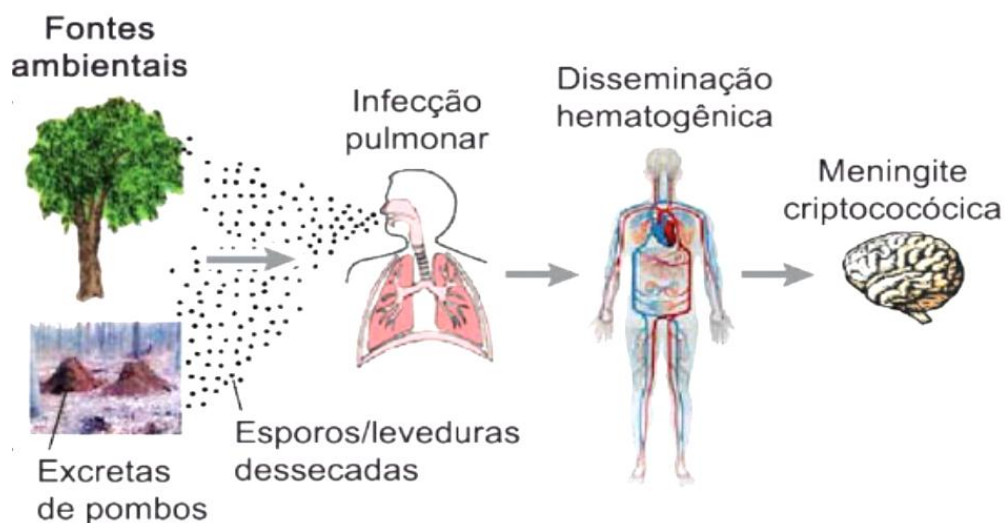


Figura 2: Rota de infecção de *Cryptococcus* spp. O fungo sobrevive no solo geralmente associado a árvores e excretas de pombos. A infecção ocorre por inalação de esporos ou células leveduriformes dessecadas, que se depositam nos alvéolos pulmonares, causando pneumonia, e podem se disseminar para outros órgãos por via hematogênica, dentre eles o sistema nervoso central causando uma forma mais grave da doença conhecida como meningoencefalite. Adaptado de (Lin e Heitman, 2006).

Os propágulos infecciosos encontram-se no ambiente e as diferentes espécies apresentam nichos distintos. Enquanto *C. neoformans* encontra-se usualmente em excretas de pombos, reservas ambientais como amebas, solo e árvores, *C. gattii* é preferencialmente encontrado em troncos de árvores de eucaliptos, em clima subtropical, e carvalhos e abetos em climas temperados (Emmons, 1955; Ellis e Pfeiffer, 1990; Lin e Heitman, 2006; Maziarz e Perfect, 2016).

Uma vez que o fungo alcança os alvéolos pulmonares vários resultados podem ocorrer os quais dependem da complexa interação entre o sistema imune do hospedeiro e os fatores de virulência expressos pelo patógeno. Sendo assim, a inalação do fungo pode resultar no (i) não desenvolvimento da doença, quando o patógeno consegue ser eliminado pelo sistema imune do hospedeiro; na (ii) infecção assintomática, na qual o patógeno entra em latência, formando granulomas (grandes massas inflamatórias, compostas por macrófagos, células gigantes nucleadas, ambas contendo leveduras no seu interior, e linfócitos CD4⁺), e pode ser reativado quando o hospedeiro torna-se imunocomprometido; na (iii) doença pulmonar, caracterizada pela presença de nódulos pulmonares e inflamação do órgão ou na (iv) doença disseminada, na qual o patógeno consegue entrar na corrente sanguínea e através deste alcançar outros órgãos (Sabiiti e May, 2012) (Figura 2).

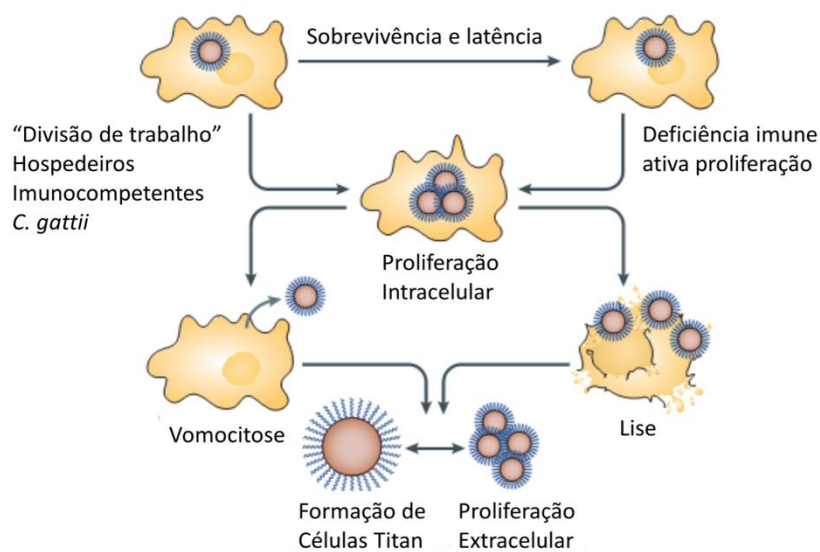


Figura 3: Possíveis resultados após a fagocitose de *Cryptococcus spp.* As leveduras *C. gattii* e *C. neoformans* são capazes de sobreviver na célula fagocítica e ficar um período de latência até conseguir se replicar intracelularmente, quando o organismo apresenta uma queda na imunidade. Algumas células de *C. gattii* também podem modificar sua mitocôndria, impulsionando a replicação das células vizinhas. Essas leveduras podem sair do hospedeiro causando lise ou sem causar dano aparente (vomocitose). No meio extracelular essas células podem proliferar-se ou aumentar de tamanho, formando as células gigantes. Adaptado de (May et al., 2016)

Nos alvéolos pulmonares, as células fúngicas encontram como primeira defesa os macrófagos alveolares, os quais possuem papel central na resposta imune (Shao et al., 2005). Além disso, existem fortes evidências de que as células epiteliais pulmonares conseguem induzir uma resposta imune localizada, através da secreção de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, além de servir como uma barreira física para exclusão dos propágulos infecciosos inalados (Bals e Hiemstra, 2004).

Os macrófagos utilizam o mecanismo de fagocitose e exposição à agentes causadores de danos, presentes no fagossomo, tais como baixo pH e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, com o objetivo de eliminar as células fúngicas (Ghosn et al., 2006; Leopold Wager et al., 2016). Entretanto, é descrito que estas espécies de patógenos são capazes de sobreviver dentro deste ambiente inóspito, podendo permanecer neste local por períodos de latência (Maziarz e Perfect, 2016). Uma vez que o hospedeiro apresente condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, geralmente relacionado com uma imunossupressão do hospedeiro, as células fúngicas são capazes de replicarem-se dentro das células fagocíticas e saírem causando, ou não, lise da célula mamífera (Tucker e Casadevall, 2002; Alvarez e Casadevall, 2006) (Figura 3).

Para que o fungo consiga alcançar o sistema nervoso central é necessário atravessar a barreira hematoencefálica. Foram descritas três maneiras utilizadas pelas leveduras para fazer essa migração: (i) por entre as células que formam a barreira hematoencefálica; (ii) atravessando intracelularmente as células endoteliais e (iii) pelo mecanismo conhecido como Cavalo de Tróia, no qual as células fúngicas usam macrófagos para conseguir alcançar o SNC (Sabiiti e May, 2012). Com relação ao último, evidências como o fato de que a depleção de macrófagos resulta em uma redução na invasão através da barreira hematoencefálica e mortalidade em camundongos suportam a importância deste

mecanismo para a migração do fungo (Kechichian *et al.*, 2007). Uma vez que o fungo consegue atravessar a barreira hematoencefálica, sua eliminação torna-se bastante difícil e os tratamentos muito agressivos (Coelho *et al.*, 2014).

C. neoformans é considerado um patógeno oportunista, causando doença em indivíduos que apresentem debilidade no sistema imunológico. Durante o curso da doença, apresenta alto grau de migração para o SNC, órgão de preferência de disseminação, causando os quadros mais severos de meningoencefalite e meningite. Provavelmente devido a este alto grau de migração não apresentam formação de cryptococomas, apresentando apenas pequenas lesões pulmonares (Bielska e May, 2016).

C. gattii é ainda considerado um patógeno primário, causando doença em indivíduos saudáveis bem como em paciente imunocomprometidos. Contudo, estudos recentes apontam que alguns fatores podem aumentar o risco de infecção, tais como fumo, uso de corticoides orais e idade avançada (Macdougall *et al.*, 2011). Além disso, a alta concentração de autoanticorpos contra o fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é um fator de risco para infecção do SNC por *C. gattii*, mas não por *C. neoformans* (Saijo *et al.*, 2014).

1.3 Fatores de virulência

Fatores de virulência são os mecanismos que permitem a sobrevivência e replicação do patógeno, defesa contra o ataque imune do hospedeiro e, conseqüentemente, a progressão para a doença (Coelho *et al.*, 2014). Embora as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentem várias diferenças, elas compartilham alguns fatores de virulência, os quais permitem a patogenicidade destes organismos.

Dentre esses fatores clássicos destaca-se a termotolerância, capacidade esta que torna possível a infecção em hospedeiros mamíferos e pode explicar a sua distribuição mundial (Martinez *et al.*, 2001; Perfect, 2006; Coelho *et al.*, 2014). A habilidade de *C. neoformans* e *C. gattii* de sobreviver e replicar em temperaturas elevadas pode ser considerado um dos principais fatores que

tornam essas leveduras patogênicas, uma vez que comparando com outros fungos filogeneticamente relativos, pode-se observar que estas outras espécies possuem outros fatores de virulência como a lacase e a cápsula polissacarídica, mas não causam doença por não conseguirem sobreviver na temperatura do hospedeiro (Petter *et al.*, 2001).

Outro fator relevante para a sobrevivência das células de *Cryptococcus spp.* no hospedeiro é a produção do composto melanina, sendo que a associação deste pigmento com a virulência não é exclusiva para *C. neoformans* e *C. gattii*, apresentando-se conservado em várias bactérias e fungos (Liu e Nizet, 2009). A melanina é capaz de estabilizar radicais livres, sendo assim um potente antioxidante protegendo o patógeno destes radicais produzidos pelo sistema imune (Wang e Casadevall, 1994). Além disso, consegue absorver a radiação eletromagnética, sendo esse mecanismo muito importante para proteção dos organismos de vida livre da radiação (Dadachova *et al.*, 2008). Este composto ainda contribui para a estrutura da parede celular, aumentando a rigidez da mesma (Williamson, 1997). A enzima produtora de melanina é a enzima lacase, que além de produzir este pigmento, possui atividade oxidase dependente de ferro, o que pode contribuir para aumentar a disponibilidade deste metal no fagossomo, e também, catalisa a produção de prostaglandina E2, podendo a sua produção no local da infecção interferir no controle da mesma (Erb-Downward e Huffnagle, 2007; Coelho *et al.*, 2014).

A secreção de enzimas também é um fator que auxilia na probabilidade de causar doença. Dentre a gama de enzimas importantes para a infecção que os fungos patogênicos do gênero *Cryptococcus* expressam podemos citar as fosfolipases, as quais são enzimas responsáveis pela degradação de fosfolipídeos (Coelho *et al.*, 2014). Já foram descritas duas classes de fosfolipases, fosfolipases B e foslipases C em espécies de *Cryptococcus*. A isoforma de fosfolipase B (Plb1) já foi observada sendo secretada durante a infecção e foi relacionada com o aumento da sobrevivência da levedura dentro do fagossomo e invasão ao SNC (Cox *et al.*, 2001). Devido a sua função, esta enzima já foi relacionada com um efeito potencializador da permeabilização de fagossomo (Chrisman *et al.*, 2011). Quando o gene codificante da isoforma Plc1,

é inativado, ocorre diminuição da secreção de Plb1, da melanização e do crescimento à 37 °C. Desta forma, é evidenciado o papel central do Plc1 na virulência (Chayakulkeeree *et al.*, 2008).

A enzima urease, também sendo secretada para o meio extracelular, apresenta um papel na migração do fungo através das barreiras epiteliais e invasão ao SNC (Olszewski *et al.*, 2004). Seu papel foi primeiramente avaliado em *C. neoformans* no qual, quando deletada, apresenta um fenótipo hipovirulento em modelo de infecção intravenosa e intranasal em murinos (Cox *et al.*, 2000). No fungo *C. gattii* também já foi comprovado o seu papel na invasão ao SNC, sendo esse mecanismo provavelmente independente da atividade básica descrita desta enzima (Feder *et al.*, 2015).

Com o intuito de eliminar o patógeno, as células fagocíticas do hospedeiro, diminuem a disponibilidade de nutrientes dentro do fagossomo, mecanismo conhecido como imunidade nutricional (Cassat e Skaar, 2012). Contudo, *C. neoformans* e *C. gattii* possuem vários mecanismos que possibilitam a aquisição destes nutrientes em ambiente de pouca disponibilidade, permitindo assim a sua sobrevivência e replicação. Um desses mecanismos é a permeabilização que *C. neoformans* causa na membrana do fagossomo, consequentemente, ganhando acesso aos nutrientes presentes no citoplasma do macrófago (Tucker e Casadevall, 2002). Outro fator descrito é a dependência da autofagia que *C. neoformans* possui para a sua virulência, provavelmente obtendo parte dos nutrientes através da reciclagem autofágica (Palmer *et al.*, 2008). Com relação a aquisição de metais, a obtenção de ferro por *C. neoformans* está relacionada com enzimas redutases férricas, tais como a lacase e a obtenção do metal zinco, está muito relacionada com os transportadores da família Zip, em especial Zip1, o qual, quando deletado apresenta um fenótipo hipovirulento (Jung *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2015).

Outro fator relacionado com a virulência é a secreção de vesículas extracelulares, as quais são estruturas que carregam uma ampla gama de moléculas através da parede celular para o ambiente extracelular (Rodrigues *et al.*, 2007; Rodrigues, Nakayasu, *et al.*, 2008; Rodrigues, Nimrichter, *et al.*, 2008). Dentre as moléculas que já foram descritas presentes nestes compartimentos

estão alguns fatores de virulência, tais como componentes da cápsula polissacarídica, pigmentos, proteínas e lipídios (Casadevall et al., 2009; Eisenman et al., 2009; Oliveira et al., 2009). Linhagens de *Cryptococcus* que apresentam defeitos na produção destas estruturas, tais como Δ snf7 de *C. gattii* e *C. neoformans* e Δ grasp de *C. neoformans* apresentam também fenótipos de hipovirulência (Kmetzsch et al., 2011; Godinho et al., 2014).

1.3.1 Cápsula polissacarídica

A produção de uma cápsula polissacarídica é um dos principais fatores de virulência expressos por este fungo sendo unicamente encontrado nas espécies do complexo *Cryptococcus* (Maziarz e Perfect, 2016). Esta estrutura apresenta grande complexidade, sendo formada principalmente por 3 moléculas: glucuronoxilomanana (GXM), que perfaz de 90 a 95 % da massa molecular; galactoxilomanana (GalXM), compondo 5 a 10 % da massa capsular; e, na menor proporção, inferior a 1 %, por manoproteínas (Doering, 2000). Sua ancoragem é realizada na parede celular, a qual é formada por quitina, quitosana, glucanas e glicoproteínas (Doering, 2009).

Os componentes formadores da cápsula são sintetizados intracelularmente e secretados em vesículas (Rodrigues et al., 2007). A montagem desta estrutura, provavelmente, ocorre com os polissacarídeos recém-sintetizados se agregando na parte mais externa da cápsula, intercalando-se com as estruturas mais velhas (Zaragoza et al., 2006). Esse mecanismo é provavelmente dependente da presença de cátions divalentes (Nimrichter et al., 2007). Dependendo de determinados estímulos, a cápsula pode aumentar a sua espessura, tais como durante a infecção e quando o fungo é cultivado em condições indutoras que mimetizem o hospedeiro (Leopold Wager et al., 2016). Os polissacarídeos da cápsula também podem ser recuperados de sobrenadante de cultura celular e já foi descrita a sua detecção em soro de pacientes e no SNC (Lee et al., 1996; Coelho et al., 2014).

Esta estrutura funciona como um “escudo”, mascarando os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), os quais são moléculas características da parede celular de fungos, e quando reconhecidos por

receptores reconhecedores de padrões (PRRs) por células do sistema imune, induzem uma resposta de defesa do hospedeiro (Leopold Wager *et al.*, 2016). Sendo assim, a cápsula é uma estrutura evasora do sistema imune, impedindo a fagocitose e, além disso, é descrita como capaz de proteger contra espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos (Zaragoza *et al.*, 2008).

Os polissacarídeos formadores da cápsula possuem atividade imunomodulatórias, sendo que já foram descritos afetando a migração de células do sistema imune, inibindo a secreção de citocinas e interferindo com a apresentação de MHC (Vecchiarelli *et al.*, 2003; Ellerbroek *et al.*, 2004; Pericolini *et al.*, 2013). O aumento da capsula de *C. neoformans* também já foi relacionado com a absorção de ROS na fagossomo, podendo ser um mecanismo que auxilia a sobrevivência do fungo neste ambiente (Zaragoza *et al.*, 2008). GXM secretado induz a expressão de FasL em macrófagos, induzindo a apoptose de células T vizinhas (Monari, *et al.*, 2005). Também já foi descrito que este polissacarídeo induz a produção de NO por macrófagos e, como consequência desta produção, as células de macrófagos entram em apoptose em uma via independente de caspase (Chiapello *et al.*, 2008). GalXM também possui a capacidade de induzir apoptose em linfócitos T e B e macrófagos (Vecchiarelli *et al.*, 2011).

A cápsula polissacarídica também é descrita possuindo uma potente capacidade antifagocítica *in vitro*, sendo a fagocitose praticamente nula se o fungo não é coberto por opsoninas (Shoham e Levitz, 2005). *In vivo*, a indução da fagocitose seria, primeiramente pelo complemento e, após a indução de uma resposta humoral, por anticorpos específicos ligados a cápsula (Diamond *et al.*, 1974; Kozel, 1993). Além do fato da cápsula impedir o reconhecimento de PAMPs e com isso diminuir a fagocitose, outro fator que provavelmente está relacionado com essa diminuição é o aumento da cápsula observado *in vivo* e um impedimento da fagocitose relacionado com o grande tamanho que o fungo atinge (Coelho *et al.*, 2014). Alguns estudos também relacionaram características físicas da cápsula, como viscosidade e rigidez, e a sua interferência na fagocitose (Araujo *et al.*, 2012; Cordero *et al.*, 2013).

1.4 Criptococose e resposta imune

Como resposta a infecção por patógenos, o hospedeiro inicia distintos mecanismos com o objetivo de eliminar o organismo invasor, sendo esta resposta diferente conforme os estímulos aos quais o hospedeiro é apresentado. Já é amplamente descrito que uma resposta pró-inflamatória do tipo-Th1, caracterizada pela presença das moléculas interleucina (IL)-2, IL-12, IL-18, Interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é protetora contra as espécies de *Cryptococcus* sp. e a resposta do tipo Th17, caracterizada por IL-17A, IL-21, IL-22, IL-6 e TGF- β , também contribui para uma resposta anti-criptococócica (Huffnagle *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1997; Huffnagle e Lipscomb, 1998; Zhang *et al.*, 2009). Entretanto, uma resposta antiinflamatória do tipo-Th2, caracterizada por IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, é associada com o aumento da sintomatologia da criptococose (Milam *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2009).

Algumas linhagens de *C. neoformans*, tal como a linhagem altamente virulenta H99 da espécie *C. neoformans* var. *grubii*, é capaz de induzir uma resposta não protetora, polarizada para o tipo Th2 (Zhang *et al.*, 2009). Entretanto, uma vez que linhagens recombinantes contendo cassetes para expressão de IFN- γ murino foram utilizadas para infectar camundongos, os mesmos apresentaram uma resposta do tipo Th1 protetora e a imunização com essa linhagem torna o camundongo 100 % protegido contra novo desafio com a linhagem selvagem (Hardison *et al.*, 2010).

Uma vez no ambiente pulmonar, já foi descrito que as leveduras de *C. neoformans*, e possivelmente *C. gattii*, podem formar células gigantes, sendo esse um mecanismo anti-fagocítico, na qual as células atingem um tamanho maior, variando de 50 a 100 μ m de diâmetro (Okagaki e Nielsen, 2012).

A resposta imune adaptativa é essencial para a erradicação de leveduras de *C. neoformans*, uma vez que o principal grupo acometido, e que chega a óbito, por essa doença são indivíduos com AIDS (Jarvis e Harrison, 2007). Esta resposta é ativada quando o fungo é reconhecido após a apresentação através de células apresentadoras de antígenos, as quais são principalmente as células

dendríticas (Syme *et al.*, 2002; Gibson e Johnston, 2015). Durante a infecção com HIV, o perfil de citocinas muda de Th1 para Th2, uma vez que o aumento da carga viral e diminuição da contagem de células CD4+ acarreta numa proeminência de IL-4 sobre IFN- γ , acarretando em um defeito na capacidade do hospedeiro de combater estas leveduras (Panackal *et al.*, 2015).

Apesar da grande importância que o sistema imune adaptativo apresenta na resolução da infecção por *Cryptococcus*, as células do sistema imune inato possuem grande papel, principalmente na resposta aguda a infecção, visto que são as primeiras recrutadas para o local da infecção (Osterholzer *et al.*, 2009). Além disso, como indivíduos com a imunidade adaptativa suprimida são os principais afetados por essa enfermidade, estudos que possuem como foco a interação da imunidade inata com essas leveduras apresentam grande relevância para o avanço dos tratamentos.

1.4.1 Macrófagos

Os macrófagos são células fagocíticas, pertencentes ao sistema imune inato, que apresentam papel fundamental contra os agentes etiológicos de diversas infecções pulmonares, tais como contra os fungos das espécies *Cryptococcus* sp, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Brummer *et al.*, 1988; Limper *et al.*, 1997; Segal, 2007; Leopold Wager e Wormley, 2014). Os macrófagos alveolares, juntamente com células dendríticas, são a primeira linha de defesa contra os esporos ou leveduras dessecadas que conseguem alcançar o espaço alveolar (Fels e Cohn, 1986; Gibson e Johnston, 2015). Uma vez que essas células são depletadas farmacologicamente de pulmões de ratos, pode-se observar um aumento da carga fúngica e disseminação após infecção intratraqueal por *C. neoformans* (Shao *et al.*, 2005). Entretanto, os macrófagos também já foram relacionados com disseminação uma vez que linhagens fúngicas que apresentem alto índice de fagocitose por macrófagos avaliada *in vitro* foram relacionados com um alto índice de carga fúngica no líquido cefalorraquidiano. As linhagens mais susceptíveis a

essa fagocitose foram descritas como hipocapsulares e com maior atividade de lacase (Sabiiti *et al.*, 2014).

Através da secreção de citocinas pelos macrófagos alveolares, células fagocíticas mononucleares, circulantes na corrente sanguínea, são recrutadas para os pulmões (Maus *et al.*, 2002). Camundongos deficientes do receptor de quimiocina CC 2 (CCR2) apresentam uma diminuição no recrutamento dos monócitos e subsequente diferenciação em macrófagos nos pulmões durante a infecção pulmonar em camundongos, além disso, há o desenvolvimento de uma resposta imune não-protetora do tipo-Th2 (Traynor *et al.*, 2000).

Dependendo das citocinas presentes no microambiente em que o macrófago se encontra, estas células são capazes de ativar diferentes fenótipos, classificados em clássico (M1) e alternativo (M2), baseados na produção de citocinas, expressão de receptores extracelulares e secreção de subprodutos (Stout e Suttles, 2004; Mosser e Edwards, 2008). Esta ativação não é determinativa, podendo uma célula que já apresenta marcas de um fenótipo, através da estimulação de certas citocinas, começar a apresentar marcas do outro fenótipo (Davis *et al.*, 2013). Os macrófagos M1 são induzidos por IFN- γ ou na presença dessa citocina associada com TNF- α e GM-CSF (Tomioka *et al.*, 2012), e estão relacionados com a defesa através da geração de moléculas microbidas, como espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio. Por outro lado, macrófagos M2, principalmente induzidos por IL-4 e IL-13, contribuem para a regulação da resposta inflamatória possuindo papel na cicatrização (Leopold Wager e Wormley, 2014).

É descrito na literatura que macrófagos M1 são protetores contra *C. neoformans*, principalmente através da produção moléculas de antimicrobianas no fagossomo (Arora *et al.*, 2011; Hardison *et al.*, 2012; Leopold Wager e Wormley, 2014). Dentre essas moléculas, destaca-se o óxido nítrico (NO), um radical livre ao qual já foi descrito que *C. neoformans* apresenta sensibilidade (Alspaugh e Granger, 1991; Aguirre e Gibson, 2000). Macrófagos de camundongos mutantes para a enzima responsável pela síntese de NO (iNOS) ou macrófagos cultivados com inibidores para iNOS foram incapazes de controlar a proliferação intracelular de *C. neoformans*, mesmo com a produção de espécies reativas de oxigênio

intacta, evidenciando a importância de NO como mecanismo para controle desta levedura (Leopold Wager *et al.*, 2015).

Células de *C. neoformans* possuem a capacidade de sobreviver em macrófagos que apresentem polarização M2, usando estas células como um nicho protetor para evadir o reconhecimento e eliminação pelo hospedeiro (Johnston e May, 2013). Já foi descrito que algumas linhagens de *Cryptococcus* spp. são capazes de induzir polarização alternativa em macrófagos. Essa indução de polarização do tipo M2 por células de *Cryptococcus* spp. ainda não foi bem esclarecida, mas sabe-se que a proteína Ssa1, secretada por *C. neoformans*, promove aumento inicial da carga fúngica e mudança para ativação M2 em macrófagos através da estimulação das citocinas IL-4 e IL-13 (Eastman *et al.*, 2015). A molécula quitina, que faz parte da parede celular de células de *Cryptococcus* sp., também já foi descrita como indutora de ativação alternativa de macrófagos em outros modelos fúngicos (Van Dyken *et al.*, 2014). Além disso, *C. neoformans* é capaz de inibir iNOS resultando em ativação M2 de macrófagos (Leopold Wager *et al.*, 2016).

Dentre as vias de sinalização envolvidas na resposta a *Cryptococcus* sp., foi demonstrado que a via do STAT1 é necessária para a proteção contra *C. neoformans* pois está envolvida na ativação clássica de macrófagos, e seu knock out ou silenciamento acarretam em aumento da inflamação pulmonar, aumento da carga fúngica, desbalanço na resposta imune Th1/Th2 e perda da proteção na infecção por H99 expressando IFN- γ murino (Hardison *et al.*, 2012; Leopold Wager *et al.*, 2014; Leopold Wager *et al.*, 2015). Além disso, macrófagos deficientes em STAT1 expressam menos NO do que macrófagos selvagens (Leopold Wager *et al.*, 2014; Leopold Wager *et al.*, 2015).

A via de NF- κ B também está relacionada com a polarização de macrófagos M1, pois regula a expressão de genes característicos deste tipo de ativação (Lawrence e Natoli, 2011; Chen *et al.*, 2016). Já foi demonstrado que, através da modulação da via de NF- κ B, *C. neoformans* induz instabilidade cromossômica, alteração do ciclo celular e apoptose em macrófagos (Ben-Abdallah *et al.*, 2012). Outro fator que demonstra a relevância desta via de sinalização é o fato de que macrófagos de camundongos SJL/J, resistentes naturais à infecção por *C.*

neoformans, apresentam produção de TNF- α e KC/CXCL1 reguladas por NF- κ B e a quinase fosfatidilinosital-3 (Guillot *et al.*, 2008). Os mecanismos da ativação desta via estão sendo estudados, mas sabe-se que tanto o polissacarídeo GXM, quanto a célula fúngica inteira são capazes de modular esta via e esta modulação é distinta frente a patógenos intactos ou ao produto microbiano isolado (Hayes *et al.*, 2016).

Apesar de dados indicarem que *C. neoformans* aparentemente não evade a acidificação do fagossomo, sobrevivendo neste ambiente, este fungo também já foi citado como capaz de diminuir a acidificação do fagossomo, fluxo de cálcio e protease, tornando o fagossomo mais permissivo a proliferação (Levitz *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2015). Sua internalização foi relacionada com depolarização da mitocôndria e dano a lisossomos de macrófagos (Coelho *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015). Além disso, esta levedura é capaz de causar a permeabilização do fagossomo, sendo citados dois mecanismos na literatura: (i) a formação de poros na membrana do fagossomo, relacionada também com vacuolização da célula mamífera; e (ii) permeabilização que antecede a extrusão da levedura, através de fusão do fagossomo com a membrana plasmática (Tucker e Casadevall, 2002; Johnston e May, 2010).

1.4.2 *C. neoformans* x *C. gattii* na resposta imune

As duas espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* sp. apresentam algumas distinções quanto a modulação que causam no hospedeiro e, talvez, essas diferenças reflitam nos indivíduos acometidos e no curso da doença. A levedura *C. gattii* induz uma resposta inflamatória menos protetora em murinos, com uma menor migração de neutrófilos para os pulmões e menor secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IFN- γ (Cheng *et al.*, 2009). Essa resposta está provavelmente relacionada com diferentes compostos secretados pelas leveduras, pois uma resposta menos pró-inflamatória e uma inibição da função de neutrófilos foi obtida com o sobrenadante de cultivo de *C. gattii* (Wright *et al.*, 2002).

A relação entre as células dendríticas, importantes apresentadoras de antígenos, e *C. gattii* é bastante estudada por fazer a ligação entre o sistema

imune inato e adaptativo e tentar responder porque esta levedura é capaz de causar infecção em indivíduos imunocompetentes. Foi observado que as leveduras de *C. gattii* são eliminadas por estas células do sistema imune, porém não há uma indução da maturação destas células, podendo evadir assim a resposta imune adaptativa (Huston *et al.*, 2013). Foi observada uma menor quantidade de células Th1 e Th17 nos pulmões de camundongos infectados com *C. gattii*, o que pode ser explicado por uma menor expressão de receptores de superfície de células dendríticas, como MHC de classe II, e uma menor expressão de transcritos de quimiocinas para células Th1 nos pulmões (Angkasekwinai *et al.*, 2014). Foi comprovado, também, que a cápsula polissacarídica de *C. gattii* possui um papel no impedimento da maturação destas células dendríticas através do bloqueio do reconhecimento extracelular e ativação da cascata necessária para a maturação e consequente apresentação do antígeno (Huston *et al.*, 2016).

O reconhecimento das leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* também ocorre de forma um pouco distinta, enquanto que é descrito que o fungo *C. neoformans* é reconhecido, entre outros receptores, por receptor do tipo-Toll (TLR) 2 e TLR4 e TLR9, *C. gattii*, dentre os receptores citados não é reconhecido pelo receptor TLR2 (Shoham *et al.*, 2001; Vecchiarelli, 2005). Este resultado sugere que uma distinção na resposta imune pode ser gerada pelos PAMPs distintos que os dois patógenos apresentam (Bielska e May, 2016).

As duas espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* são capazes de infectar macrófagos e replicar-se no fagossomo porém, os isolados do surto de Vancouver apresentam índices de proliferação mais elevados quando comparado com as outras linhagens de *C. gattii* (Ma *et al.*, 2009). Como a infecção por *C. gattii* acontece principalmente em indivíduos imunocompetentes, a taxa de replicação precisa ser elevada o suficiente para sobrepor o sistema imune do hospedeiro (Bielska e May, 2016). Essa rápida replicação intrafagossômica relacionou-se com o aumento da expressão de um grupo de genes do genoma mitocondrial e relacionados com atividades da mitocôndria e, também, com mudanças morfológicas nesta mesma organela (Ma *et al.*, 2009; Voelz *et al.*, 2014). Inicialmente, esta morfologia distinta foi relacionada com proteção do patógeno contra o ambiente inóspito do macrófago (Ma e May, 2010). Atualmente,

essa mudança na morfologia mitocondrial foi relacionada com um mecanismo de “divisão de trabalho” adotado pelas células cryptococócicas para aumentar a taxa de replicação. As células que adotam esta morfologia alterada param de dividir, entretanto as células vizinhas aumentam suas taxas de replicação, aumentando a carga fúngica total (Voelz *et al.*, 2014). Não foram relacionadas mudanças morfológicas na mitocôndria e aumento na taxa de replicação de linhagens de *C. neoformans* (Leopold Wager *et al.*, 2016).

1.5 Via de sinalização TOR

A via de sinalização TOR tem como proteína-chave a Tor (em inglês: *target of rapamycin*) uma enzima serina/treonina quinase que interage com diferentes proteínas, formando dois complexos distintos TORC1 e TORC2 (Figura 4). Essa enzima é conservada, de leveduras a humanos, possuindo um papel central na regulação da célula, sendo relacionado com crescimento celular, envelhecimento e metabolismo, além de outras funções (Cornu *et al.*, 2013).

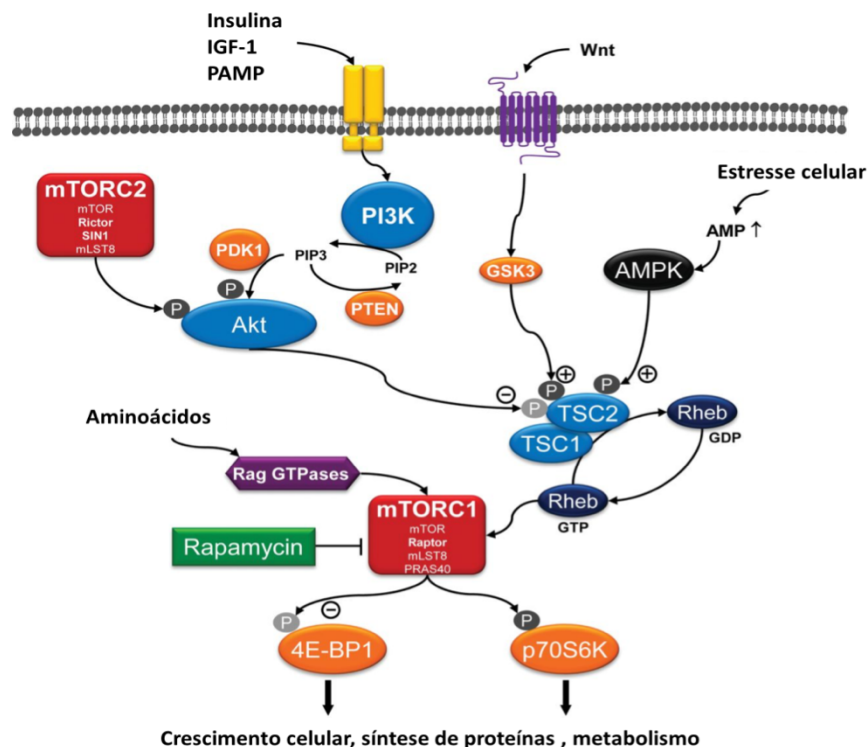


Figura 4: Via de sinalização mTOR Retirado de (Katholnig *et al.*, 2013).

O complexo 1 em mamíferos (mTORC1) é formado por cinco componentes: mTOR, a qual é a unidade catalítica do complexo, Raptor (em inglês: *regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 (em inglês: *mammalian lethal with Sec13 protein 8*), PRAS40 (em inglês: *prolinerich AKT substrate 40 kDa*) e Deptor (em inglês: *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*) (Laplante e Sabatini, 2009; Peterson *et al.*, 2009). Este complexo é responsável por regular processos relacionados com crescimento, como biogênese de ribossomos, síntese de proteínas, absorção de nutrientes e autofagia em resposta a nutrientes, fatores de crescimento e a condição energética da célula (Cornu *et al.*, 2013).

O complexo 2 em células mamíferas, mTORC2, é composto por seis diferentes proteínas: mTOR, Rictor (em inglês: *rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (em inglês: *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein*), Protor-1 (em inglês: *protein observed with Rictor-1*), mLST8 e Deptor (Laplante e Sabatini, 2009). É responsável por fosforilar e ativar diretamente a enzima quinase Akt, enzima SGK1 e a enzima PKC (Hresko e Mueckler, 2005; García-Martínez e Alessi, 2008; Ikenoue *et al.*, 2008), promovendo sobrevivência celular via Akt e mediando a organização do citoesqueleto de actina (Sarbasov *et al.*, 2004; Cybulski e Hall, 2009). A ativação do mTORC2 está relacionada fisicamente com o ribossomo garantindo que a sua ativação seja somente em células em crescimento (Zinzalla *et al.*, 2011).

A estimulação de receptores de fatores de crescimento ou TLRs acarreta no recrutamento de PI3K (phosphoinositide 3-kinase) para o receptor. PI3K fosforila PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) gerando PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) o qual recruta Akt para a membrana plasmática. Neste local, Akt é fosforilado e ativado por PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) e, então Akt fosforila TSC2, entre outros alvos. TSC2 é uma proteína que forma um complex heterodimérico com TSC1 e este complexo previne a ativação de mTORC1. Quando TSC2 é fosforilado por Akt ele se torna inativado, permitindo a ativação de mTORC1 (Laplante e Sabatini, 2012; Weichhart, 2012) (Figura 4).

Descobertas ao longo dos anos mostraram que a via mTOR é ativada durante vários processos celulares, como formação de tumor e angiogênese, resistência a insulina, adipogênese, e ativação de linfócitos T (Laplante e Sabatini, 2009). Disregulações nesses complexos acarretam em várias enfermidades relacionadas com o metabolismo, tais como obesidade, diabetes tipo 2 e câncer (Cornu *et al.*, 2013). Sendo assim, o uso de inibidores de mTOR (tais como rapamicina e seus análogos) para tratar patologias está aumentando, tais como tumores sólidos, transplante de órgãos e artrite reumatóides (Laplante e Sabatini, 2009).

1.5.1 Via mTOR e imunidade

A via de sinalização mTOR funciona em vários aspectos da biologia celular e estudos atualmente demonstram que esta via funciona como um mecanismo chave que orquestra uma ampla rede de atividades metabólicas e celulares para moldar a resposta imune (Weichhart *et al.*, 2015). Um exemplo desta relação de metabolismo e imunidade é um aumento na síntese de proteína em macrófagos e células dendríticas após quatro horas de estimulação com lipopolissacarídeo (LPS), sendo este dependente da via PIK3-mTORC1 (Lelouard *et al.*, 2007).

Os complexos mTORC1 e mTORC2, em células imunes, são ativados por inúmeros sinais extracelulares, tais como ligantes de receptores do tipo Toll e citocinas (Weichhart *et al.*, 2015). Dentre essas moléculas destacam-se o GM-CSF e o FLT3L (em inglês: *FMS-related tyrosine kinase 3 ligand*) que induzem a ativação de mTORC1 em neutrófilos e células dendríticas; ligantes de TLRs que ativam mTORC1 e mTORC2 em monócitos, macrófagos e células dendríticas humanas e murinas e IL-4 que promove ativação de mTORC1 e mTORC2 em macrófagos de camundongos (Ohtani *et al.*, 2008; Haidinger *et al.*, 2010; Sathaliyawala *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014). Sem esses sinais de ativação, a via de mTOR é inativa nesses tipos celulares *in vitro*, diferentemente de outras células primárias (Weichhart *et al.*, 2015).

mTORC1 também já foi relacionado com a imunidade treinada (*trained immunity*), conceito que refere-se a proteção não-específica contra infecções pela

segunda vez, mediada por reprogramação epigenética, em células imunes mieloides, permitindo uma resposta imune secundária mais rápida e mais pronunciada (Quintin *et al.*, 2014). Neste contexto, mTORC1 medeia a reprogramação de uma fosforilação oxidativa para glicólise aeróbica, mudança que representa a base metabólica deste mecanismo de imunidade treinada (Weichhart *et al.*, 2015). Foi observado que doses pequenas de β -glucana de *C. albicans* ativa uma resposta glicolítica dependente de Akt-mTORC1-HIF1 α em monócitos humanos e esta resposta é essencial para a alta expressão de IL-6 e TNF- α que ocorre após nova estimulação destes monócitos com ligantes de TLR depois de sete dias (Cheng *et al.*, 2014).

Os estudos sobre a interação da via mTOR e as células do sistema imune apresentam dados um pouco controversos, o que pode ser explicado pela diferença nas células estudadas e na metodologia empregada. Com relação as células dendríticas foi observado que a ativação da via PI3K-AKT-mTORC1 é necessária para o desenvolvimento *in vivo* do número normal deste tipo celular em camundongos e humanos na presença de FLT3L (Sathaliyawala *et al.*, 2010). A deleção do gene que codifica LAMTOR2 (em inglês: *endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator 2*) em células dendríticas ativa mTORC1 e resulta em expansão de células dendríticas em camundongos em envelhecimento (Scheffler *et al.*, 2014). Porém, quando o gene *Tsc1* é deletado, ocorre ativação de mTORC1 mas uma diminuição no desenvolvimento de células dendríticas *in vitro* e *in vivo*, associado com defeitos na sobrevivência e proliferação celular (Wang *et al.*, 2013). Uma resposta para essa diferença pode ser devido ao fato de que ativação constitutiva de mTORC1 pode ser prejudicial por promover a geração de ROS (Chen *et al.*, 2008). Além disso, a deleção de *Tsc1* é acompanhada de diminuição da fosforilação de Akt, sendo essa responsável por promover a sobrevivência de vários tipos celulares (Byles *et al.*, 2013).

A produção de citocinas também está relacionada com a via de mTOR e depende muito do tipo celular testado e das diferentes condições experimentais utilizadas (Weichhart *et al.*, 2015). Tratamento de monócitos humanos ou células dendríticas primárias com rapamicina, um inibidor de mTORC1, aumentou a produção de IL-12p70 após estimulação com ligantes de TLR (Macedo *et al.*,

2013). A inibição de mTOR também foi relacionada com bloqueio da expressão de IL-10, sugerindo que a inibição de mTOR seria pró-inflamatória. Entretanto, TNF e IL-6 são bloqueados pelo inibidor rapamicina, levando a conclusão que a inibição de mTOR seria anti-inflamatória e sendo esse um resultado controverso ao anterior. Além das diferenças experimentais, deve-se levar em consideração que esta via não é linear, e sim um ponto chave que integra várias respostas celulares, e alterar, farmacologicamente ou geneticamente, determinadas proteínas pode encaminhar para alterações em outras vias que são inesperadas culminando em respostas controversas (Weichhart *et al.*, 2015).

Com relação a macrófagos, sabe-se que a esta via está relacionada com a polarização desta célula para uma ativação clássica M1 ou alternativa M2. Porém, assim como os resultados com as citocinas, vários estudos estão relatando resultados contraditórios em relação a este assunto (Weichhart *et al.*, 2015). Por exemplo, a inativação do gene *Pten* em macrófagos murinos, causando aumento constitutivo da sinalização de mTOR, acarreta na expressão elevada de marcadores M2 (Sahin *et al.*, 2014). Além disso, a inibição por rapamicina em macrófagos humanos aumentou a polarização de macrófagos M1 (Mercalli *et al.*, 2013). Entretanto, o silenciamento de *Tsc1* aumentou a atividade de mTORC1 e diminuiu a atividade de mTORC2 e promoveu uma polarização para macrófagos M1 e reduziu polarização para macrófagos M2 (Byles *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014).

Pouco é descrito na literatura sobre a relação entre modulação nessa via em células do sistema imune e infecção por fungos. Dentre os fungos mais patogênicos, apenas alguns estudos com *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* foram realizados, nos quais observou-se modulação desta via durante a infecção (Moyes *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar genes e processos metabólicos em macrófagos afetados pela infecção por *C. neoformans* e *C. gattii*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar genes diferencialmente expressos em macrófagos influenciados pela presença de *C. gattii* e *C. neoformans*.
- Analisar processos metabólicos compartilhados e diferentes em macrófagos influenciados pela presença de *C. gattii* e *C. neoformans* usando dados de transcriptoma.
- Confirmar genes diferencialmente expressos.
- Confirmar a modulação da via de mTOR.

3 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA A BMC GENOMICS

***Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* modulates macrophage cells through the mTOR pathway**

Alícia C. Piffer¹, Francine M. dos Santos¹, Marcos P. Thomé¹, Nicole S. Ribeiro¹, Alexandra Gerber², Ana Tereza R. Vasconcelos², Guido Lenz¹, Lívia Kmetzsch¹, Marilene H. Vainstein¹, Charley C. Staats¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

²Laboratório Nacional de Computação Científica – Av. Getúlio Vargas 333, Quitandinha, Petrópolis, RJ 25651-075 - Brasil.

A autora Alícia Corbellini Piffer foi responsável pelas análises do RNAseq, criação e análise das redes interatômicas, realização dos experimentos de tempo real e *Western blot* e pela redação do manuscrito.

1 *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* modulates macrophage cells
2 through the mTOR pathway

3

4 Alícia C. Piffer¹ (aliciacpiffer@gmail.com), Francine M. dos Santos¹
5 (francinemelise@hotmail.com), Marcos P. Thomé¹ (marcosp.thm@gmail.com),
6 Nicole S. Ribeiro¹ (nicole.sari@hotmail.com), Alexandra Gerber²
7 (alegerber@Incc.br), Ana Tereza R. Vasconcelos² (atriv@Incc.br), Guido Lenz¹
8 (lenz@ufrgs.br), Lívia Kmetzsch¹ (liviak@cbiot.ufrgs.br), Marilene H. Vainstein¹
9 (mhv@cbiot.ufrgs.br), Charley C. Staats¹ (staats@cbiot.ufrgs.br).

10

11 ¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de
12 Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves
13 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

14

15 ²Laboratório Nacional de Computação Científica – Av. Getúlio Vargas 333,
16 Quitandinha, Petrópolis, RJ 25651-075 - Brasil.

17

18 Corresponding author: Charley C. Staats¹ - staats@cbiot.ufrgs.br

19

20 **Abstract**

21 **Background:** *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* can interact and
22 modulate innate immune cells, including macrophages. The interaction with this
23 phagocyte cells normally leads to the modulation of several cellular functions.
24 Eventually, such cells can undergo apoptosis. The aim of this work was to
25 evaluate processes and pathways that are affected in the macrophages by the
26 presence of the yeasts cells.

27 **Results:** For a better understanding of the molecular mechanisms that govern
28 such alterations on macrophage cells, a genome-scale comparative analysis of
29 transcriptional changes in macrophages exposed to *C. neoformans* and *C. gattii*
30 was conducted. The expression of nearly 40 genes was detected as altered in
31 macrophage cell line J774.A1 by either *C. neoformans* or *C. gattii*. We create and
32 analyze networks, using String 10 and Cytoscape 2.8.3 software, and we noticed
33 that the major processes with at least one differentially expressed gene was
34 related with the mTOR pathway. We confirmed the RNA-seq data employing qRT-
35 PCRs of some macrophage genes involved in the mTOR pathway (*Ddit 4*, *mTOR*,
36 *Pdk1*, *Pten*, *Raptor*, *Rictor*, *Ulk1* and *TNF- α*). All genes exhibited a decrease of
37 expression when macrophages were co-incubated for 24 hours with cryptococcal
38 cells. We also performed *Western blot* analysis to evaluate the phosphorylation
39 state of p70SK6 and GSK-3 β , as well the levels of total AKT and S6K, in
40 macrophage cells after the incubation with *C. neoformans* and *C. gattii*. We
41 observed a decrease in the levels of the phosphorylated proteins S6K and GSK-3 β
42 after 24 hours of co-incubation. We also investigated if the main capsule
43 polysaccharide, GXM, can influence the phosphorylation state of p70SK6. We did

44 not observe any difference in the level of the phosphorylation of this protein after
45 the incubation with the polysaccharide from both species.

46 **Conclusions:** In this study, we noticed that several processes are involved in the
47 macrophage infection by *C. neoformans* and *C. gattii*. In particular, our results
48 indicate that these yeasts can exploit the modulation of mTOR pathway in
49 macrophages, perhaps using this strategy to reduce macrophage antifungal
50 activities, once this pathway is involved in immune response to pathogens.

51

52 **Keywords:** macrophage, mTOR, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*.

53

54 1. Background

55 Invasive fungi diseases are responsible for a high mortality rate, killing
56 about one and a half million people every year. Of all reported fungal-related
57 deaths, a total of 90% results from species that belong to one of four genera:
58 *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* and *Pneumocystis* [1]. Cryptococcosis are
59 related with nearly one million cases per year and with more than 620,000 deaths
60 in sub-Saharan Africa [2] and it is caused, predominantly, by the basidiomycetes
61 yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* [3]. Although *C.*
62 *neoformans* and *C. gattii* show 80-90 % of genomic identity and share a lot of
63 major virulence factors [4-6], these species affect different patient population and
64 with different disease manifestation. *C. neoformans* causes disease in
65 immunocompromised patients and has a tendency to disseminate to the central
66 nervous system meanwhile *C. gattii* can affect both immunocompromised and
67 healthy individuals, and disseminate less for the central nervous system [6-8].

68 The disease initiates with inhalation of basidiospores or desiccated cells
69 from the environment source. The infection propagules that reach the pulmonary
70 alveoli encounter phagocytic cells, such as macrophages, dendritic cells and
71 neutrophils, as the first line of host defense [9, 10]. These mammalian cells will
72 engulf the pathogen and, in the phagosome, will expose the yeast to damage
73 agents, such as low pH, ROS, NO and proteases with the aim of killing the yeast
74 cells [11, 12]. However, the fungi cells can survive and replicate in the phagosome
75 and also can exit the mammalian cell without lysis [13, 14].

76 It was described that the fungi cells not only use the mammalian host for
77 replication, but can also modulate the cells to benefit themselves. *C. neoformans*
78 can prevent significant acidification of the phagosome, calcium efflux and protease
79 activity, rendering the phagosome permissive to cryptococcal proliferation *in vitro*
80 [15]. It can, also, cause lysosomal damage in bone marrow derived macrophages,
81 which is correlated with increased *C. neoformans* intracellular replication [16]. The
82 *C. gattii* fungi cells can deregulate the maturation of dendritic cells causing
83 suboptimal T cell activation and proliferation [17]. Besides that, it was also
84 described that the fungi can modulate the macrophage polarization to M2
85 (alternatively activated) which are less fungicidal and use them as a niche to
86 evade recognition and killing by the host [12]. This polarization can be triggered by
87 a secreted heat shock protein 70 homolog, Ssa1, or by chitin, an integral part of of
88 the cryptococcal cell wall, which promotes this shift by stimulating the production
89 of IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines [18-20].

90 Mammalian target of rapamycin (mTOR) is a conserved serine/threonine
91 kinase that senses the external and internal signals to control a large amount of

92 processes, including those related to immune response, cell cycle and cell death
93 [21-24]. This protein is found in two multiprotein complexes designated mTORC
94 (mTOR complex) 1 and mTORC2, whereas Raptor (regulatory associated protein
95 of mTOR) is the defining protein for mTORC1 and Rictor (rapamycin-insensitive
96 companion of mTOR) and Sin1 are specific for mTORC2 [23, 25]. Stimulation of
97 TLRs (Toll-like receptors) by PAMPs (pathogen associated molecular patterns)
98 activates mTORC1 and mTORC2 in macrophage and dendritic cells as well as the
99 growth factor GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor) induce
100 mTORC1 activation in dendritic cells [26, 27]. In the context of the defense
101 response, the mTOR complexes, especially the mTORC1, was described involved
102 in the regulation of dendritic cells development, NK cells activation and
103 proliferation, pro- and anti- inflammatory cytokine production in various cell types,
104 macrophage polarization and nitric oxide production [21, 28-32]. Meanwhile, it was
105 not described yet in the literature if the response of macrophages infected with
106 *Cryptococcus* spp. are related with the mTOR signaling pathway.

107 In this work, we co-incubated pre-activated J774.A1 macrophage-like cells
108 with *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 fungi cells and evaluated the gene
109 transcription levels of the macrophage-like cells as well as the transcription and
110 protein levels of genes related with the mTOR signaling pathway. Our data
111 suggest that *Cryptococcus* spp. cells can modulate a lot of bioprocesses in the
112 phagocytic cells and decrease the activation of the mTORC1 in the mammalian
113 cells using this as a strategy to, perhaps, make the macrophage cells less
114 fungicidal, once this pathway is involved in the defense response.

115

116 **2. Methods**

117 **Strains and cell lines**

118 The pathogenic yeasts *Cryptococcus gattii* R265 strain and *Cryptococcus*
119 *neoformans* H99 strain were routinely maintained at YPD agar media (2% glucose,
120 2% peptone, 1% yeast extract and 1.5% agar – Sigma Aldrich). Murine
121 macrophage-like cell line, J774.A1, was obtained from *Banco de Células do Rio*
122 *de Janeiro* (BCRJ – accession number 0121) and cultured with Dulbecco's
123 modified Eagle's medium (DMEM- Gibco Life Technologies) supplemented with
124 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS- Gibco Life Technologies), penicillin
125 20 U/ml and streptomycin 20 µg/ml (Gibco Life Technologies), incubated at 37 °C
126 with 5% CO₂. Confluent cultures were expanded every 2-3 days until a maximum
127 of 10 passages.

128

129 **Macrophage and fungi cells interaction experiments**

130 For the co-incubation assays, J774.A1 macrophages were seeded in culture
131 plates in a density of 10⁶ cells per milliliter and activated with 100 U/ml
132 recombinant murine IFN-γ (Sigma Aldrich) and 500 ng/mL LPS (Sigma Aldrich)
133 overnight. The *Cryptococcus* R265 and H99 strains were grown in YPD media (2%
134 glucose, 2% peptone, 1% yeast extract – Sigma Aldrich) in a shaker platform at 30
135 °C for 18 hours. After growth, cryptococcal cells were washed three times with
136 PBS and were opsonized in a density of 10⁷ cells per milliliter with 1 µg/ml of anti-
137 GXM antibody 18B7 for 1h at 37°C. Then, the opsonized cryptococcal cells were
138 incubated with activated J774.A1 cells, and again, 100 U/ml IFN-γ and 500 ng/mL
139 LPS was added. The control samples were performed as the co-incubation

140 assays, without the addition of fungi cells. Each experiment has a distinct period of
141 interaction between the mammalian and cryptococcal cells.

142

143 **RNA-seq assay**

144 Activated J774.A1 cells were incubated with opsonized cryptococcal cells, as
145 described above, for RNA extraction and evaluation of the transcriptome. After six
146 hours of co-incubation, each well was washed three times with warm PBS buffer
147 for eliminate the non-phagocysed cryptococcal cells. The macrophages were lysed
148 with TRIzol™ (ThermoFischer Scientific). The macrophage RNA was purified
149 using the RNeasy Mini kit (Qiagen) and the poly(A) RNA were purified from
150 macrophage cells with Dynabeads® mRNA purification kit (ThermoFisher
151 Scientific), according to the manufacturer instructions. The RNA quality was
152 assessed with Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies) and sequenced in
153 an Ion PGM System, at the LNCC laboratory in Petrópolis – Rio de Janeiro/ Brasil.
154 The data were analyzed using the software FastQC [33] and the software Fastx
155 Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html) was used for processing
156 the sequences. The sequences were aligned against the *Mus musculus* genome
157 using the TMAP aligner (<https://github.com/iontorrent/TMAP>) and the counting was
158 made by HTseq program [34]. The differentially expressed genes (DEGs) were
159 determined by R, using Package TCC and EdgeR as method test [35]. Transcript
160 levels were further screened by applying an unadjusted false discovery rate (FDR)
161 of 10%. Genes with a corrected p-value < 0.05 and $|\log_2 \text{fold change}| \geq 0.58$ were
162 considered to be statistically significant and differentially expressed. Two major
163 libraries were created: genes that are differentially expressed in activated

164 macrophages infected with *C. gattii* R265 compared to control (just activated
165 J774.A1) and genes that are differentially expressed in activated macrophages
166 infected with *C. neoformans* H99 compared to control.

167

168 **Interatomic networks**

169 To design the interatomic networks and to elucidate the pathways involved in
170 macrophage response to cryptococcal infection the software STRING 10 were
171 used (<http://string-db.org/>) [36, 37]. The input data was the differentially expressed
172 genes found in the RNA-seq with a q value ≤ 0.05 of each library, creating two
173 distinct networks (*C. gattii* network and *C. neoformans* network). The parameters
174 used to prospect the networks for STRING 10 software were as follows: co-
175 expression, experiments, databases, 700 additional nodes, no more than 20
176 interactions. The results gathered using the STRING 10 were analyzed with
177 Cytoscape 2.8.3 program [38]. To analyze the networks in terms of the major
178 clusters or module composition we used the program Molecular Complex
179 Detection (MCODE) [39]. The parameters for MCODE cluster finding were as
180 follows: degree cutoff, 2; expansion of a cluster by one neighbor shell allowed (fluff
181 option enabled); deletion of a single connected node from clusters (haircut option
182 enabled); node density cutoff, 0.1; node score cutoff, 0.2; k-core, 2; and maximum
183 network depth, 100. Centrality analysis was performed for the two main networks
184 using the program CentiScaPe 1.2 [40]. This analysis allowed us to identify the
185 most topologically “central” nodes within the network using an algorithm to
186 evaluate each node according to the node degree and betweenness. The majors
187 networks, the clusters generated by MCODE and the centrality nodes from de two

188 major networks were further studied by focusing on major biology-associated
189 processes using the Biological Network Gene Ontology (BiNGO) 2.44 Cytoscape
190 2.8.3 plugin [41]. The degree of functional enrichment for a network was
191 quantitatively assessed (p value) using a hypergeometric distribution. Multiple test
192 correction was also assessed by applying the false discovery rate algorithm [42],
193 at a significance level of $p < 0.05$.

194

195 **Quantitative Real Time PCR analyses**

196 J774.A1 macrophage-like cells pre-activated overnight with 100 U/ml recombinant
197 murine IFN- γ (Sigma Aldrich) and 500 ng/mL LPS (Sigma Aldrich) were exposed
198 to opsonized R265 and H99 cryptococcal cells for two, six and twenty-four hours
199 and the transcription profile of some genes of mTOR pathway was evaluated. The
200 genes *mTOR*, *Ddit4*, *Pten*, *Pdk1*, *Rictor*, *Raptor*, *Ulk1* and *TNF- α* had their
201 transcript levels analyzed.

202 After the co-incubation times, the wells were washed with warm PBS buffer for
203 three times, and the macrophage cells were lysed with TRIzol™ reagent. Samples
204 were centrifuged to eliminate the non-phagocysed cryptococcal cells. RNA
205 extraction was performed according the TRIzol™ reagent manufacturer
206 instructions and the quality of the RNA was assessed by electrophoresis on a 1%
207 agarose gel. Quantification was performed by absorbance analysis using a
208 NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA was treated with DNase
209 (Promega) and the cDNAs were prepared using ImProm-II™ Reverse
210 transcriptase (Promega) using oligo-dT. qRT-PCR was performed using SYBR
211 green (Invitrogen) on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

212 with thermal cycling conditions set with an initial step at 94 °C for 5 min, followed
213 by 50 cycles at 94 °C for 15s, 60 °C for 10s, 72 °C for 15s and 60 °C for 35s
214 followed by a melting curve. All experiments were performed in biological triplicate,
215 and each cDNA sample was also analyzed in triplicate for each primer pair. The
216 transcript abundance was calculated using $2^{-\Delta Ct}$ [43]. Expression level
217 of *Gapdh* gene was used as control to normalize the value across different target
218 genes. The primers used in these analyses are listed in Table S1. Data were
219 expressed as mean \pm SM. All assays were performed in three experiments
220 conditions, with triplicate technical repetitions for each of them. Statistical analyses
221 were performed using GraphPad Prism 6 employing one-way ANOVA followed by
222 Tukey multicomparison.

223

224 **Protein extraction and Western blotting assay**

225 J774.A1 pre-activated cells were co-incubated with opsonized *C. gattii* R265 or
226 *C. neoformans* H99 cells for two, six and twenty-four hours in 6-well culture cell
227 plates or the pre-activated mammalian cells were incubated with 50 μ g/mL of GXM
228 polysaccharide isolated from *C. neoformans* H99 or *C. gattii* R265 for 24 hours
229 [44]. IFN- γ (100 U/ml - Sigma Aldrich) and LPS (500 ng/mL - Sigma Aldrich) was
230 added again in all samples at the same time that cryptococcus cells or GXM
231 polysaccharide as well as in the control. After the incubations times, the
232 macrophages were washed with warm PBS buffer for three times, and they were
233 lysed with a denaturation buffer (4 mL SDS 10%, 0.2 mL EDTA 100 mM, 1 mL Tris
234 500 nM, ddH₂O q.s. 10 mL). Then, the proteins extracts were incubated at 70 °C
235 for 5 minutes.

236 The quantification was made with Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher
237 Scientific), according to the manufacturer instructions. Equal amounts of proteins
238 (20 ng) was electrophoresed in sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels and
239 transferred to Hybond-polyvinylidene difluoride membranes (Amersham)
240 overnight. After, the membranes were incubated with the primary antibodies
241 overnight at 4 °C and peroxidase-conjugated secondary antibodies at 4 °C for
242 2 hours. The signal was detected using ECL. The primary antibodies used were:
243 phospho-p70 S6K- Thr389 (#9234 – Cell signaling), phospho-GSK-3β – Ser9
244 (#9323 – Cell signaling), total AKT (#4691 – Cell signaling), and total S6K (sc-230
245 – Santa Cruz Biotechnology).

246

247 **3. Results**

248 **3.1 The presence of *Cryptococcal* spp. cells induces changes in the gene** 249 **expression in macrophages-like cells.**

250 To evaluate the changes that *Cryptococcal* spp. cells induce in the
251 transcriptional profile of macrophages, we co-incubated the J774.A1 macrophage-
252 like cells with the fungi cells for six hours and perform a RNA-seq analysis with the
253 macrophage poly A RNA. We found 38 differentially expressed genes when the
254 mammalian cells were co-incubated with *C. gattii* R265 (Table 1, Table S2) and 31
255 differentially expressed genes when the mammalian cells were co-incubated with
256 *C. neoformans* H99 (Table S3). Between them, just three genes (*Ube2c*, *Kif20a*,
257 *Iqgap3*) were found up regulated in the presence of both fungi cells (Table 2), and
258 seven (*Ndrp1*, *Ddit4*, *Pdk1*, *Nat6*, *Pfkl*, *Hilpda*, *Bnip3*) were down regulated in the
259 co-incubation with H99 and R265 cells (Table 2), which demonstrate that even

260 though they are very similar species, they can affect the expression of distinct
 261 genes in this phagocytic cells. All the three genes that appear up regulated in the
 262 presence of both fungi cells are related to cell cycle and proliferation. The gene
 263 *Ube2c* is necessary for degradation of mitotic cyclins [45], the gene *Kif20a* is
 264 related to cytokinesis [46] and the gene *Iqgap3* is associated with proliferation, and
 265 capable of inducing cell-cycle re-entry when exogenously expressed in quiescent
 266 cells [47]. Looking to the genes that are down regulated in the presence of the
 267 yeast cells, we could notice that three of them (*Ndrp1*, *Ddit4*, *Pdk1*) are related to
 268 the Akt/mTOR pathway [48-50], a cascade involved in cell cycle progression as
 269 well in other cell functions. These data suggest that the cell cycle was being
 270 affected in some manner by the presence of the fungi cells, which is in agreement
 271 with the literature [51].

272

273 Table 1. Differentially expressed genes in the J774.A1 macrophage-like cells after
 274 exposure to *C. neoformans* or *C. gattii*.

Fungal cells	Differentially expressed genes	Up-regulated	Down-regulated
<i>C. gattii</i>	38	16	22
<i>C. neoformans</i>	31	14	17

275 Number of genes that present differential expressed levels in J774.A1
 276 macrophage-like cells after the exposure to *C. neoformans* or *C. gattii*.

277

278 Table 2. Genes up-regulated and down-regulated in J774.A1 macrophage-like
 279 cells after exposure to *C. neoformans* and *C. gattii*.

Gene_ID	m.value for <i>C. neoformans</i>	m.value for <i>C. gattii</i>
<i>Ube2c</i>	0.8326	0.7916

<i>Kif20a</i>	0.8322	0.9988
<i>Iqgap3</i>	0.8090	1.0776
<i>Ndrp1</i>	-0.5982	-0.7039
<i>Ddit4</i>	-0.5995	-0.8485
<i>Pdk1</i>	-0.8477	-0.9299
<i>Nat6</i>	-0.8568	-1.6466
<i>Pfkl</i>	-0.9725	-0.9369
<i>Hilpda</i>	-1.0911	-1.0917
<i>Bnip3</i>	-1.5543	-3.1972

280 List of genes up-regulated and down-regulated in J774.A1 macrophage-like cells
 281 by the presence of both fungi cells. m. value: numeric vector of fold-change on
 282 log₂ scale for each gene between the two groups compared (*C. neoformans* x
 283 control and *C.gattii* x control).

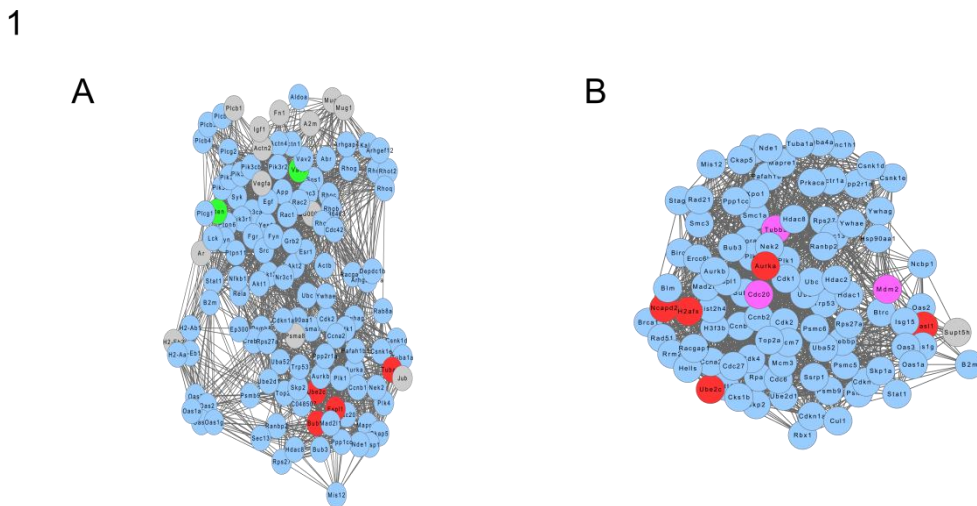
284

285 **3.2 The fungi cells can affect gene expression in various bioprocesses in** 286 **mammalian cells**

287 To gain more information about alterations in cell cycle due to the presence
 288 of the fungi cells and to find other biological processes that were possibly affected,
 289 we used systems biology tools. First, we designed two main networks in the String
 290 10 software using as input the differentially expressed genes encountered in the
 291 presence of *C. gattii* R265 cells against control (*C. gattii* network) and the
 292 differentially expressed genes encountered in the presence of *C. neoformans* H99
 293 cells against control (*C. neoformans* network) followed by the addition of 700
 294 nodes.

295 We evaluated these two networks in the Cytoscape 2.8.3 software. Using
 296 the plug-in MCODE we found clusters of genes in the two main networks. With a
 297 score cutoff of 2.0, we were able to identify 8 clusters of genes in the *C. gattii*
 298 network and 12 in the *C. neoformans* network (Table S4). Looking for genes that

299 are more topologically central for the networks, we performed an analysis using
 300 the CentiScape plug-in, choosing as parameters the hubs degree and
 301 betweenness. In the *C. gattii* network we found 129 hubs bottlenecks (Fig 1A),
 302 including 4 upregulated genes (*Bub1b*, *Ube2c*, *Tuba4a*, *Esp1*) and 2
 303 downregulated genes (*Pten*, *Vav3*). In the *C. neoformans* network we found 98
 304 hubs bottlenecks (Fig 1B), among the differentially expressed genes, just 5
 305 upregulated genes were considered bottlenecks (*Aurka*, *Oas11*, *Ncapd2*, *H2afx*,
 306 *Ube2c*).



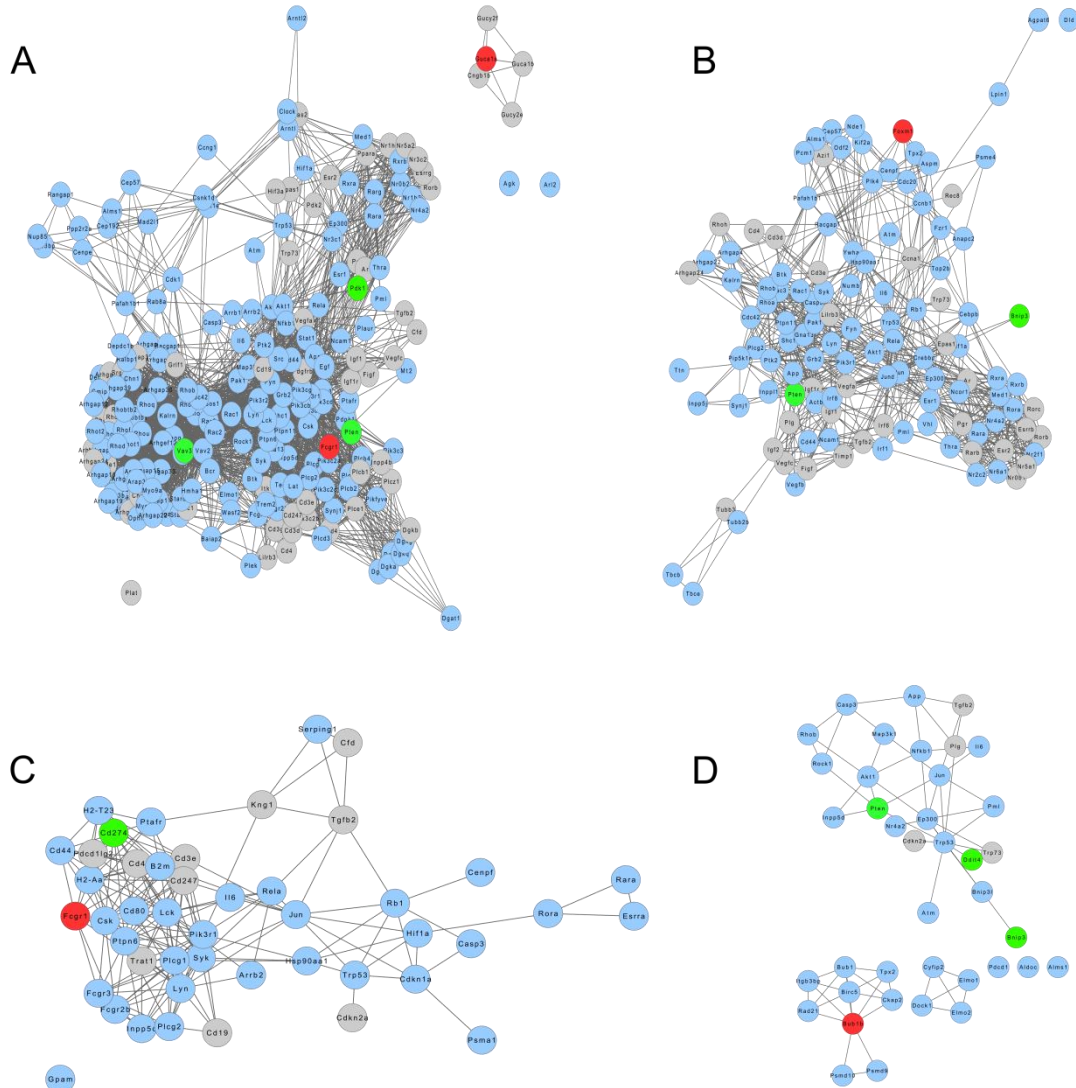
307

308 **Fig 1: *C. neoformans* and *C. gattii* networks present DEGs between their**
 309 **hubs bottlenecks.** The networks were generated in String 10 using as input the
 310 macrophage differentially expressed genes and adding 700 more related proteins
 311 (co-expression, experiments, database). Centrality analysis was performed for the
 312 two main networks using the program CentiScaPe 1.2, in the Cytoscape 2.8.3
 313 software. Red: differentially expressed genes upregulated in the fungus presence.
 314 Green: differentially expressed genes down-regulated in the fungus presence.
 315 Grey: non-expressed genes found in the RNA-seq. Blue: non-differentially
 316 expressed genes found in the RNA-seq. Pink: differentially expressed genes with
 317 a $|\log_2 \text{fold change}| < 0.58$.

318

319 Finally we analyzed the cellular processes that the genes presents in the
320 two main networks and clusters could be related. For that, we used the BINGO
321 plug-in and setting the analysis as described in materials and methods, choosing
322 the processes who present, at least, one DEG. We could observe that besides the
323 low similarities in genes that we found in the RNA-seq data, the bioprocesses that
324 are probably modulated by the presence of the fungi cells are very similar. The
325 processes that we highlight in the presence of *C. gattii* include signaling, cell
326 differentiation, death and regulation of immune system processes (Fig 2, Table
327 S5).

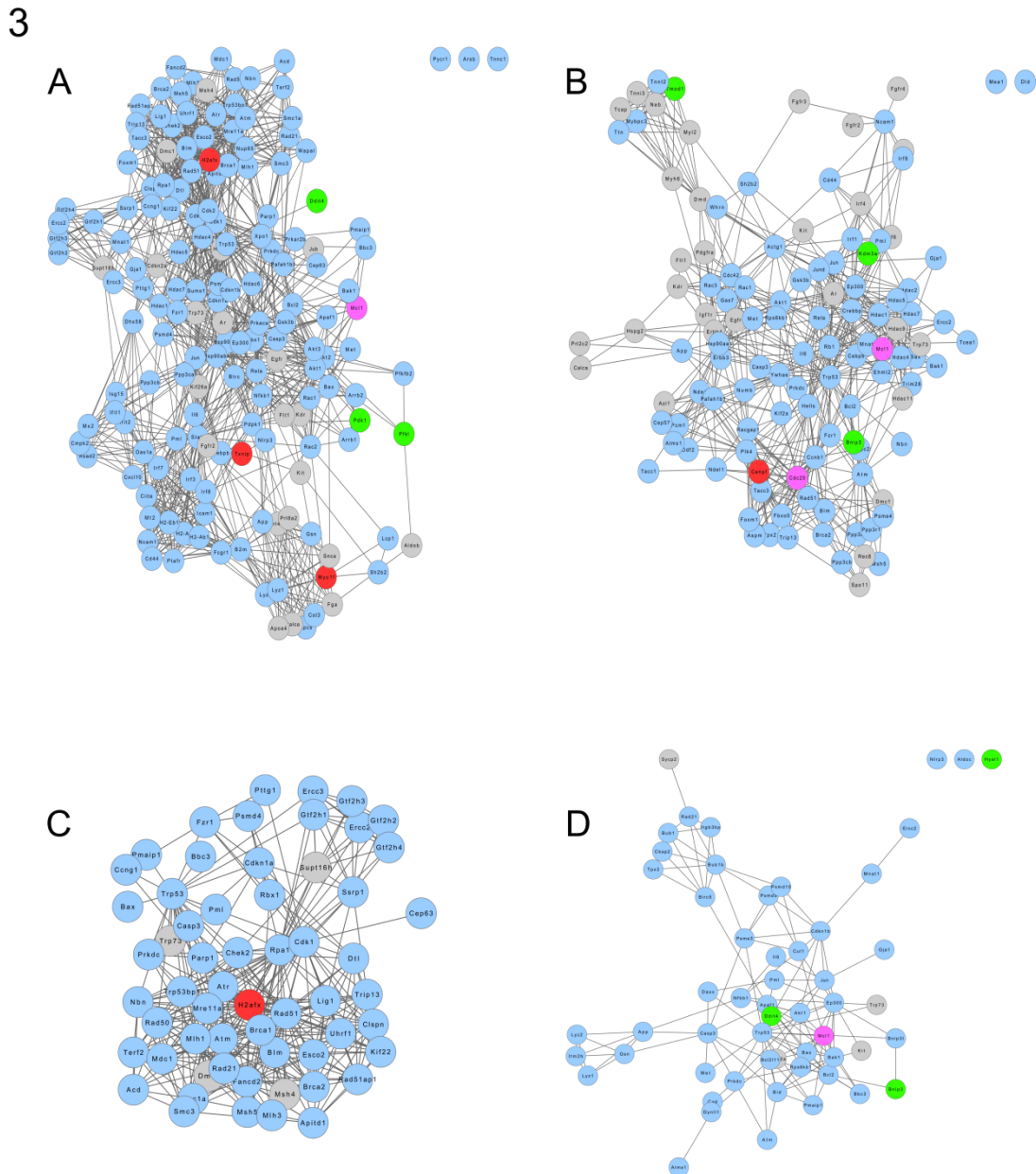
2



328

329 **Fig 2. *C. gattii* modulates different bioprocesses in the macrophages cells.**
 330 *C. gattii* networks are submitted to bioprocesses analysis using the BINGO 2.44
 331 plugin, in the Cytoscape 2.8.3 software. A. Signaling; B. Cell differentiation; C.
 332 Death; D. Regulation of immune system process. Red: differentially expressed
 333 genes upregulated in the fungus presence. Green: differentially expressed genes
 334 down-regulated in the fungus presence. Grey: non-expressed genes found in the
 335 RNA-seq. Blue: non-differentially expressed genes found in the RNA-seq.
 336

337 In the *C. neoformans* condition, we highlight response to stimulus, response
 338 to DNA damage stimulus, cell differentiation and cell death (Fig 3, Table S6).
 339 Processes involved in DNA damage and response to DNA damage are uniquely
 340 found in the *C. neoformans* network.



341
 342 **Fig 3. *C. neoformans* modulates different bioprocesses in the macrophages**
 343 **cells. *C. neoformans* networks are submitted to bioprocesses analysis using the**
 344 **BINGO 2.44 plugin, in the Cytoscape 2.8.3 software. A. Response to stimulus; B.**

345 Response to DNA damage stimulus; C. Cell differentiation; D. Cell death. Red:
346 differentially expressed genes upregulated in the fungus presence. Green:
347 differentially expressed genes down-regulated in the fungus presence. Grey: non-
348 expressed genes found in the RNA-seq. Blue: non-differentially expressed genes
349 found in the RNA-seq. Pink: differentially expressed genes with a $|\log_2$ fold
350 change < 0.58 .

351

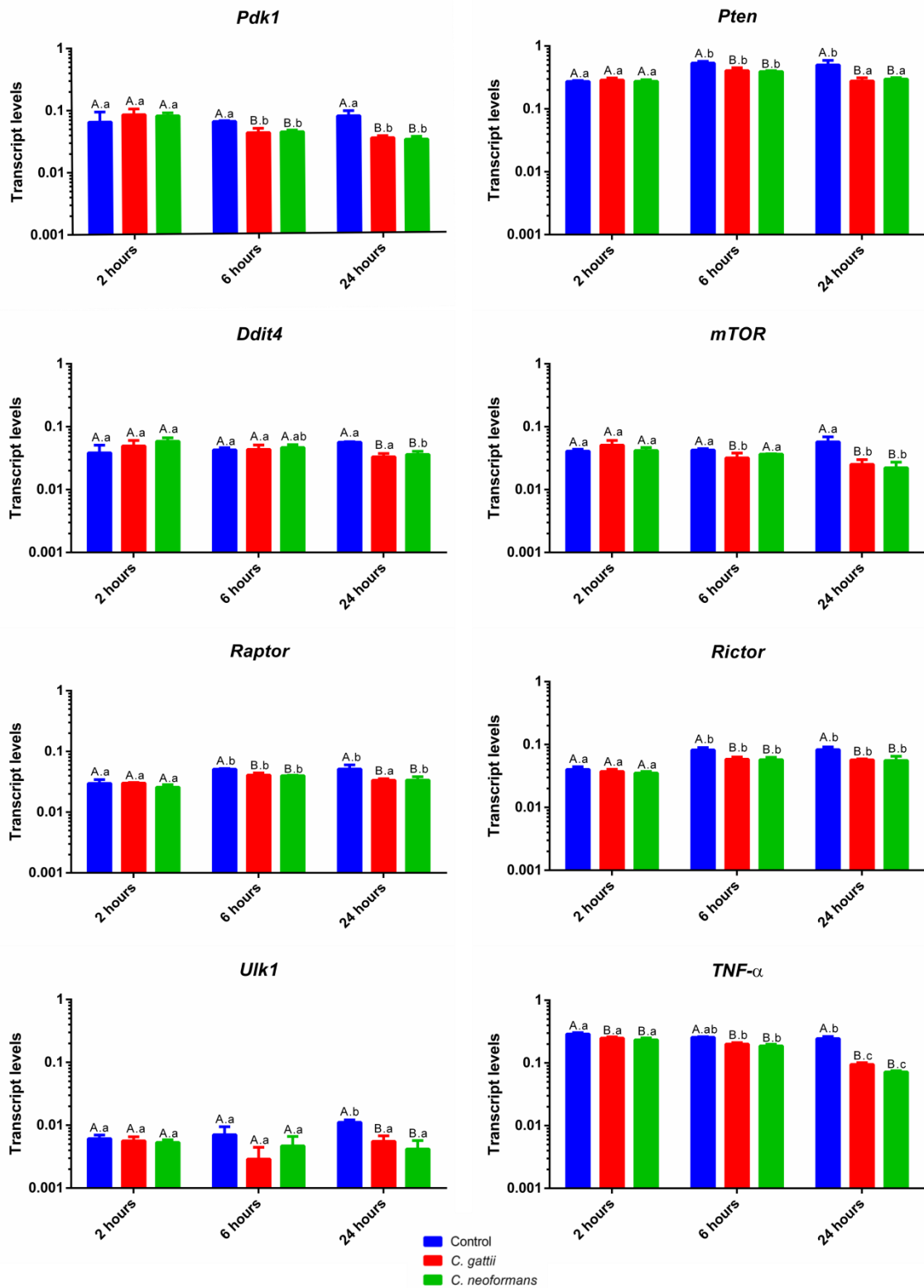
352 **3.3 The fungi cells modulate the expression level of genes involved in mTOR** 353 **pathway.**

354 The evaluation of the modulated processes found in the networks, as well
355 as some differentially expressed genes found in the RNA-seq (*Ddit 4*, *Pdk1* and
356 *Pten*), allowed us to pinpoint a convergence to the mTOR pathway. Then to
357 confirm the data found in the RNA-seq and start to look more specifically to the
358 possible modulation in the mTOR pathway by the fungi cells, we extracted RNA
359 from macrophage-like cells J774.A1 after different times of co-incubation with *C.*
360 *gattii* R265 or *C. neoformans* H99 strains and evaluated the transcriptional
361 profiling of genes involved in that cascade: *Ddit 4*, *mTOR*, *Pdk1*, *Pten*, *Raptor*,
362 *Rictor*, *Ulk1*, *TNF- α* (Fig 4). Comparing the three different conditions in the same
363 time of co-incubation we could observe a partial agreement of qRT-PCR with
364 RNA-Seq data. Transcript levels analysis of the gene *Pdk1* and *Pten* confirmed
365 the observed reduced expression in the presence of both fungi cells at six hours of
366 incubation compared with the control. This pattern was also observed after 24
367 hours. The gene *Ddit 4* did not confirm the RNA-seq data, showing less
368 expression in the presence of the fungi cells just after 24 hours of analysis. From
369 the other genes assayed all of them showed decay in the expression after 24
370 hours of incubation with both cryptococcal cells. The genes *Rictor* and *Raptor*

371 already showed less expression after six hours of incubation with both fungal
372 species. The gene *TNF- α* was the only one which, after two hours of interaction
373 with fungi cells, presented decay in expression. The gene *mTOR* was also down
374 regulated after six hours of incubation just with *C. gattii* cells.

375 We also evaluated the level of expression of each condition under all the
376 times tested. We could observe that the presence of both fungi cells decreased
377 the expression of the genes *mTOR* and *Pdk1* in the time course evaluated
378 meanwhile the control expression remained the same. The gene *Ddit 4* showed a
379 decrease in the expression during the 24 hours tested just in the presence of *C.*
380 *neoformans*. The expression of the gene *Pten* increased in all conditions tested
381 after six hours, but after 24 hours of interaction with *C. gattii* and *C. neoformans*
382 the expression decreased to similar values that we found after 2 hours co-
383 incubation. The gene *Rictor* was upregulated after six hours in all conditions tested
384 and maintained this in 24 hours, but this increase was not big as the control when
385 the J774.A1 cells were co-incubated with the fungi cells. The expression of the
386 gene *Raptor* increased in all conditions tested after six hours, but this expression
387 decreased after 24 hours when co-incubated with *C. gattii*. The gene *Ulk1*
388 presented an increase in the expression in the control condition after 24 hours.
389 The gene *TNF- α* presented a decrease in its expression during the periods tested
390 in all conditions, but the decay was more pronounced when the J774.A1 cells were
391 co-incubated with the cryptococcal cells. These data suggest that somehow the
392 cryptococcal cells can modulate the Akt/mTOR pathway.

4



393

394 Fig 4. Fungi cells modulate the transcript levels of genes involved in the
 395 mTOR pathway. IFN- γ and LPS activated J774.A1 cells were incubated for 2 h, 6

396 h and 24 h with *C. neoformans* or *C. gattii*. The measured quantity of the genes
397 tested in each sample was normalized using the Ct values obtained for the *Gapdh*
398 gene. Data are shown as the mean \pm SM from three experimental replicates of
399 three biological replicates. Columns denoted by different capital letters differ, in the
400 same period of incubation between the conditions, significantly at a *P* of ≤ 0.05 by
401 one-way ANOVA. Columns denoted by different small letters differ, the same
402 condition between the times tested, significantly at a *P* of ≤ 0.05 by one-way
403 ANOVA.

404

405 **3.4 *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 can modulate the phosphorylation** 406 **levels of proteins involved in the AKT / mTOR pathway.**

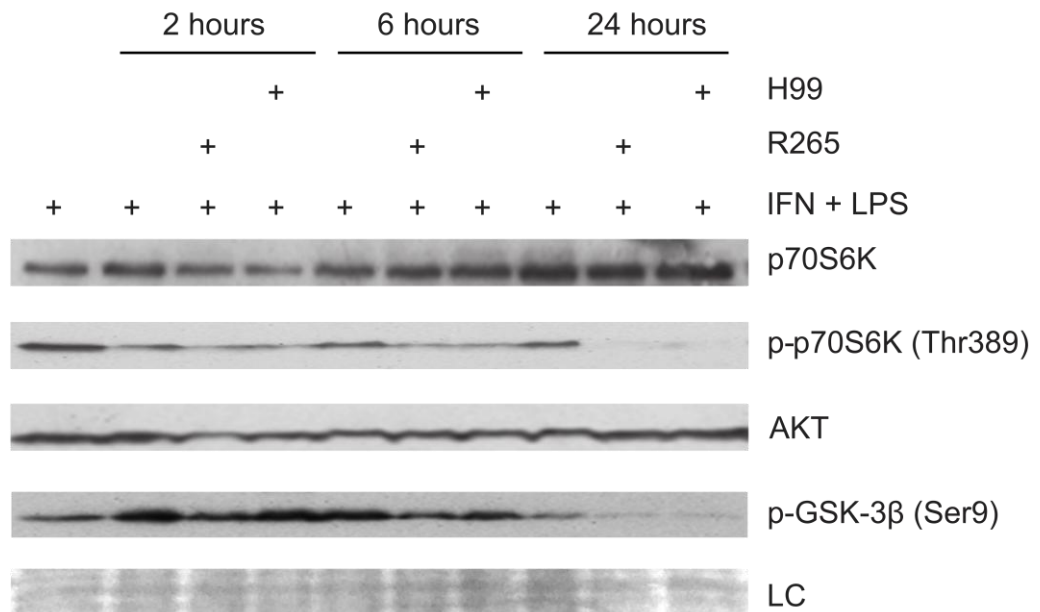
407 Next, we asked if the modulation that we observed in the expression level
408 was also noticed in the phosphorylation or protein level. For that, we extracted
409 proteins of J774.A1 cells after two, six and 24 hours of co-incubation with *C. gattii*
410 R265 or *C. neoformans* H99 cells and evaluated by *Western blot* these
411 parameters. We observed difference just after 24 hours of co-incubation when the
412 levels of phosphorylation of p70S6K and GSK-3 β were diminished in comparison
413 with the control (Fig 5A). We did not observe any difference in the total amount of
414 S6K and AKT protein with or without the yeast cells.

415 As we observed this modulation in the co-incubation with cryptococcal cells
416 we asked if this regulation in the phosphorylation of p70S6K could also be
417 observed when the J774.A1 cells where incubated with GXM, the most abundant
418 polysaccharide in the capsule [52]. We did not observe any difference in the
419 phosphorylation of the p70S6K in macrophages treated with R265 nor H99 GXM
420 in comparison to the control sample (Fig 5B).

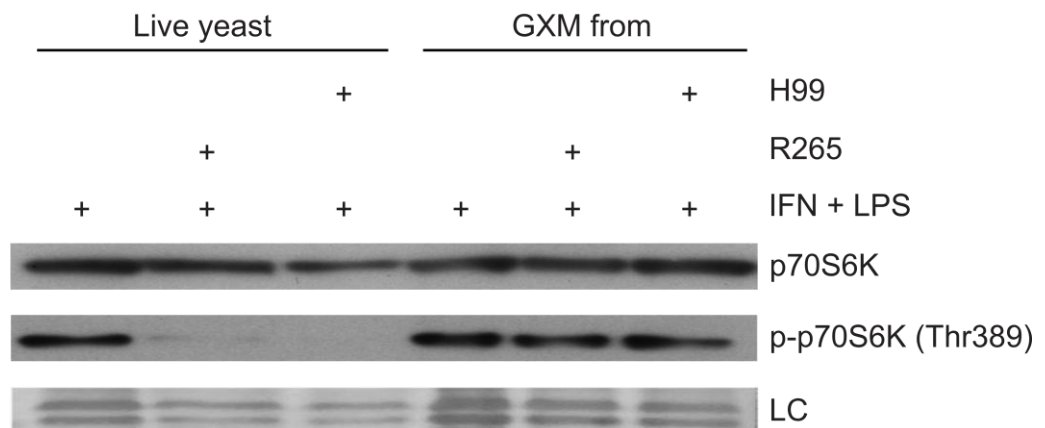
421

5

A



B



422

423

424 **Fig 5. Fungi cells decreased the levels of the phosphorylated proteins S6K e**
 425 **GSK-3β.** **A.** Proteins were extracted from pre-activated J774.A1 macrophage-like
 426 cells and pre-activated J774.A1 macrophage-like cells after coincubation for
 427 different times with *C. gattii* R265 or *C. neoformans* H99 and a *Western blot* assay
 428 were performed. **B.** Proteins were extracted from pre-activated J774.A1
 429 macrophage-like cells and pre-activated J774.A1 macrophage-like cells after

430 coincubation for 24 hours with *C. gattii* R265, *C. neoformans* H99, purified R265
431 GXM and purified H99 GXM and a *Western blot* assay were performed.

432

433 These data suggest that the presence of cryptococcal cells causes a
434 modulation of the macrophage-like cells in pos translational levels, influencing the
435 signaling of the downstream proteins, once the phosphorylation is affected.
436 Probably that modulation is only caused in the presence of the viable fungi cell,
437 once the major capsule polysaccharide are incapable of impairing the p70S6K
438 phosphorylation, but more studies are needed.

439

440 **4. Discussion**

441 During the cryptococcal infection, the interaction between macrophages and
442 fungi cells is close, once the phagocytosed pathogen can live inside the
443 mammalian cells [53]. Considerable evidences suggest that these phagocytic cells
444 can be strongly affected by the fungus presence, ultimately undergoing apoptosis
445 [13, 51, 54, 55]. Here, we performed a genome-scale comparative analysis of
446 transcriptional changes in J774.A1 macrophages-like cells exposed to *C.*
447 *neoformans* and *C. gattii* to begin to understand the processes and pathways that
448 the fungi cells can modulate in the phagocytic cells as well the differences that the
449 distinct species can cause in these immune cells.

450 We could notice a modulation in the expression of 38 genes by the
451 presence of *C. gattii* and 31 genes by the presence of *C. neoformans*. This
452 number was smaller than that observed in other studies. Coelho *et al.* found 110
453 genes with differentially modulated expression after the ingestion of *C.*
454 *neoformans* for 2 and 24 hours [56]. However, there are differences in the

455 methodology of the two works, between these differences, here the macrophage-
456 like cells were incubated with IFN- γ and LPS what makes the cells already
457 activated and polarized [57-59], and, furthermore, the co-incubation time with the
458 fungi may not have been sufficient to make bigger changes in the transcriptional
459 profile.

460 To understand the processes that could be modulated in the macrophages
461 by the presence of fungi cells we analyzed the gene ontology in the networks with
462 at least one differentially expressed gene. Comparing the results that we obtained
463 from the two networks we noticed that even with few shared differentially
464 expressed genes, the biological processes modulated are very similar. Also,
465 despite the comparison between the DEGs found in this work with the DEGs in
466 Coelho *et al.* study shown just few genes in common, the comparison between the
467 modulated process in this two studies show a major similarity [56]. In this context,
468 the bioprocesses more evident are related with: cell cycle, cell death, signaling
469 and cell communication, response to stimulus, protein modification, immune
470 process and glucose metabolic process. Most of them were already cited in the
471 literature as being modulated by *C. neoformans* [51, 55, 60, 61] but now, our work
472 could enable easier gene level studies, once the bioprocesses are related with a
473 list of possible modulated genes.

474 Once we noticed that some apparently modulated bioprocesses as well as
475 some important differentially expressed genes are related with the Akt/mTOR
476 pathway, we hypothesized that cryptococcal cells could generate such
477 modifications in the mammalian cells because it was modulating a key pathway
478 from the cells as is the Akt/mTOR pathway. We confirmed this hypothesis from

479 results based on two methods (i) cryptococcal cells could modulate the expression
480 of all tested genes related with the Akt/mTOR pathway (Fig. 4) and (ii)
481 cryptococcal cells could modulate the phosphorylation of Akt/mTOR target
482 proteins (Fig. 5). Our results suggest that the mTORC1 complex was being down
483 regulated in the macrophages-like cells by the presence of the yeast cells.

484 In the context of the qRT-PCR results, we could confirm the RNA-seq data
485 in two of three genes (*Pten* and *Pdk1*) which showed less expression when
486 incubated with cryptococcal cells in comparison to the control in six hours of
487 incubation. The result obtained with gene *Ddit4* did not confirm the RNA-seq data,
488 presenting decay in the expression just after 24 hours of incubation. A possible
489 explanation for this result could be the fact that we set a false discovery rate (FDR)
490 of 0.1 and, with that, more false positive genes could be collected. Besides that,
491 the sequence methodology used was sequencing RNA fragments from one end
492 (single-end strategy), which could also provide a major number of false positive
493 genes [62].

494 A fact that called our attention is that the two genes *Pten* and *Pdk1* were
495 down-regulated in the presence of the yeast cells, but in the Akt/mTOR pathway
496 they needs the same substrate for their activity: PIP3 recruits PDK1 and Akt to
497 plasma membrane enabling PDK1 to phosphorylate and activate Akt, however
498 *Pten* convert PIP3 to PIP2, being thus a inhibitor of the Akt activation [21]. This
499 could be explained by the fact that the gene *Pten* is not only regulated in the
500 transcriptionally level. It has being described that this gene is also regulated in the
501 post-transcriptionally, and post-translationally levels and is also sensitive to
502 regulation by its interacting proteins and its localization [63]. Therefore, we could

503 not predict if this pathway is activated just looking to the transcriptional level of
504 these genes. This difference expression induced by the fungi cells could just
505 indicate a modulation in this pathway, but a decreased activation of Akt and
506 mTORC1 is just proven by the *Western blot* analysis.

507 The Akt/mTor pathway is a key control in the cells, and it was cited as being
508 involved in a lot of outcomes in defense response that we already observe in
509 immune cells after infection with cryptococcal cells. In this context, this pathway
510 was involved in the production of nitric oxide (NO) and inhibition of mTORC1
511 inhibits NO production in inflammatory mouse DCs cells [32]. The NO production
512 was inhibited in macrophages infected with cryptococcal cells [64] and this could
513 be explained with the mTORC1 complex down regulation observed in this work.

514 Here we also observe that the expression of the gene *TNF- α* was
515 decreasing by the presence of the fungi cells in comparison with the control (Fig
516 4). In the literature is described that the expression of *TNF- α* and other
517 proinflammatory cytokines are increased in cells knock out for *TSC1* following
518 stimulation with LPS and this increased expression are related to the fact that
519 mTORC1 are activated in this cells [65]. Therefore, this decreased expression of
520 the gene *TNF- α* by the presence of *Cryptococcus* spp. could be related to the fact
521 that this fungi cells inhibited the activity of the mTORC1 complex.

522 Another outcome observed in macrophages infected with cryptococcal cells
523 that could be responded by modulation with the Akt/mTOR pathway is the
524 polarization of the immune cell. Studies are controversial of how each mTOR
525 complex polarize M1 or M2 macrophage cell as well as if they act as activating just
526 one kind of cells, but the studies agree that metabolic changes have to occur in

527 the cell to support this differentiation [24, 66]. In this work, we showed that the
528 yeasts cells inhibit the Akt and mTORC1 activation in the contrary as we observed
529 in the control cells, that are treated with IFN- γ and LPS. As LPS are described as
530 mTORC1 activator and M1 driver molecule [58, 67, 68] we suppose that the
531 macrophages incubated with cryptococcal cells are M2 polarized. This data agree
532 with literature studies who show that *C. neoformans* polarize macrophages for the
533 alternative differentiation [20, 69, 70]. Another data that corroborate our hypothesis
534 is that the protein p70S6K negatively regulates some M2 genes [71] and as the
535 cryptococcal cells could inhibit its phosphorylation and activation probably this M2
536 genes are expressed, but further studies are needed to confirm this.

537 As the capsule polysaccharides are described as antiphagocytic and a
538 strong modulator of immune cells [72-74], we supposed that the major capsule
539 polysaccharide, GXM, could interfere with the Akt/mTOR pathway, but we did not
540 see any difference between the control and GXM treated cells (Fig. 5b). Two
541 hypotheses emerge from these data: first, just the entire and active cell could
542 modify such pathways and, second, perhaps other molecules in the cryptococcal
543 surfaces are needed to cause such modulations. In this context, two molecules
544 bring attention, the Hsp 70 homologous, Ssa1, and chitin. These two molecules
545 were described as possible modulators of macrophage polarization [19, 20] and as
546 this outcome is involved with the Akt/mTOR pathway, these two could be good
547 candidates for cause this interfering in the macrophages cells.

548

549 **5. Conclusion**

550 In summary, our results confirm that some processes are modulated in
551 macrophage cells because of the infection with *C. neoformans* and *C. gattii*, and
552 besides these two species present some peculiarities the processes that these
553 organisms modulates in the phagocytic cells are very similar. In this context,
554 Akt/mTOR pathway emerged as a probable key modulator of the outcomes that
555 are observed after the co-incubation of macrophage cells and cryptococcal cells.
556 We showed here that this fungi cells could modulate this pathway and, as this
557 pathway is involved in defense response, perhaps using this strategy to reduce
558 macrophage antifungal activities.

559

560 **6. List of abbreviations**

561 **GXM:** glucuronoxylomannan **ROS:** reactive oxygen species **NO:** nitric oxide
562 **mTOR:** Mammalian target of rapamycin **mTORC1/2:** Mammalian target of
563 rapamycin complex 1/2 **TLRs:** Toll-like receptors **PAMPs:** pathogen associated
564 molecular patterns **IFN- γ :** Interferon- γ **LPS:** lipopolysaccharide **DEGs:**
565 Differentially expressed genes

566

567 **7. Declarations**

568 **Acknowledgements**

569 We thank the Dr. Diego Bonatto and Msc. Bruno Feltes for assistance with
570 the interatomic networks work. We thank Dr. Arturo Casadevall for providing
571 monoclonal antibody anti-GXM (18B7). We also thank Dr. Arnaldo Zaha for critical
572 reading of the manuscript.

573 **Funding**

574 This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho
575 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) and Coordenação
576 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A.C.P., F.M.S.,
577 M.P.T. and N.S.R. are recipients from CAPES scholarships. C.C.S. and G.L. are
578 recipients from CNPq fellowships. The funders had no role in study design, data
579 collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

580 **Authors' contributions**

581 Conceived and designed the experiments: A.C.P., G.L., L.K., M.H.V., and
582 C.C.S. Performed the experiments: A.C.P., F.M.S., M.P.T., N.S.R., and A.G.
583 Analyzed the data: A.C.P., M.P.T., and C.C.S. Contributed reagents and materials:
584 A.T.R.V., G.L., L.K., M.H.V., and C.C.S. Wrote the paper: A.C.P.

585 **Competing interests**

586 The authors declare that they have no competing interests.

587 **Consent for publication**

588 Not applicable.

589 **Ethics approval and consent to participate**

590 Not applicable.

591

592 **8. References**

- 593 1. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC.
594 Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012; 4:165rv113.
- 595 2. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller
596 TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis
597 among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009; 23:525-530.
- 598 3. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A,
599 Bahn YS. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic
600 agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;
601 4:a019760.

- 602 4. D'Souza CA, Kronstad JW, Taylor G, Warren R, Yuen M, Hu G, Jung WH,
603 Sham A, Kidd SE, Tangen K *et al.* Genome variation in *Cryptococcus gattii*,
604 an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *MBio* 2011; 2:e00342-
605 00310.
- 606 5. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 2001;
607 39:155-168.
- 608 6. Bielska E, May RC. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS*
609 *Yeast Res* 2016; 16:fov106.
- 610 7. Ngamskulrungraj P, Chang Y, Sionov E, Kwon-Chung KJ. The primary
611 target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus*
612 *neoformans* in a murine model. *mBio* 2012; 3:
- 613 8. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the
614 two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 1995; 21:28-34;
615 discussion 35-26.
- 616 9. Osterholzer JJ, Milam JE, Chen GH, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski
617 MA. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early
618 host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*.
619 *Infect Immun* 2009; 77:3749-3758.
- 620 10. Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu*
621 *Rev Immunol* 2011; 29:1-21.
- 622 11. Ghosn EE, Russo M, Almeida SR. Nitric oxide-dependent killing of
623 *Cryptococcus neoformans* by B-1-derived mononuclear phagocyte. *J*
624 *Leukoc Biol* 2006; 80:36-44.
- 625 12. Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL, Jr. *Cryptococcus*
626 and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome.
627 *Front Microbiol* 2016; 7:105.
- 628 13. Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in
629 macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and
630 accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc*
631 *Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:3165-3170.
- 632 14. Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after
633 *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 2006;
634 16:2161-2165.
- 635 15. Smith LM, Dixon EF, May RC. The fungal pathogen *Cryptococcus*
636 *neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cell*
637 *Microbiol* 2015; 17:702-713.
- 638 16. Davis MJ, Eastman AJ, Qiu Y, Gregorka B, Kozel TR, Osterholzer JJ,
639 Curtis JL, Swanson JA, Olszewski MA. *Cryptococcus neoformans*-induced
640 macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. *J*
641 *Immunol* 2015; 194:2219-2231.
- 642 17. Huston SM, Li SS, Stack D, Timm-McCann M, Jones GJ, Islam A, Berenger
643 BM, Xiang RF, Colarusso P, Mody CH. *Cryptococcus gattii* is killed by
644 dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic
645 cell maturation. *J Immunol* 2013; 191:249-261.
- 646 18. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D,
647 Locksley RM. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells
648 associated with allergy. *Nature* 2007; 447:92-96.

- 649 19. Van Dyken SJ, Mohapatra A, Nussbaum JC, Molofsky AB, Thornton EE,
650 Ziegler SF, McKenzie AN, Krummel MF, Liang HE, Locksley RM. Chitin
651 activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory
652 responses via innate lymphoid type 2 and $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* 2014;
653 40:414-424.
- 654 20. Eastman AJ, He X, Qiu Y, Davis MJ, Vedula P, Lyons DM, Park YD,
655 Hardison SE, Malachowski AN, Osterholzer JJ *et al.* Cryptococcal heat
656 shock protein 70 homolog Ssa1 contributes to pulmonary expansion of
657 *Cryptococcus neoformans* during the afferent phase of the immune
658 response by promoting macrophage M2 polarization. *J Immunol* 2015;
659 194:5999-6010.
- 660 21. Katholnig K, Linke M, Pham H, Hengstschläger M, Weichhart T. Immune
661 responses of macrophages and dendritic cells regulated by mTOR
662 signalling. *Biochem Soc Trans* 2013; 41:927-933.
- 663 22. Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in
664 metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15:155-
665 162.
- 666 23. Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr*
667 *Opin Genet Dev* 2013; 23:53-62.
- 668 24. Weichhart T, Hengstschläger M, Linke M. Regulation of innate immune cell
669 function by mTOR. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:599-614.
- 670 25. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease.
671 *Cell* 2012; 149:274-293.
- 672 26. Schmitz F, Heit A, Dreher S, Eisenächer K, Mages J, Haas T, Krug A,
673 Janssen KP, Kirschning CJ, Wagner H. Mammalian target of rapamycin
674 (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J*
675 *Immunol* 2008; 38:2981-2992.
- 676 27. Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, Kasturi S, Zeyda M, Zlabinger GJ,
677 Pulendran B, Hörl WH, Säemann MD, Weichhart T. A versatile role of
678 mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and
679 differentiation. *J Immunol* 2010; 185:3919-3931.
- 680 28. Viel S, Marçais A, Guimaraes FS, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, Degouve
681 S, Djebali S, Sanlaville A, Charrier E *et al.* TGF- β inhibits the activation and
682 functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal* 2016;
683 9:ra19.
- 684 29. Vangan N, Cao Y, Jia X, Bao W, Wang Y, He Q, Binderiya U, Feng X, Li T,
685 Hao H *et al.* mTORC1 mediates peptidoglycan induced inflammatory
686 cytokines expression and NF- κ B activation in macrophages. *Microb Pathog*
687 2016; 99:111-118.
- 688 30. Cheekatla SS, Aggarwal A, Naik S. mTOR signaling pathway regulates the
689 IL-12/IL-10 axis in *Leishmania donovani* infection. *Med Microbiol Immunol*
690 2012; 201:37-46.
- 691 31. Sukhbaatar N, Hengstschläger M, Weichhart T. mTOR-Mediated
692 Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function. *Trends Immunol*
693 2016; 37:778-789.
- 694 32. Amiel E, Everts B, Fritz D, Beauchamp S, Ge B, Pearce EL, Pearce EJ.
695 Mechanistic target of rapamycin inhibition extends cellular lifespan in

- 696 dendritic cells by preserving mitochondrial function. *J Immunol* 2014;
697 193:2821-2830.
- 698 33. **Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High**
699 **Throughput Sequence Data**
700 [<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>]
- 701 34. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-
702 throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015; 31:166-169.
- 703 35. Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K. TCC: an R package for
704 comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC*
705 *Bioinformatics* 2013; 14:219.
- 706 36. Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA. STRING: a web-server to retrieve
707 and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic*
708 *Acids Res* 2000; 28:3442-3444.
- 709 37. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-
710 Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP *et al.* STRING v10:
711 protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic*
712 *Acids Res* 2015; 43:D447-452.
- 713 38. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N,
714 Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated
715 models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13:2498-
716 2504.
- 717 39. Bader GD, Hogue CW. An automated method for finding molecular
718 complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 2003;
719 4:2.
- 720 40. Scardoni G, Petterlini M, Laudanna C. Analyzing biological network
721 parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics* 2009; 25:2857-2859.
- 722 41. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess
723 overrepresentation of gene ontology categories in biological networks.
724 *Bioinformatics* 2005; 21:3448-3449.
- 725 42. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical
726 and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical*
727 *Society Series B (Methodological)* 1995; 57:289-300.
- 728 43. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using
729 real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*
730 2001; 25:402-408.
- 731 44. Nimrichter L, Frases S, Cinelli LP, Viana NB, Nakouzi A, Travassos LR,
732 Casadevall A, Rodrigues ML. Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans*
733 capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryot*
734 *Cell* 2007; 6:1400-1410.
- 735 45. Townsley FM, Aristarkhov A, Beck S, Hershko A, Ruderman JV. Dominant-
736 negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells
737 in metaphase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:2362-2367.
- 738 46. Hill E, Clarke M, Barr FA. The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required
739 for cytokinesis. *EMBO J* 2000; 19:5711-5719.
- 740 47. Nojima H, Adachi M, Matsui T, Okawa K, Tsukita S. IQGAP3 regulates cell
741 proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* 2008;
742 10:971-978.

- 743 48. Weiler M, Blaes J, Pusch S, Sahm F, Czabanka M, Luger S, Bunse L,
744 Solecki G, Eichwald V, Jugold M *et al.* mTOR target NDRG1 confers
745 MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy. *Proc Natl Acad*
746 *Sci U S A* 2014; 111:409-414.
- 747 49. Dennis MD, Coleman CS, Berg A, Jefferson LS, Kimball SR. REDD1
748 enhances protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Akt to
749 repress mTORC1 signaling. *Sci Signal* 2014; 7:ra68.
- 750 50. Finlay DK, Rosenzweig E, Sinclair LV, Feijoo-Carnero C, Hukelmann JL,
751 Rolf J, Panteleyev AA, Okkenhaug K, Cantrell DA. PDK1 regulation of
752 mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of
753 CD8+ T cells. *J Exp Med* 2012; 209:2441-2453.
- 754 51. Coelho C, Tesfa L, Zhang J, Rivera J, Gonçalves T, Casadevall A. Analysis
755 of cell cycle and replication of mouse macrophages after in vivo and in vitro
756 *Cryptococcus neoformans* infection using laser scanning cytometry. *Infect*
757 *Immun* 2012; 80:1467-1478.
- 758 52. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E,
759 Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus*
760 *neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 2009; 68:133-216.
- 761 53. Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER.
762 *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human
763 macrophages. *Infect Immun* 1999; 67:885-890.
- 764 54. Alvarez M, Casadevall A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation
765 after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC*
766 *Immunol* 2007; 8:16.
- 767 55. Ben-Abdallah M, Sturny-Leclère A, Avé P, Louise A, Moyrand F, Weih F,
768 Janbon G, Mémet S. Fungal-induced cell cycle impairment, chromosome
769 instability and apoptosis via differential activation of NF- κ B. *PLoS Pathog*
770 2012; 8:e1002555.
- 771 56. Coelho C, Souza AC, Derengowski LaS, de Leon-Rodriguez C, Wang B,
772 Leon-Rivera R, Bocca AL, Gonçalves T, Casadevall A. Macrophage
773 mitochondrial and stress response to ingestion of *Cryptococcus*
774 *neoformans*. *J Immunol* 2015; 194:2345-2357.
- 775 57. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of
776 endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:169-176.
- 777 58. Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of the host
778 response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:8-14.
- 779 59. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The
780 chemokine system in diverse forms of macrophage activation and
781 polarization. *Trends Immunol* 2004; 25:677-686.
- 782 60. Monari C, Paganelli F, Bistoni F, Kozel TR, Vecchiarelli A. Capsular
783 polysaccharide induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic
784 mechanisms. *Cell Microbiol* 2008; 10:2129-2137.
- 785 61. Wright L, Bubb W, Davidson J, Santangelo R, Krockenberger M,
786 Himmelreich U, Sorrell T. Metabolites released by *Cryptococcus*
787 *neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human
788 neutrophil function. *Microbes Infect* 2002; 4:1427-1438.

- 789 62. González E, Joly S. Impact of RNA-seq attributes on false positive rates in
790 differential expression analysis of de novo assembled transcriptomes. *BMC*
791 *Res Notes* 2013; 6:503.
- 792 63. Bermúdez Brito M, Goulielmaki E, Papakonstanti EA. Focus on PTEN
793 Regulation. *Front Oncol* 2015; 5:166.
- 794 64. Kawakami K, Zhang T, Qureshi MH, Saito A. *Cryptococcus neoformans*
795 inhibits nitric oxide production by murine peritoneal macrophages
796 stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Cell Immunol*
797 1997; 180:47-54.
- 798 65. Pan H, O'Brien TF, Zhang P, Zhong XP. The role of tuberous sclerosis
799 complex 1 in regulating innate immunity. *J Immunol* 2012; 188:3658-3666.
- 800 66. Covarrubias AJ, Aksoylar HI, Horng T. Control of macrophage metabolism
801 and activation by mTOR and Akt signaling. *Semin Immunol* 2015; 27:286-
802 296.
- 803 67. Lee PS, Wilhelmson AS, Hubner AP, Reynolds SB, Gallacchi DA, Chiou
804 TT, Kwiatkowski DJ. mTORC1-S6K activation by endotoxin contributes to
805 cytokine up-regulation and early lethality in animals. *PLoS One* 2010;
806 5:e14399.
- 807 68. Schaeffer V, Arbabi S, Garcia IA, Knoll ML, Cuschieri J, Bulger EM, Maier
808 RV. Role of the mTOR pathway in LPS-activated monocytes: influence of
809 hypertonic saline. *J Surg Res* 2011; 171:769-776.
- 810 69. Müller U, Stenzel W, Köhler G, Werner C, Polte T, Hansen G, Schütze N,
811 Straubinger RK, Blessing M, McKenzie AN *et al.* IL-13 induces disease-
812 promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and
813 allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus*
814 *neoformans*. *J Immunol* 2007; 179:5367-5377.
- 815 70. Arora S, Olszewski MA, Tsang TM, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle
816 GB. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic
817 pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2011;
818 79:1915-1926.
- 819 71. Warren KJ, Fang X, Gowda NM, Thompson JJ, Heller NM. The TORC1-
820 activated Proteins, p70S6K and GRB10, Regulate IL-4 Signaling and M2
821 Macrophage Polarization by Modulating Phosphorylation of Insulin
822 Receptor Substrate-2. *J Biol Chem* 2016; 291:24922-24930.
- 823 72. Huston SM, Ngamskulrungraj P, Xiang RF, Ogbomo H, Stack D, Li SS,
824 Timm-McCann M, Kyei SK, Oykhman P, Kwon-Chung KJ *et al.*
825 *Cryptococcus gattii* Capsule Blocks Surface Recognition Required for
826 Dendritic Cell Maturation Independent of Internalization and Antigen
827 Processing. *J Immunol* 2016; 196:1259-1271.
- 828 73. Kozel TR, Pfrommer GS, Guerlain AS, Highison BA, Highison GJ. Role of
829 the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis*
830 1988; 10 Suppl 2:S436-439.
- 831 74. Garcia-Rodas R, Zaragoza O. Catch me if you can: phagocytosis and killing
832 avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS immunology and medical*
833 *microbiology* 2012; 64:147-161.
- 834
- 835

Supplementary material.

Table S1. Primers

Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
<i>Ddit 4</i>	CAAGGCAAGAGCTGCCATAG	CCGGTACTTAGCGTCAGGG
<i>mTOR</i>	ACCGGCACACATTTGAAGAAG	CTCGTTGAGGATCAGCAAGG
<i>Pdk1</i>	GTGCCCATTCAGTCCAGTGT	AAGGGGTTGGTGCTTGGTGTC
<i>Pten</i>	TGGATTGACTTAGACTTGACCT	GCGGTTTCATAATGTCTCTCAG
<i>Raptor</i>	TTTGTCTACGACTGTTCCAATGC	GCTACCTCTAGTTCCTGCTCC
<i>Rictor</i>	GCTGCGCTATCTCATCCAAGA	GGGTTCTGAAGTGCTAGTTCAC
<i>Ulk1</i>	AAGTTCGAGTTCTCTCGCAAG	CGATGTTTTTCGTGCTTTAGTTC
<i>TNF-α</i>	AGCCTCTTCTCATTCTCTGC	GGAGGCCATTTGGGAACT
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

List of primers used in this work.

Table S2. Differentially expressed genes in J774.A1 macrophage-like cells after exposure to *C. gattii*.

Gene	Gene_ID	m.value	p.value	q.value
Diacylglycerol O-acyltransferase 2	Dgat2	1.6568	6.42E-05	0.0321
Cell division cycle associated 2	Cdca2	1.6185	3.69E-05	0.0239
Transmembrane protein 229B	Tmem229b	1.2908	1.23E-04	0.0465
IQ motif containing GTPase activating protein 3	Iqgap3	1.0776	8.04E-05	0.0357
Family with sequence similarity 64, member A	Fam64a	1.0432	5.03E-05	0.0286
Forkhead box M1	Foxm1	1.0297	2.15E-05	0.0145
Fc receptor, IgG, high affinity I	Fcgr1	1.0210	1.91E-05	0.0135
Kinesin family member 20 ^a	Kif20a	0.9988	1.24E-05	0.0107
Nfat activating molecule with ITAM motif 1	Nfam1	0.9539	7.61E-05	0.0348
Extra spindle pole bodies	Esp11	0.9133	3.79E-06	0.0042

1, separase

G protein-coupled receptor 84	Gpr84	0.9053	5.64E-05	0.0302
Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	Ube2c	0.7916	4.62E-05	0.0276
Centrosomal protein 250	Cep250	0.7896	1.43E-05	0.0117
Tubulin, alpha 4A	Tuba4a	0.7817	1.25E-08	3.25E-05
Guanylate cyclase activator 1a	Guca1a	0.7142	1.03E-04	0.0407
BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B	Bub1b	0.6168	1.04E-04	0.0407
Brain abundant, membrane attached signal protein 1	Basp1	-0.5886	2.48E-06	0.0030
Stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	Scd2	-0.6021	1.05E-04	0.0407
N-myc downstream regulated gene 1	Ndr1	-0.7039	1.72E-05	0.0127
Proline-rich nuclear receptor coactivator 1	Pnrc1	-0.7103	3.96E-05	0.0246
CD274 antigen	Cd274	-0.7225	9.46E-05	0.0397
Polo-like kinase 2	Plk2	-0.7751	4.51E-06	0.0048
Family with sequence similarity 162, member A	Fam162a	-0.7803	5.08E-07	8.77E-04
Egl-9 family hypoxia-inducible factor 1	Egl1	-0.7889	6.87E-05	0.0333
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Slc2a1	-0.8117	4.87E-09	1.51E-05
DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	-0.8485	1.69E-09	6.55E-06
Immediate early response 3	Ier3	-0.8994	1.33E-09	6.55E-06

Phosphatase and tensin homolog	Pten	-0.9014	1.68E-05	0.0127
Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	Pdk1	-0.9299	6.41E-06	0.0058
Phosphofructokinase	Pfkl	-0.9369	5.61E-10	4.35E-06
Hypoxia inducible lipid droplet associated	Hilpda	-1.0917	7.79E-11	1.21E-06
Matrix metalloproteinase 12	Mmp12	-1.3546	5.69E-08	1.26E-04
Vav 3 oncogene	Vav3	-1.5756	7.36E-05	0.0346
N-acetyltransferase 6	Nat6	-1.6466	8.64E-08	1.68E-04
Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	Nr1d1	-1.6601	9.27E-05	0.0397
1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase 9	O- Agpat9	-1.6832	6.01E-05	0.0311
BCL2/adenovirus interacting protein 3	E1B Bnip3	-3.1972	1.53E-06	0,0022
Ankyrin repeat domain 37	Ankrd37	-3.9218	1.22E-06	0.0019

List of the DEGs in macrophage cells after exposure to *C. gattii*. m.value: numeric vector of fold-change on log₂ scale for each gene between the two groups compared (*C. gattii* x control). p.value: numeric vector of p-value. q.value: numeric vector of q-value calculated based on the p-value using FDR of 0.1.

Table S3. Differentially expressed genes in macrophages cells after exposure to *C. neoformans*.

Gene	Gene_ID	m.value	p.value	q.value
Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	Cdkn3	2.9350	8.74E-05	0.0397
Family with sequence similarity 83, member D	Fam83d	1.1525	2.55E-05	0.0181
Myosin IF	Myo1f	1.0411	8.78E-05	0.0397
Centromere protein F	Cenpf	0.9470	9.83E-05	0.0411
Kinesin family member 11	Kif11	0.8688	6.52E-05	0.0379
Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	Ube2c	0.8326	5.02E-08	1.02E-04

Kinesin family member 20 ^a	Kif20a	0.8322	9.73E-05	0.0411
IQ motif containing				
GTPase activating protein 3	Iqgap3	0.8090	9.84E-05	0.0411
Aurora kinase A	Aurka	0.7523	7.58E-05	0.0394
Thioredoxin interacting protein	Txnip	0.7328	9.93E-09	5.39E-05
H2A histone family, member X	H2afx	0.7296	4.37E-06	0.0059
Non-SMC condensin I complex, subunit D2	Ncapd2	0.6435	1.42E-05	0.0115
2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	Oasl1	0.5970	2.78E-05	0.0189
Transforming growth factor, beta induced	Tgfb1	0.5888	4.90E-06	0.0061
N-myc downstream regulated gene 1	Ndr1	-0.5982	2.02E-05	0.0150
DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	-0.5995	7.75E-05	0.0395
Jumonji domain containing 1C	Jmjd1c	-0.6900	7.57E-05	0.0395
Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	P4ha1	-0.7160	3.22E-08	8.75E-05
Elongation factor RNA polymerase II	E11	-0.7476	1.37E-05	0.0115
A kinase (PRKA) anchor protein 2	Akap2	-0.7586	8.18E-06	0.0095
Lysine (K)-specific demethylase 3A	Kdm3a	-0.8236	4.81E-07	7.84E-04
Phosphoinositide-dependent kinase 1	Pdk1	-0.8477	2.72E-08	8.75E-05
N-acetyltransferase 6	Nat6	-0.8567	1.33E-05	0.0115
Phosphofructokinase,	Pfkl	-0.9725	2.03E-14	1.78E-10

liver, B-type

Suppression of tumorigenicity 7-like	St7l	-0.9860	1.08E-05	0.0112
Mir6236 microRNA 6236	Mir6236	-1.0482	3.11E-08	8.75E-05
Hypoxia inducible lipid droplet associated	Hilpda	-1.0911	2.18E-14	1.78E-10
Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	Flrt2	-1.1175	1.18E-05	0.0113
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	Bnip3	-1.5543	3.02E-06	0.0045
Hyaluronoglucosaminidase 1	Hyal1	-2.0573	4.86E-08	1.02E-04
Tropomodulin 1	Tmod1	-3.4012	4.96E-05	0.0311

List of the DEGs in macrophage cells after exposure to *C. neoformans*. m.value: numeric vector of fold-change on log₂ scale for each gene between the two groups compared (*C. neoformans* x control). p.value: numeric vector of p-value. q.value: numeric vector of q-value calculated based on the p-value using FDR of 0.1.

Table S4. Score and number of nodes for the two main networks.

***C. gattii* network**

	Score	Nodes
Cluster 1	35.008	378
Cluster 2	21.41	371
Cluster 3	19.523	283
Cluster 4	19.353	215
Cluster 5	15.495	186
Cluster 6	8.777	94
Cluster 7	6.893	28
Cluster 8	3.59	78

***C. neoformans* network**

	Score	Nodes
Cluster 1	41.459	508
Cluster 2	21.804	439

Cluster 3	16.083	156
Cluster 4	14.692	156
Cluster 5	12.855	110
Cluster 6	9.766	47
Cluster 7	5.639	108
Cluster 8	4.286	63
Cluster 9	3.862	29
Cluster 10	3.375	8
Cluster 11	2.75	24
Cluster 12	2.071	14

The analysis of the networks in terms of the major clusters or module composition was performed using the program Molecular Complex Detection (MCODE). The score cutoff was 2. *C. gattii* network present 8 clusters and *C. neoformans* network present 12 cluster.

Table S5. Bioprocess *C. gattii* network

GO-ID	Description	Total Nodes	Up-regulated nodes	Down-regulated nodes	q.value
51301	Cell division	105	Bub1b Ube2c Cdca2	-	3.96E-87
16310	Phosphorylation	93	Bub1b	Pfkl Pdk1 Plk2	3.08E-32
23052	Signaling	217	Guca1a Fcgr1	Pten Vav3 Pdk1 Pfkl	3.78E-30
50896	Response to stimulus	163	Guca1a Foxm1 Fcgr1	Pten Pdk1 Egln1 Ddit4	1.88E-26
30154	Cell differentiation	120	Foxm1	Pten Bnip3	2.67E-21
42127	Regulation of cell proliferation	70	Foxm1	Pten Cd274	7.82E-20
2376	Immune system process	69	Fcgr1	Ndr1	8.55E-18
22607	Cellular component assembly	61	Tuba4a	Pfkl Pdk1 Vav3	1.07E-17
42325	Regulation of phosphorylation	47	-	Vav3	5.36E-15
2682	Regulation of immune system process	46	Fcgr1	Cd274	2.46E-14

10468	Regulation of gene expression	126	Foxm1	Pten Nr1d1	2.67E-14
10941	Regulation of cell death	59	Fcgr1	Pten Bnip3	1.26E-12
6464	Protein modification process	81	Bub1b Ube2c	Pten Pdk1 Plk2	6.99E-12
10646	Regulation of cell communication	66	Foxm1	Pfkl Pten Vav3 Ddit4	6.42E-11
30030	Cell projection organization	39	-	Pten Vav3	5.24E-09
45595	Regulation of cell differentiation	47	-	Pten	9.10E-09
48583	Regulation of response to stimulus	41	Foxm1 Fcgr1	-	1.69E-08
16477	Cell migration	31	-	Pten Vav3	5.53E-08
51049	Regulation of transport	43	Fcgr1	Pfkl Pten	2.72E-07
1775	Cell activation	27	-	Ndrp1	2.55E-05
50865	Regulation of cell activation	22	-	Cd274	4.66E-05
16265	Death	39	Bub1b	Pten Ddit4 Bnip3	1.27E-04
16192	Vesicle mediated transport	32	Fcgr1	Vav3	2.74E-02
6952	Defense response	30	Fcgr1	-	3.03E-02
16043	Cellular component organization	156	Tuba4a Bub1b Esp1 Ube2c Cdca2	Pten Vav3	1.40E-80
23034	Intracellular signaling pathway	46	-	Vav3	1.00E-10
51128	Regulation of cellular component organization	31	-	Pten	2.00E-09
43412	Macromolecule modification	48	Bub1b Ube2c	Pten Plk2	6.58E-07
45941	Positive regulation of transcription	30	Foxm1	-	1.33E-05
30031	Cell projection assembly	11	-	Vav3	2.20E-04
35466	Regulation of signaling pathway	27	Foxm1	Pten Vav3	1.09E-02
10628	Positive regulation of gene expression	52	Foxm1	-	2.54E-22
42981	Regulation of apoptosis	45	Fcgr1	Pten	6.01E-16
6915	Apoptosis	22	-	Pten Ddit4	7.17E-03

31344	Regulation of cell projection organization	12	-	Pten	1.92E-02
6096	Glycolysis	14	-	Pfkl	1.53E-13
19882	Antigen processing and presentation	11	Fcgr1	-	7.71E-08
2694	Regulation of leukocyte activation	16	-	Cd274	8.48E-07
6954	Inflammatory response	17	Fcgr1	-	4.70E-06
2443	Leukocyte mediated immunity	12	Fcgr1	-	5.50E-06
43687	Post-translation protein modification	35	-	Pten	1.94E-09
48870	Cell motility	15	-	Pten Vav3	6.24E-04
30258	Lipid modification	22	-	Pten	3.28E-26
43067	Regulation of programmed cell death	28	-	Pten	2.04E-10
6006	Glucose metabolic process	13	-	Pfkl Pdk1	7.54E-07
30334	Regulation of cell migration	13	-	Pten	2.14E-06
16311	Dephosphorylation	13	-	Pten	1.80E-05
7166	Cell surface receptor linked signaling pathway	28	-	Vav3	3.03E-04
19318	Hexose/carbohydrate metabolic process	18	-	Pfkl	6.47E-28
46835	Carbohydrate phosphorylation	8	-	Pfkl	8.63E-16
16043	Cellular component organization	29	-	Vav3	7.73E-09
51171	Regulation of nitrogen compound metabolic process	28	-	Vav3	7.22E-07
6796	Phosphate metabolic process	33	Bub1b	Pten	3.88E-15
51270	Regulation of cellular component movement	11	-	Pten	3.90E-05
6996	Organelle organization	36	Bub1b Esp1 Ube2c	Vav3	4.54E-17

List of the selected bioprocesses from the *C. gattii* network and clusters. The analysis was performed using the BINGO 2.44 plugin, in the Cytoscape 2.8.3 software.

Table S6. Bioprocess *C. neoformans* network

GO-ID	Description	Total Nodes	Up-regulated nodes	Down-regulated nodes	q.value
6974	Response to DNA damage stimulus	59	H2afx	-	8.77E-32

6950	Response to stress	115	H2afx Txnip Myo1f	Ddit4 Pdk1	3.19E-31
50896	Response to stimulus	163	H2afx Txnip Myo1f	Ddit4 Pdk1 Pfk1	8.71E-28
10468	Regulation of gene expression	144	Txnip	Kdm3a Jmjd1c Eil	8.10E-24
7010	Cytoskeleton organization	50	Kif11	Tmod1	1.40E-22
30154	Cell differentiation	118	Cenpf	Bnip3 Kdm3a Tmod1	4.12E-21
43412	Macromolecule modification	94	Aurka Ube2c	P4ha1 Pdk1	4.30E-18
16310	Phosphorylation	70	Aurka	Pdk1 Pfk1	1.31E-16
10941	Regulation of cell death	63	Cenpf Txnip	Bnip3	1.33E-15
8219	Cell death	55	-	Bnip3 Ddit4 Hyal1	5.58E-15
71103	DNA conformation change	24	H2afx Ncapd2	-	7.93E-15
6096	Glycolysis	17	-	Pfk1	3.91E-12
2376	Immune system process	59	Myo1f	Ndrp1	6.18E-12
10467	Gene expression	117	Txnip	Jmjd1c Kdm3a Eil	1.28E-10
32386	Regulation of intracellular transport	13	Cenpf	-	6.26E-06
46835	Carbohydrate phosphorylation	8	-	Pfk1	1.23E-04
6310	DNA recombination	12	H2afx	-	6.29E-03
32880	Regulation of protein localization	14	Cenpf	-	2.16E-02
16567	Protein ubiquitination	7	Ube2c	-	4.65E-03
6468	Protein aminoacid phosphorylation	13	Aurka	-	1.75E-02
7049	Cell cycle	182	Cdkn3 Fam83d Aurka Ube2c Kif11 H2afx Ncapd2	-	0.0000E-100
48285	Organelle fission	109	Fam83d Aurka Ube2c Kif11	-	0.0000E-100

			Ncapd2		
51726	Regulation of cell cycle	44	Cdkn3 Cenpf	-	1.37E-27
43067	Regulation of programmed cell death	37	Cenpf	-	6.26E-06
16043	Cellular component organization	131	Fam83d H2afx	Pfkl	5.65E-47
6007	Glucose catabolic process	15	-	Pfkl	1.11E-10
10646	Regulation of cell communication	37	-	Ddit4 Pfkl	3.88E-04
6091	Generation of precursor metabolites and energy	17	-	Pfkl	1.19E-02
9617	Response to bacterium	11	Myo1f	-	4.42E-04
6955	Immune response	13	Myo1f	-	4.29E-03
6952	Defense response	14	Myo1f	-	7.92E-03
22607	Cellular component assembly	23	H2afx	-	7.10E-10
51707	Response to other organism	14	Myo1f	-	1.35E-07
2682	Regulation of immune system process	13	Myo1f	-	1.47E-04
6996	Organelle organization	16	-	Tmod1	3.08E-07
19318	Hexose metabolic process	25	-	Pfkl	1.35E-27
51049	Regulation of transport	16	-	Pfkl	4.79E-06
1775	Cell activation	9	-	Ndrp1	2.36E-02
43687	Pos-translation protein modification	20	-	Pdk1	1.29E-16
23052	Signaling	21	-	Pdk1	1.38E-07
5996	Monosaccharide metabolic process	6	-	Pdk1	4.83E-07
6464	Protein modification process	14	-	Pdk1	5.53E-08

List of the selected bioprocesses from the *C. neoformans* network and clusters. The analysis was performed using the BINGO 2.44 plugin, in the Cytoscape 2.8.3 software.

4 CONCLUSÕES

- As leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de modular genes e processos metabólicos em macrófagos.
- Apesar de apresentarem bastante similaridade, as espécies são capazes de causar mudança na expressão de um número pequeno de genes idênticos.
- Os processos metabólicos modulados por ambas as espécies são similares, mesmo que os genes com diferença de expressão não sejam os mesmos.
- A via de sinalização mTOR é modulada pela presença dos fungos *C. gattii* e *C. neoformans* após 24 horas de infecção.
- O polissacarídeo GXM de ambas as espécies testadas não é capaz de causar modulação da via de sinalização mTOR.

5 PERSPECTIVAS

- Avaliar se somente os macrófagos infectados com as leveduras apresentam modulação na via de sinalização mTOR.
- Avaliar se a presença dos fungos modificou a polarização dos macrófagos de M1 para M2.
- Avaliar se esta modulação também acontece em outros tipos celulares, como células dendríticas e macrófagos primários.

6 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, K. M.; GIBSON, G. W. Differing requirement for inducible nitric oxide synthase activity in clearance of primary and secondary *Cryptococcus neoformans* infection. **Med Mycol**, v. 38, n. 5, p. 343-53, Oct 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092381> >.

ALSPAUGH, J. A.; GRANGER, D. L. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. **Infect Immun**, v. 59, n. 7, p. 2291-6, Jul 1991. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2050398> >.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, n. 21, p. 2161-5, Nov 2006. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084702> >.

ANGKASEKWINAI, P. et al. *Cryptococcus gattii* infection dampens Th1 and Th17 responses by attenuating dendritic cell function and pulmonary chemokine expression in the immunocompetent hosts. **Infect Immun**, v. 82, n. 9, p. 3880-90, Sep 2014. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980974> >.

ARAUJO, G. E. S. et al. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29561, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253734> >.

ARORA, S. et al. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 1915-26, May 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383052> >.

BALS, R.; HIEMSTRA, P. S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. **Eur Respir J**, v. 23, n. 2, p. 327-33, Feb 2004. ISSN 0903-1936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14979512> >.

BELAY, T. et al. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by dot enzyme assay. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 466-70, Feb 1996. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8789042> >.

BEN-ABDALLAH, M. et al. Fungal-induced cell cycle impairment, chromosome instability and apoptosis via differential activation of NF- κ B. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002555, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396644> >.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Res**, v. 16, n. 1, p. f0v106, Feb 2016. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26614308> >.

BRATTON, E. W. et al. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43582, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22937064> >.

BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 1-21, 2011. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936972> >.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, Dec 2012. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253612> >.

BRUMMER, E. et al. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J Immunol**, v. 140, n. 8, p. 2786-9, Apr 1988. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3128610> >.

BYLES, V. et al. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. **Nat Commun**, v. 4, p. 2834, 2013. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280772> >.

CASADEVALL, A. et al. Vesicular transport across the fungal cell wall. **Trends Microbiol**, v. 17, n. 4, p. 158-62, Apr 2009. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299133> >.

CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 215-35, Mar 2012. ISSN 1863-2300 (Electronic) 1863-2297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048835> >.

CHAYAKULKEEREE, M. et al. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 69, n. 4, p. 809-26, Aug 2008. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18532984> >.

CHEN, C. et al. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. **J Exp Med**, v. 205, n. 10, p. 2397-408, Sep 2008. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809716> >.

CHEN, W. et al. Attenuation of the programmed cell death-1 pathway increases the M1 polarization of macrophages induced by zymosan. **Cell Death Dis**, v. 7, p. e2115, Feb 2016. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26913605> >.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. Cryptococcus gattii isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than Cryptococcus neoformans. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635827> >.

CHENG, S. C. et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. **Science**, v. 345, n. 6204, p. 1250684, Sep 2014. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25258083> >.

CHIAPELLO, L. S. et al. Cryptococcus neoformans glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. **Int Immunol**, v. 20, n. 12, p. 1527-41, Dec 2008. ISSN 1460-2377. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927317> >.

CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids trigger Cryptococcus neoformans capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 5, p. e1002047, May 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637814> >.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The tools for virulence of Cryptococcus neoformans. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p. 1-41, 2014. ISSN 0065-2164 (Print) 0065-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581388> >.

COELHO, C. et al. Macrophage mitochondrial and stress response to ingestion of Cryptococcus neoformans. **J Immunol**, v. 194, n. 5, p. 2345-57, Mar 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25646306> >.

CORDERO, R. J. et al. Antibody binding to Cryptococcus neoformans impairs budding by altering capsular mechanical properties. **J Immunol**, v. 190, n. 1, p. 317-23, Jan 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233725> >.

CORNU, M.; ALBERT, V.; HALL, M. N. mTOR in aging, metabolism, and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 23, n. 1, p. 53-62, Feb 2013. ISSN 1879-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23317514> >.

COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for Cryptococcus neoformans. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 166-75, Jan 2001. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123698> >.

_____. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 443-8, Feb 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639402> >.

CUI, N. et al. mTOR Modulates Lymphocyte Differentiation through T-bet and Eomesodermin in Response to Invasive Pulmonary Aspergillosis in Rats. **Chin Med J (Engl)**, v. 129, n. 14, p. 1704-10, Jul 2016. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27411458> >.

CYBULSKI, N.; HALL, M. N. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. **Trends Biochem Sci**, v. 34, n. 12, p. 620-7, Dec 2009. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875293> >.

DADACHOVA, E. et al. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 2, p. 192-9, Apr 2008. ISSN 1755-1471. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18426412> >.

DAVIS, M. J. et al. Cryptococcus neoformans-induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. **J Immunol**, v. 194, n. 5, p. 2219-31, Mar 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637026> >.

_____. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in Cryptococcus neoformans infection. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00264-13, Jun 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23781069> >.

DIAMOND, R. D. et al. The role of the classical and alternate complement pathways in host defenses against Cryptococcus neoformans infection. **J Immunol**, v. 112, n. 6, p. 2260-70, Jun 1974. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4596700> >.

DOERING, T. L. How does Cryptococcus get its coat? **Trends Microbiol**, v. 8, n. 12, p. 547-53, Dec 2000. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115750> >.

_____. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in Cryptococcus neoformans. **Annu Rev Microbiol**, v. 63, p. 223-47, 2009. ISSN 1545-3251. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575556> >.

EASTMAN, A. J. et al. Cryptococcal heat shock protein 70 homolog Ssa1 contributes to pulmonary expansion of Cryptococcus neoformans during the afferent phase of the immune response by promoting macrophage M2 polarization. **J Immunol**, v. 194, n. 12, p. 5999-6010, Jun 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972480> >.

EISENMAN, H. C. et al. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 12, p. 3860-7, Dec 2009. ISSN 1465-2080 (Electronic) 1350-0872 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729402> >.

ELLERBROEK, P. M. et al. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 2, p. 253-66, Jan 2004. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754421> >.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-4, Jul 1990. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199524> >.

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **Am J Hyg**, v. 62, n. 3, p. 227-32, Nov 1955. ISSN 0096-5294. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13268414> >.

ERB-DOWNWARD, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. *Cryptococcus neoformans* produces authentic prostaglandin E2 without a cyclooxygenase. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 2, p. 346-50, Feb 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158733> >.

FEDER, V. et al. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **FEBS J**, v. 282, n. 8, p. 1406-18, Apr 2015. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25675897> >.

FELS, A. O.; COHN, Z. A. The alveolar macrophage. **J Appl Physiol (1985)**, v. 60, n. 2, p. 353-69, Feb 1986. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3005225> >.

GALANIS, E. et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 251-7, Feb 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113555> >.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J. M.; ALESSI, D. R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). **Biochem J**, v. 416, n. 3, p. 375-85, Dec 2008. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18925875> >.

GHOSN, E. E.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S. R. Nitric oxide-dependent killing of *Cryptococcus neoformans* by B-1-derived mononuclear phagocyte. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 1, p. 36-44, Jul 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670124> >.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 76-86, May 2015. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498576> >.

GODINHO, R. M. et al. The vacuolar-sorting protein Snf7 is required for export of virulence determinants in members of the *Cryptococcus neoformans* complex. **Sci Rep**, v. 4, p. 6198, Sep 2014. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25178636> >.

GOLDMAN, D. L. et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. E66, May 2001. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331716> >.

GUILLOT, L. et al. Enhanced innate immune responsiveness to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with resistance to progressive infection. **Infect Immun**, v. 76, n. 10, p. 4745-56, Oct 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18678664> >.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 16-48, May 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721988> >.

HADINGER, M. et al. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 3919-31, Oct 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805416> >.

HAJJEH, R. A. et al. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. **J Infect Dis**, v. 179, n. 2, p. 449-54, Feb 1999. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878030> >.

HARDISON, S. E. et al. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. **J Immunol**, v. 189, n. 8, p. 4060-8, Oct 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984078> >.

_____. Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. **Am J Pathol**, v. 176, n. 2, p. 774-85, Feb 2010. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056835> >.

HARRIS, J. R. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 12, p. 1188-95, Dec 2011. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016503> >.

HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51 Suppl 4, p. 2-15, Sep 2008. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783559> >.

HAYES, J. B. et al. Modulation of Macrophage Inflammatory Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Signaling by Intracellular *Cryptococcus neoformans*. **J Biol Chem**, v. 291, n. 30, p. 15614-27, Jul 2016. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27231343> >.

HRESKO, R. C.; MUECKLER, M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. **J Biol Chem**, v. 280, n. 49, p. 40406-16, Dec 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16221682> >.

HUFFNAGLE, G. B.; LIPSCOMB, M. F. Cells and cytokines in pulmonary cryptococcosis. **Res Immunol**, v. 149, n. 4-5, p. 387-96; discussion 512-4, 1998 May-Jun 1998. ISSN 0923-2494. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9720956> >.

HUFFNAGLE, G. B.; YATES, J. L.; LIPSCOMB, M. F. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. **J Exp Med**, v. 173, n. 4, p. 793-800, Apr 1991. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672543> >.

HUSTON, S. M. et al. *Cryptococcus gattii* is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. **J Immunol**, v. 191, n. 1, p. 249-61, Jul 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23740956> >.

_____. *Cryptococcus gattii* Capsule Blocks Surface Recognition Required for Dendritic Cell Maturation Independent of Internalization and Antigen Processing. **J Immunol**, v. 196, n. 3, p. 1259-71, Feb 2016. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26740109> >.

IKENOUE, T. et al. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. **EMBO J**, v. 27, n. 14, p. 1919-31, Jul 2008. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566587> >.

JAIN, A. V. et al. Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5389-99, Dec 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19752036> >.

JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S. HIV-associated cryptococcal meningitis. **AIDS**, v. 21, n. 16, p. 2119-29, Oct 2007. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18090038> >.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 8, p. e1001041, Aug 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714349> >.

_____. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 403-11, Mar 2013. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127124> >.

JUNG, W. H. et al. Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 10, p. 1511-20, Oct 2009. ISSN 1535-9786 (Electronic) 1535-9786 (Linking).

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. **Infect Immun**, v. 75, n. 10, p. 4792-8, Oct 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17664261> >.

KMETZSCH, L. et al. Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. **Mol Microbiol**, v. 81, n. 1, p. 206-18, Jul 2011. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21542865> >.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. **Mycoses**, v. 37, n. 7-8, p. 229-33, 1994 Jul-Aug 1994. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7739651> >.

KOZEL, T. R. Opsonization and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **Arch Med Res**, v. 24, n. 3, p. 211-8, 1993. ISSN 0188-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8298269> >.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. **Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A**, v. 257, n. 2, p. 213-8, Jul 1984. ISSN 0176-6724. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207684> >.

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, Jan-Feb 2017. ISSN 2379-5042 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28101535> >.

_____. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p. a019760, Jul 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132> >.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within Cryptococcus neoformans? **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 574-87, Jun 2006. ISSN 1567-1356 (Print) 1567-1356 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696653> >.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 20, p. 3589-94, Oct 2009. ISSN 1477-9137. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812304> >.

_____. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-93, Apr 2012. ISSN 1097-4172. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500797> >.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 750-61, Oct 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025054> >.

LEE, S. C.; CASADEVALL, A.; DICKSON, D. W. Immunohistochemical localization of capsular polysaccharide antigen in the central nervous system cells in cryptococcal meningoencephalitis. **Am J Pathol**, v. 148, n. 4, p. 1267-74, Apr 1996. ISSN 0002-9440. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8644867> >.

LELOUARD, H. et al. Regulation of translation is required for dendritic cell function and survival during activation. **J Cell Biol**, v. 179, n. 7, p. 1427-39, Dec 2007. ISSN 1540-8140. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166652> >.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against Cryptococcus neoformans. **Infect Immun**, v. 83, n. 12, p. 4513-27, Dec 2015. ISSN 1098-5522. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26351277> >.

_____. STAT1 signaling is essential for protection against Cryptococcus neoformans infection in mice. **J Immunol**, v. 193, n. 8, p. 4060-71, Oct 2014. ISSN 1550-6606. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25200956> >.

_____. Cryptococcus and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Front Microbiol**, v. 7, p. 105, 2016. ISSN 1664-302X (Electronic)

1664-302X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903984> >.

LEOPOLD WAGER, C. M.; WORMLEY, F. L. Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 5, p. 1023-35, Sep 2014. ISSN 1935-3456. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25073676> >.

LEVITZ, S. M. et al. Cryptococcus neoformans resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infect Immun**, v. 67, n. 2, p. 885-90, Feb 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916104> >.

LIMPER, A. H.; HOYTE, J. S.; STANDING, J. E. The role of alveolar macrophages in Pneumocystis carinii degradation and clearance from the lung. **J Clin Invest**, v. 99, n. 9, p. 2110-7, May 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151783> >.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the Cryptococcus neoformans species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69-105, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704346> >.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends Microbiol**, v. 17, n. 9, p. 406-13, Sep 2009. ISSN 1878-4380. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19726196> >.

LIZARAZO, J. et al. Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of Cryptococcus gattii infections in Colombia from 1997-2011. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3272, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411779> >.

MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12980-5, Aug 4 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651610> >.

MA, H.; MAY, R. C. Mitochondria and the regulation of hypervirulence in the fatal fungal outbreak on Vancouver Island. **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 197-201, 2010 May-Jun 2010. ISSN 2150-5608. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178442> >.

MACDOUGALL, L. et al. Risk factors for Cryptococcus gattii infection, British Columbia, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 193-9, Feb 2011. ISSN 1080-6059. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21291588> >.

_____. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 1, p. 42-50, Jan 2007. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17370514> >.

MACEDO, C. et al. Rapamycin augments human DC IL-12p70 and IL-27 secretion to promote allogeneic Type 1 polarization modulated by NK cells. **Am J Transplant**, v. 13, n. 9, p. 2322-33, Sep 2013. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24034707> >.

MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3365-7, Sep 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526180> >.

MAUS, U. A. et al. Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 282, n. 6, p. L1245-52, Jun 2002. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003780> >.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 106-17, Feb 2016. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685750> >.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897067> >.

MERCALLI, A. et al. Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1. **Immunology**, v. 140, n. 2, p. 179-90, Oct 2013. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23710834> >.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 189-95, Feb 2003. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603989> >.

MILAM, J. E. et al. Modulation of the pulmonary type 2 T-cell response to *Cryptococcus neoformans* by intratracheal delivery of a tumor necrosis factor alpha-expressing adenoviral vector. **Infect Immun**, v. 75, n. 10, p. 4951-8, Oct 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646355> >.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029990> >.

MOYES, D. L. et al. Protection against epithelial damage during *Candida albicans* infection is mediated by PI3K/Akt and mammalian target of rapamycin

signaling. **J Infect Dis**, v. 209, n. 11, p. 1816-26, Jun 2014. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357630> >.

MÜLLER, U. et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5367-77, Oct 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911623> >.

NIMRICHTER, L. et al. Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 8, p. 1400-10, Aug 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573547> >.

OHTANI, M. et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 635-43, Aug 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492954> >.

OKAGAKI, L. H.; NIELSEN, K. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 6, p. 820-6, Jun 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22544904> >.

OLIVEIRA, D. L. et al. *Cryptococcus neoformans* cryoultramicrotomy and vesicle fractionation reveals an intimate association between membrane lipids and glucuronoxylomannan. **Fungal Genet Biol**, v. 46, n. 12, p. 956-63, Dec 2009. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747978> >.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **Am J Pathol**, v. 164, n. 5, p. 1761-71, May 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111322> >.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 9, p. 3749-58, Sep 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19564388> >.

PALMER, G. E.; ASKEW, D. S.; WILLIAMSON, P. R. The diverse roles of autophagy in medically important fungi. **Autophagy**, v. 4, n. 8, p. 982-8, Nov 2008. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927489> >.

PANACKAL, A. A. et al. Paradoxical Immune Responses in Non-HIV Cryptococcal Meningitis. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 5, p. e1004884, May 2015. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26020932> >.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 20 2009. ISSN 1473-5571 (Electronic)

0269-9370 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PERFECT, J. R. Cryptococcus neoformans: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 463-8, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696642> >.

PERICOLINI, E. et al. The microbial capsular polysaccharide galactoxylomannan inhibits IL-17A production in circulating T cells from rheumatoid arthritis patients. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53336, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308194> >.

PETERSON, T. R. et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 873-86, May 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19446321> >.

PETTER, R. et al. A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 8, p. 2029-36, Aug 2001. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11495981> >.

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-21, May 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881> >.

QUINTIN, J. et al. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. **Curr Opin Immunol**, v. 29, p. 1-7, Aug 2014. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637148> >.

RODRIGUES, M. L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, Jan 2008. ISSN 1535-9786 (Electronic) 1535-9786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039940> >.

_____. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 1, p. 48-59, Jan 2007. ISSN 1535-9778 (Print)

1535-9786 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114598> >.

_____. Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? **Lipid Insights**, v. 2, p. 27-40, Aug 2008. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617119> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012. ISSN 1746-0921. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075448> >.

SABIITI, W. et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **J Clin Invest**, v. 124, n. 5, p. 2000-8, May 2014. ISSN 1558-8238. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743149> >.

SAIJO, T. et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00912-14, Mar 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643864> >.

SARBASSOV, D. D. et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol**, v. 14, n. 14, p. 1296-302, Jul 2004. ISSN 0960-9822. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15268862> >.

SATHALIYAWALA, T. et al. Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 597-606, Oct 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933441> >.

SCHEFFLER, J. M. et al. LAMTOR2 regulates dendritic cell homeostasis through FLT3-dependent mTOR signalling. **Nat Commun**, v. 5, p. 5138, Oct 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25336251> >.

SCHNEIDER, R. E. O. et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. **Sci Rep**, v. 5, p. 10104, May 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25951314> >.

SEGAL, B. H. Role of macrophages in host defense against aspergillosis and strategies for immune augmentation. **Oncologist**, v. 12 Suppl 2, p. 7-13, 2007. ISSN 1083-7159. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039634> >.

SHAO, X. et al. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **J Immunol**, v.

175, n. 5, p. 3244-51, Sep 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116215> >.

SHOHAM, S. et al. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **J Immunol**, v. 166, n. 7, p. 4620-6, Apr 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254720> >.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **Br J Haematol**, v. 129, n. 5, p. 569-82, Jun 2005. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916679> >.

SMITH, L. M.; DIXON, E. F.; MAY, R. C. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. **Cell Microbiol**, v. 17, n. 5, p. 702-13, May 2015. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394938> >.

SORRELL, T. C. et al. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1253-60, May 1996. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8727912> >.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 3, p. 509-13, Sep 2004. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218057> >.

SYME, R. M. et al. Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fc gamma receptor II for presentation to T lymphocytes. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 5972-81, Nov 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379672> >.

TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Curr Opin Microbiol**, v. 34, p. 67-74, Dec 2016. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27522351> >.

TOMIOKA, H. et al. Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 635451, 2012. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666284> >.

TRAYNOR, T. R. et al. CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **J Immunol**, v. 164, n. 4, p. 2021-7, Feb 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657654> >.

TRILLES, L. et al. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex. **Med Mycol**, v.

50, n. 3, p. 328-32, Apr 2012. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859388> >.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3165-70, Mar 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880650> >.

VAN DYKEN, S. J. et al. Chitin activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory responses via innate lymphoid type 2 and $\gamma\delta$ T cells. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 414-24, Mar 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631157> >.

VECCHIARELLI, A. The cellular responses induced by the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* differ depending on the presence or absence of specific protective antibodies. **Curr Mol Med**, v. 5, n. 4, p. 413-20, Jun 2005. ISSN 1566-5240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15977997> >.

VECCHIARELLI, A. et al. *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan is a potent negative immunomodulator, inspiring new approaches in anti-inflammatory immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 3, n. 8, p. 997-1005, Aug 2011. ISSN 1750-7448 (Electronic) 1750-743X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843086> >.

_____. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. **J Leukoc Biol**, v. 74, n. 3, p. 370-8, Sep 2003. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949240> >.

VOELZ, K. et al. 'Division of labour' in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nat Commun**, v. 5, p. 5194, Oct 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323068> >.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect Immun**, v. 62, n. 7, p. 3004-7, Jul 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8005689> >.

WANG, Y. et al. Tuberous sclerosis 1 (Tsc1)-dependent metabolic checkpoint controls development of dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 50, p. E4894-903, Dec 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24282297> >.

WEICHHART, T. Mammalian target of rapamycin: a signaling kinase for every aspect of cellular life. **Methods Mol Biol**, v. 821, p. 1-14, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22125056> >.

WEICHHART, T.; HENGSTSCHLÄGER, M.; LINKE, M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 10, p. 599-614, Oct 2015. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403194> >.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Front Biosci**, v. 2, p. e99-107, Nov 1997. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342305> >.

WRIGHT, L. et al. Metabolites released by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human neutrophil function. **Microbes Infect**, v. 4, n. 14, p. 1427-38, Nov 2002. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475633> >.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2043-57, Oct 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554313> >.

_____. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. **Mol Microbiol**, v. 59, n. 1, p. 67-83, Jan 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359319> >.

ZHANG, T. et al. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. **Infect Immun**, v. 65, n. 9, p. 3594-9, Sep 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284124> >.

ZHANG, Y. et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. **Am J Pathol**, v. 175, n. 6, p. 2489-500, Dec 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893050> >.

ZHU, L. et al. TSC1 controls macrophage polarization to prevent inflammatory disease. **Nat Commun**, v. 5, p. 4696, Sep 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25175012> >.

ZINZALLA, V. et al. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 757-68, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376236> >.