

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Lara Mees dos Santos

**Avaliação da influência do transporte de cálcio na integridade da parede celular em
*Cryptococcus neoformans***

Porto Alegre

2018

Lara Mees dos Santos

Avaliação da influência do transporte de cálcio na integridade da parede celular em
Cryptococcus neoformans

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de habilitação: Biologia Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Co-orientadora: Bárbara Machado Marques

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Lara Mees

Avaliação da influência do transporte de cálcio na integridade da parede celular em *Cryptococcus neoformans* / Lara Mees dos Santos. -- 2018.

44 f.

Orientadora: Livia Kmetzsch Rosa e Silva.

Coorientadora: Bárbara Machado Marques.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Cálcio. 3. PMC1. 4. Quitinase. 5. Quitina sintase. I. Rosa e Silva, Livia Kmetzsch, orient. II. Marques, Bárbara Machado, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lara Mees dos Santos

Avaliação da influência do transporte de cálcio na integridade da parede celular em *Cryptococcus neoformans*

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Ane Wichine Garcia – UFRGS

Paloma Koprovski Menguer – UFRGS

Lívia Kmetzsch Rosa e Silva - UFRGS

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada responsável pelo estabelecimento da criptococose, infecção que acomete indivíduos imunocomprometidos, principalmente. Considerando a importância do armazenamento intracelular de cálcio mediado por transportadores na virulência de *C. neoformans*, é importante elucidar os mecanismos celulares que afetam o metabolismo do cálcio. Este estudo busca avaliar o efeito da deleção do gene *PMCI* na integridade da parede celular. As linhagens selvagem H99 e mutante *pmc1* foram avaliadas quanto ao seu crescimento em presença de três clássicos estressores de parede celular: Congo red, caspofungina e Calcofluor white. Os níveis de expressão dos genes codificadores de quitina sintases e quitinases também foram avaliados, no intuito de elucidar uma correlação entre os fenótipos observados e o padrão de expressão destes alvos. Observamos um fenótipo de tolerância das células do mutante *pmc1* na presença de Congo red. Além disto, o gene codificador de quitina sintase *Chs6 (CHS6)* apresentou aumento significativo de expressão em células do mutante *pmc1* quando comparado com a linhagem selvagem H99. Já os genes codificadores das quitinases *Chi2 (CHI2)* e *Chi22 (CHI22)* apresentaram diminuição significativa na expressão em células do mutante *pmc1*. Estes dados sugerem que o transportador de cálcio *Pmc1* pode estar envolvido com a regulação da integridade da parede celular e que altos níveis de cálcio intracelular, em decorrência da deleção do gene *PMCI*, levam à uma alteração no padrão de expressão de genes relacionados com a síntese e degradação da quitina.

Palavras-chave: *C. neoformans*, *PMCI*, quitina, quitina sintase, quitinase, Congo Red.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast responsible for cryptococcosis, an infection that mainly affects immunocompromised individuals. Considering the importance of intracellular calcium transport in *C. neoformans* virulence, it is important to elucidate the cellular mechanisms that affect calcium metabolism. This study aims to evaluate the effect of deletion of the *PMCI* gene on cell wall integrity. The wild-type H99 and *pmc1* mutant strains were evaluated for their growth in the presence of three classical cell wall stressors: Congo red, caspofungin and Calcofluor white. The expression levels of the genes encoding chitin synthases and chitinases were also evaluated in order to elucidate a correlation between the observed phenotypes and the expression pattern of these targets. We observed a resistance phenotype of the *pmc1* mutant cells in the presence of Congo red. In addition, the gene encoding Chs6 chitin synthase (*CHS6*) showed increased expression in cells of the *pmc1* mutant when compared to wild-type H99 strain. However, the genes encoding the chitinases Chi2 (*CHI2*) and Chi22 (*CHI22*) showed a significant decrease in expression in *pmc1* mutant cells. These data suggest that the calcium transporter Pmc1 may be involved in the regulation of cell wall integrity and that high levels of intracellular calcium, due to deletion of the *PMCI* gene, lead to a change in the expression pattern of genes related to the synthesis and degradation of chitin.

Keywords: *C. neoformans*, *PMCI*, chitin, chitin synthase, chitinase, Congo Red.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. ARTIGO CIENTÍFICO	11
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
6. ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BMC MICROBIOLOGY	35

1. INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada, agente etiológico da meningite criptocócica, infecção fúngica que mais acomete o sistema nervoso central, sendo um dos mais importantes patógenos causadores de infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos. A rota de infecção em humanos acontece por meio da inalação de células dessecadas ou esporos provenientes do meio ambiente, sendo encontrado principalmente nas fezes de pombos. Quando as células de *C. neoformans* alcançam os alvéolos, colonizam o tecido pulmonar por interação com macrófagos alveolares ou internalização por células epiteliais. Dependendo da resposta imune do hospedeiro, podendo ser eliminadas ou promoverem uma infecção latente assintomática. Quando em pacientes imunocomprometidos, a infecção pode ser sintomática, causando nódulos e inflamação pulmonar, podendo ainda ocorrer disseminação para outros órgãos e tecidos, incluindo o tecido cerebral. As células de *C. neoformans* necessitam ultrapassar a barreira hematoencefálica para que possam causar a meningite criptocócica (Kwon-Chung *et al.*, 2014; Perfect, 2014; Sabiiti e May, 2012; Srikanta *et al.*, 2014). Há distintos mecanismos responsáveis por este processo, incluindo o denominado Cavalo de Troia, onde as células de *C. neoformans* parasitam monócitos e/ou macrófagos, sendo transportadas através da barreira até o cérebro. Pode ocorrer também interação com células endoteliais microvasculares, resultando em transcitose através da barreira. Os sintomas principais da doença são cefaleia, febre, estado mental alterado, indisposição e pressão intracraniana elevada, sendo esta a principal complicação. *C. neoformans* desenvolveu mecanismos para evadir a resposta imune e promover a sua sobrevivência no hospedeiro (Tseng *et al.*, 2015). O principal fator de virulência neste modelo é a expressão da cápsula polissacarídica, a qual é relacionada à resistência a fagocitose e modulação imune. As linhagens acapsulares tendem a ser incapazes de estabelecer a infecção. A cápsula é composta, principalmente, por dois polissacarídeos, glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) e sua montagem requer a interação com componentes da parede celular, como a α - 1,3 - glucana e moléculas de quitina (Frasés *et al.*, 2008; Grechi *et al.*, 2011; Zaragoza *et al.*, 2009).

A parede celular de *C. neoformans* é uma malha complexa composta de glucana, quitosana, proteínas glicosiladas, pigmentos e quitina. Essa estrutura é fundamental para a manutenção da morfologia e integridade celular, além de conferir rigidez, proteção contra estresse ambiental e a lise osmótica. A síntese de quitina é regulada por uma série de fatores, os quais são importantes na determinação da morfogênese e na biossíntese da parede celular

(Baker *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2009; Lenardon *et al.*, 2010; O'meara e Alspaugh, 2012). *C. neoformans* codifica oito quitina sintases, e 3 potenciais reguladores de sua expressão (Banks *et al.*, 2005; Janbon *et al.*, 2014). Além disto, diferentes vias de sinalização podem atuar na regulação na expressão destes genes, incluindo a via mediada por cálcio e calcineurina, a qual regula a integridade da parede celular em resposta a estresse (Chow *et al.*, 2017; Kozubowski *et al.*, 2009; Kraus *et al.*, 2005; Lev *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016; Thewes, 2014).

A via de sinalização mediada por calcineurina regula os níveis de cálcio intracelulares, permitindo que a célula mantenha sua homeostase. Quando os níveis de cálcio intracelular estão baixos, a calcineurina é inativada. Elevados níveis de cálcio são detectados pela proteína calmodulina, a qual ativa calcineurina, levando ao estímulo da transcrição de genes em que os produtos atuam na resposta ao estresse, virulência e regulação da homeostase de cálcio. A via da calcineurina em *C. neoformans* é essencial para adaptação ao hospedeiro e estabelecimento da infecção. Os níveis de cálcio são controlados por canais localizados na membrana plasmática e membranas de vacúolo ou retículo endoplasmático (Fox *et al.*, 2001; Kmetzsch *et al.*, 2013b; Kmetzsch *et al.*, 2010; Kraus *et al.*, 2005; Lev *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2016).

O transportador de cálcio Pmc1 atua na via da calcineurina como uma bomba de cálcio vacuolar e regula a homeostase do cálcio em conjunto com outros transportadores. Sua função é diminuir os níveis intracelulares de cálcio, bombeando Ca^{2+} para dentro do vacúolo. A presença do Pmc1 é necessária para a progressão da infecção e sua deleção influencia os níveis relativos de cálcio intracelular nas células de *C. neoformans*. Outros transportadores de cálcio também são afetados pela deleção do gene *PMCI*, diminuindo, assim, a carga fúngica em tecidos pulmonares em modelos murinos, e a ausência de infecção no sistema nervoso central (Kmetzsch *et al.*, 2013a; Squizani *et al.*, 2018).

Para elucidar os mecanismos de proteção a estresse de parede celular, são utilizados clássicos agentes estressores. Caspofungina é um fármaco utilizado como estressor de parede celular, pois inibe a síntese do β -(1,3)-D-glucana, um componente essencial da parede celular em fungos filamentosos e leveduras (Feldmesser *et al.*, 2000). *Calcofluor White* (CFW) e *Congo Red* (CR) são corantes que interagem com quitina e β -glucanas, respectivamente (Ram e Klis, 2006). A adição de CFW ou CR em células fúngicas resulta em mudanças morfológicas, como a incompleta separação das células na divisão, possivelmente pela inibição da ação das quitinases. A presença de altas concentrações de CFW ou CR também

pode resultar na lise celular em fungos filamentosos (Ram e Klis, 2006). A resposta ao agente estressor inclui a ativação de genes codificadores de proteínas que possuem funções importantes na manutenção da integridade da parede celular, com consequente aumento da deposição de quitina na parede celular (Levin, 2011; Roncero *et al.*, 1988a; b).

A síntese e degradação da quitina, importante na manutenção da integridade e virulência das células de *C. neoformans*, é feita por enzimas específicas, denominadas quitina sintases e quitinases. As quitinases são enzima que hidrolisam as ligações $\beta(1-4)$ -glucanas em polímeros de quitina. São divididas em dois grupos, as endoquitinases e as exoquitinases. Em *C. neoformans* foram identificadas quatro endoquitinases: Chi2, Chi4, Chi21 e Chi22. Sua classificação se dá de acordo com a função específica e localização na célula. Estudos mostraram que Chi2 pode estar localizada na membrana plasmática, onde sua função é associada com a morfologia celular e remodelamento da quitina da parede celular (Baker *et al.*, 2009). As quitina sintases são proteínas que atuam na síntese de quitina, porém sua multiplicidade sugere que possuem diferentes funções. A expressão e atividade das quitina sintases está altamente ligada ao ciclo celular e também na resposta a condições de estresse. Em *C. neoformans* foram identificadas 8 quitina sintases (Chs1, Chs2, Chs3, Chs4, Chs5, Chs6, Chs7, Chs8)(Baker *et al.*, 2009; Lenardon *et al.*, 2010).

Neste contexto, dada a importância do transporte e armazenamento de cálcio em *C. neoformans*, seguido por evidências de que a via de sinalização mediada por calcineurina regula a integridade da parede celular, o presente trabalho visa avaliar a influência da deleção do transportador de cálcio Pmc1 na expressão de genes codificadores de quitina sintase e quitinase. Além disto, a correlação do padrão de expressão destes genes com o fenótipo observado para as células da linhagem mutante *pmc1* na presença de agentes estressores de parede celular foi estabelecida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da deleção do gene *PMCI* na integridade da parede celular em *C. neoformans*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar sensibilidade da linhagem selvagem H99 e mutante *pmc1* de *C. neoformans* à Calcofluor white, Congo red e caspofungina.
- Avaliar o efeito da deleção de *PMCI* na expressão dos genes codificadores de quitina sintase e quitinase em condições selecionadas.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “**Deleção do gene *PMCI* altera expressão de genes codificadores de quitina sintases e quitinases em resposta ao estresse de parede celular**” foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *BMC Microbiology* (Anexo A).

Deleção do gene *PMCI* altera expressão de genes codificadores de quitina sintases e quitinases em resposta ao estresse de parede celular

Lara Mees dos Santos^a, Bárbara Machado Marques^a e Lívia Kmetzsch^{ab*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, Avenida Bento Gonçalves 4500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

^b Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, Avenida Bento Gonçalves 4500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

Email: Lara Mees dos Santos - lara.mees@ufrgs.br; Bárbara Machado Marques - bbabimarques@hotmail.com; Lívia Kmetzsch* - liviak@cbiot.ufrgs.br

* Autor correspondente

Resumo

Introdução: *Cryptococcus neoformans* é um patógeno humano, responsável pelo desenvolvimento da criptococose, doença fúngica caracterizada por causar lesões nos pulmões, em tecidos subcutâneos, no cérebro e nas meninges. A via de sinalização mediada por calcineurina é ativada em resposta aos níveis de cálcio intracelular, estimulando a transcrição de diversos genes envolvidos em virulência, desenvolvimento a 37°C e integridade de parede celular. O transportador de cálcio Pmc1 é regulado pela via da calcineurina, e sua deleção afeta a transcrição de genes envolvidos na resposta aos estímulos estressores, e influencia a disseminação de células fúngicas para o sistema nervoso central. A quitina é o principal constituinte da parede celular e seu metabolismo é realizado por enzimas específicas, as quitina sintases e as quitinases, responsáveis, respectivamente, pela síntese e degradação da quitina.

Resultados: Células da linhagem mutante *pmc1* apresentaram fenótipo de tolerância a Congo red em comparação com a linhagem selvagem H99. Além disto, genes codificadores de quitina sintase (*CHS6*) e quitinases (*CHI2*) e (*CHI22*) apresentaram diferença significativa na expressão na linhagem *pmc1* na presença de Congo Red.

Conclusões: O transportador de cálcio Pmc1 está potencialmente envolvido na regulação da integridade da parede celular em *C. neoformans*. Altos níveis de cálcio intracelular, em decorrência da deleção do gene *PMCI*, levam à uma alteração no padrão de expressão de genes relacionados com a síntese e degradação da quitina.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, *PMCI*, quitinase, quitina sintase, Congo red

INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada agente etiológico da criptococose. Os macrófagos pulmonares são as primeiras células do hospedeiro a entrarem em contato com as células de *C. neoformans*, onde o fungo pode permanecer em estado de latência, causando uma infecção limitada nos pulmões [1]. Células fúngicas podem ser reativadas no pulmão e se disseminarem pela corrente sanguínea até outros órgãos e, quando o fungo transmigra pela barreira hematoencefálica e prolifera no parênquima cerebral, a meningite criptocócica se estabelece [2]. As infecções fúngicas oportunistas e seu controle tem emergido como um desafio para a saúde pública mundial [3-5]. *C. neoformans* é bem caracterizado por infectar indivíduos imunocomprometidos, como pacientes recebendo quimioterapia, pacientes de transplantes de órgãos recebendo terapia imunossupressora e, principalmente, portadores do vírus HIV [3, 6, 7].

Fungos patogênicos utilizam sistemas de sinalização complexos para se adaptar ao ambiente, controlando proliferação, desenvolvimento e virulência [8]. A via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina controla resposta a estresse ambiental, *mating*, frutificação monocariótica, crescimento a 37°C e virulência [9-11]. O aumento no nível de cálcio é detectado pela proteína calmodulina, que ativa a fosfatase calcineurina, subsequentemente estimulando a transcrição de diversos genes cujos produtos possibilitam que a célula mantenha a homeostase do cálcio e responda a estímulos ambientais [9, 10, 12]. Dados recentes do grupo de pesquisa estão relacionados com a caracterização de dois transportadores vacuolares de cálcio de *C. neoformans* [13-15]. Mutantes nulos para o transportador de cálcio Pmc1 foram avirulentos em modelo sistêmico de infecção em camundongos. Além disso, Pmc1 é essencial para a progressão da criptococose em modelo murino e influencia a disseminação para o Sistema Nervoso Central (SNC)[14, 15].

A quitina é o principal constituinte da parede celular dos fungos [16], atuando como componente estrutural de suporte celular. O metabolismo da quitina se divide em processos de síntese e degradação catalisadas por enzimas específicas. As enzimas quitina sintases catalisam a formação da quitina através da transferência de N-acetilglucosamina. Já as enzimas responsáveis pela degradação de quitina são as quitinases, endoglicosil-hidrolases que clivam as ligações glicosídicas da quitina, formado por unidades de N-acetil-glucosamina unidas por ligações do tipo β -[1-4]. Em fungos, as quitinases estão envolvidas em diversas funções, como digestão da parede celular, diferenciação e germinação de esporos, bem como

crescimento e autólise da hifa [17]. No genoma de *C. neoformans*, foram anotados oito genes codificantes de quitina sintases (*CHS1* a *CHS8*) e quatro quitinases: *CHI2*, *CHI4*, *CHI21* e *CHI22* [18].

A relação entre as atividades de quitina sintases, quitinases e a deleção do gene *PMCI* em *C. neoformans* surge ao relacionarmos o metabolismo do cálcio e sua interação com a parede celular, quando o desequilíbrio da homeostase pode levar a uma alteração na integridade desta estrutura. Para avaliação deste processo foram utilizados estressores como Congo red e Calcofluor white, corantes que interagem com β -glucanas e quitina, respectivamente [19]. Além disto, caspofungina, um fármaco antimicótico, atua inibindo a síntese de β -1,3-glucana [20] também foi utilizado. Visto que a deleção do gene *PMCI* em *C. neoformans* leva a um aumento dos níveis de cálcio intracelular, com consequente ativação da via da calcineurina [15], foi investigada a expressão gênica de quitina sintases e quitinases, em resposta a uma alteração na integridade da parede celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens fúngicas e condições de cultivo

Foram utilizadas as linhagens de *C. neoformans* H99 (selvagem) e o mutante *pmc1*. As células foram cultivadas em ágar YPD 1X (2 % glicose, 2 % de peptona e 1 % de extrato de levedura) e colônias isoladas foram inoculadas em YPD líquido e incubadas a 30°C por 16 h a 150 rotações por minuto (rpm) para ensaios *in vitro*.

Testes de sensibilidade a agentes estressores de parede celular

A avaliação da sensibilidade das linhagens de *C. neoformans* H99 e *pmc1* foi realizada por testes de sensibilidade em diluições seriadas. Ambas linhagens celulares foram cultivadas em meio YPD líquido, a 30°C por 16 h. As células foram lavadas em PBS e sua concentração foi ajustada para 10^7 células/ml. A suspensão de células foi diluída de forma seriada nas concentrações de 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 células/ml. Cada diluição foi inoculada no volume de 3 μ l, em uma placa de YPD suplementada com Calcofluor white (400 mg/ml, 200 mg/ml ou 100 mg/ml), caspofungina (20 μ g/ml) ou Congo red (5 mg/ml; 2,5 mg/ml ou 1,25 mg/ml). Como controle, foram utilizadas placas com meio YPD e YPD 0,5X (1% glicose, 1% de peptona e 0,5 % de extrato de levedura). As placas foram incubadas por 48 h a 30°C ou 37 °C e fotografadas.

Extração de RNA de células de *C. neoformans* das linhagens *pmc1* e H99 e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total, as linhagens H99 e *pmc1* de *C. neoformans* foram cultivadas em meio YPD por 16 h a 30°C. As células foram lavadas com PBS e inoculadas em triplicata em meio YPD 0,5X contendo ou não Congo red (30 µg/mL), em uma concentração de 10⁷ células/ml, e incubadas por 4 h a 30°C. A extração do RNA total foi realizada com Trizol (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas em *NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids* (Thermo Scientific™ NanoDrop™). Aproximadamente de 1 µg de RNA total de cada uma das amostras foi tratado com DNase (Promega). A síntese de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa ImProm-II™ (Promega), de acordo com instruções do fabricante.

Análise por qPCR da expressão de genes codificadores de quitina sintase e quitinases de *C. neoformans*

Análises da expressão de genes codificadores de quitina sintase (*CHS2*, *CHS3*, *CHS4*, *CHS5*, *CHS6* e *CHS8*) e quitinases (*CHI2*, *CHI4*, *CHI21* e *CHI22*) foram realizadas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando o sistema 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems®. O cDNA total foi utilizado como molde nas reações de qPCR. A reação foi preparada com *SYBR® Select Master Mix*, de acordo com instruções do fabricante e suplementadas com 5pmol de cada iniciador e 14 ng de cDNA. Cada condição foi analisada em triplicata. O gene da actina (CNAG_00483) foi utilizado como controle normalizador. A quantificação relativa do nível de expressão dos genes foi realizada pelo método 2^{-ΔCt} [21]. A lista de *primers* utilizados encontra-se nos materiais adicionais (Material adicional 1).

RESULTADOS

Células da linhagem *pmc1* de *C. neoformans* apresentam fenótipo de tolerância em presença do estressor de parede celular Congo red

No intuito de avaliar se a deleção do gene *PMCI* em *C. neoformans* poderia influenciar a integridade de parede celular, foram utilizados três clássicos estressores: Congo red, Calcofluor white e caspofungina. Não foi constatada alteração no crescimento da linhagem mutante *pmc1* em relação à linhagem selvagem H99 em meio contendo caspofungina e Calcofluor white nas condições testadas (Figuras 1 e 2). Em relação aos fenótipos observados na presença de Congo red, quando utilizado o meio de cultura padrão

YPD, não observamos diferença significativa de crescimento entre as linhagens testadas (Figura 3). Entretanto, em condições hipo-osmóticas (YPD 0,5X), a linhagem *pmc1* apresentou discreta tolerância na presença deste estressor a 37 °C (Figura 4).

O gene codificador de quitina sintase *Chs6* apresenta aumento significativo de expressão em condições de estresse de parede celular

Com o objetivo de investigar uma potencial relação entre a deleção de *PMCI* e alterações na integridade da parede celular, células de *C. neoformans* das linhagens H99 e *pmc1* foram cultivadas na presença de Congo red em meio YPD 0,5X, para posterior avaliação do perfil de expressão gênica de quitina sintases e quitinases nestas condições. Neste contexto, observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão do gene *CHS6* na linhagem *pmc1* (Figura 5) na presença do agente estressor. A expressão dos genes *CHS2*, *CHS3*, *CHS4*, *CHS5* e *CHS8* não foi alterada nas condições observadas (Figura 5).

No caso da análise de expressão de quitinases, foi observada diminuição significativa ($p < 0,0001$) na expressão do gene *CHI2* em células da linhagem *pmc1* em presença de Congo red em comparação com a mesma linhagem na ausência do estressor (Figura 6). Adicionalmente, o gene que codifica a quitinase *Chi22* apresentou diminuição significativa de expressão ($p < 0,05$) nas células da linhagem *pmc1* na presença de Congo red em comparação às células da mesma linhagem na ausência do estressor (Figura 6).

DISCUSSÃO

O transportador de cálcio *Pmc1* é ativado pela via da calcineurina, sendo um regulador da homeostase de cálcio. Por meio do armazenamento de cálcio nos vacúolos, ele atua na manutenção das concentrações intracelulares deste íon. A deleção do gene *PMCI* altera o processo de transmigração para o sistema nervoso central, e influencia diretamente as concentrações de cálcio citoplasmáticas em células de *C. neoformans* [15]. O presente estudo avaliou a sensibilidade de células do mutante nulo *pmc1* na presença de estressores de parede celular. Células *pmc1* expostas ao agente Congo red em condições hipo-osmóticas foram mais tolerantes em relação às células da linhagem selvagem. A condição hipo-osmótica gerada pela utilização de YPD 0,5X nestes ensaios pode influenciar as variações fenotípicas que foram observadas. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi demonstrado que esta condição induz a ativação de proteína quinase C (*Pkc1*), essencial para a manutenção da integridade da parede

celular [22]. Quando ocorre o estresse hiposmótico, a célula desencadeia mecanismos de resposta, como o aumento da expressão de genes que atuam em resposta a estresse, assim é possível que a síntese de quitina seja alterada nestas condições [8].

A parede celular das células de *C. neoformans* tem como principal componente estrutural a quitina [16, 17]. Em condições de estresse de parede celular, *C. neoformans* ativa uma resposta metabólica de adaptação ao estresse, que culmina na ativação de dois sistemas distintos de captação de cálcio: *HACS* (do inglês, *high affinity calcium influx system*) e *LACS* (do inglês, *low affinity calcium influx system*). Conseqüentemente, ocorre a ativação da via da calcineurina [23]. Foi possível detectar que a expressão de genes codificadores de quitinases e quitina sintases, importantes remodeladores da parede celular [24], foi afetada em decorrência da deleção do gene *PMCI*. Desta forma, hipotetiza-se que a ausência de *PMCI* ocasionaria um efeito compensatório nestas células quando expostas a Congo Red, com aumento de síntese de quitina, já que ocorre aumento da expressão de uma quitina sintase (*CHS6*) e diminuição da expressão de uma quitinase (*CHI22*).

O ortólogo de *CHS6* no Basidiomiceto *Ustilago maidys* está associado a caracteres morfológicos, visto que mutantes nulos para este gene apresentam menor quantidade de teliosporos, diminuída quantidade de quitina na parede celular, assim como crescimento reduzido, especialmente em condições de infecção de folhas de *Zea mays* [25]. Adicionalmente, foi demonstrado que o produto do gene *CHS6* no fungo fitopatogênico *Magnaporthe oryzae* apresenta características únicas não complementáveis por seus parálogos, já que o aumento da expressão de *CHS7* no mutante nulo para o gene *CHS6* não restaurou os defeitos de virulência e diminuição de crescimento de hifas [26]. Evidências adicionais da participação do produto de *CHS6* vem de estudos em *S. cerevisiae*, para qual foi demonstrado que, em condições de choque hiposmótico, a sobre-expressão de genes envolvidos na via de integridade celular não é suficiente para sobrepujar os defeitos de crescimento observados na ausência de *CHS6* [22]. Desta forma, é possível sugerir que *Chs6* de *C. neoformans* participa na manutenção da integridade celular em condições de choque hiposmótico.

Apesar de apresentar quatro genes codificadores de quitinases, *C. neoformans* não necessita das mesmas para o seu desenvolvimento, visto que mutantes nulos para os quatro genes não apresentam qualquer diferença de crescimento quando comparado à linhagem selvagem [27]. Adicionalmente, a atividade de quitinase detectada em desenvolvimento vegetativo de *C. neoformans* é principalmente oriunda de *Chi2* e *Chi22* [27]. Desta forma,

considerando que (i) Chi2 tem uma α -hélice em sua porção N-terminal, indicando que possa estar localizada na membrana plasmática, onde sua função seria na morfologia celular ou na remodelação da quitina na parede celular [27]; (ii) ocorre diminuição da expressão dos genes codificadores de quitinase *CHI2* e *CHI22* no mutante *pmc1* em condições de choque hiposmótico; (iii) ocorre aumento de expressão do gene codificante de quitina sintase *CHS6* no mutante *pmc1* em condições de choque hiposmótico; e (iv) o mutante *pmc1* é mais tolerante a agentes estressores de parede em condições de choque hiposmótico, é possível inferir que por intermédio da ativação da via da clacineurina ocorra um aumento de deposição de quitina na parede celular do mutante *pmc1* quando o mesmo é cultivado nas condições supracitadas.

CONCLUSÃO

Foram obtidas evidências de que Pmc1 regula o balanço da síntese/degradação de quitina em condições de estresse osmótico. Por intermédio da regulação da expressão de quitina sintases (*CHS6*) e de quitinases (*CHI2* e *CHI22*), Pmc1 medeia um controle adequado da deposição de quitina na parede celular de *C. neoformans*. Estudos adicionais são necessários para comprovar a deposição diferencial de quitina na parede celular, o que comprovaria a maior tolerância de células *pmc1* a agentes estressores de parede em condições de choque hiposmótico.

Aprovação ética e consentimento para participar

Não aplicável

Consentimento para publicação

Não aplicável

Disponibilidade de dados e materiais

Não aplicável

Interesses competitivos

A autora declara que não há nenhum interesse competitivo.

Financiamento

CAPES e CNPq.

Contribuições dos autores

LMS e BMM realizaram e analisaram todos os dados experimentais. LK projetou o estudo, analisou os dados, coordenou o estudo e revisou o manuscrito. LMS escreveu o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

As agências de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Informações dos autores

Lara Mees dos Santos é aluna de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Bárbara Machado Marques é aluna de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Cbiot, UFRGS. Lívia Kmetzsch é professora do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS.

Material adicional

Material adicional 1: Lista de *primers* utilizados neste estudo.

Material adicional 2: Lista de genes testados neste estudo.

Referências Bibliográficas

1. Zhang M, Sun D, Shi M: **Dancing cheek to cheek: *Cryptococcus neoformans* and phagocytes.** *Springerplus* 2015, **4**:410.
2. Tseng HK, Huang TY, Wu AY, Chen HH, Liu CP, Jong A: **How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier.** *Future microbiology* 2015, **10**(10):1669-1682.
3. Limper AH, Adenis A, Le T, Harrison TS: **Fungal infections in HIV/AIDS.** *Lancet Infect Dis* 2017.
4. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A: **The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management.** *Lancet Infect Dis* 2017.
5. Chang YL, Yu SJ, Heitman J, Wellington M, Chen YL: **New facets of antifungal therapy.** *Virulence* 2017, **8**(2):222-236.
6. Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozi MT, Castaneda E: **The status of cryptococcosis in Latin America.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018, **113**(7):e170554.
7. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, Denning DW, Loyse A, Boulware DR: **Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis.** *Lancet Infect Dis* 2017.
8. Kozubowski L, Lee SC, Heitman J: **Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*.** *Cell Microbiol* 2009, **11**(3):370-380.
9. Chow EW, Clancey SA, Billmyre RB, Averette AF, Granek JA, Mieczkowski P, Cardenas ME, Heitman J: **Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*.** *PLoS Genet* 2017, **13**(4):e1006667.
10. Park HS, Chow EW, Fu C, Soderblom EJ, Moseley MA, Heitman J, Cardenas ME: **Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence.** *PLoS Pathog* 2016, **12**(9):e1005873.
11. Thewes S: **Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes.** *Eukaryotic cell* 2014, **13**(6):694-705.
12. Lev S, Desmarini D, Chayakulkeeree M, Sorrell TC, Djordjevic JT: **The Crz1/Sp1 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity.** *PLoS One* 2012, **7**(12):e51403.

13. Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, de Oliveira DL, Sobrino L, Rodrigues J, Leal AL, Nimrichter L, Rodrigues ML *et al*: **The Vacuolar Ca²⁺ Exchanger Vcx1 Is Involved in Calcineurin-Dependent Ca²⁺ Tolerance and Virulence in *Cryptococcus neoformans*.** *Eukaryotic cell* 2010, **9**(11):1798-1805.
14. Squizani ED, Oliveira NK, Reuwsaat JCV, Marques BM, Lopes W, Gerber AL, de Vasconcelos ATR, Lev S, Djordjevic JT, Schrank A *et al*: **Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1.** *Cell Microbiol* 2018, **20**(2).
15. Kmetzsch L, Staats CC, Cupertino JB, Fonseca FL, Rodrigues ML, Schrank A, Vainstein MH: **The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection.** *The FEBS journal* 2013, **280**(19):4853-4864.
16. Dichtl K, Samantaray S, Wagener J: **Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi.** *Cell Microbiol* 2016, **18**(9):1228-1238.
17. Lenardon MD, Munro CA, Gow NA: **Chitin synthesis and fungal pathogenesis.** *Current opinion in microbiology* 2010, **13**(4):416-423.
18. Janbon G, Ormerod KL, Paulet D, Byrnes EJ, 3rd, Yadav V, Chatterjee G, Mullapudi N, Hon CC, Billmyre RB, Brunel F *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* 2014, **10**(4):e1004261.
19. Ram AF, Klis FM: **Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red.** *Nat Protoc* 2006, **1**(5):2253-2256.
20. Feldmesser M, Kress Y, Mednick A, Casadevall A: **The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*.** *J Infect Dis* 2000, **182**(6):1791-1795.
21. Schmittgen TD, Livak KJ: **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.** *Nat Protoc* 2008, **3**(6):1101-1108.
22. Valdivia RH, Schekman R: **The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(18):10287-10292.

23. Liu S, Hou Y, Liu W, Lu C, Wang W, Sun S: **Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets.** *Eukaryotic cell* 2015, **14**(4):324-334.
24. Bailao AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Walquiria Ines Molinari-Madlum EE, Soares Felipe MS, Soares Mendes-Giannini MJ, Martins WS, Pereira M, Maria de Almeida Soares C: **Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis.** *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2006, **8**(12-13):2686-2697.
25. Garcera-Teruel A, Xoconostle-Cazares B, Rosas-Quijano R, Ortiz L, Leon-Ramirez C, Specht CA, Sentandreu R, Ruiz-Herrera J: **Loss of virulence in *Ustilago maydis* by *Umchs6* gene disruption.** *Research in microbiology* 2004, **155**(2):87-97.
26. Kong LA, Yang J, Li GT, Qi LL, Zhang YJ, Wang CF, Zhao WS, Xu JR, Peng YL: **Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*.** *PLoS Pathog* 2012, **8**(2):e1002526.
27. Baker LG, Specht CA, Lodge JK: **Chitinases are essential for sexual development but not vegetative growth in *Cryptococcus neoformans*.** *Eukaryotic cell* 2009, **8**(11):1692-1705.

Legenda das figuras

Figura 1: A inativação de *PMCI* não altera a sensibilidade a *Calcofluor white*. Teste em diluição seriada realizado nas linhagens H99 e *pmc1* para avaliar a sensibilidade a *Calcofluor white* das células em meio com YPD em diferentes concentrações e cultivadas em temperaturas de (A) 30°C e (B) 37°C por 48 h.

Figura 2: A ausência de *PMCI* não altera a sensibilidade a Caspofungina. Teste em diluição seriada realizado nas linhagens H99 e *pmc1* para avaliar a sensibilidade a caspofungina das células em meio YPD na concentração de 20 µg/ml cultivados em temperaturas de (A) 30°C e (B) 37°C por 48h.

Figura 3: *Pmc1* não influencia na sensibilidade a *Congo red* em condições de ausência de estresse osmótico. Teste em diluição seriada realizado nas linhagens H99 e *pmc1* para avaliar a sensibilidade a *Congo red* das células em meio YPD nas concentrações de 5 mg/ml, 2,5 mg/ml e 1,25mg/ml cultivados em temperaturas de (A) 30°C e (B) 37°C por 48h.

Figura 4: *Pmc1* influencia a sensibilidade a *Congo red* em condições de estresse hiposmótico. Teste em diluição seriada realizado nas linhagens H99 e *pmc1* para avaliar sensibilidade a *Congo red* das células em meio YPD 0,5X na concentração de 5 mg/ml cultivados em temperaturas de (A) 30°C e (B) 37°C por 48h.

Figura 5: A ausência de *PMCI* regula a expressão de genes codificantes de quitina sintases na presença de estressores de parede. Análise por RT-qPCR de *C. neoformans* H99 ou *pmc1* cultivados em YPD acrescidos ou não de *Congo red* (CR). Os valores de expressão foram normalizados usando os valores de Ct obtidos para o gene da actina. Os dados são apresentados como a média ± DP de três replicados experimentais de três repetições biológicas. Análise de variância realizada com One-Way ANOVA. *, P < 0,05.

Figura 6: A ausência de *PMCI* regula a expressão de genes codificantes de quitinasas na presença de estressores de parede. Análise por RT-qPCR de *C. neoformans* H99 ou *pmc1* cultivados em YPD acrescidos ou não de *Congo red* (CR). Os valores de expressão foram normalizados usando os valores de Ct obtidos para o gene da actina. Os dados são apresentados como a média ± DP de três replicados experimentais de três repetições biológicas. Análise de variância realizada com One-Way ANOVA. *, P < 0,05.; *** P = 0,0002; **** P < 0,0001.

Figura 1

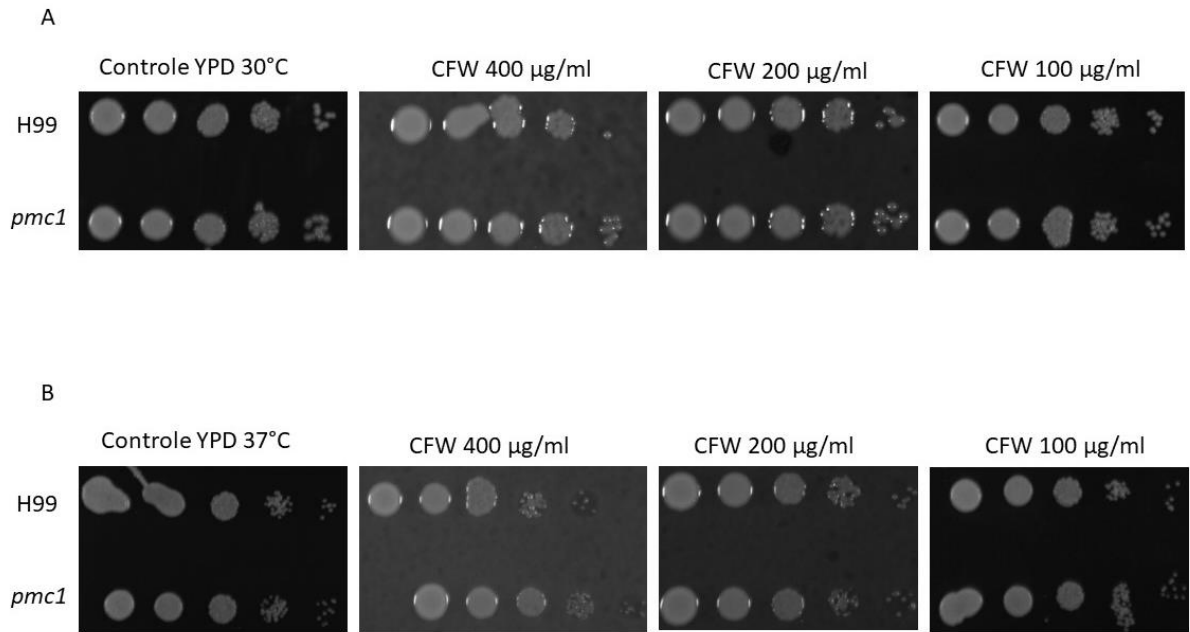


Figura 2

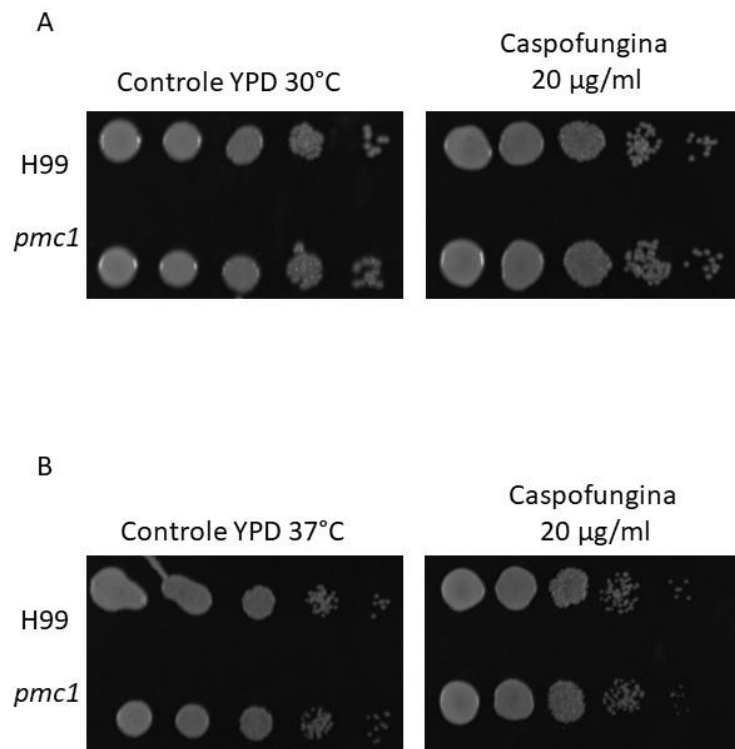


Figura 3

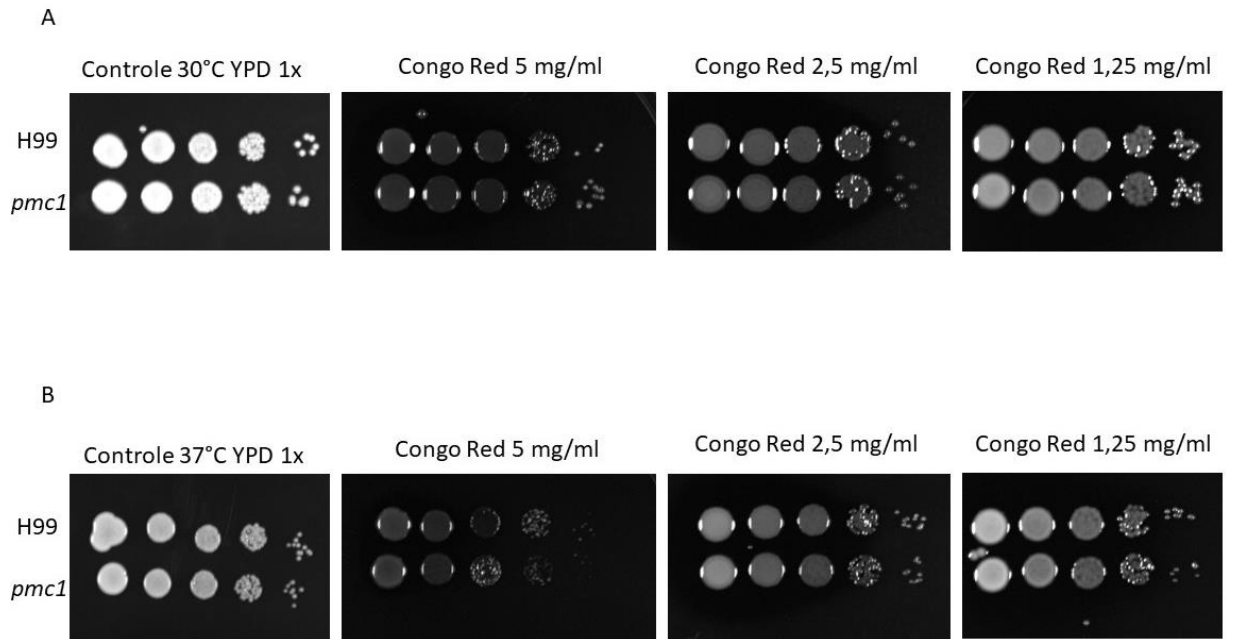


Figura 4

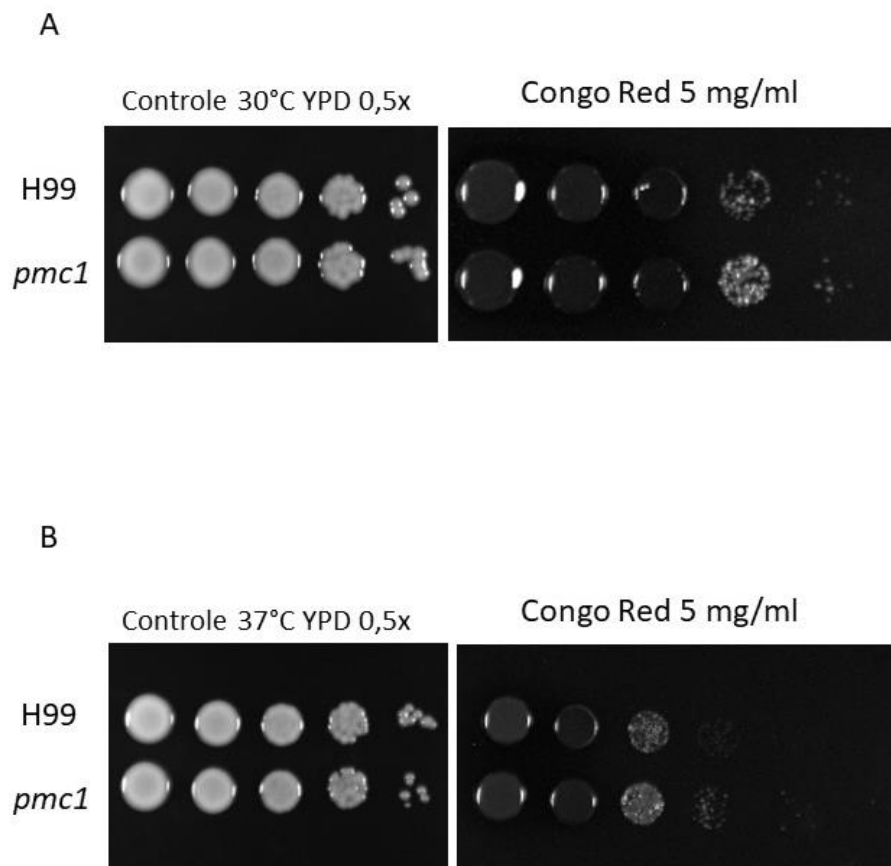


Figura 5

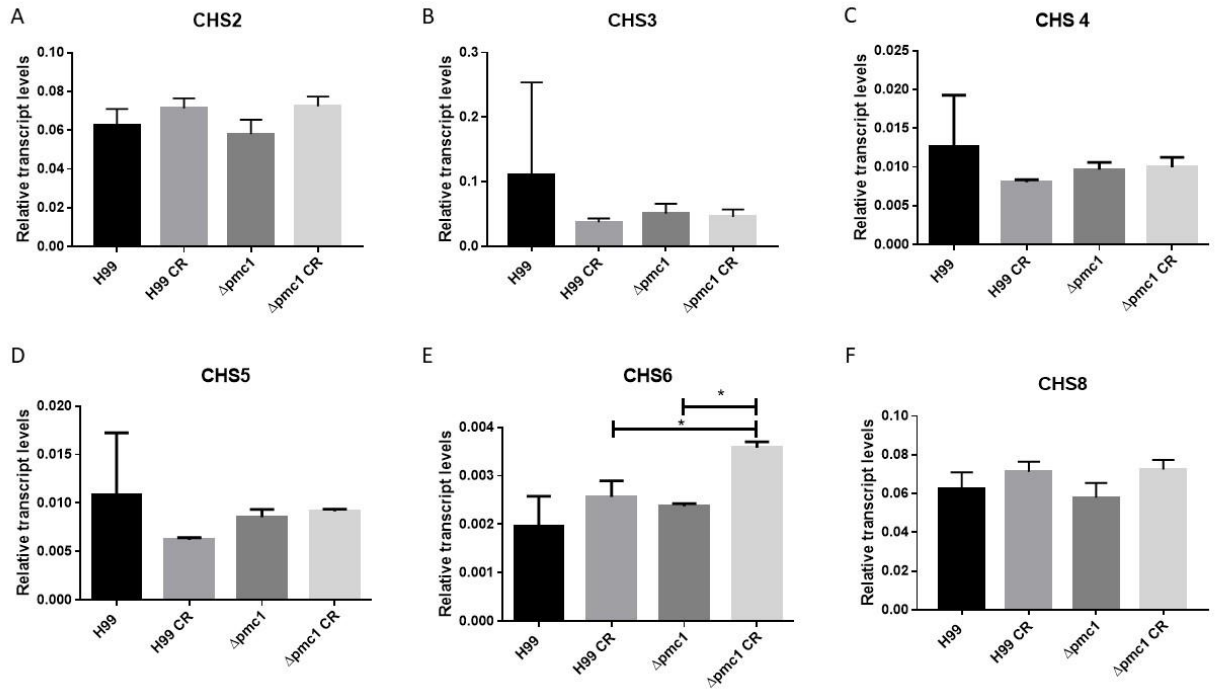
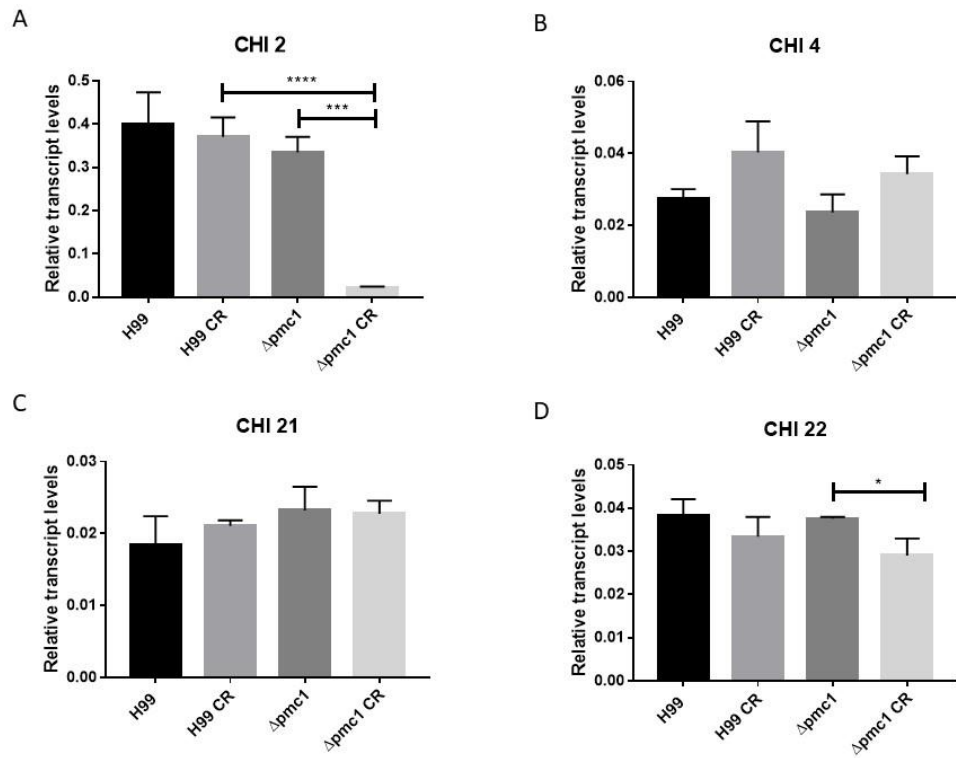


Figura 6



Material adicional 1: Lista de *primers* utilizados neste estudo

PRIMER	Sequencia (5' - 3')
CNAG_00546 F	GGTGATGATGACTACTATGCTG
CNAG_00546 R	CAGATGAGGTTGTGTATGAGG
CNAG_07499 F	CAGCCGACAACAAAGATGAAG
CNAG_07499 R	TCCAAACCAGCAACACATTC
CNAG_05818 F	CAGAAATGGCACAACAACC
CNAG_05818 R	TGGAAGATGGGAATAAGGG
CNAG_03099 F	TACCTTCCCGTCAACCAAC
CNAG_03099 R	GCCATAATCTCCACCAATC
CNAG_03326 F	ATACCTCCTCCTTCTTCCTTC
CNAG_03326 R	CCTCTACATCCTCTTGCTTC
CNAG_06487 F	TACCACCGACCCAGATGATG
CNAG_06487 R	GCCCAGACCCTTGAGTTC
CNAG_05581 F	TCGCTGGTGTTCATTCTTGG
CNAG_05581 R	GCTGCTCGTTTCATTCGTTC
CNAG_02351 F	GTTCTCTGAACTCGACTCTTT
CNAG_02351 R	TAGACCCAAAGGCAGCAATC
CNAG_04245 F	CTCCAGCCGTTCTTTCATTGG
CNAG_04245 R	CAGTGGTGGTAGCGGTAATAG
CNAG_02598 F	CCGACGGAAGTACAGAGATTA
CNAG_02598 R	GTTGAGACTCCAGACCATAGC
CNAG_03412 F	GAAGCATCTCCTCATTACCTATG
CNAG_03412 R	CTCACAGTCCTCACCAATGAC

Material adicional 2: Lista de genes testados neste estudo

GENE	GENE ID
<i>CHS2</i>	CNAG_03326
<i>CHS3</i>	CNAG_05581
<i>CHS4</i>	CNAG_00546
<i>CHS5</i>	CNAG_05818
<i>CHS6</i>	CNAG_06487
<i>CHS8</i>	CNAG_07499
<i>CHI2</i>	CNAG_03412
<i>CHI4</i>	CNAG_02351
<i>CHI21</i>	CNAG_02598
<i>CHI22</i>	CNAG_04245

4. CONCLUSÃO

- A deleção do gene *PMCl* em *C. neoformans* acarreta em tolerância ao estressor de parede celular Congo Red em condições hipo-osmóticas, tendo influência em genes associados a síntese e degradação de quitina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, L. G.; SPECHT, C. A.; LODGE, J. K. Chitinases are essential for sexual development but not vegetative growth in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 11, p. 1692-705, Nov 2009.

BANKS, I. R.; SPECHT, C. A.; DONLIN, M. J.; GERIK, K. J.; LEVITZ, S. M.; LODGE, J. K. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 11, p. 1902-12, Nov 2005.

CHOW, E. W.; CLANCEY, S. A.; BILLMYRE, R. B.; AVERETTE, A. F.; GRANER, J. A.; MIECZKOWSKI, P.; CARDENAS, M. E.; HEITMAN, J. Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genet**, v. 13, n. 4, p. e1006667, Apr 2017.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; MEDNICK, A.; CASADEVALL, A. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **J Infect Dis**, v. 182, n. 6, p. 1791-5, Dec 2000.

FONSECA, F. L.; NIMRICHTER, L.; CORDERO, R. J. *et al.* Role for chitin and chitooligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 10, p. 1543-53, Oct 2009.

FOX, D. S.; CRUZ, M. C.; SIA, R. A.; KE, H.; COX, G. M.; CARDENAS, M. E.; HEITMAN, J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 835-49, Feb 2001.

FRASES, S.; NIMRICHTER, L.; VIANA, N. B.; NAKOUZI, A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 2, p. 319-27, Feb 2008.

GRECHI, J.; MARINHO-CARVALHO, M.; ZANCAN, P.; CINELLI, L. P.; GOMES, A. M.; RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; SOLA-PENNA, M. Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. **J Biol Chem**, v. 286, n. 17, p. 14820-9, Apr 29 2011.

JANBON, G.; ORMEROD, K. L.; PAULET, D. *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**, v. 10, n. 4, p. e1004261, Apr 2014.

KMETZSCH, L.; STAATS, C. C.; CUPERTINO, J. B.; FONSECA, F. L.; RODRIGUES, M. L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **FEBS J**, v. 280, n. 19, p. 4853-64, Oct 2013a.

KMETZSCH, L.; STAATS, C. C.; CUPERTINO, J. B.; FONSECA, F. L.; RODRIGUES, M. L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **Febs Journal**, v. 280, n. 19, p. 4853-4864, Oct 2013b.

KMETZSCH, L.; STAATS, C. C.; SIMON, E. *et al.* The Vacuolar Ca²⁺ Exchanger Vcx1 Is Involved in Calcineurin-Dependent Ca²⁺ Tolerance and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 11, p. 1798-1805, Nov 2010.

KOZUBOWSKI, L.; LEE, S. C.; HEITMAN, J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 3, p. 370-80, Mar 2009.

KRAUS, P. R.; NICHOLS, C. B.; HEITMAN, J. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 6, p. 1079-87, Jun 2005.

KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y. S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, p. a019760, Jul 2014.

LENARDON, M. D.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 416-23, Aug 2010.

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**, v. 7, n. 12, p. e51403, 2012.

LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1145-75, Dec 2011.

LIU, M.; DU, P.; HEINRICH, G.; COX, G. M.; GELLI, A. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 10, p. 1788-96, Oct 2006.

LIU, S.; HOU, Y.; LIU, W.; LU, C.; WANG, W.; SUN, S. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 4, p. 324-34, Apr 2015.

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.

PARK, H. S.; CHOW, E. W.; FU, C.; SODERBLOM, E. J.; MOSELEY, M. A.; HEITMAN, J.; CARDENAS, M. E. Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 9, p. e1005873, Sep 2016.

PERFECT, J. R. Cryptococcosis: a model for the understanding of infectious diseases. **J Clin Invest**, v. 124, n. 5, p. 1893-5, May 1 2014.

RAM, A. F.; KLIS, F. M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2253-6, 2006.

RONCERO, C.; VALDIVIESO, M. H.; RIBAS, J. C.; DURAN, A. Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, v. 170, n. 4, p. 1945-9, Apr 1988a.

RONCERO, C.; VALDIVIESO, M. H.; RIBAS, J. C.; DURAN, A. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. **J Bacteriol**, v. 170, n. 4, p. 1950-4, Apr 1988b.

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.

SQUIZANI, E. D.; OLIVEIRA, N. K.; REUWSAAT, J. C. V. *et al.* Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. **Cell Microbiol**, v. 20, n. 2, Feb 2018.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, Feb 2014.

THEWES, S. Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. **Eukaryot Cell**, v. 13, n. 6, p. 694-705, Jun 2014.

TSENG, H. K.; HUANG, T. Y.; WU, A. Y.; CHEN, H. H.; LIU, C. P.; JONG, A. How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. **Future Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 1669-82, 2015.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009.

6. ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BMC MICROBIOLOGY PREPARING YOUR MANUSCRIPT

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** a brief summary and potential implications

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary.

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

For research articles this section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study. For study protocols and methodology manuscripts this section should include a discussion of any practical or operational issues involved in performing the study and any issues not covered in other sections.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study to the field.

Methods (can also be placed after Background)

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study

- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Declarations

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our editorial policies for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, this section is not applicable to your submission. Please state "Not applicable" in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent to publish must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent to publish. You can use your institutional consent form or our consent form if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our editorial policies for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain any individual persons data, please state "Not applicable" in this section.

Availability of data and material

For all journals, BioMed Central strongly encourages all datasets on which the conclusions of the manuscript rely to be either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main paper or additional supporting files, in machine-readable format (such as spreadsheets rather than PDFs) whenever possible. Please see the list of recommended repositories in our editorial policies.

For some journals, deposition of the data on which the conclusions of the manuscript rely is an absolute requirement. Please check the Criteria section for this article type (located at the top of this page) for journal specific policies. 50

For all journals, authors must include an "Availability of data and materials" section in their article detailing where the data supporting their findings can be found. If you do not wish to share your data, please state that data will not be shared, and state the reason.

For information on how to cite your data and format this section see preparing your manuscript.

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section. See our editorial policies for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our editorial policies.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our editorial policies for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

For group authorship: if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can 51

add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

GENERAL FORMATTING INFORMATION

Manuscripts must be written in concise English. For help on scientific writing, or preparing your manuscript in English, please see Springer's Author Academy.

Quick points:

- Use double line spacing
- Include line and page numbering
- Use SI units: Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF
- Do not use page breaks in your manuscript

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)

Please note: editable files are required for processing in production. If your manuscript contains any non-editable files (such as PDFs) you will be required to re-submit an editable file if your manuscript is accepted.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

Style and language

Manuscripts submitted to most journals do not undergo copyediting for style and language. Please check individual journal 'About' pages to confirm whether accepted manuscripts will undergo copyediting for style and language.

You can use a professional language editing service of your choice if you want to. Such services include:

- Edanz Language Editing. BioMed Central authors can obtain a 10% discount to the fee charged by Edanz if they choose to use this service.
- Nature Publishing Group Language Editing. Authors can use this coupon code to claim a 10% discount: LE_BM15

Contact the service providers directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Data and materials

For all journals, BioMed Central strongly encourages all datasets on which the conclusions of the manuscript rely to be either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main paper or additional supporting files, in machine-readable format (such as spread sheets rather than PDFs) whenever possible. Please see the list of recommended repositories in our editorial policies.

For some journals, deposition of the data on which the conclusions of the manuscript rely is an absolute requirement. Please check the Instructions for Authors for the relevant journal and article type for journal specific policies.

For all manuscripts, information about data availability should be detailed in an 'Availability of data and materials' section. For more information on the content of this section, please see the Declarations section of the relevant journal's Instruction for Authors.

For more information on BioMed Central's policies on data availability, please see our editorial policies.

Formatting the 'Availability of data and materials' section of your manuscript

The following format for the 'Availability of data and materials' section of your manuscript should be used:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) available in the [repository name] repository, [unique persistent identifier and hyperlink to dataset(s) in http://format]."

The following format is required when data are included as additional files:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) included within the article (and its additional file(s))."

For databases, this section should state the web/ftp address at which the database is available and any restrictions to its use by non-academics.

For software, this section should include:

- Project name: e.g. My bioinformatics project
- Project home page: e.g. <http://sourceforge.net/projects/mged>
- Archived version: DOI or unique identifier of archived software or code in repository (e.g. enodo)
- Operating system(s): e.g. Platform independent
- Programming language: e.g. Java
- Other requirements: e.g. Java 1.3.1 or higher, Tomcat 4.0 or higher
- License: e.g. GNU GPL, FreeBSD etc.
- Any restrictions to use by non-academics: e.g. licence needed

Information on available repositories for other types of scientific data, including clinical data, can be found in our editorial policies.

References

See our editorial policies for author guidance on good citation practice.

What should be cited?

Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited.

Unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE.

Any in press articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Authors may wish to make use of reference management software to ensure that reference lists are correctly formatted. An example of such software is Papers, which is part of Springer Science+Business Media.

PREPARING FIGURES

When preparing figures, please follow the formatting instructions below.

- Figures should be provided as separate files, not embedded in the main manuscript file.
- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file that fits on a single page in portrait format.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.
- Multi-panel figures (those with parts a, b, c, d etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figures should be uploaded in the correct orientation.
- Figure titles (max 15 words) and legends (max 300 words) should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- Figure keys should be incorporated into the graphic, not into the legend of the figure.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see our detailed instructions.
- Individual figure files should not exceed 10 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- **Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere.** In order for all figures to be open access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non open access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Figure file types

We accept the following file formats for figures:

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)
- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)

- PNG (suitable for images)
- BMP (suitable for images)
- CDX (ChemDraw - suitable for molecular structures)

Figure size and resolution

Figures are resized during publication of the final full text and PDF versions to conform to the BioMed Central standard dimensions, which are detailed below.

Figures on the web:

- width of 600 pixels (standard), 1200 pixels (high resolution).

Figures in the final PDF version:

- width of 85 mm for half page width figure
- width of 170 mm for full page width figure
- maximum height of 225 mm for figure and legend
- image resolution of approximately 300 dpi (dots per inch) at the final size

Figures should be designed such that all information, including text, is legible at these dimensions. All lines should be wider than 0.25 pt when constrained to standard figure widths. All fonts must be embedded.

Figure file compression

Vector figures should if possible be submitted as PDF files, which are usually more compact than EPS files.

- TIFF files should be saved with LZW compression, which is lossless (decreases file size without decreasing quality) in order to minimize upload time.
- JPEG files should be saved at maximum quality.
- Conversion of images between file types (especially lossy formats such as JPEG) should be kept to a minimum to avoid degradation of quality.

If you have any questions or are experiencing a problem with figures, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

PREPARING TABLES

When preparing tables, please follow the formatting instructions below.

- Tables should be numbered and cited in the text in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, Table 2 etc.).
- Tables less than one A4 or Letter page in length can be placed in the appropriate location within the manuscript.
- Tables larger than one A4 or Letter page in length can be placed at the end of the document text file. Please cite and indicate where the table should appear at the relevant location in the text file so that the table can be added in the correct place during production.
- Larger datasets, or tables too wide for A4 or Letter landscape page can be uploaded as additional files. Please see [below] for more information.

- Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). Please use the standard file extensions.

- Table titles (max 15 words) should be included above the table, and legends (max 300 words) should be included underneath the table.

- Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files, but should be formatted using 'Table object' function in your word processing program.

- Color and shading may not be used. Parts of the table can be highlighted using superscript, numbering, lettering, symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend.

- Commas should not be used to indicate numerical values.

If you have any questions or are experiencing a problem with tables, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

PREPARING ADDITIONAL FILES

As the length and quantity of data is not restricted for many article types, authors can provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

All Additional files will be published along with the accepted article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files, if requested, should be sent by email to the journal's editorial email address, quoting the manuscript reference number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" should be included as additional files. Since many web links and URLs rapidly become broken, BioMed Central requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. Do not include any individual participant details. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission. Each additional file should be cited in sequence within the main body of text.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.