

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UMA MANOPROTEÍNA PREDITA DE  
*Cryptococcus gattii* NA ARQUITETURA CAPSULAR E NA INTERAÇÃO COM O  
HOSPEDEIRO**

Dissertação de Mestrado

**Júlia Catarina Vieira Reuwsaat**

Porto Alegre, outubro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UMA MANOPROTEÍNA PREDITA DE  
*Cryptococcus gattii* NA ARQUITETURA CAPSULAR E NA INTERAÇÃO COM O  
HOSPEDEIRO**

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.

**Júlia Catarina Vieira Reuwsaat**

Orientadora: Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Co-orientadora: Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, outubro de 2016

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

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à UFRGS, ao PPGBCM e a todos os professores e funcionários pela oportunidade e ensino de excelência;

Em especial à minha orientadora Lívia Kmetzsch pelos ensinamentos, dedicação, paciência e apoio. À minha também orientadora Marilene Vainstein pela confiança e oportunidade única;

Ao professor Charley pela revisão da redação científica e também orientação;

Ao professor Augusto pelas ideias e ensinamentos;

Ao professor Itabajara Vaz, membro da comissão de acompanhamento e sempre disposto a conversar, discutir e emprestar reagentes;

Aos meus companheiros de pesquisa Carolina Vasconcelos e Heryk Motta por toda dedicação, paciência e amizade. À Bárbara Machado pela ajuda;

Às minhas amigas Francine, Ane, Nicole, Alícia, Amanda e Vanessa por fazerem meus dias mais felizes;

Aos meus colegas dos laboratórios 222, 220 e 217 do Centro de Biotecnologia pelo companheirismo e convivência;

Aos meus pais e avós pelo amor incondicional, eu não teria chego até aqui sem vocês;

Ao meu irmão, minha inspiração e melhor amigo;

Ao Júnior, meu amor e companheiro, obrigada principalmente pela paciência;

À minha família e todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho;

Aos meus amigos de Porto Alegre e São Leopoldo pelo carinho e amor, mesmo nós estando distantes a maioria do tempo;

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

## SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas, símbolos e unidades</b> .....	<b>6</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>8</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>9</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>11</b>
1.1. Aspectos gerais.....	11
1.2. Criptococose e resposta imune.....	14
1.3. Fatores de virulência .....	17
1.3.1. Termotolerância .....	17
1.3.2. Produção de melanina .....	19
1.3.3. Fosfolipases .....	20
1.3.4. Cápsula polissacarídica .....	21
1.3.4.1. Interação da cápsula polissacarídica com a parede celular.....	26
1.3.4.2. Glicoproteínas.....	28
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>32</b>
2.1. Objetivo geral .....	32
2.2. Objetivos específicos .....	32
<b>3. Manuscrito: “A predicted <i>Cryptococcus gattii</i> mannoprotein is important for cell wall integrity and affects the interaction with host cells” .....</b>	<b>33</b>
<b>4. Conclusões</b> .....	<b>59</b>
<b>5. Perspectivas</b> .....	<b>60</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>61</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

5-FC	5-fluorocitosina/flucitosina
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
Ca <sup>2+</sup>	ión cálcio
CD4+	linfócito T <i>helper</i>
CD8+	linfócito T citotóxico
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
GalXM	galactoxilomanana
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GXM	glucuronoxilomanana
GXMGal	glucuranoxilomanogalactana
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
INF- $\gamma$	interferon gama
kDa	quilodalton
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina
MAT	<i>mating type</i>
MAT $\alpha$	<i>mating type</i> alpha
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MP	manoproteína
MP84	manoproteína 84
MP98	manoproteína 98
PMAP	padrões moleculares associados a patógenos

pH	potencial hidrogeniônico
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
SNC	sistema nervoso central
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
UDP	uridina difosfato
var	variedade
VG	<i>variety gattii</i>
VN	<i>variety neoformans</i>
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
WT	<i>wild type</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especiação de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> e seus diferentes sorotipos e genótipos..	12
Figura 2. Ciclo infeccioso de <i>C. gattii</i> .....	15
Figura 3. Produção de melanina por <i>C. neoformans</i> .....	19
Figura 4. Cápsula polissacarídica de <i>C. neoformans</i> .. .....	22
Figura 5. Estrutura dos polissacarídeos da cápsula de <i>Cryptococcus</i> spp.....	23
Figura 6. Esquema simplificado da parede celular e da cápsula de <i>Cryptococcus</i> spp. .	27
Figura 7. Caracterização da N-glicosilação e O-glicosilação em fungos.....	29



## RESUMO

O principal fator de virulência das leveduras do gênero *Cryptococcus* é a produção de uma cápsula polissacarídica composta por glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas. Os polissacarídeos GXM e GalXM já foram e continuam sendo extensivamente caracterizados em relação a suas estruturação, produção e participação na virulência, mas não existem relatos sobre a função das manoproteínas na estruturação/montagem da cápsula de *Cryptococcus* spp. e pouco se sabe sobre seu papel na virulência da levedura. Considerando isso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a função de uma manoproteína predita de *C. gattii*, codificada pelo gene *CNBG4278*, através de perda e ganho de função de mutantes nulo e de superexpressão, respectivamente. A partir de análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi verificado que a montagem da cápsula do mutante nulo é distinta daquela da linhagem selvagem, porém não há diferença no tamanho da cápsula sintetizada por ambas. Células do mutante nulo são mais sensíveis ao agente estressor de parede *Congo Red* e apresentam aumento de secreção de GXM ao sobrenadante de cultivo em relação à linhagem selvagem, podendo indicar um possível defeito no ancoramento do polissacarídeo à parede celular. Testes de fagocitose *in vitro* demonstraram que a deleção do gene codificador da manoproteína predita diminui a eficiência com a qual as células são fagocitadas por macrófagos J774.A1 nas primeiras horas de interação e aumenta a taxa de replicação intracelular do fungo. Entretanto, os mutantes nulo e de superexpressão não apresentaram diferença de virulência em modelo murino de criptococose. Além disso, a manoproteína recombinante expressa em *Escherichia coli* é reconhecida por soro de pacientes infectados com *Cryptococcus* spp. Nossos resultados indicam que a manoproteína predita *CNBG4278* de *C. gattii* afeta a estrutura da parede celular e conseqüentemente a montagem da cápsula, mas não é essencial para virulência do fungo *in vivo*.

## ABSTRACT

The major *Cryptococcus* virulence factor is the production of a polysaccharide capsule composed by glucuronoxylomannan (GXM), galactoxylomannan (GalXM) and mannoproteins (MPs). The GXM and GalXM polysaccharides were and still are extensively characterized in aspects related to its structuration, production, and virulence participation, however there is no data on mannoproteins role in capsule structure/assembly and little is known about its participation in the yeast virulence. Considering this, the present study aimed to characterize the function of a predicted mannoprotein from *C. gattii*, coded by *CNBG4278* gene, through the loss and gain of function of null and overexpression mutants, respectively. Analysis of Scanning Electron Microscopy (SEM) demonstrated that the capsule assembly in the null mutant strain is distinct from that observed in WT cells, but there is no difference in the size of the synthesized capsule among the strains. Also, null mutant cells are more sensitive to the cell wall stressor Congo Red and have increased GXM secretion to the culture supernatant compared to wild type, indicating a possible defect in the polysaccharide anchoring to the cell wall. *In vitro* phagocytosis tests showed that the deletion of the predicted mannoprotein coding gene affects phagocytosis by J774.A1 macrophages in the early hours of interaction and increases the yeast intracellular replication rate. However, the null and overexpression mutants showed no difference in virulence in a murine model of cryptococcosis. Furthermore, sera from patients with cryptococcosis recognized the recombinant mannoprotein expressed in *Escherichia coli*. Together, our results indicate that the predicted mannoprotein CNBG4278 from *C. gattii* affects the cell wall structure and therefore the capsule assembly, but is not essential for virulence *in vivo*.

# 1. INTRODUÇÃO

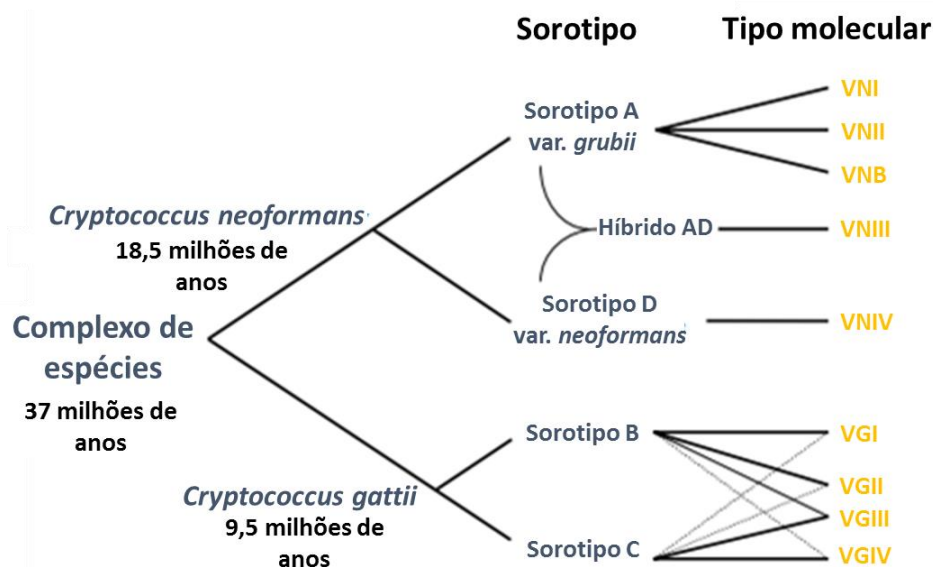
## 1.1. Aspectos gerais

*Cryptococcus gattii* é uma levedura basidiomicética e um dos principais agentes responsáveis pela infecção e desenvolvimento da criptococose em seres humanos, juntamente com a espécie *Cryptococcus neoformans*. As duas espécies divergiram de um ancestral comum (Figura 1) e variam em sua distribuição geográfica, epidemiologia, patologia e características moleculares (Cogliati, 2013). *C. neoformans* infecta principalmente pacientes imunocomprometidos, sendo infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) a condição mais comum de imunossupressão, enquanto *C. gattii* ainda é considerado um patógeno primário, pois possui a capacidade de infectar indivíduos imunocompetentes (Speed e Dunt, 1995; Sorrell, 2001). Porém, atualmente um estudo de caso-controle apontou alguns fatores que podem predispor à infecção por essas espécies, como idade avançada, uso de corticoides e fumo (Macdougall *et al.*, 2011).

Primeiramente, acreditava-se que a ocorrência de *C. gattii* era limitada às regiões tropicais e subtropicais, como Austrália, Nova Zelândia e sudeste da Ásia (Kwon-Chung e Bennett, 1984). Porém, este panorama foi alterado após o surto de infecção por *C. gattii* na ilha de Vancouver, Canadá, no ano de 1999, admitindo-se também a existência desta espécie em regiões temperadas (Datta *et al.*, 2009). Esse surto de infecção se expandiu para a região continental do Canadá e região noroeste dos Estados Unidos, principalmente nos estados de Oregon e Washington e não atingiu apenas humanos, mas também animais domésticos, terrestres e marinhos (Bielska e May, 2016).

De acordo com critérios moleculares, os isolados de *C. gattii* podem ser classificados nos sorotipos B e C, possuindo quatro tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII e VGIV, sendo os dois primeiros associados à infecção em indivíduos saudáveis e os dois últimos à infecção em indivíduos imunocomprometidos (Byrnes *et al.*, 2011). Os tipos moleculares VGI e VGII estão associados ao sorotipo B enquanto VGIII e VGIV estão associados ao sorotipo C (Figura 1) (Lin e Heitman, 2006). Isolados pertencentes ao genótipo VGII podem ser ainda classificados em três subgenótipos principais: VGIIa, VGIIb, e VGIIc, sendo VGIIa responsável por 86,3 % dos casos de criptococose na ilha de Vancouver e 81 % em Oregon/Washington, enquanto VGIIb é

responsável pelo restante dos casos. O sub-genótipo VGIIc é praticamente restrito ao estado de Oregon. O subgenótipo VGIIa possui fenótipo de hipervirulência quando comparado aos outros subgenótipos, inclusive maior fertilidade e resistência a antifúngicos (Byrnes *et al.*, 2010; Bielska e May, 2016).



**Figura 1. Especiação de *C. neoformans* e *C. gattii* e seus diferentes sorotipos e genótipos.** Existem três diferentes sorotipos de *C. neoformans*: A (genótipos VNI, VNII e VNB), D (genótipo VNIV) e o híbrido AD (genótipo VNIII). São conhecidos dois sorotipos de *C. gattii*: B (genótipos VGI, VGII) e C (genótipos VGIII e VGIV). Adaptado de Lin e Heitman (2006).

A presença de *C. gattii* é endêmica na Austrália, sendo que a maioria das células dessa levedura são encontradas em plantas, principalmente árvores de eucaliptos (*Eucalyptus calmadulensis*) e madeiras em decomposição (Ma e May, 2009). Em regiões mais tropicais, o fungo é majoritariamente encontrado em amendoeiras (*Terminalia catappa*) e pinheiros (*Pseudotsuga menziesii*) (Bielska e May, 2016). O motivo pelo qual *C. gattii* é amplamente encontrado em plantas é sua alta capacidade de reprodução em suas superfícies (Xue *et al.*, 2007).

Na tentativa de caracterizar os eventos moleculares que fazem com que *C. gattii* infecte indivíduos saudáveis e *C. neoformans* não, foram realizados alguns estudos genômicos que demonstraram diferenças significativas em rearranjos cromossômicos entre as diferentes linhagens das duas espécies. Comparando o genoma da linhagem B-3501A de *C. neoformans* var. *neoformans* com a linhagem hipervirulenta R265

(subgenótipo VGIIa, responsável pelo surto em Vancouver) de *C. gattii*, foram descritos inúmeros rearranjos cromossômicos e 85,6 % de identidade entre os genomas. Por exemplo, o cromossomo 4 de *C. gattii* R265 é composto por regiões gênicas dos cromossomos 4, 9 e 10 de *C. neoformans* B-3501A. Também foi constatado um rearranjo no locus *mating type* (*MAT*), já relacionado à virulência de *C. neoformans*, no cromossomo 9 de *C. gattii* R265 (Wickes, 2002; D'souza *et al.*, 2011). Além disso, já foram constatadas diferenças genômicas entre os próprios isolados de *C. gattii* como, por exemplo, a perda dos genes codificadores das proteínas *argonauta\_1* e *argonauta\_2*, ambas essenciais para via de RNA de interferência, do genoma da linhagem R265, assim como também a perda de 108 genes, a maioria codificando proteínas hipotéticas quando comparado ao genoma da linhagem WM276 de *C. gattii* (D'souza *et al.*, 2011). Ainda assim, pouco se sabe da relação dessas alterações genômicas na patogenicidade de *C. gattii* R265. Outras diferenças observadas experimentalmente são a capacidade de *C. gattii* assimilar D-prolina, D-triptofano e ácido L-málico, como também a capacidade de usar glicina como fonte de carbono e nitrogênio e de crescer na presença de cicloheximida e canavanina, ao contrário das linhagens de *C. neoformans* (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2009a).

Um estudo de Hagen e colaboradores (Hagen *et al.*, 2013) indica que há maior probabilidade do genótipo VGII de *C. gattii* ter tido origem na América do Sul, mais especificamente na Amazônia e, a partir desse local, ter se disseminado para o noroeste da América do Norte, sendo responsável pelo surto em Vancouver, Canadá. Uma característica que pode estar diretamente associada ao surto é em relação ao ciclo reprodutivo de *C. gattii*. A reprodução sexual de *Cryptococcus* spp. (*mating*) envolve a fusão de células haploides de *mating types* opostos,  $\alpha$  e **a**, para a produção de filamentos dicarióticos que sofrem meiose, levando à produção de basidiósporos e consequente dispersão dos mesmos (Wickes, 2002). Todos os isolados de *C. gattii* responsáveis pelo surto de criptococose na América do Norte são *MAT* $\alpha$  e capazes de se reproduzir sexualmente com células do mesmo *mating type*. Também podem existir outros mecanismos alternativos de reprodução envolvidos na hipervirulência de *C. gattii* R265, como geração espontânea de esporos e reprodução clonal (Bielska e May, 2016).

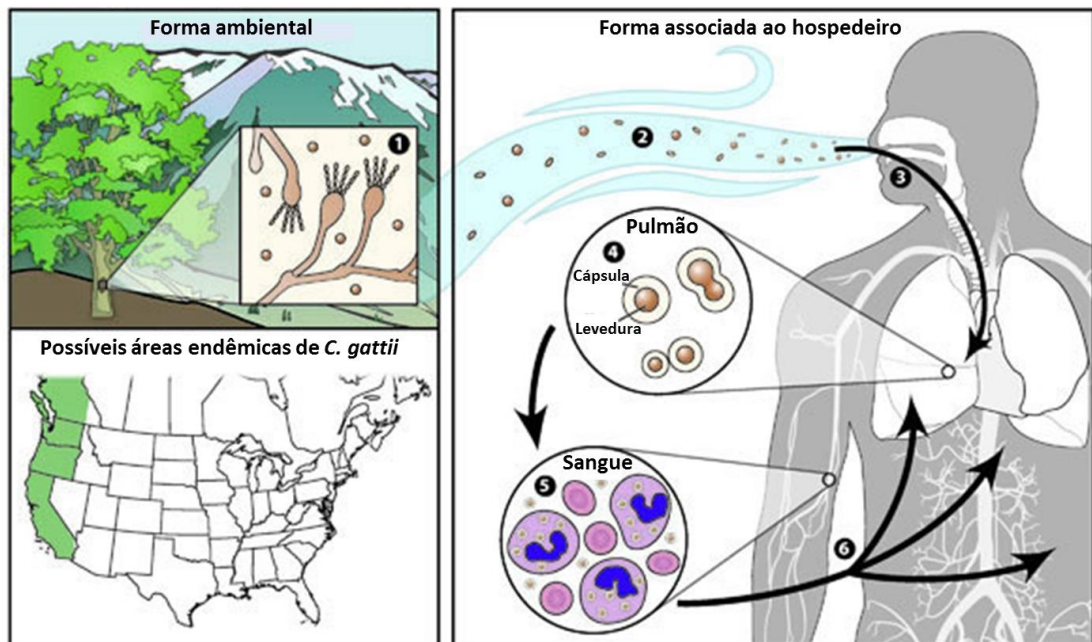
## 1.2. Criptococose e resposta imune

A infecção causada por *C. gattii* e *C. neoformans* acontece a partir da inalação dos basidiósporos ou de células fúngicas dessecadas que se depositam no pulmão. Após o estabelecimento da infecção pulmonar, as leveduras podem se disseminar para o sistema nervoso central, causando meningite (Figura 2) (Sabiiti e May, 2012). Estimativas apontam um milhão de casos de infecção por *Cryptococcus* spp. no mundo, gerando mais de 620 mil mortes anualmente (Park *et al.*, 2009). Infecções por *C. gattii* e *C. neoformans* ocorrem com maior prevalência em pacientes que possuem resposta de células T deficiente, como, por exemplo, pacientes portadores dos vírus HIV, da hepatite B/C ou pacientes tratados com imunossupressores (Mitchell e Perfect, 1995; Husain *et al.*, 2001). Estimativas do ano de 2009 apontam que até 12 % dos pacientes portadores do vírus HIV no mundo desenvolvem criptococose e, em alguns países da África, *C. neoformans* desponta como a causa mais comum de meningite (Park *et al.*, 2009). No Brasil, *C. neoformans* é o maior causador de micose sistêmica em pacientes com AIDS, causando até 51 % dos óbitos nesses indivíduos (Prado *et al.*, 2009). Dados da Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul (SES-CEVS-TABNET) demonstram que, de 2007 a dezembro de 2013, aproximadamente 20 % dos pacientes notificados com meningite por *Cryptococcus* sp. foram a óbito por complicações da doença (Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, 2013 - <http://200.198.173.165/tabnet/>).

Mesmo que a infecção causada por *C. neoformans* seja prevalente em relação a infecções causadas por *C. gattii*, as estatísticas sobre o surto que ocorreu na América do Norte não podem ser ignoradas. Além disso, novos indícios mostram que infecções causadas por *C. gattii* podem ter sido diagnosticadas erroneamente, pois é facilmente confundida com tuberculose ou outras infecções pulmonares causadas por vírus e bactérias (Chen, S. C. *et al.*, 2012). Nos Estados Unidos, entre os anos de 2004 e 2011, houve uma mortalidade de 33 % dos pacientes infectados com a espécie, enquanto no Canadá, entre os anos 1999 e 2006, 218 pessoas foram infectadas e 19 foram a óbito (Galanis e Macdougall, 2010; Harris *et al.*, 2011).

Foi demonstrado em modelo murino de infecção que *C. gattii* linhagem R265 fica mais restrito à infecção pulmonar, com menor disseminação para o sistema nervoso central, e tem como característica a formação de grandes aglomerados inflamatórios, denominados criptococomas (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012). Já *C. neoformans*, possui

tropismo acentuado pelo tecido cerebral e pode causar mais frequentemente a forma mais grave da doença, caracterizada por um quadro de meningoencefalite, mas sem a formação de criptococomas (Perfect, 2012).



**Figura 2. Ciclo infeccioso de *C. gattii*.** *C. gattii* pode ser isolado do ambiente (1), onde está geralmente associado a árvores e solo. Humanos e animais podem ser infectados a partir da inalação de células dessecadas ou basidiósporos da levedura (2) que passam pelas vias aéreas e se depositam no pulmão (3). O ambiente interno do hospedeiro induz a produção da cápsula polissacarídica de *C. gattii* (4) que protege as células fúngicas da ação do sistema imune. Após a infecção do pulmão, células de *C. gattii* podem se disseminar através da via hematogênica (5) para outras partes do corpo (6), principalmente o cérebro. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2016 (<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-gattii/causes.html>).

Após a deposição das células fúngicas no pulmão, a resposta imune do hospedeiro é acionada, diferindo conforme a espécie que causa a infecção. *C. neoformans* induz uma resposta inflamatória protetora, através da secreção das citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , ao contrário de *C. gattii* que retarda a ativação do sistema imune (Cheng *et al.*, 2009). O primeiro contato das células fúngicas com o sistema imune é caracterizado pela interação com macrófagos alveolares, pois esses representam a maior parte da população de células bronco-alveolares em condições de infecções pulmonares (Erwig e Gow, 2016). As ações dessas células incluem fagocitose e eliminação das células fúngicas, sequestro de polissacarídeos, produção de citocinas e quimiocinas

e apresentação de antígenos (García-Rodas e Zaragoza, 2012). Quando fagocitada, a levedura pode ser eliminada pela apresentação de antígenos às células T, entrar em um estado de latência ou sobreviver e estabelecer a infecção pulmonar (Mcquiston e Williamson, 2012). O combate das leveduras fagocitadas pelos macrófagos acontece a partir da formação de fagolisossomos, os quais possuem um pH baixo e atividade de enzimas hidrolíticas que degradam a matéria orgânica do fungo (García-Rodas e Zaragoza, 2012). Para a disseminação ao sistema nervoso central, as células de *Cryptococcus* spp. podem atravessar a barreira hematoencefálica através do transporte mediado por macrófagos alveolares, mecanismo denominado de “cavalo de Tróia” ou por transcitose direta, processo no qual as células fúngicas sofrem alterações morfológicas para interagir com as células endoteliais (Kronstad *et al.*, 2011).

A resposta mediada por células T inicia-se nos órgãos linfoides secundários, havendo o reconhecimento do complexo peptídeo-MHC exposto nas células apresentadoras de antígenos (APCs) por células T virgens, pois os linfócitos T não são capazes de reconhecer antígenos na forma nativa. Após a ativação das células T, por reconhecimento de MHC do tipo I ou II, as mesmas se proliferam através da resposta autócrina à interleucina-2 (IL-2) e podem ativar resposta de linfócitos T *helper* ou citotóxico. A principal resposta imune contra células de *Cryptococcus* spp. é através da ativação de linfócitos T *helper* (CD4+) pela apresentação de antígenos via MHC do tipo II, porém a ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8+) não pode ser descartada (Huffnagle *et al.*, 1994).

A resposta Th1 é caracterizada pela secreção de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, ativação de macrófagos e indução de linfócitos B para opsonização do patógeno. Neste caso, *Cryptococcus* spp. são eliminados pela ativação clássica de macrófagos (Kawakami *et al.*, 1995; Hoag *et al.*, 1997; Herring *et al.*, 2002; Wormley *et al.*, 2007). Também já foi demonstrado que a secreção de IL-17 e IL-23 (perfil Th17) é capaz de induzir uma resposta através da ativação de macrófagos capazes de proteger o hospedeiro (Müller *et al.*, 2007). A resposta Th2 é caracterizada pela secreção de IL-4, IL-10 e IL-13, ativação de linfócitos B para produção de anticorpos e alternativa ativação de macrófagos. Na infecção por *Cryptococcus* spp., há ativação e migração de células do sistema imune inato para fagocitar o patógeno, principalmente macrófagos, mas a levedura consegue se proliferar no interior dos mesmos após a permeabilização dos



fagolisossomos (Hoag *et al.*, 1997; Koguchi e Kawakami, 2002; Wozniak *et al.*, 2012). Já foi demonstrado que a troca de resposta de Th1 para Th2 induz a expressão de fatores de virulência em *C. neoformans* (Osterholzer *et al.*, 2009), porém, apenas as respostas Th1 e Th17 fortes não foram capazes de proteger camundongos contra a infecção e disseminação de *C. neoformans* (linhagem H99) para o sistema nervoso central (Zhang *et al.*, 2009). Uma possível explicação para a efetividade de *C. gattii* em infectar pacientes imunocompetentes está associada à forte indução de uma resposta imune Th2, o que favorece a proliferação do fungo, e também à modulação da maturação de células dendríticas. Essas células, como apresentadoras de antígenos, são eficazes em internalizar e eliminar células fúngicas de *C. gattii*, porém as células dendríticas infectadas falham ao entrar no processo de maturação, não havendo aumento de expressão de MHC do tipo II, o que leva a uma resposta de células T diminuída (Huston *et al.*, 2013; Angkasekwinai *et al.*, 2014).

Os sintomas causados pela infecção por *Cryptococcus* spp. são febre, fadiga, perda de peso, tosse, dores no peito, suores noturnos, dores de cabeça e vômito (Phillips *et al.*, 2015). Se descoberta inicialmente, a criptococose causada por *C. gattii* é geralmente tratada com anfotericina B em combinação com fluconazol ou flucitosina (5-FC) (Centers for Disease Control and Prevention, 2016 - <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-gattii/treatment.html>). Porém, a demora no diagnóstico pode ter consequências sérias como necessidade de cirurgia e administração de corticoides, como também tratamento com os antifúngicos por períodos prolongados (Sorrell e Chen, 2010).

### **1.3. Fatores de virulência**

O estabelecimento da infecção e a sobrevivência no interior do hospedeiro está diretamente relacionado a expressão de enzimas, produção pigmentos e polissacarídeos que atuam como fatores de virulência de *C. gattii* e *C. neoformans*. Alterações em qualquer um dos fatores de virulência citados abaixo prejudica diretamente a patogenicidade das leveduras.

#### **1.3.1. Termotolerância**

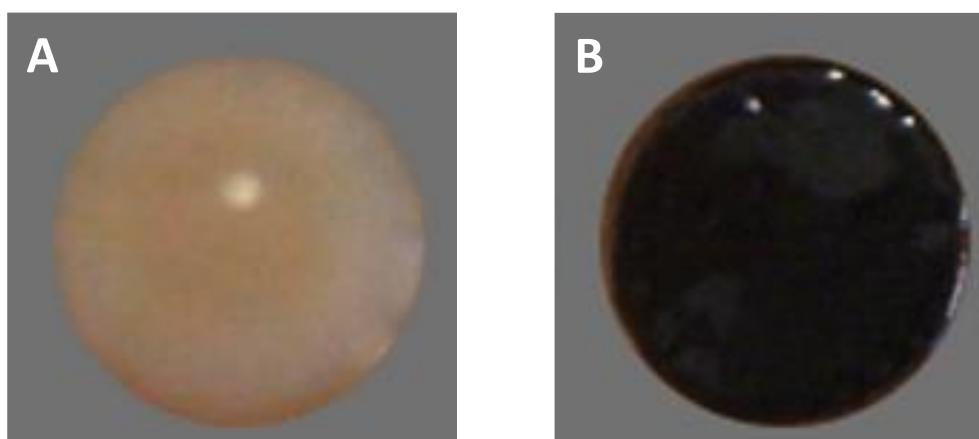
A capacidade de desenvolvimento a 37 °C é uma característica fundamental de fungos patogênicos humanos. Desenvolvimento na temperatura corporal do

hospedeiro está associado com a transição da forma filamentosa para leveduriformes de fungos dimórficos capazes de infectar seres humanos como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Blastomyces dermatidis* (Kraus *et al.*, 2004). Essa capacidade pode explicar a distribuição mundial de *C. neoformans* e *C. gattii* e é uma característica que as diferenciam de outras espécies do gênero *Cryptococcus* que não conseguem estabelecer a infecção, mas produzem outros fatores de virulência, como a cápsula polissacarídica e produção de melanina (Coelho *et al.*, 2014).

O desenvolvimento das leveduras *C. neoformans* e *Candida glabrata* a 37 °C é dependente da atividade de calcineurina. Essa proteína é uma fosfatase serina/treonina-específica composta pela subunidade catalítica A (CNA1) e uma subunidade reguladora B ligadora à cálcio (CNB1), formando um heterodímero. A atividade de calcineurina é regulada pelo complexo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, que interage com a subunidade reguladora do heterodímero, alterando sua conformação e o ativando (Chen, Y. L. *et al.*, 2012). O mutante nulo para calcineurina em *C. neoformans* não é viável a 37 °C, mesmo após uma variação de 37 °C para 24 °C. Já o mutante para a mesma proteína em *C. gattii* R265 se desenvolve na temperatura corporal do hospedeiro, em uma taxa menor em relação à da linhagem selvagem, mas o desenvolvimento é totalmente reestabelecido após o retorno para 24 °C *in vitro* (Chen *et al.*, 2013). Porém, ensaios *in vivo* em modelo murino de criptococose com mutante nulo para calcineurina de *C. gattii* R265 revelaram que esse heterodímero é essencial para patogenicidade da espécie, não só devido à dificuldade de desenvolvimento a 37 °C, mas também a todas as outras vias afetadas pela falta de calcineurina, como integridade da parede e membrana celular. O fenótipo de termotolerância observado pelo mutante de R265 *in vitro* não é reproduzido por outras linhagens da espécie, como R272 (VGIIb) e WM276 (VGI), mostrando mais uma adaptação da linhagem R265 (VGIIa) que foi a responsável pelo surto de criptococose na América do Norte (Chen *et al.*, 2013). Adicionalmente, a deleção dos genes *TPS1* e *TPS2*, que codificam a enzima trealose-6-fosfato-sintase, afetam a termotolerância de *C. gattii*, assim como também a síntese de outros fatores de virulência da espécie, como melanina e cápsula polissacarídica (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2009b). Essa enzima é responsável pela síntese de trealose, um açúcar importante na proteção contra estresses, como ambientes altamente oxidantes.

### 1.3.2. Produção de melanina

A produção de melanina é importante para a virulência de leveduras *Cryptococcus* spp., pois protege o fungo dos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro. A melanina é um pigmento escuro, hidrofóbico e com carga negativa, proveniente da oxidação de compostos fenólicos, como L-DOPA (Casadevall *et al.*, 2000). Esse pigmento é depositado na parede celular de *Cryptococcus* spp. (Figura 3) (Ma e May, 2009) e as enzimas responsáveis pela sua síntese são denominadas lacases. *Cryptococcus* spp. possuem dois genes codificadores dessas proteínas, *LAC1* e *LAC2* e a inativação de ambos reduz a taxa de sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro (Missall *et al.*, 2005).



**Figura 3. Produção de melanina por *C. neoformans*.** A. Colônia de células de *C. neoformans* não melanizadas. B. Colônia de células de *C. neoformans* melanizadas. Adaptações da imagem disponível em Ma e May (2009).

O gene *LAC1* codificada uma enzima glicoproteica de 75 kDa, sendo responsável pela síntese de melanina em praticamente sua totalidade. Esta enzima encontra-se ancorada à parede celular de *C. neoformans* (Williamson, 1994; Zhu *et al.*, 2001). Mutantes com defeitos na integridade da parede celular não conseguem manter o pigmento depositado em sua parede, apresentando um fenótipo de “leaky melanin” que contribui para a atenuação da virulência de *C. neoformans* (Baker *et al.*, 2007). O gene *LAC2* possui um nível basal de transcrição menor ao de *LAC1*, mas seu produto também é importante para síntese de melanina e proteção no interior de macrófagos (Missall *et al.*, 2005). A localização da enzima codificada por *LAC2* ainda não foi determinada.

No ambiente, a melanização é importante como um mecanismo contra predadores como, por exemplo, amebas (Steenbergen *et al.*, 2001), ou contra a radiação ultravioleta (Wang *et al.*, 1995). Durante a infecção, a síntese de melanina inibe a resposta imune do hospedeiro, protegendo a levedura contra a fagocitose por macrófagos (Zhu e Williamson, 2004). *C. neoformans* utiliza componentes exógenos para síntese de melanina, como catecolaminas presentes no sistema nervoso central, o que pode contribuir para o neurotropismo da levedura (Perfect *et al.*, 1998; Williamson *et al.*, 1998). Além da melanina ser uma molécula antioxidante, ela também é um importante componente da estrutura da parede celular de *Cryptococcus* spp. e é reconhecida por anticorpos durante modelo murinho de infecção experimental (Rosas *et al.*, 2001).

### 1.3.3. Fosfolipases

Fosfolipases formam um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídeos. A ação dessas enzimas resulta na desestabilização de membranas, lise celular e liberação de lipídeos que são reconhecidos como segundos mensageiros e induzem a produção da cápsula polissacarídica em *C. neoformans* quando em contato com o hospedeiro (Schmiel e Miller, 1999; Chrisman *et al.*, 2011).

Duas principais fosfolipases são encontradas em fungos e têm papel importante na patogenicidade de *Cryptococcus* spp.: Plb1 e Plc1. A primeira encontra-se ancorada à parede celular de *C. neoformans* via âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Siafakas *et al.*, 2006), porém exerce papel importante na virulência da levedura quando secretada (Santangelo *et al.*, 2004). O mutante nulo para o gene codificador dessa proteína em *C. neoformans* apresenta atenuação da sua virulência, pois possui dificuldade em estabelecer infecção tanto em um modelo murino de infecção quanto em modelo de meningoencefalite induzido em ratos, mostrando o fundamental papel de Plb1 na disseminação do fungo (Cox *et al.*, 2001).

No intuito de descrever como a proteína Plb1 era liberada do ancoramento à parede celular, foram encontrados dois genes codificadores de fosfolipases C (*PLC1* e *PLC2*) em *C. neoformans* (Chayakulkeeree *et al.*, 2008). Ambas proteínas (Plc1 e Plc2) possuem atividade de clivagem da ligação fosfodiéster de proteínas ancoradas à GPI (Hereld *et al.*, 1986). Mutantes nulos para ambos os genes demonstraram que

apenas a deleção do gene *PLC1* teve impacto significativo na secreção de Plb1, porém também gera um fenótipo de deficiência na secreção de melanina e capacidade de crescimento a 37 °C, atenuando a virulência da levedura (Chayakulkeeree *et al.*, 2008). Esse resultado evidencia a atividade de Plc1 ligada a outras proteínas componentes da parede celular de *C. neoformans*, não apenas atrelada à Plb1.

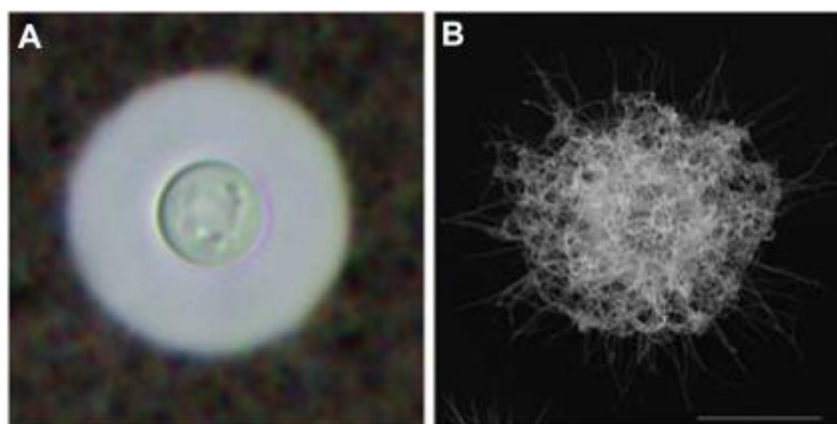
*C. gattii* R265 também expressa a enzima Plb1 que possui 85 % de identidade de sequência com a Plb1 de *C. neoformans* H99 (Latouche *et al.*, 2002). Porém, ambas as proteínas diferem em algumas características: a Plb1 de *C. gattii* possui massa molecular de 275 kDa, enquanto a expressa por *C. neoformans* possui massa molecular de 180 kDa aproximadamente. Outra diferença importante é a preferência por substratos lipídicos saturados mais similares aos surfactantes encontrados nos alvéolos pulmonares de seres humanos, podendo assim a Plb1 de *C. gattii* estar diretamente envolvida no estabelecimento da infecção pulmonar e na indução da formação de criptocomas (Wright *et al.*, 2004). A atividade de fosfolipase pode estar intimamente ligada à capacidade de replicação no interior de macrófagos de ambas as espécies, através da permeabilização das membranas dos fagolisossomos (Smith *et al.*, 2015; Deleon-Rodriguez e Casadevall, 2016).

#### **1.3.4. Cápsula polissacarídica**

A cápsula polissacarídica (Figura 4) é considerada o principal fator de virulência de *Cryptococcus* spp. devido a sua alta capacidade de suprimir o sistema imune do hospedeiro, atuando como uma barreira física que interfere diretamente no processo de fagocitose (Bose *et al.*, 2003; Monari *et al.*, 2006). Ela também está presente em isolados ambientais, envolvendo a parede celular da levedura e agindo contra a desidratação (Bose *et al.*, 2003).

A cápsula é composta por dois polissacarídeos de grande massa molecular, glucuronoxilomanana (GXM), compondo de 90 a 95 % da massa capsular e galactoxilomanana (GalXM), compondo de 5 a 10 % da massa capsular. Há ainda uma fração minoritária (inferior a 1 %) constituída por manoproteínas (MPs) (Doering, 2009). GXM apresenta uma massa molecular que varia de 1700 a 7000 kDa, dependendo da linhagem e é composto por monômeros de manose  $\alpha$ -1-3 ligadas com uma molécula de ácido glucurônico  $\beta$ -1-2 ligada, formando o núcleo básico. Também fazem parte de sua composição moléculas de xilose  $\beta$ -1-2 e/ou  $\beta$ -1-4 ligadas aos

resíduos de manose *O*-acetilados (Figura 5A e B). Já foram descobertas seis estruturas diferentes, sendo que as modificações sempre são em relação à adição dos resíduos de xilose ligadas às manoses e o núcleo manose- $\beta$ -1-2-ácido glucurônico mantem-se o mesmo entre todos os sorotipos. Esses monômeros se polimerizam e formam as fibras de GXM, que podem ser lineares ou ramificadas (Doering, 2009; Zaragoza *et al.*, 2009). GalXM possui uma massa molecular de aproximadamente 100 kDa e é composto por monômeros de galactose  $\alpha$ -1-6 ligadas com ramificações de ligações  $\beta$ -1-3 com galactose, seguidas de outras ligações com manose e xilose (Figura 5C). Recentemente foi observada a presença de uma molécula de ácido glucurônico também no monômero de GalXM (Figura 5C) (Heiss *et al.*, 2009) e sugeriu-se uma mudança de nome do polissacarídeo para glucuranoxilomanogalactana (GXMGal), porém para manter a concordância na literatura, manteve-se GalXM (Doering, 2009; Zaragoza *et al.*, 2009). As características das manoproteínas serão discutidas a seguir, mas suas funções na estruturação e montagem da cápsula ainda são desconhecidas.



**Figura 4. Cápsula polissacarídica de *C. neoformans*.** A. Imagem gerada por microscopia óptica na presença de tinta da China. B. Imagem gerada por microscopia eletrônica de varredura evidenciando as fibras que compõe a cápsula. Adaptações da imagem disponível em Zaragoza *et al.*, 2009.

A síntese dos polissacarídeos ocorre através da atividade de glicosiltransferases e se acredita que mais de 12 dessas enzimas estejam envolvidas apenas na produção de GXM (Doering, 2000). Os açúcares doadores necessários para síntese de GXM e GalXM são: GDP-manose, UDP-galactose, UDP-ácido glucurônico e UDP-xilose. Mutações de genes codificadores de enzimas envolvidas na ativação desses açúcares



Kwon-Chung, 1994). Foram encontrados outros genes envolvidos na produção da cápsula, como *CAP64*, *CAP60* e *CAP10*. Os produtos gênicos de *CAP64* e *CAP10* têm similaridade com a subunidade do proteassomo *PRE1* e xilosiltransferase, respectivamente, e *CAP60* tem similaridade com um gene envolvido na capacidade de crescimento da célula fúngica na presença de celulose. A deleção individual desses três genes geram leveduras acapsulares e sem a capacidade de levar camundongos a morte em ensaios de criptococose experimentais (Zaragoza *et al.*, 2009). A expressão desses genes está diretamente ligada com o aumento ou diminuição da produção da cápsula de *Cryptococcus* spp. (Okabayashi *et al.*, 2005).

A síntese de GXM ocorre intracelularmente, especificamente no complexo de Golgi (Yoneda e Doering, 2006). O transporte desse polissacarídeo é mediado por secreção de vesículas que ultrapassam a parede celular e o liberam no espaço extracelular (Rodrigues *et al.*, 2007). Esse mecanismo de secreção de GXM via vesículas está relacionado com a biogênese da cápsula, pois, em condições que induzem a expressão dessa estrutura, há maior liberação de vesículas extracelulares contendo o polissacarídeo (Rodrigues *et al.*, 2007). Porém, mutantes acapsulares continuam secretando as vesículas, mesmo não produzindo GXM e, quando em contato com vesículas de outras linhagens que contém o polissacarídeo, conseguem incorporá-lo em sua superfície (Rodrigues *et al.*, 2008b).

Além de estarem associadas à secreção de GXM, essas vesículas extracelulares também são conhecidas como “*virulence bags*”, pois contêm importantes fatores de virulência de *C. neoformans*, como as enzimas fosfolipase, lacase e urease (Rodrigues *et al.*, 2008b). Também já foram identificados diversos lipídeos, manoproteínas e microRNAs no interior de vesículas secretadas por *C. neoformans* (Wolf *et al.*, 2014; Peres Da Silva *et al.*, 2015) que, quando em contato com o hospedeiro, conseguem modular a função de macrófagos (Oliveira *et al.*, 2010).

Pouco se sabe sobre a montagem dos polissacarídeos após a sua secreção, mas a principal hipótese é de que os mesmos se auto-agregam na presença de cátions divalentes (Mcfadden *et al.*, 2006; Nimrichter *et al.*, 2007). O material capsular recém sintetizado se agrega na parte mais externa da cápsula, longe da parede celular, se intercalando com as estruturas mais velhas (Zaragoza *et al.*, 2006). A cápsula de *Cryptococcus* spp. é composta por duas partes: a região mais externa, que é mais permeável e menos densa, enquanto a região mais próxima à parede celular é mais



densa e evita o contato de moléculas maiores com a superfície celular (Gates *et al.*, 2004; Frases *et al.*, 2009). O ancoramento da cápsula polissacarídica será discutido na próxima sessão.

Durante a infecção, há um aumento significativo do tamanho da cápsula devido à presença de estímulos, como limitação de nutrientes, principalmente ferro, e altas concentrações de CO<sub>2</sub>. Há evidências de que o tamanho da estrutura polissacarídica varia conforme o local da infecção, sendo que os maiores tamanhos são encontradas em leveduras residentes no pulmão. Além disso, as propriedades imunogênicas da cápsula também variam, evidenciando uma adaptação da levedura para evitar o reconhecimento pelo hospedeiro (Zaragoza *et al.*, 2009).

Há alguns relatos que correlacionam o tamanho da cápsula de *C. neoformans* com sua virulência, sendo que linhagens com cápsulas maiores apresentam maior virulência do que linhagens com cápsulas menores (D'souza *et al.*, 2001; O'meara e Alspaugh, 2012). Porém, para alguns isolados de *C. gattii* a correlação é inversa, pois isolados com cápsulas menores são mais virulentos do que isolados com cápsulas maiores (Barcellos, V. dados não publicados). As células de *Cryptococcus* spp., quando internalizadas por macrófagos liberam GXM, sendo possível localizar vesículas no citoplasma da célula do sistema imune contendo o polissacarídeo. Esse conteúdo pode levar a célula do sistema imune a lise, como também afetar a secreção de citocinas e inativar componentes do sistema complemento (Vecchiarelli *et al.*, 1995; Bose *et al.*, 2003). Além disso, tanto GXM quanto GalXM também afetam a migração de leucócitos para o local da infecção e levam linfócitos T à apoptose (Pericolini *et al.*, 2006; Yauch *et al.*, 2006).

Um estudo comparativo entre o polissacarídeo GXM de *C. neoformans* e *C. gattii* revelou que existem diferenças significativas nesta molécula entre sorotipos e espécies. GXM produzido por *C. gattii* R265 mostrou um menor diâmetro e capacidade de modulação de macrófagos *in vitro* significativas quando comparado aos outros (Fonseca *et al.*, 2010). Também já foi descrito que *C. gattii* muda um ou dois grupos O-acetil no polímero GXM que altera sua estrutura, o que ajuda a inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro e, conseqüentemente, favorece o estabelecimento da infecção (Urai *et al.*, 2015).

#### 1.3.4.1. Interação da cápsula polissacarídica com a parede celular

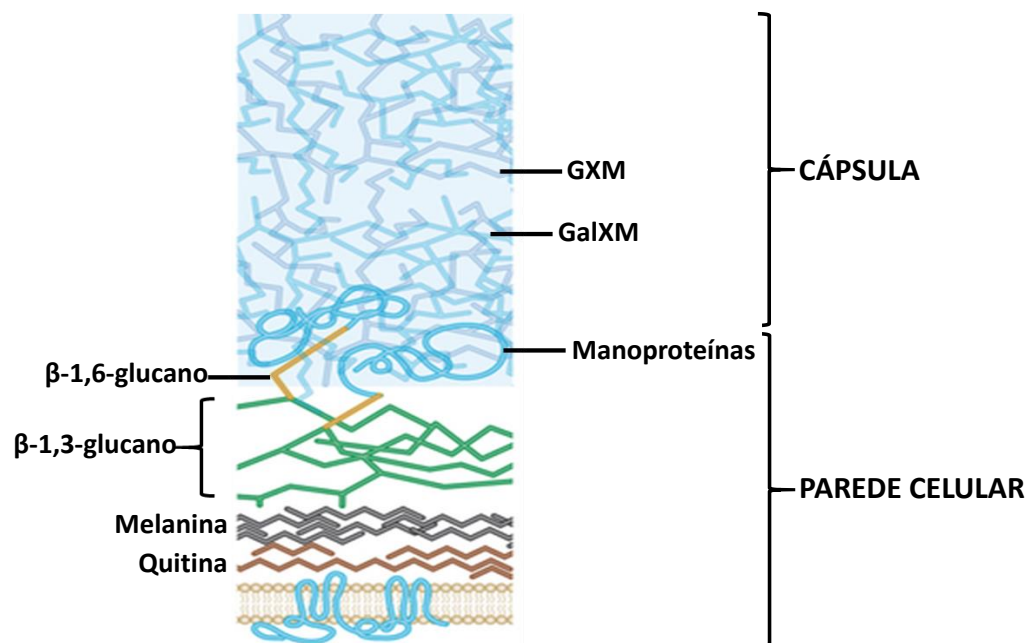
A parede celular, assim como a cápsula polissacarídica, é uma estrutura dinâmica que altera sua composição de acordo com as condições externas à célula, principalmente disponibilidade de nutrientes. Ela promove rigidez à célula, protegendo-a de estresses ambientais e lise osmótica e também confere forma e permeabilidade (Free, 2013). Além disso, essa estrutura consegue mudar sua morfologia durante processos de *mating* e brotamento, por exemplo, e permite a transição entre diferentes condições, como do ambiente para a corrente sanguínea de mamíferos (Doering, 2009).

A parede celular de *Cryptococcus* spp. é composta por  $\beta$ -1-3 e  $\beta$ -1-6-glucanos,  $\alpha$ -1-3-glucanos, quitina, quitosana, melanina, glicoproteínas e glucosilceramidas derivados da membrana plasmática (Figura 6) (Nimrichter *et al.*, 2005; Rhone *et al.*, 2007). Como na cápsula polissacarídica, a parede celular de *C. neoformans* também possui duas camadas. A mais interna é formada por fibras paralelas compostas de  $\beta$ -glucanos, quitina e, quando presente, melanina. Esse pigmento confere a porosidade da parede celular (Jacobson e Ikeda, 2005). Já a camada mais externa da parede é composta principalmente por  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanos, formando uma rede mais particulada (Sakaguchi *et al.*, 1993). Diferentemente de outros fungos, *C. neoformans* possui mais moléculas de  $\beta$ -1-6-glucanos em sua composição do que  $\beta$ -1-3-glucanos (O'meara e Alspaugh, 2012).

A síntese de glicanos ocorre através da atividade de glicano-sintases associadas à membrana celular que utilizam monômeros de glucose para formar os diferentes polímeros. A quitina também é sintetizada por proteínas ancoradas à membrana, nesse caso as quitina-sintases, que utilizam como monômeros  $\beta$ -1-4-*N*-acetilglucosamina (Free, 2013). Em ambos os casos, os polímeros são liberados diretamente no espaço periplasmático. Já as glicoproteínas, que são a maior fonte dos polímeros de manose encontrados na parede celular de fungos, terão sua síntese abordada resumidamente no próximo tópico. No espaço periplasmático, enzimas *cross-linking* realizam as ligações covalentes entre os polímeros e glicoproteínas, formando a matriz tridimensional da parede celular de *Cryptococcus* spp. (Free, 2013).

A parede celular é o maior determinante para o ancoramento da cápsula polissacarídica das espécies de *Cryptococcus*. Ainda não se sabe se o ancoramento ocorre diretamente com os componentes clássicos da parede celular, ou se ela

promove uma estruturação de proteínas que interagem diretamente com os polissacarídeos da cápsula (O'meara e Alspaugh, 2012). Já foi demonstrado que a inativação da síntese de  $\alpha$ -1-3-glucanos não afeta a produção da cápsula, mas o seu ancoramento à parede celular de *C. neoformans*, porém não foi identificada ainda uma ligação direta dessas duas estruturas (Reese e Doering, 2003). Moléculas de quitosana, que são formadas a partir da O-acetilação de moléculas de quitina, já tiveram sua importância demonstrada na arquitetura correta da cápsula de *C. neoformans*. Uma das enzimas responsáveis pela síntese de quitosana é uma manoproteína conhecida como MP98 (Baker *et al.*, 2007). Além disso, já foi demonstrado através da marcação de oligômeros de  $\beta$ -1-4-*N*-acetilglucosamina por *wheat germ agglutinin* (WGA), que essas moléculas formam projeções que ligam a cápsula à parede celular (Rodrigues *et al.*, 2008a).



**Figura 6. Esquema simplificado da parede celular e da cápsula de *Cryptococcus* spp.** Os componentes  $\alpha$ -1-3-glucanos, quitosana e glucosilceramidas não estão representados. A parede celular das leveduras desse gênero é composta por moléculas de melanina, quitina e  $\beta$ -glucanos formando a camada mais interna em forma de fibras. A camada mais externa é formada por  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanos juntamente com glicoproteínas. Logo acima da parede está representada a cápsula de *Cryptococcus* spp. com seus componentes: GXM, GalXM e manoproteínas na interface entre as duas estruturas. Adaptação de Erwig e Gow (2016).

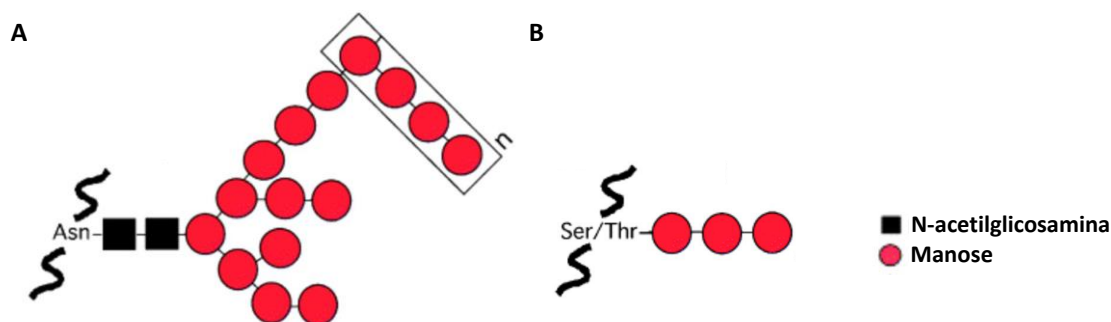
#### 1.3.4.2. Glicoproteínas

Glicoproteínas são a maior fonte de manose da parede celular de fungos, sendo que a inibição do processo geral de glicosilação leva célula fúngica à morte (Jin, 2012). A maioria das glicoproteínas são conhecidas como proteínas integrais de parede e estão covalentemente ligadas à parede celular via âncora de GPI. Há, porém, proteínas que estão covalentemente ligadas à matriz e não através do ancoramento via GPI (Free, 2013). Muitas das glicoproteínas de parede atuam em sua estruturação tridimensional ou também como *cross-linkers*. Outras atuam como sensores do meio externo, como adesinas, na aquisição de micronutrientes ou detoxificação de espécies reativas de oxigênio. E, por fim, também existem glicoproteínas de parede que não possuem função descrita e são chamadas de estruturais (Free, 2013).

As glicoproteínas de parede mais estudadas possuem um sítio de ancoramento à GPI em sua região C-terminal e um peptídeo sinal em sua porção N-terminal, que as direcionam para glicosilação e sequencial secreção. A âncora de GPI é uma estrutura glicolipídica adicionada a um motivo de resíduos de aminoácido hidrofóbicos seguido do sítio chamado de ômega, que geralmente é um resíduo de serina, glicina ou alanina. Nesse sítio ocorre a clivagem seguida da adição da estrutura glicolipídica (Free, 2013). Após a tradução, as glicoproteínas de parede são direcionadas ao lúmen do retículo endoplasmático devido a sinalização do peptídeo sinal. Nessa organela ocorre a *N*-glicosilação dos resíduos de asparagina (Figura 7A) e a adição da âncora de GPI. Após, a glicoproteína segue para o complexo de Golgi, onde ocorre a *O*-glicosilação de resíduos de serina e treonina (Figura 7B) e a mesma segue para secreção via vesículas (Free, 2013). A parte oligossacarídica da âncora de GPI se liga covalentemente à  $\beta$ -1-6-glucanos (Kollár *et al.*, 1997).

Manoproteínas são clássicas glicoproteínas localizadas na parede celular que correspondem a aproximadamente 1 % da composição da cápsula de *Cryptococcus* spp. (Levitz *et al.*, 2001). Elas possuem uma região rica nos aminoácidos serina e treonina, local no qual ocorre extensiva *O*-glicosilação e também uma âncora de GPI e um peptídeo sinal (Levitz e Specht, 2006). Mais da metade das proteínas encontradas no sobrenadante de cultivo de *C. neoformans* são manoproteínas (Mansour *et al.*, 2002). Através de marcações com Concanavalina A, foi demonstrado que as MPs de *Cryptococcus* spp. que não são secretadas, estão associadas ao lado interno da parede celular (Vartivarian *et al.*, 1989). Esta característica difere das MPs

de *Candida albicans*, por exemplo, as quais estão expostas ao meio extracelular em sua totalidade (Bates *et al.*, 2005).



**Figura 7. Caracterização da N-glicosilação e O-glicosilação em fungos.** A. N-glicosilação dos resíduos de asparagina (Asn) em fungos pode chegar a até 200 resíduos de manose (esfera vermelha), com extensas ramificações. Porém, tal predição não foi realizada especificamente para *C. neoformans*. Já a O-glicosilação dos resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) são bem menores, possuindo de 2 a 3 resíduos de manose. Adaptações da figura disponível em Levitz e Specht (2006).

Inúmeros fungos patogênicos expressam manoproteínas capazes de eliciar resposta imune no hospedeiro, como, por exemplo, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium marneffeii*. A capacidade das manoproteínas de interagirem com a parede celular dos fungos pode contribuir com a patogenicidade dos mesmos, pois mutantes de *C. albicans* deficientes no processo de manosição apresentam virulência atenuada em modelo murino de infecção (Bates *et al.*, 2005). A glicosilação de proteínas com resíduos de manose é essencial para a indução da resposta imune via células T no hospedeiro, a qual ocorre a partir do reconhecimento de antígenos pelas células dendríticas através dos receptores de manose seguido da apresentação dos mesmos às células T (Mansour *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2005). Por exemplo, a manoproteína de 98 kDa (MP98) de *C. neoformans* expressa heterologicamente na levedura modelo *Pichia pastoris* foi capaz de induzir resposta de células T CD4+ mais eficientemente, medida através da secreção de IL-2, em relação à MP98 expressa heterologicamente em *Escherichia coli*, pois a primeira estava glicosilada e a segunda não (Specht *et al.*, 2007). Este fato comprova a importância da glicosilação como fator imunogênico nas manoproteínas. Apenas proteínas O-glicosiladas com resíduos de manose também foram capazes de induzir resposta

imune mediada por células T (Specht *et al.*, 2007). Entretanto, a resposta de células T foi diminuída quando células dendríticas foram pré-incubadas com inibidores de receptores de manose, mostrando o papel das mesmas como apresentadoras de antígenos e a imunogenicidade das manoproteínas ao serem reconhecidas por receptores de manose (Specht *et al.*, 2007).

Inúmeros trabalhos exploram o potencial imunoterapêutico das manoproteínas de *C. neoformans*, como MP115, MP88 e MP84, justamente pelo fácil reconhecimento das mesmas como PMAPs (padrões moleculares associados a patógenos) pelo sistema imune do hospedeiro (Huang *et al.*, 2002; Biondo *et al.*, 2005). Além dessa capacidade, já foi demonstrado que algumas MPs podem mediar a adesão da célula fúngica às células epiteliais do hospedeiro, como a Epa1 de *Candida glabrata* e a MP84 de *C. neoformans* (Frieman *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2014). Uma segunda manoproteína de *C. neoformans* cuja função já foi caracterizada é a Cig1. Ela é secretada ao meio extracelular e tem sua expressão aumentada em condições de privação de ferro. É atribuída como sua função a absorção de componentes hemes para o interior da célula. A deleção do gene *CIG1*, juntamente com o gene codificador da ferroxidase *CFO1*, atenuam a virulência de *C. neoformans* em modelo murino de infecção (Cadieux *et al.*, 2013). Já a manoproteína MP98 (codificada pelo gene *CDA2*) de *C. neoformans*, é uma das cinco enzimas responsáveis pela síntese de quitosana no fungo, sendo que o mutante quántuplo para todos os cinco genes possui fenótipo de extremo defeito na integridade da parede celular e também é avirulento em modelo experimental de infecção (Baker *et al.*, 2007).

Análises de bioinformática do genoma de *C. neoformans* JEC21 evidenciaram a presença de 53 genes codificadores de proteínas com peptídeo sinal e âncora de GPI, sendo que 40 deles codificam manoproteínas putativas (Levitz e Specht, 2006). Entre essas 40 manoproteínas putativas, estão a MP98 e CIG1 citadas anteriormente, como também a manoproteína MP88 e outras que não possuem nenhum domínio conservado, uma característica predominante entre elas (Huang *et al.*, 2002; Levitz e Specht, 2006). Confirmando os resultados genômicos preditivos, análises qualitativas experimentais de proteínas extracelulares de *C. neoformans* também identificaram essas mesmas manoproteínas e outras que já haviam sido caracterizadas como imunogênicas, como MP115 e MP84 (Biondo *et al.*, 2005; Biondo *et al.*, 2006; Eigenheer *et al.*, 2007).

Considerando a falta de informações sobre a função de manoproteínas na estruturação e montagem da cápsula de *C. gattii*, seu principal fator de virulência, e o importantíssimo papel das mesmas durante a interação com o hospedeiro, o presente trabalho visou primeiramente fazer uma avaliação geral das manoproteínas codificadas pelo genoma dessa espécie e compará-las às codificadas pelo genoma de *C. neoformans*. Posteriormente, foi constatado que o gene codificador ortólogo de uma manoproteína predita de *C. gattii* (CNBG4278) em *C. neoformans* (CNAG05595) já foi encontrado diferencialmente expresso em condições de estresse da integridade da parede celular, vesículas extracelulares e no secretoma do fungo (Donlin *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2014; Geddes *et al.*, 2015; Peres Da Silva *et al.*, 2015). Portanto, seguiram-se as análises para caracterização funcional desse produto gênico de *C. gattii* na estruturação e montagem da cápsula polissacarídica, como também na interação com o hospedeiro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar a função de uma manoproteína predita (codificada pelo gene *CNBG4278*) de *C. gattii* nas arquitetura e montagem de cápsula e no processo de interação patógeno-hospedeiro.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1. Predição de manoproteínas codificadas pelo genoma de *C. gattii* e *C. neoformans*;
- 2.2.2. Construção de mutantes nulo e de superexpressão para manoproteína putativa *CNBG4278*;
- 2.2.3. Avaliação de danos na parede celular e cápsula dos referidos mutantes;
- 2.2.4. Avaliação da função da manoproteína predita na interação patógeno-hospedeiro *in vitro* e *in vivo*;
- 2.2.5. Avaliação da antigenicidade da manoproteína recombinante expressa em *E. coli*.



### 3. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA SCIENTIFIC REPORTS

**“A predicted *Cryptococcus gattii* mannoprotein is important for cell wall integrity and affects the interaction with host cells”**

Júlia Catarina Vieira Reuwsaat<sup>1,3\*</sup>, Heryk Motta de Souza<sup>1</sup>, Carolina Bettker Vasconcelos<sup>1</sup>, Bárbara Machado Marques<sup>1</sup>, Ane Wichine Acosta Garcia<sup>1,3</sup>, Francine Melise dos Santos<sup>1,3</sup>, Alícia Corbellini Piffer<sup>1,3</sup>, William Lopes<sup>1</sup>, Vanessa Barcellos<sup>1,3</sup>, Eamim Squizani<sup>1,3</sup>, Augusto Schrank<sup>1,2,3</sup>, Charley Christian Staats<sup>1,2,3</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>1,2,3</sup> and Lívia Kmetzsch<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

\* juliareuwsaat@gmail.com

# A predicted *Cryptococcus gattii* mannoprotein is important for cell wall integrity and affects the interaction with host cells

Júlia Catarina Vieira Reuwsaat<sup>1,3</sup>, Heryk Motta de Souza<sup>1</sup>, Carolina Bettker Vasconcelos<sup>1</sup>, Bárbara Machado Marques<sup>1</sup>, Ane Wichine Acosta Garcia<sup>1,3</sup>, Francine Melise dos Santos<sup>1,3</sup>, Alícia Corbellini Piffer<sup>1,3</sup>, William Lopes<sup>1</sup>, Vanessa Barcellos<sup>1,3</sup>, Eamim Squizani<sup>1,3</sup>, Augusto Schrank<sup>1,2,3</sup>, Charley Christian Staats<sup>1,2,3</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>1,2,3</sup>, and Lívia Kmetzsch<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

\*livial@cbiot.ufrgs.br

## ABSTRACT

The major *Cryptococcus* virulence factor is the production of a polysaccharide capsule composed by glucuronoxylomannan (GXM), galactoxylomannan (GalXM) and mannoproteins (MPs). The GXM and GalXM polysaccharides were and still are extensively characterized in aspects related to its structuration, production, and virulence participation, however there is no data on mannoproteins role in capsule structure/assembly and little is known about its participation in the yeast virulence. Considering this, the present study aimed to characterize the function of a predicted mannoprotein from *C. gattii*, coded by the *CNKG4278* gene, through the loss and gain of function of null and overexpression mutants, respectively. Analysis of Scanning Electron Microscopy (SEM) demonstrated that the capsule assembly in the null mutant strain is distinct from that observed in WT cells, but there is no difference in the size of the synthesized capsule among the strains. Also, null mutant cells are more sensitive to the cell wall stressor Congo Red and have increased GXM secretion to the culture supernatant compared to wild type, indicating a possible defect in the polysaccharide anchoring to the cell wall. *In vitro* phagocytosis tests showed that the deletion of the predicted mannoprotein coding gene affects phagocytosis by J774.A1 macrophages in the early hours of interaction and increases the yeast intracellular replication rate. However, the null and overexpression mutants showed no difference in virulence in a murine model of cryptococcosis. Furthermore, sera from patients with cryptococcosis recognized the recombinant mannoprotein expressed in *Escherichia coli*. Together, our results indicate that the predicted mannoprotein *CNKG4278* from *C. gattii* affects the cell wall structure and therefore the capsule assembly, but is not essential for virulence *in vivo*.

## Introduction

*Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* are sibling species that can cause cryptococcosis in humans. The first is responsible for infection in immunocompetent patients, while *C. neoformans* has higher infection incidence in immunocompromised hosts<sup>1</sup>. *C. gattii* infections were assumed to be restricted to tropical and subtropical areas, but the Vancouver Island outbreak in 1999 changed this view and confirmed the presence of this species in temperate regions<sup>2,3</sup>. The R265 strain of *C. gattii* (VGIIa molecular type) was responsible for the Vancouver outbreak, which spread to USA Northwestern<sup>4</sup> and it is hypervirulent compared to other *C. gattii* B and C serotype strains<sup>5</sup>. Cryptococcal infections led to approximately 620 thousand deaths of immunocompromised patients<sup>6</sup>. Despite the human infection caused by *C. neoformans* is prevalent in relation to *C. gattii* infections, during 2004-2011, the *C. gattii* outbreak had 33 % of mortality rate in the USA<sup>7</sup>.

*C. gattii* is widespread in trees and soil and the human infection occurs through inhalation of spores or dried yeasts that reach the lungs<sup>8</sup>. In the host, to escape from phagocyte cells like macrophages, *Cryptococcus* spp. use a repertoire of virulence strategies, as the ability to grow at 37 °C, melanin production and deposition in the cell wall, enzymes phospholipase B and urease secretion and production of a polysaccharide capsule<sup>9</sup>. The capsule is the major *Cryptococcus* spp. virulence factor because it has immunosuppressive properties and protects the yeast against oxidative stress<sup>8</sup>. The capsule is composed by the polysaccharides glucuronoxylomannan (GXM: 90-95 %) and galactoxylomannan (GalXM: 10-5 %) and less than 1 %

of mannoproteins (MPs)<sup>10,11</sup>. *C. neoformans* GXM is the most characterized capsule component and its features are usually related to the GXM produced by *C. gattii*. It is synthesized intracellularly and secreted by extracellular vesicles (EVs) that cross membrane and cell wall and release the polysaccharide content outside the cell, for capsule assembly in association with divalent cations<sup>12,13</sup>. Different GXM fractions from *C. gattii* and *C. neoformans* led to distinct immune responses in the host. A specific fraction of *C. gattii* serotype B is the most potent inducer of nitric oxide (NO) production by macrophages, which shows that *C. gattii* GXM is significantly different from the model proposed by *C. neoformans*<sup>14</sup>. It is also known that *C. neoformans* mutants for gene products involved in galactose metabolism do not secrete GalXM and are easily eradicated from the host<sup>15</sup>, showing the importance of this polysaccharide in pathogenicity. The roles of mannoproteins in capsule structure and assembly are still not clear, however their influence in T cell response induction in the host is well established<sup>16,17,18</sup>, which indicates that these proteins could be potential targets to immunotherapy.

Mannoproteins are found in a large variety of fungi<sup>19,20</sup> and their functions are closely related to cell wall structuring<sup>21,22</sup>. In *C. neoformans*, the mannoproteins are mainly found in the inner cell wall, as GalXM, and are not associated with GXM<sup>23,24</sup>. These are capable to induce strong T cell response in host<sup>16,17,18,25</sup>, however few works demonstrated the mannoprotein function in the yeast physiology<sup>26,27,28</sup>. Only two mannoproteins in *C. neoformans* had their function characterized through null mutants construction. The first was identified as Cig1, which is highly expressed and secreted into culture supernatants with MP88 and GPI8, a GPI transamidase essential for yeast growth<sup>26</sup>. Cig1 is a hemophore of cell surface and the knockout of it coding gene led to impaired growth in iron-limiting medium and a small capsule phenotype<sup>26,27</sup>. MP98 was characterized as a chitin deacetylase that contributes to maintain cell wall integrity by producing chitosan<sup>28</sup>. Mannoproteins have classically been considered as minor components of the capsule, however, their role in capsule architecture has never been established. Here, we described for the first time a mannoprotein (CNBG4278) that affects capsule assembly in *C. gattii* and, at the same time, as the other mannoproteins, is antigenic.

## Results

### Biomining of *C. gattii* and *C. neoformans* proteomes for putative mannoproteins

To predict the mannoproteins encoded by the *C. gattii* R265 genome and compare to *C. neoformans* H99, we searched the predicted proteomes for the essential features of a mannoprotein: signal peptide, GPI anchor and *O*-glycosylation sites<sup>29</sup>. As seen in Table 1, we predicted 36 and 43 mannoproteins encoded by *C. gattii* and *C. neoformans*, respectively, and more than 60 % of them are annotated as hypothetical proteins. Only two *C. gattii* predicted mannoproteins did not have the *C. neoformans* ortholog identified as mannoprotein, because of the lost of the GPI anchor (Table S1). In the same line, four *C. neoformans* predicted mannoproteins did not have the *C. gattii* ortholog identified as a mannoprotein due the lost of the signal peptide or GPI anchor (Table S2). Also, *C. neoformans* has 5 mannoproteins that does not have ortholog in *C. gattii* (Table S2). As expected, more than 40 % of the predicted mannoproteins does not have conserved domains (Table 1), and the majority of the mannoproteins with conserved domains display function of carbohydrate modifications.

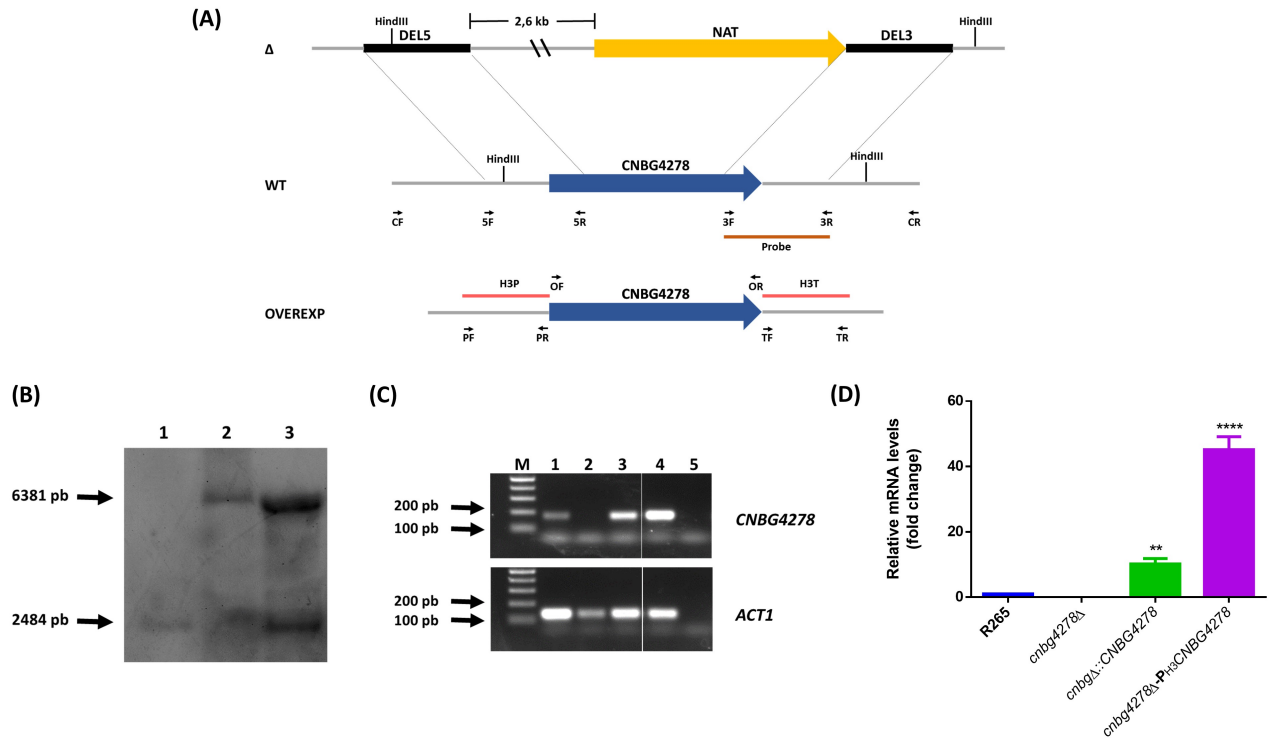
Among the hypothetical proteins with conserved domains, the predicted mannoprotein coded by *CNMG4278* gene displays a domain of galactose oxidase, according to InterProScan analysis. It is important to note that the ortholog protein in *C. neoformans* H99 was found in the extracellular vesicles known as "virulence bags"<sup>30,31</sup>, as well as in the cryptococcal secretome<sup>32</sup>. Moreover, this gene was found to be differentially expressed in mutants for kinases that govern the cell wall integrity<sup>33</sup>. As observed for different fungi, some mannoproteins are associated with the proper cell wall architecture<sup>34</sup>. Considering these findings, we hypothesized that the product of *CNMG4278* gene could be involved in cell wall maintenance. In this way, the construction of null and overexpression mutants were conducted to characterize the function of this *C. gattii* predicted mannoprotein.

**Table 1.** Prediction of mannoproteins coded by *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99

	<i>C. gattii</i> R265	<i>C. neoformans</i> H99
<b>Predicted proteome</b>	6456	7816
<b>Predicted mannoproteins</b>	36 (0.56%)	43 (0.55%)
<b>Predicted mannoproteins annotated as hypothetical</b>	23 (63.9%)	28 (65.1%)
<b>Predicted mannoproteins without conserved domains</b>	16 (44.4%)	19 (44.2%)

### Deletion, complementation and overexpression of *CNMG4278*

The construction of the mutants strains used in this study is summarized in Figure 1. Disruption of *CNMG4278* gene was achieved employing the Delsgate methodology<sup>35</sup>. The 5' (DEL5) and 3' (DEL3) *CNMG4278* flanks were PCR amplified and cloned into pDNORNAT<sup>36</sup>. The resulting targeting vector was used for *C. gattii* R265 transformation and the



**Figure 1. Deletion, complementation and overexpression of *CNMG4278* gene for functional analysis.** A. Scheme for the construction of mutant strains. Deletion ( $\Delta$ ) and overexpression (OVEREXP) cassettes are shown. All primers and the cleavage site of HindIII restriction enzyme are indicated. NAT: nourseothricin marker. B. Southern blot analysis. Genomic DNA (10  $\mu$ g) from WT (lane 1), *cnbg4278 $\Delta$*  (lane 2) and *cnbg $\Delta$ ::CNMG4278* (lane 3) strains were digested with HindIII restriction enzyme. The 3' gene flank was used as probe in Southern hybridization. Numbers at left indicate the hybridization signal sizes based upon the position of molecular size marker. C. Semi-quantitative RT-PCR with cDNA from WT (lane 1), *cnbg4278 $\Delta$*  (lane 2), *cnbg $\Delta$ ::CNMG4278* (lane 3) and *cnbg4278 $\Delta$ -P<sub>H3</sub>CNMG4278* (lane 4) as template. Lane 5: negative control of the PCR reaction. M: molecular size marker 1 Kb plus DNA ladder, indicated in base pairs on the left. Upper panel shows the amplification of *CNMG4278* transcripts and lower panel of actin transcripts (*ACT1*). cDNAs were synthesized from RNA isolated from fungal grown in YPD for 24 h. D. Quantitative real time RT-PCR of *CNMG4278* gene transcripts after growth of the *C. gattii* WT, *cnbg4278 $\Delta$* , *cnbg $\Delta$ ::CNMG4278* and *cnbg4278 $\Delta$ -P<sub>H3</sub>CNMG4278* strains in YPD. The measured quantity of the mRNA in each of the samples was normalized using the Ct values obtained for the *ACT1* gene. Data are shown as the mean  $\pm$  SD from three experimental replicates of three biological replicates. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ . It was performed One-Way ANOVA followed by Post-Hoc Dunnett test.

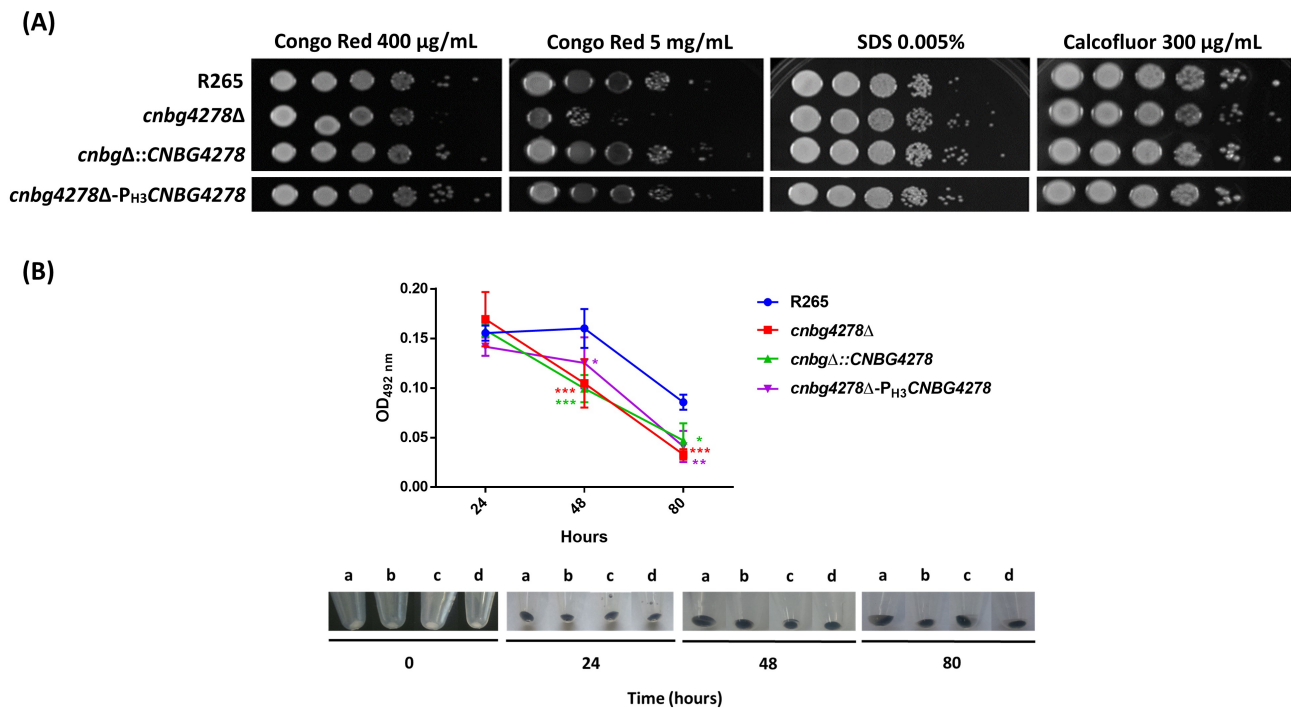
transformants construction were evaluated by Southern hybridization (Figure 1B) and semi-quantitative RT-PCR (Figure 1C). The transformants for the complemented strain were confirmed employing the same techniques, as seen in Figure 1B and 1C. For overexpression strain (*cnbg4278 $\Delta$ -P<sub>H3</sub>CNMG4278*) construction, the *CNMG4278* coding sequence was fused to *H3* (histone 3) promoter and terminator and cloned into pJAF1. The resulting targeting vector was used for *cnbg4278 $\Delta$*  strain transformation and the transformants were evaluated by semi-quantitative RT-PCR (Figure 1C) and quantitative real time RT-PCR (Figure 1D). As seen in Figure 1D, the reconstituted strain expresses more *CNMG4278* mRNA compared to wild type strain, which could be a consequence of the biolistic transformation and random insertion of the complemented vector into the genome, but it did not affect the fitness of this strain in the tested conditions. As expected, the overexpression transformant expresses almost 50 % more the *CNMG4278* mRNA, a consequence of the strong *H3* promoter (Figure 1D).

### ***CNMG4278* product is involved in proper cell wall function**

Mannoproteins are directed involved in cell wall structure in fungal cells<sup>21,22</sup> and, in *C. neoformans*, two of them had their function elucidated<sup>27,28</sup>. In this way, we sought to analyze if the inactivation of *CNMG4278* gene would alters cryptococcal cell wall functionality. To test this hypothesis, the WT, mutant, reconstituted and overexpression strains were tested for growth in the presence of cell wall stressors<sup>37</sup>. As seen in Figure 2A, the *cnbg4278 $\Delta$*  strain had severe impaired growth in medium

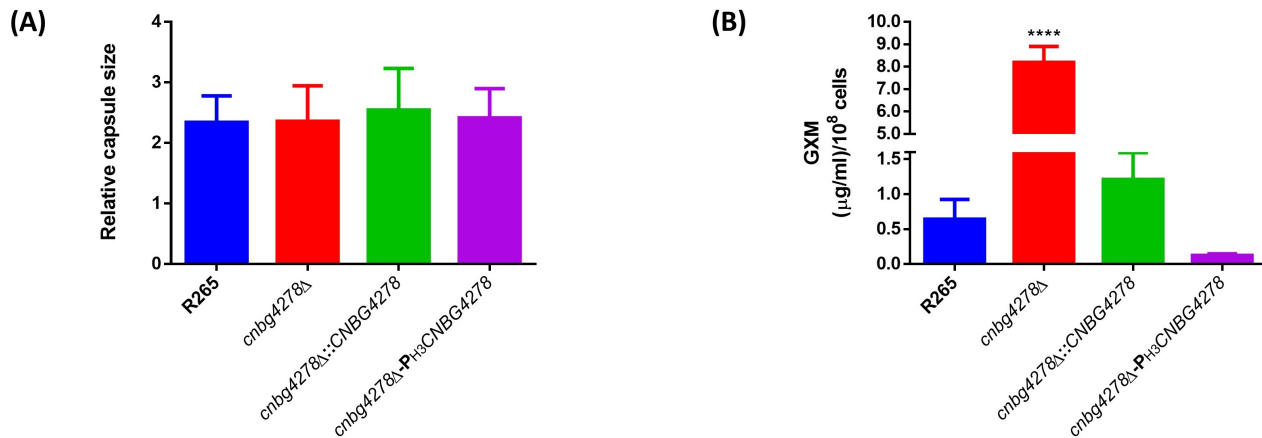
containing high doses of Congo Red, a dye that interacts with nascent glucan chains. However, all strains grew similarly in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS), that disrupts integral membrane proteins, and calcofluor white, which interacts with nascent chitin chains (Figure 2A). Also, no differences were observed in saline conditions (Figure S1A).

As shown by Baker and contributors<sup>28</sup>, cell wall defect influences the deposition and secretion of melanin, a pigment important for *Cryptococcus* spp. virulence<sup>38</sup>. To test the production, secretion and deposition of melanin by all CNBG4278 mutant strains, a melanization assay was conducted<sup>28</sup>. As shown in Figure 2B, after 80 hours of growth in liquid medium containing L-DOPA, all mutants had defect in melanin secretion to the supernatant when compared to WT, but there was not any visual difference of it deposition to the cell wall, as seen by cellular pellets. These results could indicate some defect in cell wall structure of *CNBG4278* mutant strains, as the secretion of this pigment was impaired in the null mutant and it was not totally recovered in complemented and overexpression strains. One of the enzymes responsible for melanin production (coded by *LAC1* gene) is attached to cell wall<sup>39,40</sup> and any difference in the Lac1 localization may be responsible for this phenotype. Other important virulence factors were not affected by *CNBG4278* disruption, as growth at 37 °C and phospholipase activity, another enzyme attached to cell wall<sup>41</sup> (Figure S1B and C).



**Figure 2. The absence of *CNBG4278* led to impaired growth in cell wall stress conditions and affected the secretion of melanin.** A. Cells of all strains were serially diluted 10-fold and 3 µL of each dilution was spotted onto YPD agar supplemented with the cell wall stressors Congo Red, SDS and Calcofluor white in the concentrations indicated. Plates were incubated at 30 °C for 48 hours. B. Pigmentation of *C. gattii* strains after growth in liquid medium in the presence of L-DOPA. Pigmented pellets of WT (a), *cnbg4278Δ* (b) *cnbgΔ::CNBG4278* (c) and *cnbg4278Δ-P<sub>H3</sub>CNBG4278* (d) are shown. Release of pigment-like molecules into *C. gattii* cultures was quantified spectrophotometrically and the means were statistically analyzed by Two-Way ANOVA followed by Dunnett post-test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ ).

The cell wall anchors the polysaccharide capsule, the major virulence factor of *Cryptococcus* spp., and changes in this structure affects proper capsule assembly and consequently the yeast virulence<sup>13</sup>. In this context, we evaluated the capsule size by optical microscopy using India ink counterstaining. No differences in capsular size were observed among the strains analyzed (Figure S2 and 3A). However, a higher level of secreted GXM was observed in the knockout strain supernatant (Figure 3B). This finding might be a consequence of a defective cell wall structure and lack of GXM interaction and cell wall deposition, but not from a failure in polysaccharide synthesis and secretion. This result is in agreement with the *cnbg4278Δ* creamy colony phenotype (data not shown). Although no visual difference in capsule structure was observed by optical microscopy, we performed a Scanning Electron Microscopy (SEM) of WT, null, complemented and overexpression strains grown in minimal medium, a classical capsule inducing media<sup>14</sup>. As seen in Figure 4, the *cnbg4278Δ* strain has a remarkable distinct capsule



**Figure 3. *CNMG4278* disruption does not affect capsule size but GXM release.** A. Capsule size was measured as the ratio of capsule size/cell diameter. B. ELISA test of culture supernatants with anti-GXM mAb 18B7. Statistical analysis of the results shown in B indicates that values obtained for *cnbg4278Δ* strain are significantly higher than those found for WT, complemented and overexpression strains. One-Way ANOVA followed by Dunnett test was performed. \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

assembly, which is probably a consequence of a defective cell wall. To further evaluate the surface characteristics of *CNMG4278* knockout mutant, we performed confocal microscopy to evaluate differences in labeling of chitin, GXM and chitoooligomers. However, no differences could be found (Figure S3).

### ***CNMG4278* product influences phagocytosis by J774.A1 macrophages, but not survival in mice**

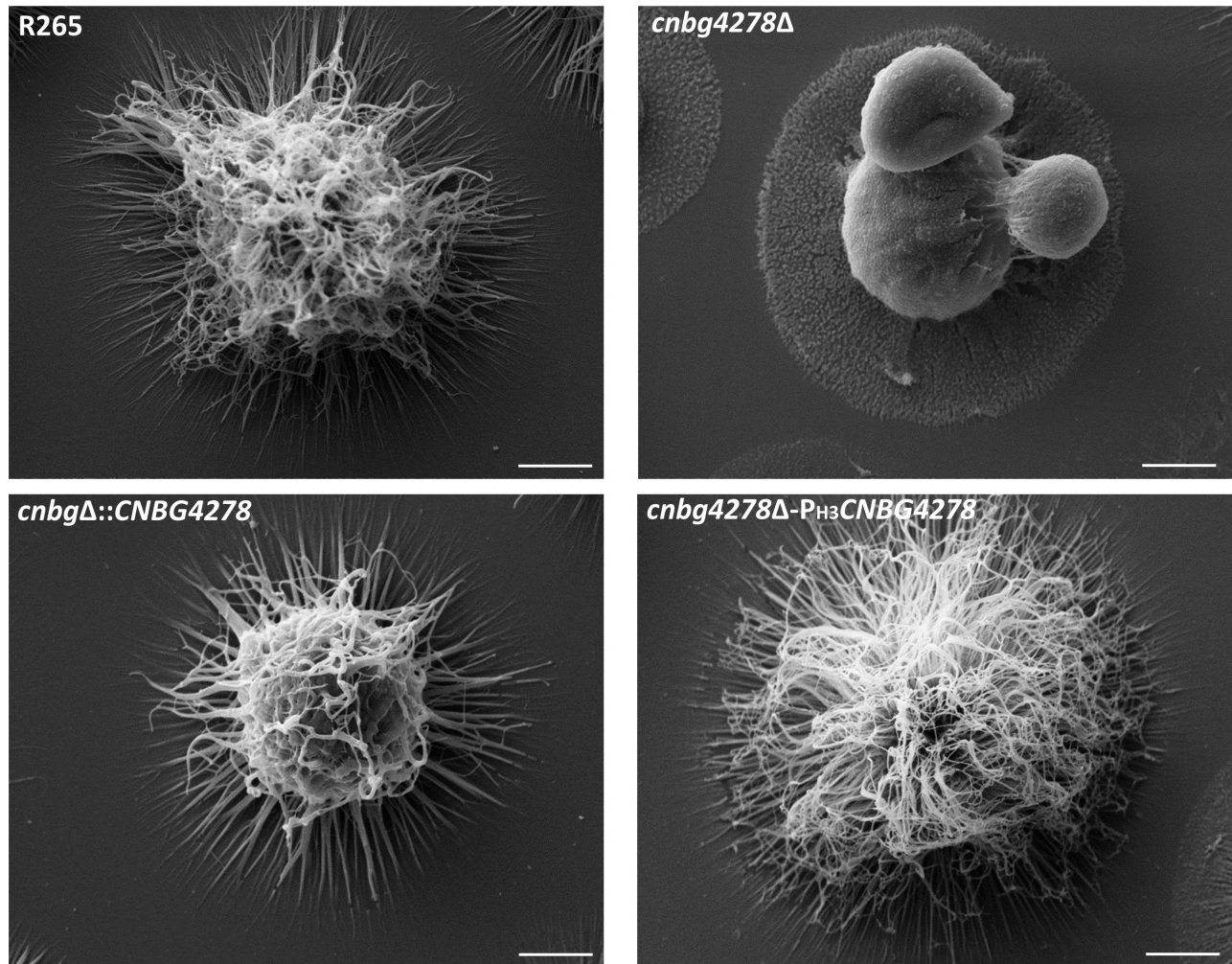
As macrophages are part of the defense first line against pathogens<sup>42</sup>, we focused in understand the role of this predicted mannoprotein in host-pathogen interaction. To perform that, interactions of *Cryptococcus* cells with PMA-activated J774.A1 macrophages cells were conducted. The results showed that *CNMG4278* disruption affects phagocytosis in the early hours of interaction with the immune cells, but the cryptococcal cells recovered from macrophages interaction after 24 hours was not altered (Figure 5A and 5B). The lowest phagocytosis rate in the first two hours of interaction was also confirmed by Giemsa assay (Figure S4). In line with the lower phagocytosis rate, cells lacking *CNMG4278* displayed higher intracellular replication rate (Figure 5C). This might be related to the higher GXM amount shed by the null mutant strain, which can modulate the macrophages response, or by the lack of mannan in the surface to be recognized as a pathogen-associated molecular pattern (PAMP). These observations cannot be explained by the macrophages cytokine expression profile, as there was not any difference in the cytokines tested, not even after 24 hours of interaction (Figure S5). These in vitro results do not reflect the in vivo virulence of the mutant cells, as seen by the survival curve in a murine model of cryptococcosis (Figure 6).

### ***CNMG4278* apoprotein is antigenic**

To test the antigenicity of the predicted mannoprotein *CNMG4278*, a truncated form (Figure S6A), lacking signal peptide (first 20 amino acids) and the predicted GPI anchoring signal (last 30 amino acids) was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS* and purified in a cobalt affinity chromatography in denaturing conditions (Figure S6B). This semi-purified fraction was serially diluted and submitted to Western blot assay using pooled sera from patients with cryptococcosis. All dilutions were recognized by the pooled sera, which confirms the antigenicity of r*CNMG4278* (Figure 7). This result endorses that the predicted mannoprotein is exposed and can be recognized by the host, as there was not identify any other predicted mannoprotein that shares identity with the one coded by *CNMG4278* gene (Table S1). Also, an ELISA was performed to confirm the recognition specificity of the recombinant mannoprotein by sera from patients infected by other fungi. OD readings using pooled sera from cryptococcosis patients were at least 5 times higher (IgG) or 3 times higher (IgM) compared from those obtained with pooled sera from patients with candidiasis (Figure S6C).

## **Discussion**

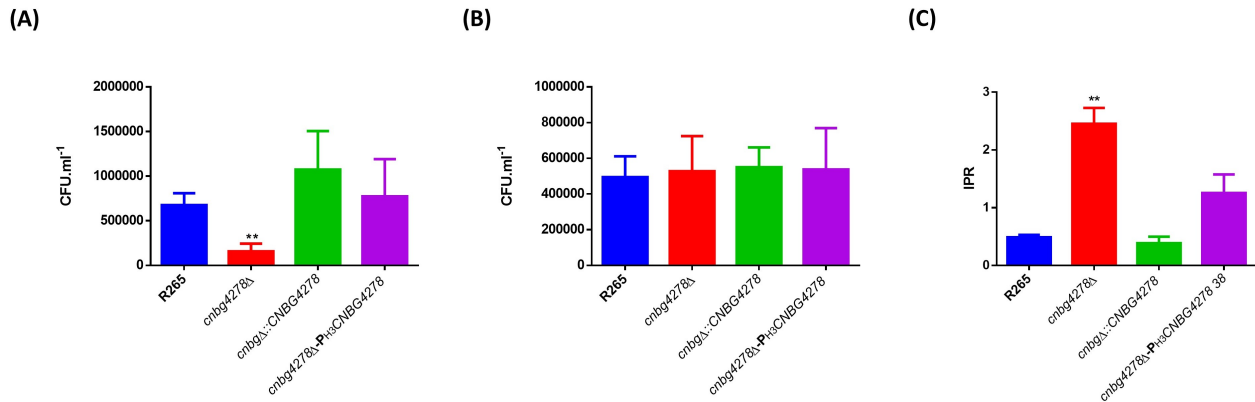
Mannoproteins are important structural constituents of fungi cell walls<sup>34</sup> and there is no information about *C. gattii* mannoproteins function in the cell wall or capsule structure and even less about their metabolic function in the yeast pathogenicity. After bioinformatics analysis of the proteome of two clinically important *Cryptococcus* species, we found out 43 predicted



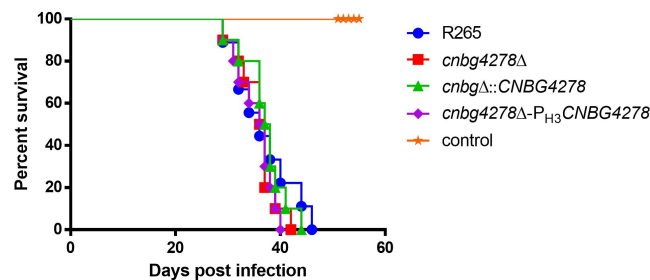
**Figure 4. Inactivation of *CNKG4278* led to alterations in *C. gattii* capsular architecture.** SEM analysis demonstrating that *cnbg4278Δ* capsule is different from WT. This observed phenotype was recovered by complemented and overexpression strains. Bars indicate 2  $\mu$ m.

mannoproteins codified by *C. neoformans* H99, which is in accordance with a previous work with *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21 that found 53 proteins containing GPI anchor and signal peptide, and about 75 % of them have regions rich in serine and threonine amino acids<sup>29</sup>. For *C. gattii*, a total of 36 mannoproteins were predicted. The most part of the predicted mannoproteins in both species are annotated as hypothetical proteins, with a little proportion spanning conserved domains. The ortholog of *CNKG4278* gene in *C. neoformans* (*CNAG05595*) was found in the yeast secretome<sup>32</sup> and EVs<sup>43,31</sup>, which suggests that this protein might play a role in capsule assembly or architecture during *Cryptococcus* sp. pathogenesis, as EVs are known as "virulence bags"<sup>44</sup>. RNA sequence data from *C. gattii* R265 cells recovered from mice bronchi-alveolar lavage, a condition that induces capsule enlargement, revealed high levels of *CNKG4278* mRNA (Staats and Vainstein, personal communication). These informations led to the investigation of the role of this predicted mannoprotein in *C. gattii* capsule assembly and architecture.

As the *CNKG4278* ortholog in *C. neoformans* was also found differentially expressed in mutants for gene products involved in cell wall integrity<sup>33</sup>, experiments were undertaken to assess the function of the predicted mannoprotein in *C. gattii* cell wall integrity. In line with these assumptions, we found that the null mutant cells displayed higher sensitivity to the cell wall stressor Congo Red, a dye that interact whit  $\beta$ -glucan nascent chains and impair activity of assembly enzymes that connect chitin to  $\beta$ -glucans<sup>37</sup>. Congo Red may be further affecting the cell wall structure already disrupted by preventing the interaction of other cell wall proteins to  $\beta$ -glucans. The cell wall chitin labeling in the presence of Congo Red was evaluated by confocal microscopy and no difference was observed compared to wild type (data not show). Growth differences in the presence of



**Figure 5. Disruption of *CNMG4278* affects the phagocytosis rate by macrophages and the survival within host cells.** After 2 hours (A) and 24 hours (B) of interaction, macrophage cells were lysed and CFU count was performed. C. Intracellular proliferation rate (IPR) assay was conducted as the ratio of intracellular cryptococci at 24 hours to the number of intracellular cryptococci at 2 hours determined by CFU counts. One-Way ANOVA followed by Post-Hoc Dunnett test was performed. \*\* $P < 0.01$ .

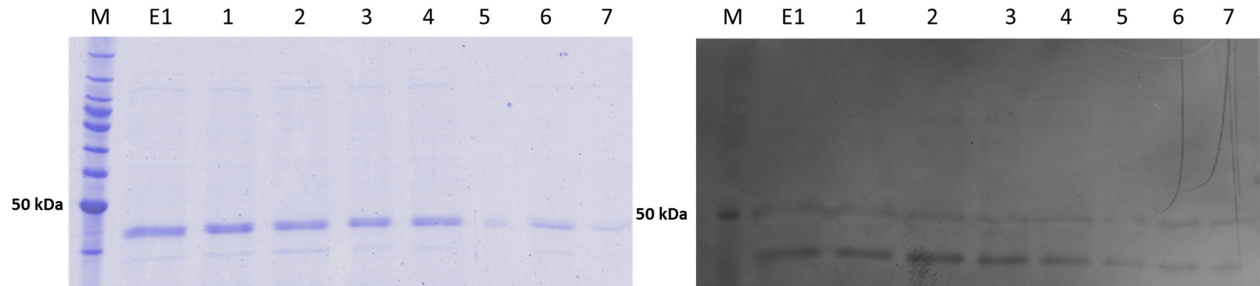


**Figure 6. *CNMG4278* is not required for full *C. gattii* virulence in mice.** Virulence assay of WT, *cnbg4278Δ* mutant, *cnbgΔ::CNMG4278* complemented and *cnbg4278Δ-P<sub>H3</sub>CNMG4278* overexpression strains in an intranasal inhalation model of murine infection.

others cell wall stressors as calcofluor and SDS were not observed, nor at saline conditions. Another *Cryptococcus* spp. cell wall component is melanin, an important virulence factor that protects the yeast against free radicals and increase the resistance to antifungals<sup>38</sup>. The melanin production is conducted by laccase enzymes (coded by *LAC1* and *LAC2* genes) and deletion of both genes reduced survival of *C. neoformans* in the host<sup>39</sup>. *Lac1* is the mainly melanin producer and is localized in the cell wall<sup>39,40</sup>. We reported in this study that *CNMG4278* deletion affects melanin secretion, but not the deposition of the pigment in the cell wall. Probably, alterations in the cell wall localization of these enzymes due to *CNMG4278* deletion could have influenced these phenotypes. An opposite "leaky melanin" phenotype was seen in a quadruple mutant defective in chitosan production. These cells had severe impaired cell wall integrity that disables melanin attachment<sup>28</sup>. Another important virulence factor that is attached to the cell wall is phospholipase B<sup>41</sup>, but the activity of this enzyme was not affected by *CNMG4278* deletion (Figure S1C).

Based on results that indicate a cell wall defect in the *cnbg4278Δ* mutant strain, we performed tests to evaluate the major *C. gattii* virulence factor, the polysaccharide capsule. *CNMG4278* deletion did not affect the capsule size, but the capsule assembly, as observed by SEM analysis. The most likely explanation for the observed capsule phenotype in the null mutant cells is a cell wall defect that impaired the capsule connection. The null mutant capsule ultrastructure was more fragile and sensible to the steps involved in sample processing prior to analysis by SEM, since the same cells evaluated through India ink counterstaining presented normal capsule. The cell wall is a dynamic organelle that changes its 3D structure and components distribution according to external conditions, mainly nutrients availability. As the most of mannose molecules in fungal cell wall are derived from proteins, it is possible to assume that *CNMG4278* deletion affected the cell wall structure<sup>34</sup>. The deletion





**Figure 7. CNBG4278 apoprotein is antigenic.** Western blot assay. Elution fraction 1 was serially diluted (1-7) and probed with pooled sera from patients with cryptococcosis. M: mass molecular marker indicated in kDa. SDS-PAGE gel mirror (A). Western blot film (B).

may have changed the  $\alpha$ -1-3-glucans distribution that are responsible directly or indirectly for capsule interaction with cell wall<sup>45</sup> and the other cell wall components like chitosan<sup>46</sup>. It was also observed that the lack of  $\beta$ -1-6-glucans affects the cell wall integrity, capsule assembly and cell wall proteins malfunction, as GPI-anchor interacts with  $\beta$ -1-6-glucans<sup>47</sup>. This can explain the difficulty to grow in the presence of Congo Red and to secrete melanin, phenotypes observed in the null mutant strain. Also, the highest GXM shed content is probably a consequence of an impaired connection between cell wall-capsule, not a dysfunction in the polysaccharide production and secretion.

To understand the role of *CNBG4278* product in the host-pathogen interaction, we performed in vitro interaction assays with J774.A1 macrophages. Lower phagocytosis rates were observed for the null mutant strain in early hours of interaction. This phenotype can be due the high secreted content of GXM in the null mutant supernatant that abolishes macrophages response or a lack of mannose in the surface to be recognized as a PAMP. The *C. gattii* intracellular replication within macrophages may be essential to the infection establishment in immunocompetent patients, since the yeast cells must proliferate rapid enough to overwhelm the host immune system<sup>8</sup>. The in vitro IPR assay demonstrated that the null mutant strain replicates more within macrophages. This increased survival and proliferation is associated with yeast rapid defense against reactive oxygen species (ROS), which is provided by capsule enlargement and melanin production<sup>48</sup>. Also, shed GXM can be favoring the null mutant proliferation maybe through increased phagosomal permeabilization<sup>49</sup>. These findings possibly indicate a hypervirulent phenotype for the null mutant strain. However, we observed that *CNBG4278* is not required for virulence in a murine model of cryptococcosis.

Since *Cryptococcus* mannoproteins are characterized by immunological importance in T cell and humoral induction response, we aimed to evaluate if the predicted mannoprotein *CNBG4278* was also recognized during host-pathogen interaction. For that, the recombinant apoprotein was expressed in *E. coli* and purified in a cobalt-affinity chromatography. Even without glycosylation, the recombinant *CNBG4278* protein was recognized in ELISA by pooled sera from patients with cryptococcosis. The Western Blot also indicates that there is some *CNBG4278* not glycosylated epitope that can be recognized by antibodies, which was already shown by other *C. neoformans* mannoproteins<sup>50</sup>.

Mannoproteins have a prospective importance in immunity-based strategies to control cryptococcosis<sup>51</sup>. In the present work the functional characterization of a *C. gattii* predicted mannoprotein coded by *CNBG4278* gene was conducted. This protein has a potential role for maintaining the cell wall integrity, however cryptococcal virulence was not influenced. Interestingly, the recombinant *CNBG4278* was highly reactive with sera from cryptococcosis patients. A more detailed analysis of capsule assembly in the null mutant strain will be needed to fully understand the contribution of *CNBG4278* product to this process.

## Methods

### Fungal strains, plasmid and media

The *C. gattii* R265 strain used in this study was kindly provided by Dr. Wieland Meyer (The University of Sydney, Australia). Plasmid pDNORNAT, which contains the nourseothricin marker cassette, was previously constructed by our group<sup>36</sup>. Plasmid pJAF15, which contains the hygromycin resistance marker cassette and plasmid pJAF1, which contains the G418 resistance marker cassette, were a generous gift of Joseph Heitman (Duke University, Durham, NC USA). The strains were maintained on YPD medium (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose, and 1,5 % agar). YPD plates containing nourseothricin (100  $\mu$ g/ml) were used to select *C. gattii* mannoprotein deletion transformants (*cnbg4278* $\Delta$ ). YPD plates containing hygromycin (200  $\mu$ g/ml) were used to select *C. gattii* mannoprotein reconstituted transformants (*cnbg* $\Delta$ ::*CNBG4278*) and YPD plates containing

gentamicin (200 µg/ml) were used to select *C. gattii* mannoprotein overexpression transformants (*cnbg4278Δ-P<sub>H3</sub>CNMG4278*).

### Bioinformatics analysis

The proteomes were retrieved from the Broad Institute *C. gattii* R265 and *C. neoformans* H99 proteome database<sup>52,53,54</sup>. SignalP was used for the signal peptide prediction<sup>55</sup>, PredGPI for GPI-anchor prediction<sup>56</sup> and GlycoEP standard for O-glycosylation analysis<sup>57</sup>. The search for conserved domains was performed using InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>).

### Disruption, complementation and overexpression of *CNMG4278*

Disruption of *CNMG4278* was achieved employing the Delsgate methodology<sup>35</sup>. The 5' and 3' *CNMG4278* flanks (781 bp and 771 bp, respectively) were PCR amplified and purified from agarose gels (PureLink-TM Quick Gel Extraction, Invitrogen, Germany). *Double Joint* PCR with 1 ng of each fragment was carried out, resulting in a fragment with 1552 bp. Approximately 200 ng of pDONRNAT and 100 ng of *Double Joint* PCR product were submitted to BP clonase reaction, according to manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, Ca). The product of this reaction was transformed into *E. coli* TG-2. After confirmation of the correct deletion construct, the plasmid was linearized with I-SceI prior to *C. gattii* biolistic transformation<sup>58</sup>. The mutants were screened by colony PCR, and the deletion was confirmed by Southern blot and semi-quantitative RT-PCR analysis. For complementation, a 3427 bp genomic PCR fragment containing the wild-type *CNMG4278* gene was cloned into the EcoRV site of pJAF15. The resulting plasmid was used for transformation of the *CNMG4278* null mutant strain. Genomic insertion of the complemented gene was confirmed by Southern blot and semi-quantitative RT-PCR analysis. For overexpression, the promoter and terminator of histone 3 gene (*CNAG06745*) were amplified from *C. neoformans* H99 genome and the coding sequence of *CNMG4278* was amplified from *C. gattii* R265 cDNA by PCR. The three fragments were purified from agarose gels and fused by *Double Joint* PCR, using the external primers of the construction. A fragment of 2.4 kb purified from agarose gel was utilized for cloning into the plasmid pJAF1 using the In-Fusion HD EcoDry kit (Clontech), according to manufacturer's instructions. The resulting plasmid was used for transformation of the *CNMG4278* null mutant strain. Genomic insertion of the overexpression cassette was confirmed by semi-quantitative RT-PCR and quantitative RT-qPCR analysis. The primers used in these plasmids constructions are listed in Table S3.

### Phenotypic characterization assays

For phenotypic characterization, WT, null, complemented and overexpression strains were grown on YPD medium for 16 h, washed with PBS and adjusted to a cell density of 10<sup>7</sup> cells/ml. The cell suspensions were serially diluted 10-fold and 3 µL of each dilution was spotted onto YPD agar supplemented with the cell wall stressors Congo Red (400 µg/ml and 500 mg/ml), Calcofluor white (300 µg/ml) or SDS (0.005 %)<sup>37</sup> and with the salts NaCl (1.5 M) and CaCl<sub>2</sub> (1.5 M)<sup>59</sup>. The plates were incubated for 2 days at 30 °C and photographed. For thermo tolerance assay, the serial dilution was spotted onto YPD agar and incubated at 37 °C for two days. For melanization assay, cells were grown on YPD medium for 16 h, washed with PBS and incubated in minimal medium (1 g/L L-asparagine, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mg/L thiamine and 1 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)) at 30 °C. After 24 h, 48 h and 80 h of intervals, the cultures were centrifuged 1,000 g for 10 min and the pellets were photographed for visual pigmentation analysis. The supernatants were spectrophotometrically analyzed (absorbance 492 nm)<sup>28</sup>. The solid melanization test was performed as described above, mixing 10 ml of 2X minimal medium (2 g/L L-asparagine, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/L thiamine and 2 mM L-DOPA) with 19 ml 2 % of agar-water.

### Capsule size and GXM secretion

For capsule size measurement, WT, null, complemented and overexpression strains were grown on YPD medium for 16 h, washed with PBS and 10<sup>6</sup> cells were incubated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) for 72 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. After incubation, cells were fixed in 4 % paraformaldehyde and washed three times with PBS. *C. gattii* cells were placed onto glass slides and mixed with similar volumes of India ink. Capsule sizes, defined as the distances between the cell wall and the outer border of the capsule in India ink stained yeast cells, were determined using ImageJ Software (version 1.33), elaborated and provided by National Institutes of Health (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Cell diameters were determined using the same software. Final measurements were presented as ratio of capsule size / cell diameter. For determination of secreted GXM, supernatants were acquired as previously described<sup>14</sup>. GXM concentration in fungal supernatants was determined by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the monoclonal antibody against GXM 18B7, using modifications of a previously described protocol for GXM detection<sup>60,61</sup>. Briefly, 96-Well polystyrene plates were coated with serial diluted standard *C. gattii* R265 GXM (10 µg/ml) and supernatant samples and further blocked with bovine serum albumin. The plates were sequentially incubated with mAb 18B7 and a peroxidase-conjugated anti-mouse IgG for 1 h. Reactions were developed after the addition of 50 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) and 50 µl 0.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, followed by measuring absorbance

at 450 nm with a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices). Antibody concentration in this assay corresponded to 1  $\mu\text{g/ml}$ .

### Microscopy

Cell surface morphology was analyzed after incubation of yeast cells with calcofluor white, the monoclonal antibody 18B7 and wheat germ agglutinin (WGA). These probes were used to visualize cell wall chitin (calcofluor), GXM (18B7) and chitooligomers (WGA) by confocal microscopy following a previously described protocol<sup>62</sup>. Briefly,  $10^6$  cells of WT, null, complemented and overexpression strains were grown on DMEM for 72 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. After incubation, cells were fixed in 4 % paraformaldehyde and washed three times with PBS. The concentrations used in this work were 5  $\mu\text{g/ml}$  WGA, 5  $\mu\text{g/ml}$  calcofluor and 10  $\mu\text{g/ml}$  18B7. The incubations were performed individually for 30 minutes at 37 °C. After each incubation, cells were washed three times with PBS. The cells were analyzed with a Confocal microscope FV1000, in the Electron Microscopy Center of the Federal University of Rio Grande do Sul (CME, UFRGS). For scanning electron microscopy,  $10^6$  cells were grown in minimal medium for 72 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. The sample preparation was conducted as described previously<sup>63</sup>, with few modifications. The cells were analyzed with a scanning electron microscope Zeiss EVO MA10, also in the CME, UFRGS.

### Survival assay

Virulence studies were conducted according to a previously described intranasal inhalation infection model<sup>64,65</sup> using ten female BALB/C mice (approximately 4 weeks old) for each strain. Mice were infected with  $10^5$  yeast cells suspended in 50  $\mu\text{l}$  of PBS and monitored daily. Kaplan–Meier analysis of survival was performed using GraphPad Software.

### Macrophage assays

Phagocytosis assays were conducted to evaluate the susceptibility of the mutant strains to macrophage antifungal activity. One day before the phagocytosis test, an aliquot of  $10^5$  J774.A1 cells in DMEM supplemented with 10 % FBS was seeded into 96-well culture plates and cultivated for 24 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. The *C. gattii* strains were inoculated into YPD and allowed to grow at 18 h at 30 °C. After this period, the *C. gattii* cells were washed 3 times with PBS and counted. A total of  $10^7$  cells of each strain were opsonized with mAb 18B7 (final concentration of 1  $\mu\text{g/ml}$ ) and incubated for 1 h at 37 °C. At the same time, macrophage cells were washed once with warm PBS and incubated in DMEM with 5 nM phorbol myristate acetate (PMA) for activation for 2 h. Then, macrophages were exposed to yeast cells at 1:10 ratio and incubated for 2 and 24 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. At the end of incubation, the wells were washed 3 times with warm PBS, the macrophages cells were lysed with sterile ice-cold water and subsequently plated on YPD plates for CFU determination. For intracellular proliferation rate (IPR) assay, after 2 h of interaction, the medium was removed and macrophages were washed 3 times with PBS to remove extracellular cryptococci. A fraction of the wells were used to determine the number of phagocytosed cryptococcal cells by the lysis of macrophages cells with ice-cold sterile water. The remaining wells were used for the determination of proliferation rate. DMEM with 10 % FBS was added and further incubated at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> for 24 h. The IPR was determined as the ratio of the number of intracellular cryptococci at 24 h to the number of intracellular cryptococci at 2 h. For Giemsa assay, at the end of interaction, macrophages cells were fixed with methanol and stained with Giemsa for 15 min at room temperature. Cells were visualized in Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope equipped with an AxioCam MRc camera (Carl Zeiss, Jena, Germany). The images were acquired using AxioVision Rel 4.8 Software. The phagocytosis index was determined as the ratio of internalized cryptococcal cells to the number of macrophages cells.

### Real time RT-PCR analysis

For the evaluation of *CNBG4278* expression, cultures of WT, *cnbg4278 $\Delta$* , *cnbg $\Delta$ ::CNBG4278* and *cnbg4278 $\Delta$ -P<sub>H3</sub>CNBG4278* cells were grown overnight in YPD medium at 30 °C with shaking. Three independent RNA samples were prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. For macrophage RNA extraction, the interaction of the immune cells with *C. gattii* strains was performed as described above. The experiment was conducted in 12-well plate in duplicate for each biological triplicate. The RNA samples were prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After DNase I (Promega) treatment, reverse transcriptase reactions were performed. Real-time PCR reactions were performed using StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR thermal cycling conditions included an initial step at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. For cytokine real-time PCR, 50 cycles were performed. Reaction's volumes of 20  $\mu\text{l}$  contained 2  $\mu\text{l}$  of diluted cDNA (1:5), 0.1 X SYBR Green I (Invitrogen), 25  $\mu\text{M}$  dNTP, 1X PCR Buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 1 pmol of each reverse and forward primers. For real time RT-PCR analysis of IL-4, IL-6 and IL-12 a total of 4  $\mu\text{l}$  of diluted cDNA (1:5) was used. Each cDNA sample was analyzed in triplicate with each primer pair. Melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm the amplification of a single PCR product. Data were normalized to actin (for *C. gattii*) and GAPDH (for macrophages) cDNA amplified in each set of PCR experiments. The  $2^{-\Delta CT}$  method was used to

determine the relative expression for *C. gattii* mutants confirmation and for macrophages cytokines evaluation<sup>66</sup>. The cytokine data was normalized using square root of  $2^{-\Delta CT}$  values. The primers utilized in these experiments are listed in Table S3.

### Recombinant expression of CNBG4278

For expression in *E. coli*, the modified coding sequence of *CNBG4278* (without signal peptide and GPI-anchor site) was cloned into pET-23D(+) between the sites of BamHI and HindIII (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA). The cloning was confirmed by cleavage and DNA sequencing. For the expression of the recombinant mannoprotein, the BL21 (DE3) pLysS *E. coli* strain was transformed with the plasmid and protein expression was induced with 20 g/l lactose for 3 h. Purification was conducted under denaturing conditions with HiTrap Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC-GE Healthcare Life Science) charged with 100 mM CoCl<sub>2</sub>. Buffers with increasing concentrations of imidazole (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 8 M urea and 10-500 mM imidazole) were used for elution of the recombinant protein from IMAC column.

### Western Blot and ELISA with patients sera

We evaluated the serological properties of recombinant CNBG4278 by Western blotting assay and ELISA using sera from individuals diagnosed with cryptococcosis. Sera were kindly donated by Dr. Jorge Horta (Universidade de Santa Cruz do Sul, Brazil). For Western Blot test, the semi-purified recombinant CNBG4278 fraction was separated by SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene fluoride membrane and probed with pooled sera from patients with cryptococcosis at a dilution of 1:10. Detection was performed using a Pierce-ECL (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. For ELISA assay, 1 µg of rCNBG4278 semi-purified was fixed in microplate (BD Falcon 3912) and probed with pooled sera from patients with cryptococcosis and candidiasis for cross-reactivity evaluation at a dilution of 1:200. The IgG and IgM conjugates were quantified using Pierce-ECL (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

### Ethics statement

The use of animals in this work was performed with approval of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ethics Committee for Use of Animals. Mice were housed in groups of four kept in filtered top ventilated cages with food and water ad libitum. The animals were cared for according to the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) guidelines. All efforts to minimize animal suffering were made. Before infection assays, mice were intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 16 mg/kg xylazine. Mice were analyzed twice daily for any signs of suffering, defined by weight loss, weakness or inability to obtain feed or water. At the first signs of suffering, mice were euthanized with over dosage of thiopental (140 mg/kg) and lidocaine (10 mg/kg).

### References

1. Chen, S. C.-A., Meyer, W. & Sorrell, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. *Clinical microbiology reviews* **27**, 980–1024 (2014).
2. Kwon-Chung, K. & Bennett, J. E. High prevalence of *cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* **257**, 213–218 (1984).
3. Datta, K., Bartlett, K. H. & Marr, K. A. *Cryptococcus gattii*: emergence in western north america: exploitation of a novel ecological niche. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* **2009** (2009).
4. Lin, X. & Heitman, J. The biology of the *cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 69–105 (2006).
5. Byrnes III, E. J. *et al.* Emergence and pathogenicity of highly virulent *cryptococcus gattii* genotypes in the northwest united states. *PLoS Pathog* **6**, e1000850 (2010).
6. Park, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with hiv/aids. *Aids* **23**, 525–530 (2009).
7. Harris, J. *et al.* *Cryptococcus gattii* in the united states: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clinical infectious diseases* **53**, 1188–1195 (2011).
8. Bielska, E. & May, R. C. What makes *cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS yeast research* **16**, fov106 (2016).
9. Ma, H. & May, R. C. Virulence in *cryptococcus* species. *Advances in applied microbiology* **67**, 131–190 (2009).
10. Rakesh, V. *et al.* Finite-element model of interaction between fungal polysaccharide and monoclonal antibody in the capsule of *cryptococcus neoformans*. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 8514–8522 (2008).

11. Levitz, S. M., Nong, S.-h., Mansour, M. K., Huang, C. & Specht, C. A. Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates t cell responses to cryptococcus neoformans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 10422–10427 (2001).
12. Yoneda, A. & Doering, T. L. A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. *Molecular biology of the cell* **17**, 5131–5140 (2006).
13. Zaragoza, O. *et al.* The capsule of the fungal pathogen cryptococcus neoformans. *Advances in applied microbiology* **68**, 133–216 (2009).
14. Fonseca, F. L. *et al.* Immunomodulatory effects of serotype b glucuronoxylomannan from cryptococcus gattii correlate with polysaccharide diameter. *Infection and immunity* **78**, 3861–3870 (2010).
15. Moyrand, F., Fontaine, T. & Janbon, G. Systematic capsule gene disruption reveals the central role of galactose metabolism on cryptococcus neoformans virulence. *Molecular microbiology* **64**, 771–781 (2007).
16. Specht, C. A., Nong, S., Dan, J. M., Lee, C. K. & Levitz, S. M. Contribution of glycosylation to t cell responses stimulated by recombinant cryptococcus neoformans mannoprotein. *Journal of Infectious Diseases* **196**, 796–800 (2007).
17. Pietrella, D., Corbucci, C., Perito, S., Bistoni, G. & Vecchiarelli, A. Mannoproteins from cryptococcus neoformans promote dendritic cell maturation and activation. *Infection and immunity* **73**, 820–827 (2005).
18. Mansour, M. K., Latz, E. & Levitz, S. M. Cryptococcus neoformans glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. *The Journal of Immunology* **176**, 3053–3061 (2006).
19. Zhang, W. & Ballou, C. Saccharomyces kluyveri cell wall mannoprotein. structures of the o- and n-linked carbohydrate components. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 10073–10079 (1981).
20. Nguyen, T., Fleet, G. & Rogers, P. Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied microbiology and biotechnology* **50**, 206–212 (1998).
21. Teparić, R. & Mrša, V. Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. *Current genetics* **59**, 171–185 (2013).
22. Hagen, I. *et al.* Sed1p and srl1p are required to compensate for cell wall instability in saccharomyces cerevisiae mutants defective in multiple gpi-anchored mannoproteins. *Molecular microbiology* **52**, 1413–1425 (2004).
23. Vartivarian, S. *et al.* Localization of mannoprotein in cryptococcus neoformans. *Journal of bacteriology* **171**, 6850–6852 (1989).
24. De Jesus, M. *et al.* Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of cryptococcus neoformans. *Virulence* **1**, 500–508 (2010).
25. Huang, C., Nong, S.-h., Mansour, M. K., Specht, C. A. & Levitz, S. M. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from cryptococcus neoformans that stimulates t-cell responses. *Infection and immunity* **70**, 5485–5493 (2002).
26. Lian, T. *et al.* Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen cryptococcus neoformans. *Molecular microbiology* **55**, 1452–1472 (2005).
27. Cadieux, B. *et al.* The mannoprotein cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus cryptococcus neoformans. *Journal of Infectious Diseases* **207**, 1339–1347 (2013).
28. Baker, L. G., Specht, C. A., Donlin, M. J. & Lodge, J. K. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in cryptococcus neoformans. *Eukaryotic cell* **6**, 855–867 (2007).
29. Levitz, S. M. & Specht, C. A. The molecular basis for the immunogenicity of cryptococcus neoformans mannoproteins. *FEMS yeast research* **6**, 513–524 (2006).
30. Rodrigues, M. L. *et al.* Vesicular polysaccharide export in cryptococcus neoformans is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic cell* **6**, 48–59 (2007).
31. Wolf, J. M., Espadas-Moreno, J., Luque-Garcia, J. L. & Casadevall, A. Interaction of cryptococcus neoformans extracellular vesicles with the cell wall. *Eukaryotic cell* **13**, 1484–1493 (2014).
32. Geddes, J. M. *et al.* Secretome profiling of cryptococcus neoformans reveals regulation of a subset of virulence-associated proteins and potential biomarkers by protein kinase a. *BMC microbiology* **15**, 1 (2015).
33. Donlin, M. J. *et al.* Cross talk between the cell wall integrity and cyclic amp/protein kinase a pathways in cryptococcus neoformans. *MBio* **5**, e01573–14 (2014).

34. Free, S. J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet* **81**, 33–82 (2013).
35. García-Pedrajas, M. D. *et al.* Delsgate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 379–388 (2008).
36. de Oliveira Schneider, R. *et al.* Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS one* **7**, e43773 (2012).
37. Ram, A. F. & Klis, F. M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on calcofluor white and congo red. *Nature protocols* **1**, 2253–2256 (2006).
38. Coelho, C., Bocca, A. L. & Casadevall, A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Adv. Appl. Microbiol* **87**, 1–41 (2014).
39. Missall, T. A., Moran, J. M., Corbett, J. A. & Lodge, J. K. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant *tsa1*. *Eukaryotic Cell* **4**, 202–208 (2005).
40. Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A. & Williamson, P. R. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and immunity* **69**, 5589–5596 (2001).
41. Siafakas, A. R. *et al.* Cell wall-linked cryptococcal phospholipase b1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 37508–37514 (2007).
42. Erwig, L. P. & Gow, N. A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 163–176 (2016).
43. da Silva, R. P. *et al.* Extracellular vesicle-mediated export of fungal rna. *Scientific reports* **5**, 7763 (2015).
44. Joffe, L. S., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L. & Del Poeta, M. Potential roles of fungal extracellular vesicles during infection. *mSphere* **1**, e00099–16 (2016).
45. Reese, A. J. *et al.* Loss of cell wall alpha (1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Molecular microbiology* **63**, 1385–1398 (2007).
46. Rodrigues, M. L., Alvarez, M., Fonseca, F. L. & Casadevall, A. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryotic cell* **7**, 602–609 (2008).
47. Gilbert, N. M. *et al.* Kre genes are required for  $\beta$ -1, 6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology* **76**, 517–534 (2010).
48. Johnston, S. A. & May, R. C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cellular microbiology* **15**, 403–411 (2013).
49. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 3165–3170 (2002).
50. Biondo, C. *et al.* Characterization of two novel cryptococcal mannoproteins recognized by immune sera. *Infection and immunity* **73**, 7348–7355 (2005).
51. Mansour, M. K., Yauch, L. E., Rottman, J. B. & Levitz, S. M. Protective efficacy of antigenic fractions in mouse models of cryptococcosis. *Infection and immunity* **72**, 1746–1754 (2004).
52. D'Souza, C. *et al.* Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *MBio* **2**, e00342–10 (2011).
53. Farrer, R. A. *et al.* Genome evolution and innovation across the four major lineages of *Cryptococcus gattii*. *mBio* **6**, e00868–15 (2015).
54. Janbon, G. *et al.* Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex rna expression and microevolution leading to virulence attenuation. *PLoS Genet* **10**, e1004261 (2014).
55. Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. Signalp 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* **8**, 785–786 (2011).
56. Pierleoni, A., Martelli, P. L. & Casadio, R. Predgpi: a gpi-anchor predictor. *BMC bioinformatics* **9**, 1 (2008).
57. Chauhan, J. S., Rao, A. & Raghava, G. P. In silico platform for prediction of n-, o- and c-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PLoS one* **8**, e67008 (2013).

58. Toffaletti, D. L., Rude, T. H., Johnston, S. A., Durack, D. & Perfect, J. Gene transfer in cryptococcus neoformans by use of biolistic delivery of dna. *Journal of bacteriology* **175**, 1405–1411 (1993).
59. Lev, S., Desmarini, D., Chayakulkeeree, M., Sorrell, T. C. & Djordjevic, J. T. The *crz1/sp1* transcription factor of cryptococcus neoformans is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity. *PLoS One* **7**, e51403 (2012).
60. Casadevall, A., Mukherjee, J. & Scharff, M. D. Monoclonal antibody based elisas for cryptococcal polysaccharide. *Journal of immunological methods* **154**, 27–35 (1992).
61. Fonseca, F. L. *et al.* Structural and functional properties of the trichosporon asahii glucuronoxylomannan. *Fungal Genetics and Biology* **46**, 496–505 (2009).
62. Fonseca, F. L. *et al.* Role for chitin and chitooligomers in the capsular architecture of cryptococcus neoformans. *Eukaryotic cell* **8**, 1543–1553 (2009).
63. Araújo, G. R. d. S. *et al.* Cryptococcus neoformans capsular polysaccharides form branched and complex filamentous networks viewed by high-resolution microscopy. *Journal of structural biology* **193**, 75–82 (2016).
64. Kmetzsch, L. *et al.* The vacuolar  $ca^{2+}$  exchanger *vcx1* is involved in calcineurin-dependent  $ca^{2+}$  tolerance and virulence in cryptococcus neoformans. *Eukaryotic cell* **9**, 1798–1805 (2010).
65. Kmetzsch, L. *et al.* The calcium transporter *pmc1* provides  $ca^{2+}$  tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. *FEBS Journal* **280**, 4853–4864 (2013).
66. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\Delta\Delta ct}$  method. *methods* **25**, 402–408 (2001).

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). The authors thank Dr. Joseph Heitman for providing pJAF15 plasmid, Dr. Arturo Casadevall for providing the monoclonal antibody anti-GXM (18B7), Dr. Wieland Meyer for providing *C. gattii* R265 and Dr. Jorge Horta for performed the ELISA with patients sera. We also thank the Electron Microscopy Center of the Federal University of Rio Grande do Sul (CME, UFRGS) for the Confocal and Scanning Electron Microscopy analysis, as well as Henrique Biehl and Diego Muszinski for technical assistance.

## Author informations

### Affiliations

**Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 43421, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil:** Júlia Catarina Vieira Reuwsaat, Heryk Motta de Souza, Carolina Bettker Vasconcelos, Bárbara Machado Marques, Ane Wichine Acosta Garcia, Francine Melise dos Santos, Alcía Corbellini Piffer, William Lopes, Vanessa Barcellos, Eamim Squizani, Augusto Schrank, Charley Christian Staats, Marilene Henning Vainstein and Lívía Kmetzsch. **Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul:** Augusto Schrank, Charley Christian Staats, Marilene Henning Vainstein and Lívía Kmetzsch. **Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul:** Júlia Catarina Vieira Reuwsaat, Ane Wichine Acosta Garcia, Francine Melise dos Santos, Alcía Corbellini Piffer, Vanessa Barcellos, Eamim Squizani, Augusto Schrank, Charley Christian Staats, Marilene Henning Vainstein and Lívía Kmetzsch.

### Contributions

Conceived and designed the experiments: J.C.V.R., C.C.S., M.H.V. and L.K.; Performed the experiments: J.C.V.R., H.M.S., C.B.V., B.M.M., A.W.A.G., F.M.S., A.C.P., W.L., V.B. and E.S.; Analyzed the data: J.C.V.R., C.C.S., M.H.V. and L.K.; Contributed reagents and materials: A.S., C.C.S., M.H.V. and L.K.; Wrote the paper: J.C.V.R., C.C.S. and L.K.

### Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

### Corresponding author

Correspondence to Lívía Kmetzsch.

## Supplementary information

PDF file

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table S1. *C. gattii* predicted mannoproteins**

<i>C. gattii</i> predicted mannoproteins <sup>A</sup>	Annotation	Domain prediction <sup>B</sup>	Coverage/Identity <sup>C</sup>
<b>CNBG_4278</b>	Hypothetical	Galactose oxidase	-
<b>CNBG_0310</b>	Hypothetical	None	NSSF <sup>D</sup>
<b>CNBG_0972</b>	Hypothetical	None	67/27
<b>CNBG_1017</b>	Endopeptidase	Aspartic peptidase A1	25/35
<b>CNBG_1499</b>	Glyoxal oxidase	Galactose/glyoxal oxidase	47/25
<b>CNBG_1575</b>	Hypothetical	None	7/24
<b>CNBG_2381</b>	Hypothetical	None	7/36
<b>CNBG_2705</b>	Hypothetical	Kre9/Knh1 family	10/42
<b>CNBG_3416</b>	Hypothetical	None	8/35
<b>CNBG_4403</b>	Endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase	Glucanase	NSSF
<b>CNBG_4430</b>	Hypothetical	None	2/50
<b>CNBG_4538</b>	Hypothetical	CFEM domain	3/42
<b>CNBG_4742<sup>I</sup></b>	Glycoprotein	None	3/53
<b>CNBG_4814</b>	Hypothetical	Glycoside hydrolase/ $\beta$ -glucuronidase	3/36
<b>CNBG_5038</b>	Hypothetical	Kre9/Knh1 family	11/33
<b>CNBG_5182</b>	Glyoxal oxidase	Galactose/glyoxal oxidase	42/32
<b>CNBG_5209</b>	Hypothetical	None	NSSF
<b>CNBG_5294</b>	Hypothetical	None	21/33
<b>CNBG_5804</b>	Endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase	Glucanase/glycoside hydrolase	12/43
<b>CNBG_6180</b>	Hypothetical	Kre9/Knh1 family	4/40
<b>CNBG_0181</b>	Hypothetical	None	5/38
<b>CNBG_0228</b>	Glucan-1,3- $\beta$ -glucosidase	Glycoside hydrolase	10/50
<b>CNBG_0269</b>	Hypothetical	None	8/45
<b>CNBG_0806</b>	Chitin deacetylase (CDA3) MP84 <sup>49,27</sup>	Glycoside hydrolase/deacetylase	9/38
<b>CNBG_1576</b>	Hypothetical	None	NSSF
<b>CNBG_1672</b>	Endopeptidase	Aspartic peptidase A1	16/36
<b>CNBG_2366</b>	Hypothetical	Kre9/Knh1 family	4/37
<b>CNBG_5735</b>	Hypothetical	None	10/25
<b>CNBG_9064</b>	Chitin deacetylase 2 (CDA2) MP98 <sup>11,27</sup>	Glycoside hydrolase/deacetylase	16/50
<b>CNBG_2946</b>	Nuclear protein	Phosphatidylethanolamide-binding protein	27/34
<b>CNBG_9160<sup>II</sup></b>	Hypothetical	None	8/32
<b>CNBG_0840</b>	Hypothetical	None	15/69
<b>CNBG_2759</b>	Glycosyl hydrolase	Class I glutamine amidotransferase-like/ThuA-like	27/34



<b>CNBG_5802</b>	Hypothetical	ConA-like lectin/Glucanase/Glycoside hydrolase family 16	3/47
<b>CNBG_5332</b>	$\alpha$ -amylase	Glycoside hydrolase	38/23
<b>CNBG_5392</b>	Hypothetical	None	NSSF

<sup>A</sup> FungiDB codes

<sup>B</sup> InterProscan

<sup>C</sup> Sequence coverage (%) / sequence identity (%) in relation to *CNBG\_4278* sequence

<sup>D</sup> No significant similarity found (NSSF)

<sup>I</sup>The ortholog in *C. neoformans* (CNAG\_0600) does not have GPI anchor.

<sup>II</sup>The ortholog in *C. neoformans* (CNAG\_05915) does not have GPI anchor

**Table S2. *C. neoformans* predicted mannoproteins**

<i>C. neoformans</i> predicted mannoproteins <sup>A</sup>	Annotation	Domain prediction <sup>B</sup>	Orthology <sup>A</sup>
<b>CNAG_05595</b>	Hypothetical	Galactose oxidase	CNBG_4278
<b>CNAG_00261</b>	Hypothetical	None	CNBG_0310
<b>CNAG_00373</b>	Glucan-1,3- $\beta$ -glucosidase	Glycoside hydrolase	CNBG_0228
<b>CNAG_00407</b>	Glyoxal oxidase	Galactose/glyoxal oxidase	CNBG_1499
<b>CNAG_00776<sup>I</sup></b>	MP88 <sup>25</sup>	None	CNBG_1155
<b>CNAG_01239</b>	Chitin deacetylase ( <i>CDA3</i> ) MP84 <sup>49,27</sup>	Glycoside hydrolase/deacetylase	CNBG_0806
<b>CNAG_01272</b>	Hypothetical	None	CNBG_0840
<b>CNAG_01986<sup>II</sup></b>	Hypothetical	None	CNBG_2966
<b>CNAG_02030</b>	Glyoxal oxidase	Galactose/glyoxal oxidase	CNBG_5182
<b>CNAG_02060</b>	Hypothetical	None	CNBG_5209
<b>CNAG_02146</b>	Hypothetical	Fas1 domain	CNBG_5294
<b>CNAG_02189</b>	$\alpha$ -amylase	Glycoside hydrolase	CNBG_5332
<b>CNAG_02775</b>	Hypothetical	None	-
<b>CNAG_03223</b>	Hypothetical	Kre9/Knh1 family	CNBG_2366
<b>CNAG_03857</b>	Hypothetical	None	CNBG_1575
<b>CNAG_03858</b>	Hypothetical	None	CNBG_1576
<b>CNAG_04291</b>	Glycosyl hydrolase	Class I glutamine amido- transferase-like/ThuA-like	CNBG_2759
<b>CNAG_04357</b>	Hypothetical	Kre9/Knh1 family	CNBG_2705
<b>CNAG_04635</b>	Endopeptidase	Aspartic peptidase A1	CNBG_1017
<b>CNAG_04874</b>	Hypothetical	ConA-like lectin/Glucanase/Glycoside hydrolase family 16	CNBG_5802
<b>CNAG_05156</b>	Hypothetical	CFEM domain	CNBG_4538
<b>CNAG_05424</b>	Hypothetical	None	CNBG_4430
<b>CNAG_05458</b>	Endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase	ConA-like lectin/Glucanase/Glycoside hydrolase family 16	CNBG_4403
<b>CNAG_05799<sup>III</sup></b>	Chitin deacetylase ( <i>CDA1</i> ) <sup>27</sup>	Glycoside hydrolase/deacetylase	CNBG_1745
<b>CNAG_06422</b>	Hypothetical	Kre9/Knh1 family	CNBG_5038
<b>CNAG_06501<sup>IV</sup></b>	1,3- $\beta$ - glucanosyltransferase	Glucanosyltransferase/ glycoside hydrolase/X8-like	CNBG_4970
<b>CNAG_06795</b>	Hypothetical	Kre9/Knh1 family	CNBG_6180
<b>CNAG_07856</b>	Hypothetical	Quinoprotein alcohol dehydrogenase-like	CNBG_0972
<b>CNAG_00301</b>	Hypothetical	None	CNBG_0269
<b>CNAG_01230</b>	Chitin deacetylase 2 ( <i>CDA2</i> ) MP98 <sup>11,27</sup>	Glycoside hydrolase/deacetylase	CNBG_9064
<b>CNAG_02759</b>	Hypothetical	None	CNBG_3416
<b>CNAG_03204</b>	Hypothetical	None	CNBG_2381
<b>CNAG_03782</b>	Hypothetical	None	CNBG_0181
<b>CNAG_04091</b>	Hypothetical	None	CNBG_5392
<b>CNAG_04506</b>	Hypothetical	None	-

<b>CNAG_04876</b>	Endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase	ConA-like lectin/Glucanase/Glycoside hydrolase family 16	CNBG_5804
<b>CNAG_05278</b>	Hypothetical	None	-
<b>CNAG_05312</b>	Hypothetical	None	CNBG_5735
<b>CNAG_06396</b>	Hypothetical	None	-
<b>CNAG_02008</b>	Nuclear protein	Phosphatidylethanolamide- binding protein	CNBG_2946
<b>CNAG_07784</b>	Hypothetical	None	-
<b>CNAG_06104</b>	Hypothetical	Glycoside hydrolase/ $\beta$ - glucuronidase	CNBG_4814
<b>CNAG_05872</b>	Endopeptidase	Aspartic peptidase A1	CNBG_1672

<sup>A</sup> FungiDB codes

<sup>B</sup> InterProscan

<sup>I</sup>The ortholog in *C. gattii* (CNBG\_1155) does not have signal peptide

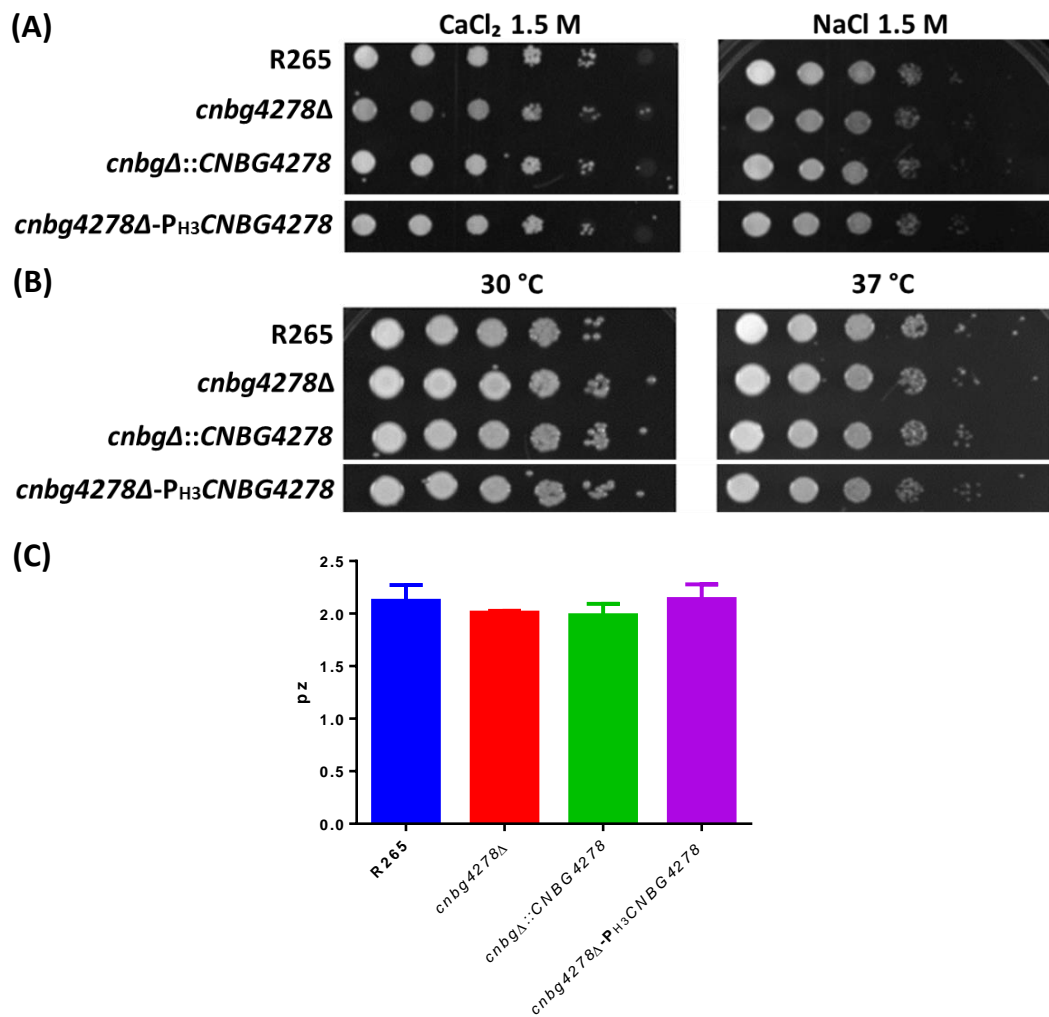
<sup>II</sup>The ortholog in *C. gattii* (CNBG\_2966) does not have both signal peptide and GPI anchor

<sup>III</sup>The ortholog in *C. gattii* (CNBG\_1745) does not have signal peptide

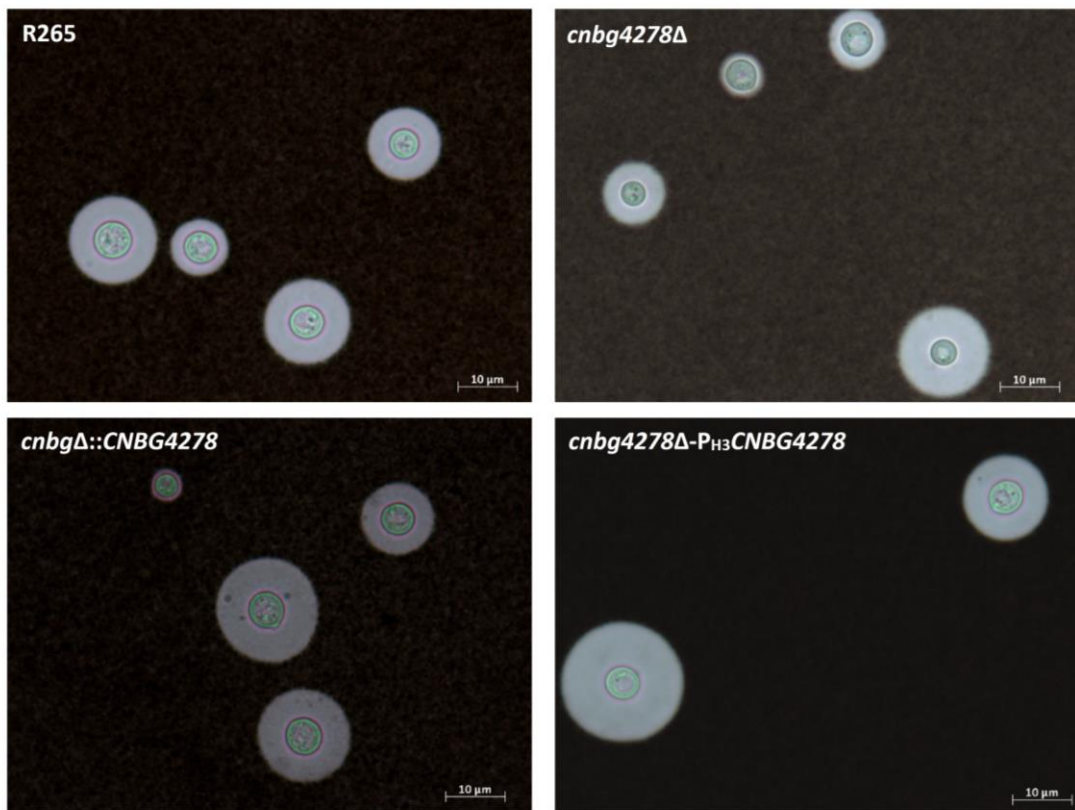
<sup>IV</sup>The ortholog in *C. gattii* (CNBG\_4970) does not have GPI anchor

**Table S3: Primers used in the present work**

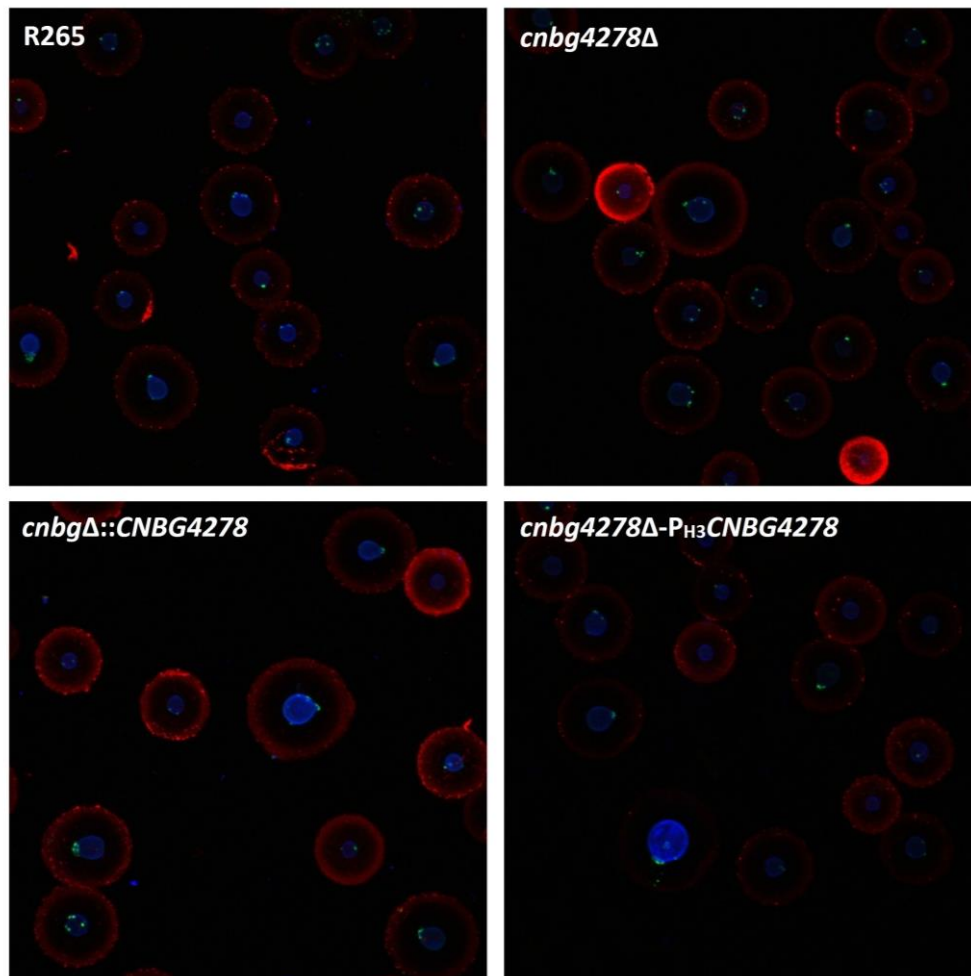
<b>Primer</b>	<b>Sequence (5' - 3')</b>
<b>DEL5 F</b>	AAAATAGGGATAACAGGGTAATACTCGGCGTTAACGGCATGG
<b>DEL5 R</b>	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATCTGTCTGGGACCA ATGACGTA
<b>DEL3 F</b>	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATACGTCTCAAGAC AAAGCTG
<b>DEL3 R</b>	AAAAATTACCCTGTTATCCCTATGAGAAGCCTTTTAGAGCC
<b>COMP F</b>	AGAACTCACGTGGAAGACC
<b>COMP R</b>	CTGACTGAAATGATCGGTAG
<b>RT1 F</b>	GATTGGGGACAACAACACCT
<b>RT1 R</b>	GCTGCTCAAGTCGTCGTCGT
<b>RT2 F</b>	CCGCGAACAATGTTCCTTACT
<b>RT2 R</b>	TGTCTTGAGACGTAGGAGCG
<b>RT3 F</b>	ACGACTTGAGCAGCATCTAC
<b>RT3 R</b>	GGGTGAAGAATACATTGGTG
<b>RT4 F</b>	TCAAGTGACACCCTCAGATG
<b>RT4 R</b>	CACCACGAAAATGTAAGCAG
<b>H3P F</b>	GCGAATTCTGCAGATGAGCTCGGCAGATCAGAT
<b>H3P R</b>	AGCGGCGGCGGCGAGCATGGTGATAGATGTGTTGTGGT
<b>MPexp F</b>	ACCACAACACATCTATCACCATGCTCGCCGCCGCCGCT
<b>MPexp R</b>	CCAAGCTAATAAAAGCTGTTACATGAGGATACCAGCA
<b>H3T F</b>	TGCTGGTATCCTCATGTAACAGCTTTTATTAGCTTGG
<b>HT3 R</b>	GCCAGTGTGATGGATCTTGTACGCTTGATTGTTCT
<b>pET23 F</b>	AAAAGGATCCTATGCGTCCAGTTTGA CT CG
<b>pET23 R</b>	AAAAAAGCTTAGAATTGGTACTAGCAGAAGCG
<b>ACT F</b>	CGGTATCGTCACAACTGG
<b>ACT R</b>	GGAGCCTCGGTAAGAAGAAC
<b>IL-6 F</b>	ACAACCACGGCCTTCCCTACTT
<b>IL-6 R</b>	CACGTATTCACAACCACGGCCTTCCCT
<b>IL-12/23p40 F</b>	GGAAGCACGGCAGCAGAATA
<b>IL-12/23p40 R</b>	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
<b>IL-4 F</b>	CTGACGGCACAGAGCTATTGA
<b>IL-4 R</b>	TATGCGAAGCACCTTGGAAGC
<b>GAPDH F</b>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
<b>GAPDH R</b>	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA



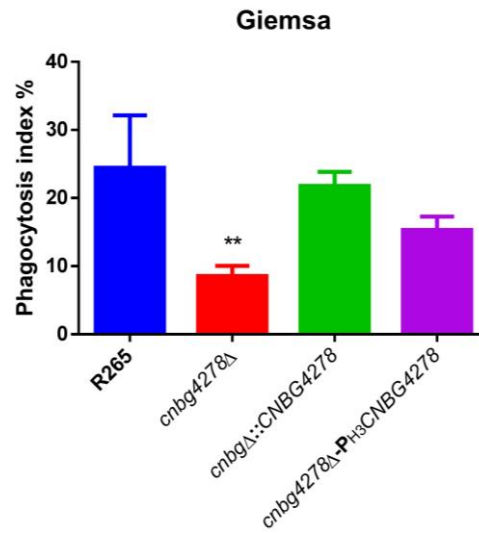
**Figure S1. Phenotypic characterization of *CNMG4278* mutants.** A. Growth test at saline conditions. Cells of all strains were serially diluted 10-fold and 3  $\mu$ L of each dilution was spotted onto YPD agar supplemented with CaCl<sub>2</sub> and NaCl, as indicated. B. Growth test at 37 °C. Cells of all strains were serially diluted 10-fold and 3  $\mu$ L of each dilution was spotted onto YPD agar and incubated at 30 and 37 °C for 48 h. C. Phospholipase test. Cells of all strains were spotted in agar containing egg yolk emulsion in a concentration of 8 %. After 96 h of incubation at 30 °C, the phospholipase activity (pz) was measured as the ratio of the colony diameter by the generated precipitation zone.



**Figure S2. *CNMG4278* disruption does not affect capsule size.** Optical microscopy with India ink. Bars indicate 10 μm.

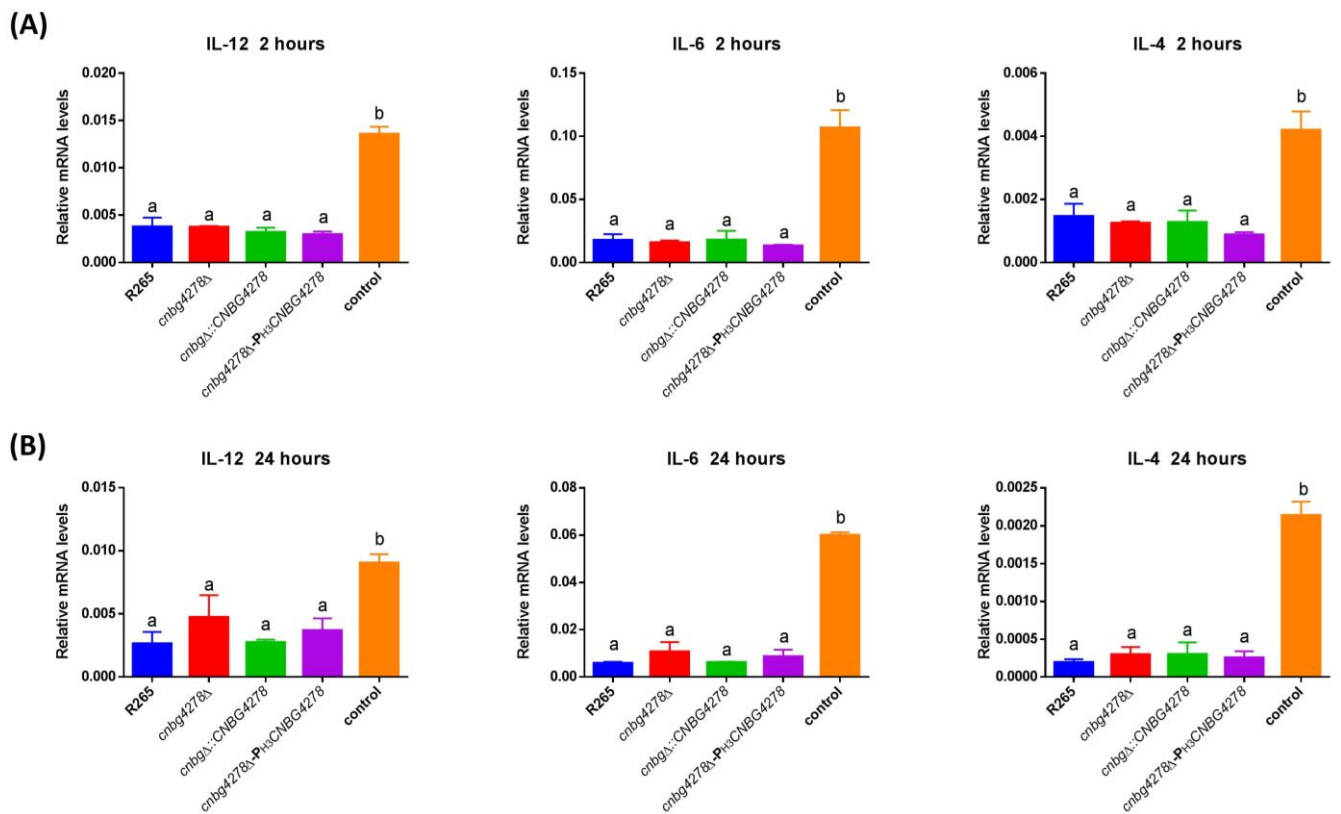


**Figure S3. Confocal microscopy of *CNMG4278* mutants.** Cells were grown in minimal medium for 48 h, fixed and labeled with calcofluor white (blue), mAb 18B7 (red) and WGA (green).

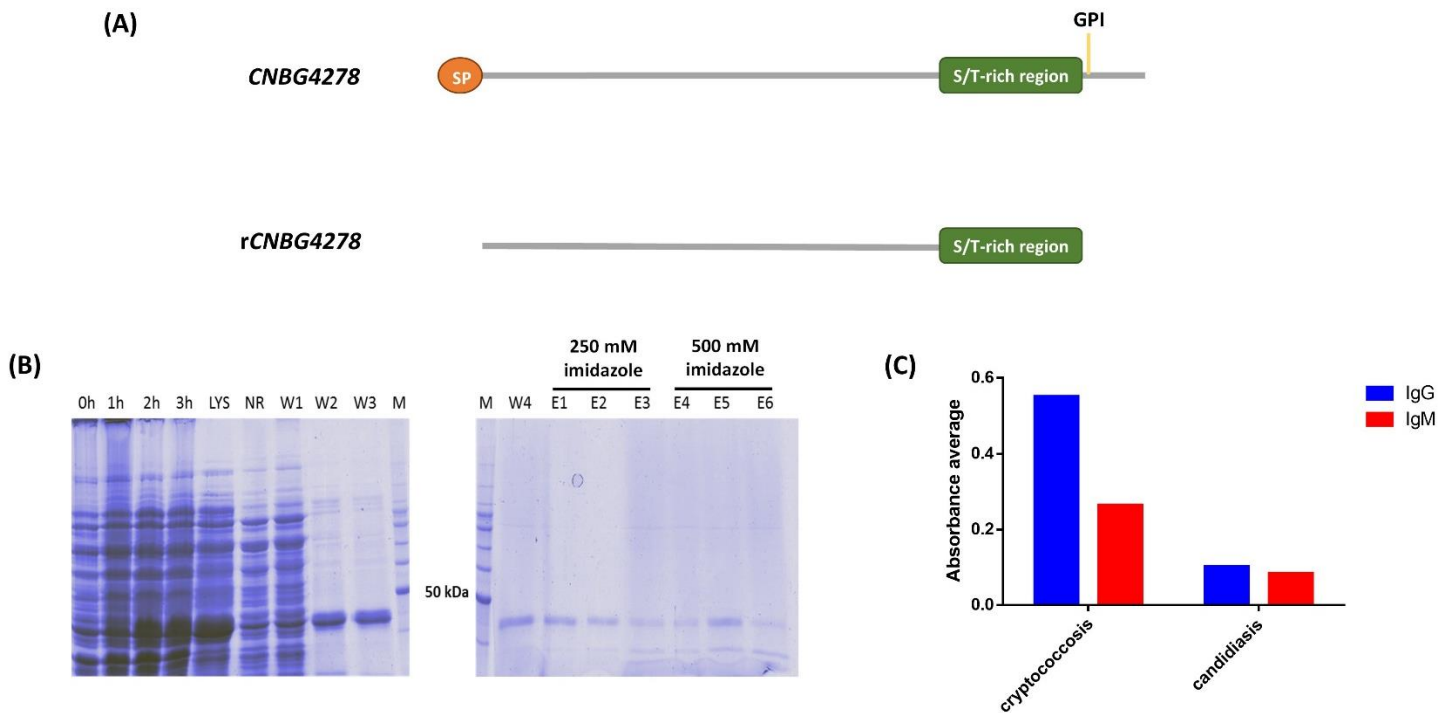


**Figure S4. Phagocytosis index of *C. gattii* mutant cells determined by Giemsa staining.** After 2 h of interaction with J774.A1 macrophages, *C. gattii* cells not internalized were washed and macrophages were fixed and labeled with Giemsa. The phagocytosis index was calculated as the ratio of cryptococcal cells internalized by the number of macrophages cells.





**Figure S5. Cytokine expression profile by macrophages infected with *C. gattii* strains.** A. IL-12, IL-6 and IL-4 cytokines expression after 2 h of *C. gattii* strains interaction with J774.A1 macrophages. B. IL-12, IL-6 and IL-4 cytokines expression after 24 h of interaction. Means with the same letter are not significantly different, as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multicomparison test.



**Figure S6. Recombinant CNBG4278 expression and purification.** A. Scheme demonstrating the modifications made in *CNMG4278* sequence for heterologous expression in *E. coli*. SP: signal peptide predicted by SignalP. S/T-rich region: region rich in the amino acids serine and threonine, predicted to be O-glycosylated by GlycoEP. GPI: GPI anchoring site, predicted by PredGPI. The first 60 and last 90 nucleotides were excluded from amplification for vector construct. *CNMG4278* codifies a predicted mannoprotein of 411 amino acids with predicted molecular mass of 43 kDa, while *rCNMG4278* codifies a protein of 361 amino acids with predicted molecular mass of 38.2 kDa. B. The expression of the recombinant mannoprotein was induced with 20 g/L lactose for 3 h. The purification was performed in a cobalt-affinity column (iMAC) with different imidazole concentrations. 0-3h: hours of interaction. LYS: cell lysate. NR: column not retained. W1 – W4: wash fractions with 20 mM imidazole. E1-E3: elution fractions with 250 mM imidazole. E4-E6: elution fractions with 500 mM imidazole. M: mass molecular marker indicated in kDa. C. ELISA. One  $\mu$ g of semi-purified *rCNMG4278* was probed with pooled sera from patients with cryptococcosis and candidiasis.

## 1. CONCLUSÕES

- 1.1. A manoproteína predita codificada pelo gene *CNBG4278* influencia a funcionalidade da parede celular, visto que o mutante nulo para o gene apresenta hipersensibilidade ao agente estressor de parede *Congo Red* e também alteração na secreção de melanina;
- 1.2. O defeito na parede celular observado nas células do mutante nulo influencia a arquitetura da cápsula de *C. gattii*, fenótipo que só pôde ser observado através de análises por MEV e que, provavelmente, está relacionado a uma falha na interação dos polissacarídeos com a parede celular, visto que o conteúdo de GXM no sobrenadante de cultivo dessas células é muito maior quando comparado ao controle;
- 1.3. A manoproteína predita não tem relação com a capacidade de crescimento a 37 °C de *C. gattii*, assim como também não influencia a atividade de fosfolipase. A deleção do gene codificador dessa manoproteína não altera a distribuição de quitina e oligômeros de quitina na superfície celular da levedura;
- 1.4. O produto gênico de *CNBG4278* influencia o reconhecimento das células de *C. gattii* por macrófagos J774.A1 e também sua sobrevivência no interior dos macrófagos, visto que mutantes que não expressam *CNBG4278* são menos reconhecidos e fagocitados nas primeiras horas de interação e se replicam mais no interior dos macrófagos *in vitro*. Porém, tanto a deleção quanto a superexpressão dessa manoproteína predita não alteram a virulência das linhagens em um modelo murino de criptococose;
- 1.5. *CNBG4278* expressa em *E. coli* é antigênica, pois a mesma é reconhecida 5 vezes mais por IgG de pacientes com criptococose do que pacientes com candidíase.

## 2. PERSPECTIVAS

- 2.1. Na tentativa de localizar a manoproteína predita codificada pelo gene *CNBG4278*, serão produzidos anticorpos policlonais em coelho contra a manoproteína recombinante e células de *C. gattii* serão marcadas e visualizadas por microscopia confocal;
- 2.2. Para avaliar uma possível alteração na distribuição de manose na superfície dos mutantes nulo e de superexpressão, células dessas linhagens serão marcadas com Concanavalina A e visualizadas por microscopia confocal;
- 2.3. Para avaliar possíveis alterações na interação dos polissacarídeos com a parede celular nas células do mutante nulo, serão realizados ensaios de interação do polissacarídeo secretado pelo mutante com células de linhagens acapsulares de *C. neoformans* seguidas de visualização por microscopia confocal;
- 2.4. Para entender o papel da manoproteína predita na alteração do fenótipo capsular e interação com o hospedeiro, tanto os polissacarídeos das linhagens mutantes ancorados à parede celular quanto os secretados serão comparados com os produzidos pela linhagem selvagem através da quantificação dos principais monômeros componentes dessas estruturas por cromatografia seguida de espectrometria de massas e pela técnica de Espalhamento de Luz (*Light Scattering*);
- 2.5. Para avaliar a imunogenicidade da manoproteína predita *CNBG4278*, serão realizados ensaios de imunização passiva em camundongos infectados com *C. gattii* R265 com os anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a manoproteína recombinante.

### 3. REFERÊNCIAS

ANGKASEKWINA, 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: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980974> >.

BAKER, L. G. *et al.* Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 5, p. 855-67, May 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400891> >.

BATES, S. *et al.* *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase, is required for glycosylation and virulence. **J Biol Chem**, v. 280, n. 24, p. 23408-15, Jun 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843378> >.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Res**, v. 16, n. 1, p. fov106, Feb 2016. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26614308> >.

BIONDO, C. *et al.* Identification of major proteins secreted by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 645-51, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696661> >.

BIONDO, C. *et al.* Characterization of two novel cryptococcal mannoproteins recognized by immune sera. **Infect Immun**, v. 73, n. 11, p. 7348-55, Nov 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239533> >.

BOSE, I. *et al.* A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 4, p. 655-63, Aug 2003. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12912884> >.

BYRNES, E. J. *et al.* Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942> >.

BYRNES, E. J. *et al.* A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002205, Sep 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909264> >.

CADIEUX, B. *et al.* The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **J Infect Dis**, v. 207, n. 8, p. 1339-47, Apr 2013. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322859> >.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 354-8, Aug 2000. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972493> >.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 7, p. 4912-9, Jul 1994. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8007987> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18532984> >.

CHEN, S. C. *et al.* Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 6, p. 789-98, Sep 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22670042> >.

CHEN, Y. L. *et al.* Convergent Evolution of Calcineurin Pathway Roles in Thermotolerance and Virulence in *Candida glabrata*. **G3 (Bethesda)**, v. 2, n. 6, p. 675-91, Jun 2012. ISSN 2160-1836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690377> >.

CHEN, Y. L. *et al.* Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*. **G3 (Bethesda)**, v. 3, n. 3, p. 527-39, Mar 2013. ISSN 2160-1836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450261> >.

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> >.

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: < <http://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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581388> >.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica (Cairo)**, v. 2013, p. 675213, 2013. ISSN 2090-908X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278784> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123698> >.

D'SOUZA, C. A. *et al.* Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 9, p. 3179-91, May 2001. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287622> >.

D'SOUZA, C. A. *et al.* Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. **MBio**, v. 2, n. 1, p. e00342-10, 2011. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304167> >.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; MARR, K. A. *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2009, p. 176532, 2009. ISSN 1687-708X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19266091> >.

DELEON-RODRIGUEZ, C. M.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: Tripping on Acid in the Phagolysosome. **Front Microbiol**, v. 7, p. 164, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925039> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115750> >.

DOERING, T. L. 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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575556> >.

DONLIN, M. J. *et al.* Cross talk between the cell wall integrity and cyclic AMP/protein kinase A pathways in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 5, n. 4, 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118241> >.

EIGENHEER, R. A. *et al.* Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 7, n. 4, p. 499-510, Jun 2007. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17233760> >.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 163-76, Mar 2016. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853116> >.

FONSECA, F. L. *et al.* Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. **Infect Immun**, v. 78, n. 9, p. 3861-70, Sep 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547742> >.

FRASES, S. *et al.* Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 4, p. 1228-33, Jan 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164571> >.

FREE, S. J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Adv Genet**, v. 81, p. 33-82, 2013. ISSN 0065-2660. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23419716> >.

FRIEMAN, M. B.; MCCAFFERY, J. M.; CORMACK, B. P. Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. **Mol Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 479-92, Oct 2002. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406223> >.

GALANIS, E.; MACDOUGALL, L. 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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113555> >.

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 64, n. 2, p. 147-61, Mar 2012. ISSN 1574-695X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029633> >.

GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Mol Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 13-24, Apr 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15049807> >.



GEDDES, J. M. *et al.* Secretome profiling of *Cryptococcus neoformans* reveals regulation of a subset of virulence-associated proteins and potential biomarkers by protein kinase A. **BMC Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 206, 2015. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453029> >.

HAGEN, F. *et al.* Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71148, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940707> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016503> >.

HEISS, C. *et al.* The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains beta-D-glucuronic acid. **Carbohydr Res**, v. 344, n. 7, p. 915-20, May 2009. ISSN 1873-426X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345342> >.

HERELD, D. *et al.* A phospholipase C from *Trypanosoma brucei* which selectively cleaves the glycolipid on the variant surface glycoprotein. **J Biol Chem**, v. 261, n. 29, p. 13813-9, Oct 1986. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3759991> >.

HERRING, A. C. *et al.* Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 6, p. 2959-64, Jun 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010985> >.

HOAG, K. A. *et al.* IL-12 and IFN-gamma are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 17, n. 6, p. 733-9, Dec 1997. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409560> >.

HUANG, C. *et al.* Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-Cell responses. **Infect Immun**, v. 70, n. 10, p. 5485-93, Oct 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228274> >.

HUFFNAGLE, G. B. *et al.* The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. **J Leukoc Biol**, v. 55, n. 1, p. 35-42, Jan 1994. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7904293> >.

HUSAIN, S.; WAGENER, M. M.; SINGH, N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 375-81, 2001 May-Jun 2001. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11384512> >.

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> >.

JACOBSON, E. S.; IKEDA, R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. **Med Mycol**, v. 43, n. 4, p. 327-33, Jun 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110778> >.

JIN, C. Protein Glycosylation in *Aspergillus fumigatus* Is Essential for Cell Wall Synthesis and Serves as a Promising Model of Multicellular Eukaryotic Development. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 654251, 2012. ISSN 1687-9198. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21977037> >.

KAWAKAMI, K. *et al.* T cell-dependent activation of macrophages and enhancement of their phagocytic activity in the lungs of mice inoculated with heat-killed *Cryptococcus neoformans*: involvement of IFN-gamma and its protective effect against cryptococcal infection. **Microbiol Immunol**, v. 39, n. 2, p. 135-43, 1995. ISSN 0385-5600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783686> >.

KOGUCHI, Y.; KAWAKAMI, K. Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. **Int Rev Immunol**, v. 21, n. 4-5, p. 423-38, 2002 Jul-Oct 2002. ISSN 0883-0185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486822> >.

KOLLÁR, R. *et al.* Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. **J Biol Chem**, v. 272, n. 28, p. 17762-75, Jul 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211929> >.

KRAUS, P. R. *et al.* Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249-60, Oct 2004. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470254> >.

KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274> >.

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

LAM, J. S. *et al.* A model vaccine exploiting fungal mannosylation to increase antigen immunogenicity. **J Immunol**, v. 175, n. 11, p. 7496-503, Dec 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301657> >.

LATOUCHE, G. N.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **FEMS Yeast Res**, v. 2, n. 4, p. 551-61, Dec 2002. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702271> >.

LEVITZ, S. M. *et al.* Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10422-7, Aug 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504924> >.

LEVITZ, S. M.; SPECHT, C. A. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 513-24, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696647> >.

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> >.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245939> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21291588> >.

MANSOUR, M. K.; SCHLESINGER, L. S.; LEVITZ, S. M. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. **J Immunol**, v. 168, n. 6, p. 2872-9, Mar 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884457> >.

MCFADDEN, D. C.; DE JESUS, M.; CASADEVALL, A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule

construction. **J Biol Chem**, v. 281, n. 4, p. 1868-75, Jan 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278213> >.

MCQUISTON, T. J.; WILLIAMSON, P. R. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. **J Infect Chemother**, v. 18, n. 1, p. 1-9, Feb 2012. ISSN 1437-7780. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045161> >.

MISSALL, T. A. *et al.* Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 1, p. 202-8, Jan 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643075> >.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468> >.

MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 537-42, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696649> >.

MOYRAND, F.; FONTAINE, T.; JANBON, G. Systematic capsule gene disruption reveals the central role of galactose metabolism on *Cryptococcus neoformans* virulence. **Mol Microbiol**, v. 64, n. 3, p. 771-81, May 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462022> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911623> >.

NGAMSKULRUNGROJ, P. *et al.* The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570277> >.

NGAMSKULRUNGROJ, P. *et al.* Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5862, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517012> >.

NGAMSKULRUNGROJ, P. *et al.* **B.** The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4584-96, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651856> >.

NIMRICHTER, L. *et al.* Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7860-8, Dec 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16299276> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573547> >.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 3, p. 387-408, Jul 2012. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763631> >.

OKABAYASHI, K. *et al.* Expression of capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 160, n. 1, p. 1-7, Aug 2005. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160761> >.

OLIVEIRA, D. L. *et al.* Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infect Immun**, v. 78, n. 4, p. 1601-9, Apr 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145096> >.

OSTERHOLZER, J. J. *et al.* Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **Am J Pathol**, v. 174, n. 3, p. 932-43, Mar 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19218345> >.

PARK, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PERES DA SILVA, R. *et al.* Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. **Sci Rep**, v. 5, p. 7763, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586039> >.

PERFECT, J. R. The triple threat of cryptococcosis: it's the body site, the strain, and/or the host. **MBio**, v. 3, n. 4, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782526> >.

PERFECT, J. R. *et al.* *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 79-86, 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988495> >.

PERICOLINI, E. *et al.* *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 267-75, Feb 2006. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441437> >.

PHILLIPS, P. *et al.* Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. **Clin Infect Dis**, v. 60, n. 9, p. 1368-76, May 2015. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632012> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881> >.

REESE, A. J.; DOERING, T. L. Cell wall alpha-1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Mol Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 1401-9, Nov 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622425> >.

RHOME, R. *et al.* Biosynthesis and immunogenicity of glucosylceramide in *Cryptococcus neoformans* and other human pathogens. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 10, p. 1715-26, Oct 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693597> >.

RODRIGUES, M. L. *et al.* **A.** Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggests an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 4, p. 602-9, Apr 2008. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039942> >.

RODRIGUES, M. L. *et al.* **B.** 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039940> >.

RODRIGUES, M. L. *et al.* 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114598> >.

ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3410-2, May 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292764> >.

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> >.

SAKAGUCHI, N. *et al.* Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. **Mycopathologia**, v. 121, n. 3, p. 133-41, Mar 1993. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8474529> >.

SANTANGELO, R. *et al.* Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2229-39, Apr 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039347> >.

SCHMIEL, D. H.; MILLER, V. L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes Infect**, v. 1, n. 13, p. 1103-12, Nov 1999. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572314> >.

SIAFAKAS, A. R. *et al.* Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 3, p. 488-98, Mar 2006. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524904> >.

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. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol**, v. 39, n. 2, p. 155-68, Apr 2001. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11346263> >.

SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. Recent advances in management of cryptococcal meningitis: commentary. **F1000 Med Rep**, v. 2, p. 82, 2010. ISSN 1757-5931. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21170376> >.

SPECHT, C. A. *et al.* Contribution of glycosylation to T cell responses stimulated by recombinant *Cryptococcus neoformans* mannoprotein. **J Infect Dis**, v. 196, n. 5, p. 796-800, Sep 2007. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674324> >.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 28-34; discussion 35-6, Jul 1995. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7578756> >.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742090> >.

TEIXEIRA, P. A. *et al.* Mannoprotein MP84 mediates the adhesion of *Cryptococcus neoformans* to epithelial lung cells. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, p. 106, 2014. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25191644> >.

URAI, M. *et al.* Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 101, 2015. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779451> >.

VARTIVARIAN, S. E. *et al.* Localization of mannoprotein in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 171, n. 12, p. 6850-2, Dec 1989. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2687257> >.

VECCHIARELLI, A. *et al.* Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. **Infect Immun**, v. 63, n. 8, p. 2919-23, Aug 1995. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622213> >.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect Immun**, v. 63, n. 8, p. 3131-6, Aug 1995. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622240> >.

WICKES, B. L. The role of mating type and morphology in *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Int J Med Microbiol**, v. 292, n. 5-6, p. 313-29, Oct 2002. ISSN 1438-4221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452279> >.



WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **J Bacteriol**, v. 176, n. 3, p. 656-64, Feb 1994. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300520> >.

WILLIAMSON, P. R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 180, n. 6, p. 1570-2, Mar 1998. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9515929> >.

WOLF, J. M. *et al.* Interaction of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles with the cell wall. **Eukaryot Cell**, v. 13, n. 12, p. 1484-93, Dec 2014. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906412> >.

WORMLEY, F. L. *et al.* Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. **Infect Immun**, v. 75, n. 3, p. 1453-62, Mar 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210668> >.

WOZNIAK, K. L. *et al.* Induction of protective immunity against cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 387-94, Jun 2012. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143898> >.

WRIGHT, L. C. *et al.* Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Biochem J**, v. 384, n. Pt 2, p. 377-84, Dec 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320865> >.

XUE, C. *et al.* The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell Host Microbe**, v. 1, n. 4, p. 263-73, Jun 2007. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005707> >.

YAUCH, L. E.; LAM, J. S.; LEVITZ, S. M. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 11, p. e120, Nov 2006. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096589> >.

YONEDA, A.; DOERING, T. L. A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 12, p. 5131-40, Dec 2006. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17021252> >.

ZARAGOZA, O. *et al.* The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426855> >.

ZARAGOZA, O. *et al.* 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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359319> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893050> >.

ZHU, X. *et al.* Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5589-96, Sep 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500433> >.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 1, p. 1-10, Oct 2004. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381117> >.