

**Universidade de Brasília  
Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**Moléculas pequenas secretadas pelo fungo *Cryptococcus neoformans* interferem na ativação do inflamassoma NLRP3**

**Pedro Henrique Miranda Bürgel**

**Brasília  
2018**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA**

**Moléculas pequenas secretadas pelo fungo *Cryptococcus neoformans* interferem na ativação do inflamassoma NLRP3**

Tese de Doutorado apresentado para obtenção do  
título de Doutor no programa de pós-graduação de  
Biologia Microbiana – Instituto de Biologia –  
Universidade de Brasília

**AUTOR: PEDRO HENRIQUE MIRANDA BÜRCEL**  
**ORIENTADOR: ALDO HENRIQUE FONSECA PACHECO TAVARES**  
**COORIENTADOR ESTRANGEIRO: ROBIN C. MAY**

**Brasília**  
**2018**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha mãe: Mirian Christiane Miranda, que sempre me motivou e algumas vezes exigiu que eu fosse melhor amanhã do que sou hoje. Esse trabalho é tanto meu quanto seu, e eu sinto muito a sua falta no meu dia a dia.

Ao meu pai e irmão, que seguraram uma situação delicadíssima por tempo suficiente para que eu conseguisse terminar esta etapa da vida de maneira satisfatória. Vocês foram essenciais.

Aos meus outros familiares, que formam uma rede de proteção e carinho que é muito importante. Vocês fazem todo mundo da família se sentir querido e parte de algo nesse mundo.

À minha parceira Yasmin Lima, que neste período foi parceira em todos os termos, denominações e funções possíveis, me trazendo equilíbrio quando necessário e desequilíbrio quando tudo estava muito chato. Obrigado por sempre estar presente.

Aos meus chefes: Aldo H. Tavares, Anamelia L. Bocca e Robin C. May. Muitos chefes podem desandar um bolo, mas neste caso foi impossível não ter aprendido e crescido tanto na convivência de três grandes mestres dessa área. Acredito que evoluí muito profissionalmente nestes 4 anos, e tudo passa pelas mãos de vocês.

Aos meus grandes amigos que já foram agradecidos no mestrado e continuaram sendo companheiros no/de doutorado: Fernando Sá e Raffael Castro. Apesar do péssimo timing que vocês têm pra sanduíche, meu desejo é fazer parte da vida de vocês pra sempre.

Aos amigos de quase infância, que comprovam a tese que grandes amigos resistem a distância de outro bairro, cidade ou até mesmo continente: Roland Montenegro, Leandro Martins, Lucas Costa e Daniel Oliveira. É sempre bom poder contar com vocês.

Aos membros do laboratório mais fantástico do mundo (mundo = Brasília e Birmingham). O LIA é um ótimo ambiente de trabalho e espero que continue tendo este espírito por muitos anos, pois eu faço muita propaganda desse laboratório. Meus agradecimentos especiais à Clara Freitas, Karina Simon, Paulo Holanda, Stephan de Oliveira, Thaís Bergmann, Camille Florêncio, Mariana Damas e Gabriela Spolti por permitirem minhas playlists alternativas e rádios marroquinas durante o expediente.

Ao “Host and Pathogen Interaction Lab” (HAPI Lab), por ter me recebido de forma tão amigável durante meu período de sanduíche. Obrigado pelas discussões, ajudas e principalmente pelo Retiro, aquela semana mágica de sol em pleno Reino Unido.

Aos parceiros brasileiros que conheci em Birmingham e me ajudaram muito durante este período. Karina, Letícia, Cris, Felipe, Vanessa, Laís, Carol, Ravenna e Emilly, vocês foram essenciais para que a cidade fosse mais acolhedora e interessante.

Também a outros colegas, entre professores, técnicos e alunos, do laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI), do Lab MOA da BioMol e do laboratório de Biofísica, que sempre me receberam com um sorriso no rosto e as portas abertas (principalmente das estufas e freezers) quando era necessário.

Às professoras e professores Andréa Maranhão, Larissa Matos, Alex Leite e Leonardo Nimrichter, que prontamente aceitaram fazer parte da avaliação deste trabalho, mesmo próximo ao Natal.

À CAPES, que me proporcionou a oportunidade de realizar parte deste projeto em outro país, a partir do programa PDSE.

Finalmente ao CNPq e FAP-DF, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	14
<i>Cryptococcus sp.</i> e criptococose.....	14
Imunidade antifúngica contra o <i>C. neoformans</i> .....	17
Inflamassomas e seu papel na criptococose.....	22
Estratégias de evasão da resposta imune do gênero <i>Cryptococcus</i> .....	30
Meio Condicionado de <i>C. neoformans</i> e seu efeito na ativação do inflamassoma .....	35
Justificativa.....	36
OBJETIVOS .....	38
Geral .....	38
Específicos.....	38
METODOLOGIA.....	39
Animais .....	39
Cepas Fúngicas.....	39
Obtenção de Macrófagos (BMMs e BMDMs) e Células Dendríticas (BMDCs) Murinos derivados de Medula Óssea .....	40
Obtenção do Meio Condicionado Bruto e seu Fracionamento .....	41
Análise dos meios condicionados por espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa .....	42
Obtenção de Polissacarídeos de Cápsula e Secretados pelo <i>C. neoformans</i> .....	43
Detecção de GXM por ELISA.....	43
Captura de GXM por ELISA e Depleção de CMs.....	44
Detecção de GXM por Microscopia de Fluorescência Confocal.....	44
Isolamento de Vesículas .....	45
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	46
Microscopia de Varredura (MEV).....	46
Ensaio de Interação com Células Murinas .....	46
Dosagem de Citocinas por ELISA.....	47
Detecção de Caspase-1 e Caspase-8 Ativa por Citometria de Fluxo .....	47
Ensaio de PCR em Tempo Real .....	49
Análise de Índice de Fagocitose .....	50
Ensaio de Atividade Fungicida em Sistema Transwell.....	50
Ensaio de Quantificação de Eventos de Extrusão por Citometria .....	51
Análise Estatística .....	53
RESULTADOS .....	54
CM35 também é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ em macrófagos diferenciados por GM-CSF e células dendríticas .....	54
CM35 é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ promovida por outros estímulos secundários, porém não de TNF- $\alpha$ mesmo quando adicionado previamente.....	54
Inibição da secreção de IL-1 $\beta$ promovida pelo CM35 envolve inibição da ativação de caspase-1 e caspase-8 .....	56
Tratamento com meios condicionados induz a transcrição de gene <i>il1b</i> .....	58
Fagocitose é prejudicada em macrófagos tratados previamente com CM35 .....	60
Infecção por B3501 impacta atividade fungicida em macrófagos adjacentes não infectados em primeiro momento.....	61
CM35 potencializa os eventos de vomocitose entre <i>C. neoformans</i> e macrófagos murinos .....	64
Polissacarídeos secretados contendo GXM não são capazes de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ .....	66
Fosfolípido e seus precursores e carboidratos associados com virulência não estão associados a capacidade inibitória de CM35 .....	71
ILA participa de inibição do inflamassoma promovida por CM35 .....	73
Vesículas extracelulares de <i>C. neoformans</i> lisadas promovem inibição na secreção de IL-1 $\beta$ similar ao CM35 .....	76
DISCUSSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94
ANEXOS .....	108

Anexo I – Projeto Aprovado em Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/UnB) .....	108
Anexo II – Produção Científica Durante Período de Doutorado (2015 – 2018).....	109

---



---

**ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Fungos estudados quanto à ativação do inflamassoma .....	<b>27</b>
<b>Figura 1</b> - Esquema representativo do reconhecimento de patógenos fúngicos promotores de doenças sistêmicas com subsequente ativação de plataformas de inflamassoma .....	<b>29</b>
<b>Figura 2</b> - Esquema demonstrando a localização de enzimas consideradas importantes para a virulência .....	<b>32</b>
<b>Figura 3</b> - Esquema de “gates” utilizados para análise citométrica de caspase-1 ativa. ....	<b>48</b>
<b>Figura 4</b> - Desenho experimental do ensaio de atividade fungicida em sistema “Transwell”.52	
<b>Figura 5</b> - Desenho experimental do ensaio de quantificação de eventos de extrusão por citometria.....	<b>53</b>
<b>Figura 6</b> - CM35 também é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ em macrófagos diferenciados por GM-CSF e células dendríticas.....	<b>55</b>
<b>Figura 7</b> - CM35 é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ promovida por outros estímulos secundários, porém não de TNF- $\alpha$ mesmo quando adicionado previamente.....	<b>56</b>
<b>Figura 8</b> - Inibição da secreção de IL-1 $\beta$ promovida pelo CM35 envolve a inibição na ativação de caspase-1.....	<b>58</b>
<b>Figura 9</b> - Inibição da secreção de IL-1 $\beta$ promovida pelo CM35 envolve a inibição na ativação de caspase-8.....	<b>59</b>
<b>Figura 10</b> - Tratamento com meios condicionados induz a transcrição de gene <i>illb</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 11</b> - Fagocitose é prejudicada em macrófagos tratados previamente com CM35 .....	<b>61</b>
<b>Figura 12</b> - Validação da integridade de membrana no Sistema “Transwell” .....	<b>63</b>
<b>Figura 13</b> - Infecção por B3501 impacta atividade fungicida em macrófagos adjacentes não infectados em primeiro momento. ....	<b>64</b>
<b>Figura 14</b> - CM35 potencializa os eventos de vomocitose entre <i>C. neoformans</i> e macrófagos murinos .....	<b>65</b>
<b>Figura 15</b> - Polissacarídeos secretados contendo GXM não são capazes de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ .....	<b>67</b>
<b>Figura 16</b> - Detecção de GXM em CMs por ELISA .....	<b>68</b>
<b>Figura 17</b> - Validação da técnica de captura de GXM por ELISA.....	<b>69</b>

---

<b>Figura 18</b> - Processamento de meios condicionados por ELISA de captura de GXM não altera suas características inibitórias .....	<b>70</b>
<b>Figura 19</b> - Fosfolipídio e seus precursores e carboidratos associados com virulência e não estão associados a capacidade inibitória de CM35.....	<b>72</b>
<b>Figura 20</b> - Análise diferencial de conteúdo presente em CM35 e CMCAP por espectrometria de massa.....	<b>73</b>
<b>Figura 21</b> - ILA participa de inibição do inflamassoma promovida por CM35 .....	<b>75</b>
<b>Figura 22</b> - Metabólitos não previnem morte celular por piroptose.....	<b>75</b>
<b>Figura 23</b> - ILA apresenta padrões diferentes de CM35 quanto à inibição da ativação de caspase-1.....	<b>77</b>
<b>Figura 24</b> - Caracterização de vesículas extracelulares secretadas por <i>C. neoformans</i> .....	<b>79</b>
<b>Figura 25</b> - Incubação com SFB rompe EVs de <i>C. neoformans</i> .....	<b>80</b>
<b>Figura 26</b> - Vesículas extracelulares de <i>C. neoformans</i> lisadas promovem inibição na secreção de IL-1 $\beta$ similar ao CM35 .....	<b>80</b>



---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASC	Proteína do tipo SPECK associada a apoptose que contém CARD
ATP	Adenosina Trifosfato
BM	Célula de Medula Óssea
BMDC	Célula Dendrítica Derivada de Medula Óssea
BMDM	Macrófago Diferenciado por GM-CSF Derivado de Medula Óssea
BMM	Macrófago Diferenciado por M-CSF Derivado de Medula Óssea
BSA	Albumina Bovina Sérica
cDNA	DNA Cíclico
CLR	Receptores de Tipo Lecitina
CM35	Meio Condicionado Derivado de B3501
CMCAP	Meio Condicionado Derivado de CAP67
DAMP	Padrão Molecular Associados a Dano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Ligação Imunoenzimático
EV	Vesícula Extracelular
FAM	Molécula de Carboxifluoresceína
FAME	Éster Metílico de Ácido Graxo
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FLICA	Inibidor Fluorescente de Caspase
GalXM	Galactoxilomanana
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GPC	Glicerilfosforilcolina
GPE	Glicerilfosforiletanolamina
GXM	Glucoronoxilomanana

---

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMGB	Proteínas de Grupo de Alta Mobilidade
HPLA	Ácido 3-(4-hidroxifenil)lático
HSP	Proteína de Choque Térmico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de Citocinas da Família IL-1
ILA	Ácido 3-indol lático
IPAF	Fator Ativador da Protease ICE
kDa	Kilodalton
LCCM	Meio Condicionado Célula L
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeos
m	Metro
MAN	Manose
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitros
MM	Meio Mínimo
mM	Milimolar
mm	milímetro
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil) Trifluoroacetamida
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NLR	Receptor de Tipo NOD
NLRC	Receptor do Tipo NOD que contém CARD
NLRP	Receptor do Tipo NOD que contém Pirina
ng	Nanograma
nm	Nanômetro

---

NOD	Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pdi	Índice de Polidispersividade
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídio
PLA	Ácido fenil-láctico
POP	Proteínas Apenas com Pirina
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
PS	Polissacarídeo
PTA	Ácido Fosfotúngstico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reativos de Oxigênio
RPM	Rotações por Minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOR	Sorbitol
SyK	Tirosina Quinase Esplênica
T3SS	Sistema de Secreção Tipo III
TBS-T	Solução Salina Tamponada com Tris
TRE	Trealose
Th	Linfócito T Auxiliar
TLR	Receptor do Tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TWEEN	Polietileno Glicol Monoestearato de Sorbitano
xg	Força Centrífuga Relativa
Yop	Proteínas Externas de <i>Yersinia</i>
YVAD	Tirosina, Valina, Alanina e Aspartato

---

**RESUMO**

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada capaz de causar doença principalmente em hospedeiros imunocomprometidos. É considerada um patógeno intracelular facultativo por causa de sua capacidade de sobreviver e se replicar no interior de fagócitos, especialmente macrófagos. Esta capacidade é extremamente dependente de vários fatores de virulência expressos pelo fungo, que tornam o macrófago não ativado ou fracamente ativado ineficaz no combate a levedura fagocitada. Estratégias utilizadas pelo macrófago visando prevenir este cenário incluem a piroptose (uma morte celular programada, rápida e altamente inflamatória) e a vomocitose (expulsão não lítica do patógeno do meio intracelular). A ativação do inflamassoma em fagócitos é geralmente protetiva no combate a infecções fúngicas, incluindo na criptococose. Ainda assim, o reconhecimento do *C. neoformans* por receptores associados ao inflamassoma requer mudanças específicas em sua morfologia ou opsonização da levedura, dificultando assim o funcionamento apropriado desta via durante a infecção. Neste contexto, analisamos o impacto de moléculas secretadas pela cepa selvagem B3501 e o mutante acapsular  $\Delta cap67$  em um modelo *in vitro* de ativação canônica do inflamassoma. Nossos resultados mostraram que o meio condicionado derivado de B3501 (CM35) era capaz de inibir a ativação do inflamassoma e eventos dependentes (por exemplo, secreção de IL-1 $\beta$ ) de maneira mais robusta que o meio condicionado derivado de  $\Delta cap67$  (CMCAP), mesmo este efeito sendo independente da presença de GXM. Também demonstramos que macrófagos tratados com meio condicionado se encontravam menos responsivos contra a infecção com a cepa virulenta H99, exibindo menor capacidade fagocítica, aumento em carga fúngica intracelular e na promoção da vomocitose. Adicionalmente, demonstramos que o metabólito Ácido 3-indol lático (ILA) está presente no CM35 e apresenta inibição contra a ativação do inflamassoma NLRP3. Também analisamos o papel de vesículas extracelulares secretadas pelo fungo na inibição da via do inflamassoma. De forma geral, os resultados apresentados mostram que o meio condicionado de uma cepa selvagem de *C. neoformans* é capaz de inibir uma importante via de reconhecimento e consequentemente inibir funções fungicidas de macrófagos, contribuindo para a sobrevivência fúngica em modelos *in vitro*, indicando um possível papel importante destas moléculas secretadas durante a infecção criptococócica.

Palavras chave: *C. neoformans*, meio condicionado, inflamassoma, vesículas extracelulares

---

**ABSTRACT**

*Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast capable of causing disease mainly in immunosuppressed hosts. It is considered a facultative intracellular pathogen because of its capacity to survive and replicate inside phagocytes, especially macrophages. This capacity is heavily dependent on various virulence factors that render the non or poorly activated macrophage ineffective against the phagocytosed yeast. Strategies utilized by macrophages to prevent this scenario includes pyroptosis (a rapid highly inflammatory cell death) and vomocytosis (the expulsion of the pathogen from the intracellular environment without lysis). Inflammasome activation in phagocytes is usually protective against fungal infections, including cryptococcosis. Nevertheless, recognition of *C. neoformans* by inflammasome receptors requires specific changes in morphology or the opsonization of the yeast, impairing a proper inflammasome function. In this context, we analysed the impact of molecules secreted by B3501 strain and its nonencapsulated mutant  $\Delta\text{cap67}$  in an inflammasome canonical activation *in vitro* model. Our results showed that conditioned media derived from B3501 (CM35) was capable of inhibiting inflammasome dependent events (i.e. IL-1 $\beta$  secretion) strongly than conditioned media from  $\Delta\text{cap67}$  (CMCAP), regardless of GXM presence. We also demonstrated that macrophages treated with conditioned media were less responsive against infections with the virulent strain H99, exhibiting less phagocytosis capacity, increased fungal burden and vomocytosis. Moreover, we showed that the aromatic metabolite DL-Indole-3-lactic acid (ILA) was present in CM35 and have impact in NLRP3 inflammasome activation. We also analysed the role of extracellular vesicles regarding inhibition of inflammasome. Overall the results presented show that conditioned media from a *C. neoformans* wild-type strain can inhibit an important recognition pathway and subsequently fungicidal functions in macrophages, contributing to fungal survival *in vitro*, indicating an important role of secreted molecules during cryptococcal infections in the host.

Key words: *C. neoformans*, conditioned media, inflammasome, extracellular vesicles

---

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### *Cryptococcus sp.* e criptococose

O fungo *Cryptococcus neoformans*, agente etiológico da criptococose e da meningite criptococócica, é um basidiomiceto que possui ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em solo, troncos de árvores, vegetais em processo de apodrecimento e até mesmo em excreta de aves, principalmente em pombos (LAZERA et al., 2000; LIN, 2009; LIN; HEITMAN, 2006; SORRELL; ELLIS, 1997; TAKAHARA et al., 2013).

Apesar dos fungos do gênero *Cryptococcus* se apresentarem em seu habitat natural principalmente na forma de basídio ou basidiósporos, sua forma mais conhecida e estudada é a de levedura, forma essa associada a patogênese. A principal característica morfológica apresentada por esta levedura é a presença de uma cápsula polissacarídica, cujas diferenças estruturais permitiram uma classificação primordial das espécies patogênicas deste gênero em 5 sorotipos: *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A); *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D); um híbrido entre os supracitados (sorotipo AD) e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) (NAKAMURA et al., 2000). Após diversos estudos aplicando técnicas moleculares para uma caracterização mais precisa dos diferentes genótipos do gênero (LOFTUS et al., 2005), o sequenciamento total do genoma completo do fungo, estabeleceu-se uma nova identificação baseada em oito tipos moleculares: VNI e VNII (sorotipo A); VNIV (sorotipo D); VNIII (sorotipo AD) e os VGI, VGII, VGIII e VGIV (sorotipos B e C) (MEYER et al., 2009). Dentre esses, o *Cryptococcus* var. *grubii* (sorotipo A e tipo molecular VNI) é o que apresenta maior prevalência entre amostras clínicas e ambientais em proporções mundiais. Seguindo a tendência global, na América Latina e especificamente no Brasil este tipo molecular também é o mais prevalente (FIRACATIVE et al., 2018).

A criptococose é caracterizada como uma micose sistêmica que pode ser contraída tanto por indivíduos imunocomprometidos quanto indivíduos hígidos. Neste âmbito os sorotipos A e D se apresentam usualmente como patógenos oportunistas, enquanto os sorotipos B e C costumam se apresentar como patógenos primários (IDNURM et al., 2005). Apesar de conseguir promover a doença em indivíduos saudáveis, a restrição geográfica do *C. gattii* faz com que ele apresente prevalência de apenas um por cento nos casos de criptococose registrados, limitando a sua importância clínica em surtos localizados (ESPINEL-INGROFF; KIDD, 2015). Em contraste, o *C. neoformans* var. *grubii* é responsável por cerca noventa e

---

cinco por cento dos casos de criptococose registrados, fato parcialmente explicado pela sua ampla distribuição geográfica clínica e ambiental e também por sua maior virulência quando comparado ao *C. neoformans var. neoformans* (LIN, 2009).

A infecção se dá a partir da inalação dos esporos ou leveduras dessecadas do fungo (LIN; HEITMAN, 2006). Apesar de a inalação de esporos estar usualmente associada à infecções fúngicas, as leveduras são consideradas formas infectantes importantes na criptococose, apresentando uma maior carga fúngica em órgãos-alvo e estando mais associadas a letalidade em modelos murinos de infecção (GILES et al., 2009; VELAGAPUDI et al., 2009). Em contrapartida, esporos não apresentam grande resistência às barreiras e defesas imunológicas do organismo, como por exemplo evasão à fagocitose e a produção de radicais livres de oxigênio, logo é necessária uma rápida transformação para levedura, que possui vários mecanismos de resistência, para uma colonização efetiva do fungo no sistema respiratório.

Nos tecidos pulmonares ocorrem interações entre as células fúngicas e o sistema imune do hospedeiro que determinam o desfecho da infecção, especialmente dependentes da virulência apresentada pelo fungo e também pelo estágio de ativação dos macrófagos (ALANIO; DESNOS-OLLIVIER; DROMER, 2011). Esta interação pode resultar em: eliminação do fungo, gerando a cura do hospedeiro; latência do crescimento, resultando em infecção assintomática que não gera danos ao hospedeiro, mas que pode ser reativada em caso de comprometimento da imunidade do hospedeiro ou restrição temporária do fungo nos pulmões, gerando infecção sintomática seguida de disseminação sistêmica (SABIITI; MAY, 2012). A progressão letal da doença envolve a resistência e crescimento fúngico no pulmão e subsequente disseminação para outros órgãos, preferencialmente para o sistema nervoso central, gerando o quadro clínico de meningite criptococócica. Em casos de infecção por *C. neoformans*, este quadro clínico tem uma alta associação com indivíduos imunossuprimidos, em especial entre aqueles que portam o vírus HIV (PARK et al., 2009; RAJASINGHAM et al., 2017).

Grande parte da virulência e letalidade creditadas ao fungo estão em sua habilidade de evadir dos tecidos pulmonares e se disseminar pela corrente sanguínea, existindo relatos em que leveduras mutantes que apresentam falhas nesse escape promovem doenças assintomáticas ou brandas (DENHAM; BROWN, 2018). Uma vez localizado na corrente sanguínea, o *C. neoformans* pode infectar virtualmente qualquer órgão do corpo humano, já

tendo sido localizado em: adrenais, coração, linfonodos, articulações, ossos, rins, trato gastrointestinal, cavidade ocular e próstata (LIN; HEITMAN, 2006; MITCHELL; PERFECT, 1995). Porém, o órgão pelo qual a levedura apresenta maior tropismo é o sistema nervoso central. A causa para este tropismo ainda não é totalmente elucidada, porém existem possíveis explicações para este fenômeno, como por exemplo: a presença de substratos preferenciais para o crescimento do fungo; a constituição de um refúgio para o fungo evitar uma resposta imune eficiente do hospedeiro e/ou a presença de receptores mais específicos que em outros órgãos, que atraíam fungo (LIN; HEITMAN, 2006).

Devido ao seu tamanho celular, a levedura de *C. neoformans* necessita de mecanismos ativos para a sua penetração pela barreira hematoencefálica e subsequente colonização do sistema nervoso central. Evidências apontam para três possíveis mecanismos pelos quais a levedura se utiliza para realizar esta transmigração, sendo aceito por alguns autores que elas podem ocorrer concomitantemente (CASADEVALL, 2010). São os três mecanismos: migração paracelular, por meio de dano primariamente provocado pela secreção de enzimas fúngicas, que comprometem as junções da barreira hematoencefálica (OLSZEWSKI et al., 2004); migração transcelular, por meio da adesão a células endoteliais microvasculares, com subsequente internalização das leveduras e transmigração das mesmas para as porções internas do órgão (CHANG et al., 2004); e o modelo cavalo-de-tróia, por meio da migração no interior de macrófago infectado pelo fungo (CHARLIER et al., 2009).

Estudos utilizando modelos deficientes para esses mecanismos demonstraram que esta é uma etapa crítica para a fatalidade da criptococose. Sem a capacidade de transmigração cerebral, a infecção pulmonar e em outros órgãos promovida por estes mutantes ainda é similar, porém a mortalidade do hospedeiro é significativamente reduzida (LEV et al., 2017; VU et al., 2014). Por outro lado, o estabelecimento da infecção cerebral observada em cepas selvagens, especialmente pela espécie *C. neoformans var grubii*, evidencia o fungo como um dos principais agentes causadores de meningite e o principal causador da meningite fúngica em níveis globais, particularmente em associação com a AIDS (CHARALAMBOUS et al., 2018; RAJASINGHAM et al., 2017).

Em estudo realizado em 2009, a meningite criptococócica afetava cerca de 1 milhão de pessoas portadoras do HIV, com índices de mortalidade próximos a 65% e uma alta incidência de 75% dos casos na região da África subsaariana (PARK et al., 2009). Desde então, protocolos otimizados para o manejo da AIDS associados com técnicas de diagnóstico



mais acessíveis e precisas para a detecção de infecções fúngicas oportunistas trouxeram reduções significativas nos casos de mortalidade causadas por infecções fúngicas neste grupo de pacientes (DENNING, 2016). Estes fatores foram confirmados em estudo mais recente, que demonstrou uma queda no número de casos relatados de meningite criptocócica para cerca de 223 mil. Apesar do quadro apresentar queda nos números totais de pacientes com AIDS infectados, o que invariavelmente também reduz o número de mortes provocadas pela doença, deve-se ressaltar que a taxa de mortalidade se elevou para 81%, enquanto a taxa de incidência na região da África subsaariana permaneceu em 73%. Esses dados demonstram que essa região em específico ainda possui uma alta correlação com a meningite criptocócica e que os avanços medicinais supracitados ainda não impactaram a região (RAJASINGHAM et al., 2017).

O Brasil apresenta dados clínicos consistentes com os globais, com a criptococose sendo a segunda infecção fúngica com maior mortalidade no Brasil e a décima terceira causa de mortalidade no geral. Corroborando com a forte associação com HIV, a criptococose é a principal causa de morte de pacientes com AIDS entre as infecções fúngicas. Geograficamente, foram relatados casos de criptococose em todas as regiões brasileiras, reforçando a localização ubíqua do fungo (PRADO et al., 2009).

### **Imunidade antifúngica contra o *C. neoformans***

O desenvolvimento de resposta imunológica competente indica qual será o prognóstico que o hospedeiro apresentará quando em contato com o *C. neoformans*. Existem poucos estudos descrevendo a resposta imunocompetente frente à criptococose, devido a rápida resolução da infecção e a natureza assintomática da infecção. Neste aspecto a imunidade inata apresenta importante função, por modular a resposta adaptativa e ser a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o patógeno. No contexto da criptococose, as principais células da resposta imune inata possuem papéis e importância distintos.

Células dendríticas funcionam como uma das primeiras linhas de defesa localizadas no pulmão do hospedeiro, agindo no reconhecimento e internalização do fungo. Assim como em outras infecções, na criptococose estas células são essenciais para a ativação de resposta imune adaptativa, a partir da apresentação de antígenos para a ativação de linfócitos T específicos contra o *C. neoformans*. Células dendríticas possuem a capacidade de destruir

---

leveduras fagocitadas através de seu conteúdo lisossomal, mesmo em hospedeiros susceptíveis a doença (GIBSON; JOHNSTON, 2015; HOLE et al., 2012). Os neutrófilos também possuem capacidade fungicida frente ao *C. neoformans*, principalmente a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (SUN et al., 2016a). Apesar de apresentarem importância em sítios específicos durante a infecção disseminada (SUN et al., 2016b), estas células não são consideradas essenciais durante a patogênese, sendo o seu aumento relacionado à piora no quadro clínico do hospedeiro (OSTERHOLZER et al., 2009b).

Macrófagos por outro lado, assim como as células dendríticas, são considerados células essenciais para o controle de carga fúngica nos estágios iniciais da criptococose, sendo que macrófagos alveolares funcionam como uma primeira linha de defesa localizada no pulmão, reconhecendo e fagocitando o fungo (GIBSON; JOHNSTON, 2015). A importância dos macrófagos na defesa contra o fungo apresenta relatos contraditórios. Hospedeiros resistentes (ratos) apresentam uma piora na carga fúngica pulmonar quando passam pelo procedimento de depleção de macrófagos alveolares, enquanto hospedeiros susceptíveis (camundongos) apresentam uma diminuição em sua carga fúngica pulmonar (SHAO et al., 2005). Outro estudo também aponta que macrófagos murinos são importantes disseminadores do *C. neoformans*, demonstrando que a depleção de macrófagos nestes hospedeiros reduz a carga fúngica cerebral (KECHICHIAN; SHEA; DEL POETA, 2007). Juntos, estes estudos demonstram que macrófagos eficientemente ativados são importantes para o controle da doença, enquanto macrófagos precariamente ativados apresentam dificuldades para combater o fungo e acabam auxiliando em sua replicação e disseminação.

Devido a esta interação peculiar entre macrófagos e o fungo, macrófagos são as células mais estudadas no contexto da criptococose. Primeiramente, macrófagos precisam fagocitar as leveduras para a realização de suas ações efetoras, e esta fagocitose é primariamente auxiliada por moléculas opsonizantes, tendo em vista as capacidades antifagocíticas que o *C. neoformans* apresenta (KRONSTAD et al., 2011). Entretanto, um estudo demonstrou que um aumento da fagocitose está associado a um pior prognóstico em pacientes portadores de HIV, reforçando o caráter permissivo apresentado pelos macrófagos fracamente ativados (ROHATGI et al., 2013).

Um dos fatores que explicam o fato de macrófagos agravarem o curso da doença é o de que o *C. neoformans* tem a capacidade de agir como um patógeno intracelular facultativo, apresentando habilidade inata de sobrevivência e replicação no interior destas células

(FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001). Esta resistência intracelular é conferida graças a vários fatores de virulência do fungo, que permitem ao fungo modular e afetar vários mecanismos microbicidas do macrófago como: atraso na maturação do fagolisossomo (SMITH; DIXON; MAY, 2014); danos nas membranas do fagolisossomo (FELDMESSER et al., 2000); alterações em funções celulares realizadas por organelas citoplasmáticas (BEN-ABDALLAH et al., 2012); danos e promoção de deformações no citoesqueleto celular (CHEN et al., 2003); ativação de sinalizações relacionada à apoptose (MONARI et al., 2005b); morte celular resultando em lise do macrófago (O'MEARA et al., 2015); e extrusão não lítica ou “vomocitose” do fungo para o meio extracelular (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006).

Essas alterações promovidas pelo fungo auxiliam na explicação de como o macrófago negativamente modulado acaba por servir como um sítio de replicação intracelular e consequente disseminação do fungo do tecido pulmonar para demais tecidos, incluindo o cérebro. Desta forma, estudos abordando a interação inicial entre o *C. neoformans* e a imunidade do hospedeiro são considerados essenciais para uma melhor compreensão do curso da doença e do real impacto que as modulações promovidas pelo fungo exercem.

A resposta imune protetora contra a criptococose é usualmente caracterizada por um aumento nas citocinas pró-inflamatórias associadas a polarização da subpopulação de linfócitos T auxiliares 1 ou Th1 (*T helper 1*) e sua função efetora, como IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$  (UPADHYA et al., 2016). A resposta associada com linfócitos T auxiliares 17 ou Th17 (*T helper 17*), com a secreção de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-17, apresenta resultados mistos na literatura, com estudos demonstrando certa importância na ativação desta subpopulação, enquanto outros associam a maior presença de neutrófilos com uma piora no quadro da doença, dependendo do modelo de infecção utilizado (VOELZ; LAMMAS; MAY, 2009; WOZNIAK et al., 2011). De toda forma, um balanço entre as respostas Th1/Th17 é consensualmente considerado protetor frente a criptococose (MURDOCK et al., 2014a, 2014b). Por outro lado, a presença de citocinas anti-inflamatórias associadas a linfócitos T auxiliares 2 ou Th2 (*T helper 2*), como IL-4, IL-5 e IL-13, apresenta correlação com quadros mais graves da doença e a uma maior mortalidade. Interessantemente, este padrão de resposta é promovido pelo fungo em hospedeiros susceptíveis, reforçando a associação da doença com pacientes imunocomprometidos (OSTERHOLZER et al., 2009a).

A montagem de respostas imunes adaptativas protetoras (Th1/Th17) ou deletérias (Th2) é dependente de quais células imunes inatas entrarão em contato com o fungo e como eles reconhecerão o mesmo e serão ativadas. Para tal, células de imunidade inata recorrem a receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos ou a dano (PAMPs e DAMPs). As duas famílias principais envolvidas neste reconhecimento são as dos receptores *Toll-like* (TLRs) e dos receptores do tipo C-lectina (CLRs).

Alguns TLRs já foram descritos como sendo capazes de reconhecer PAMPs presentes no *C. neoformans*, sendo eles os TLRs 2, 4 e 9. Os TLRs 2 e 4 estão presentes no reconhecimento de polissacarídeos da cápsula fúngica, enquanto que o TLR9 apresenta-se importante no reconhecimento do DNA fúngico (CUNHA; ROMANI; CARVALHO, 2010).

Neste contexto, TLR2 apresenta resultados contraditórios na literatura, sendo visto como importante no reconhecimento do fungo, mas não necessariamente na montagem de uma resposta protetora. Primeiramente, estudos demonstraram que animais nocaute para TLR2 apresentaram uma mortalidade maior e uma produção diminuída de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos frente à infecção fúngica (BIONDO et al., 2005; YAUCH et al., 2004). Porém, outro estudo demonstrou que o nocaute de TLR2 em camundongos não alterava o perfil de citocinas produzidas e nem alterava a gravidade da infecção no pulmão, quando comparado a animais controle, creditando assim pouca importância no papel do TLR2 frente ao reconhecimento do fungo (NAKAMURA et al., 2006). Interessantemente, os estudos utilizavam a mesma linhagem de camundongo e o mesmo sorotipo de *C. neoformans* (sorotipo A), se diferenciando somente pela via de infecção dos animais. Todos os estudos acima também demonstraram que o TLR4 apresentava pouca contribuição em uma resposta protetora frente ao reconhecimento do *C. neoformans*, sendo que a deleção do receptor não gerava alterações no perfil de citocinas expressas por células dendríticas e por macrófagos, assim como não alterava a mortalidade do hospedeiro, corroborando com outro estudo que já havia sido publicado (SHOHAM et al., 2001).

O TLR9 é tido como responsável no balanço entre a resposta Th1 e Th2 na criptococose, sendo sua ativação importante graças ao favorecimento de uma polarização de resposta Th1, promovendo um aumento de citocinas pró-inflamatórias, assim como aumento na produção de óxido nítrico por macrófagos (NAKAMURA et al., 2008; WANG et al., 2011). Curiosamente, assim como a polarização para Th17, o reconhecimento do fungo por

TLR9 não se traduz em um combate efetivo contra o fungo durante os estágios iniciais da infecção, mas se mostra essencial para a montagem da resposta adaptativa. Esta resposta então leva a uma diminuição da carga fúngica pulmonar presente no hospedeiro durante a infecção tardia (ZHANG et al., 2010).

Os CLRs são receptores de fundamental importância no reconhecimento e promoção da resposta antifúngica, sendo dectina-1, dectina-2, dectina-3 e receptor de manose os receptores que, até o momento, estão mais associados ao reconhecimento contra PAMPs fúngicos (ROMANI, 2011). Surpreendentemente, o reconhecimento do *C. neoformans* promovido por CLRs de forma geral não é capaz de promover respostas protetoras ao hospedeiro.

Dectina-1, que é o principal receptor relacionado com reconhecimento de parede fúngica, não apresenta nenhuma importância na resposta frente a criptococose. Estudos demonstraram que a ausência deste receptor não promovia nenhuma piora no prognóstico do hospedeiro, tanto em carga fúngica quanto em mortalidade. Interessantemente, os estudos utilizaram tanto leveduras quanto esporos e mostraram uma ausência de reconhecimento do fungo pelo receptor de dectina-1 inclusive nos esporos, demonstrando que esta falta de reconhecimento e importância da ativação de dectina-1 está além do mascaramento da parede celular realizado pela cápsula (NAKAMURA et al., 2007; WALSH et al., 2017).

Dectina-2 é um receptor capaz de reconhecer mananas, que estão presentes tanto na parede celular quanto na cápsula do *C. neoformans*. A ativação de dectina-2 no contexto da criptococose apresenta resultados contraditórios. Um estudo demonstrou que a deleção de dectina-2 durante a infecção pelo *C. neoformans in vitro* promove uma queda drástica na resposta pró-inflamatória, enquanto que *in vivo* promove um aumento na resposta anti-inflamatória. Apesar destes resultados destoantes, a ausência de dectina-2 não era suficiente para alterar a carga fúngica pulmonar durante a infecção, existindo portanto pouca correlação entre sua ativação e a montagem de resposta protetora (NAKAMURA et al., 2015).

Dectina-3 é outro receptor com capacidade de reconhecer  $\alpha$ -mananas que, assim como dectina-2, não apresenta importância na resposta contra o *C. neoformans*. A ausência deste receptor não alterou o perfil de citocinas, o perfil de células presentes no local, a carga fúngica e nem a mortalidade associada à infecção (CAMPUZANO et al., 2017). Por último, o receptor de manose é um receptor capaz de reconhecer manoproteínas, que são um dos constituintes da cápsula polissacarídica (MANSOUR; LATZ; LEVITZ, 2006). A ativação dos

receptores de manose é considerada protetora contra a criptococose, visto que a deleção deste receptor leva a uma piora no prognóstico do hospedeiro, com presença de maior carga fúngica pulmonar e menor migração de linfócitos T para o local primário da infecção (DAN et al., 2008).

### **Inflamassomas e seu papel na criptococose**

Outra família de receptores de extrema importância para o reconhecimento de infecções fúngicas é a dos receptores do tipo NOD (NLRs). Todos os integrantes desta família descritos até então se localizam na porção citoplasmática das células, sendo considerados extremamente importantes também no combate contra bactérias intracelulares e vírus, sendo considerados essenciais para o reconhecimento de patógenos presentes no citoplasma por invasão celular ou que evadiram do fagolisossomo (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013). Os NLRs podem ser divididos em três subtipos distintos, denominados NOD; NLRP e IPAF (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Dentre estes subtipos, o mais relacionado a patógenos fúngicos até este momento são os NLRP. Estes receptores são reconhecidos pela habilidade de reconhecerem, além de PAMPs, uma ampla variedade de DAMPs. DAMPs são sinais de perigo que não derivam diretamente de um patógeno, mas sim do possível dano que ele ou outras condições patogênicas trazem às células do hospedeiro. Desta maneira, estes sinais estão presentes em situações de ativação de imunidade inata, sendo liberados pelas células do hospedeiro após uma morte não programada, ou propositalmente por células do sistema imune. Os DAMPs são em sua grande maioria de origem intracelular, podendo ser encontrados após o rompimento das células (proteínas de grupo de alta mobilidade – HMGB1) ou após serem secretados pelas mesmas (proteína do choque térmico – HSP). Essas moléculas podem ser proteicas (complemento C3a) ou não (RNA próprio ou adenosina trifosfato – ATP) (VÉNÉREAU; CERIOTTI; BIANCHI, 2015).

Apesar de extremamente associada a respostas inflamatórias exacerbadas, a ativação de receptores NLRP tem papel importante na regulação da microbiota, especialmente intestinal. Estudo demonstram que a ausência destes receptores ou proteínas envolvidas na sinalização subsequente predis põem os hospedeiros a quadros mais exacerbados de manifestações inflamatórias associadas ao trato intestinal (CHEN, 2017). Apesar de controverso, acredita-se que o reconhecimento coordenado destes DAMPs pelos NLRP é de

vital importância para a manutenção da homeostasia, principalmente por meio de respostas inflamatórias exacerbadas, que previnem a disbiose e sinais pró-inflamatórios mais robustos.

A função pró-inflamatória relacionada aos receptores NLRP se dá a partir capacidade que receptores NLR tem em se oligomerizar, formando um complexo proteico denominado inflamassoma (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Este complexo proteico apresenta alta massa molecular e é capaz de ativar caspases pró-inflamatórias. Diversos NLRs são capazes de gerar a formação de inflamassomas, o que faz com que o reconhecimento de diversos tipos de DAMPs e PAMPs levem a ativação destes complexos (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). Entre os principais inflamassomas estudados em infecções encontram-se: NLRP1b, responsável por reconhecer e proteger o hospedeiro contra *Bacillus anthracis* (TERRA et al., 2010); NLRC4, inflamassoma gerado a partir da ativação de um receptor do subtipo IPAF que é capaz de reconhecer dois componentes bacterianos vitais: flagelina, uma importante proteína associada a locomoção bacteriana (MIAO et al., 2006) e proteínas participantes dos sistemas secretores do tipo III e IV, relacionadas com a secreção de fatores de virulência em células do hospedeiro (MIAO et al., 2010); AIM2, inflamassoma classicamente relacionado com o reconhecimento de material genético em bactérias e especialmente em vírus (KANNEGANTI, 2010); e NLRP3, que é o principal inflamassoma estudado atualmente, devido a sua importância em diversas patologias e sua capacidade de reconhecer patógenos bacterianos, virais, parasitários e fúngicos (LAMKANFI; DIXIT, 2012).

Devido à grande diversidade de microrganismos reconhecidos pelo NLRP3, é postulado que a ativação deste receptor ocorra de maneira indireta, através do reconhecimento de DAMPs liberados a partir de danos gerados durante a infecção. Corroborando com este pressuposto, é sabido que diversos destes sinais de dano como: ATP, ácido úrico e cristais de colesterol são capazes de ativar o NLRP3. Além desses, também foi constatado que irritantes ambientais como sílica, amianto e radiação UVB eram capazes de ativar o inflamassoma NLRP3 (BAUERNFEIND; HORNING, 2013). O NLRP3 também é ativado quando em contato com a proteína heme, liberada por eritrócitos, corroborando com o papel de regulador da homeostasia atribuído a este inflamassoma, apesar de que sua participação exacerbada também pode ser indicativa de transtornos inflamatórios hemolíticos (ERDEI et al., 2018).

A ativação do inflamassoma NLRP3 por DAMPs não é capaz de explicar como moléculas que não compartilham nenhum padrão em comum são capazes de ativar um único receptor. Desta forma, estudos foram realizados para se determinar quais seriam os eventos



essenciais para que o receptor NLRP3 fosse ativado e promovesse a oligomerização do inflamassoma. Atualmente, quatro sinais são considerados como capazes de promover esta ativação, sendo eles: o efluxo de potássio celular (MUÑOZ-PLANILLO et al., 2013); a translocação do receptor NLRP3 para a mitocôndria (MISAWA et al., 2013); a produção de reativos de oxigênio (ROS) mitocondriais (ZHOU et al., 2011) e a partir da desestabilização de fagolisossomos, com a liberação de catepsinas lisossomais (HORNUNG et al., 2008). Apesar do consenso sobre estes sinais, nenhum deles é universal e por vezes a inibição destes sinais isoladamente é o suficiente para prevenir a ativação do receptor NLRP3, o que coloca em dúvida a existência de eventuais mecanismos de redundância entre eles (BAUERNFEIND et al., 2011). Mesmo com toda a gama de patógenos reconhecidos pelo NLRP3 tendo sido reduzida a quatro eventos, ainda assim estes eventos se apresentam muito distintos entre si, o que novamente reforça que a ativação do NLRP3 descrita até o momento é indireta, necessitando de adaptadores ainda desconhecidos para uma ligação direta com o receptor (LAMKANFI; DIXIT, 2014).

Sob o ponto de vista estrutural simplificado, o inflamassoma NLRP3 é composto de um receptor (NLRP3), uma proteína adaptadora (ASC) e uma proteína efetora (caspase-1). A ativação canônica deste inflamassoma, com a participação dos componentes descritos acima, envolve a ativação do receptor NLRP3 pelos sinais previamente descritos, levando ao recrutamento e interação com o adaptador ASC, que por sua vez recruta a pró-caspase-1, fazendo uma ligação entre estas proteínas. A ligação das pró-caspases-1 promove uma autoclivagem da mesma, gerando a caspase-1, proteína ativa que exerce a função efetora do inflamassoma. Alternativamente, a proteína efetora caspase-8 pode ser clivada e promover a efetividade do inflamassoma, seja por mecanismos independentes de NLRs ou por acoplamento da caspase-8 em conjunto com a caspase-1, sendo a utilização da caspase-8 denominada de via não-canônica do inflamassoma (GRINGHUIS et al., 2012). Sob o ponto de vista funcional, o inflamassoma NLRP3 é responsável pela clivagem de citocinas imaturas pró-inflamatórias, como pró-IL1 $\beta$  e pró-IL18, promovendo a secreção de suas porções ativas IL-1 $\beta$  e IL-18, respectivamente (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Outro evento importante relacionado a ativação do inflamassoma é a promoção de uma morte celular rápida e altamente inflamatória, denominada piroptose. A piroptose é considerada na grande maioria das interações protetora contra infecções por patógenos intracelulares (JORGENSEN; MIAO, 2015) e diversos estudos relacionam este



---

evento com uma liberação robusta de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  (CULLEN et al., 2015; LIU et al., 2014).

Apesar de aparentar ser uma via de sinalização bastante direta, com um receptor, uma proteína adaptadora e uma proteína efetora, o inflamassoma é usualmente regulado em dois momentos distintos, necessitando por vezes de dois sinais específicos para a sua total ativação e funcionamento, o que diferencia esta via de outras ativadas por PRRs clássicos. O primeiro sinal necessário é um sinal prévio à ativação do NLRP3 e serve para que haja a produção de um número suficiente destes receptores para a oligomerização do inflamassoma. Este sinal é fornecido a partir da ativação do NF- $\kappa$ B, geralmente por PRRs de membrana como TLRs e CLRs, e induz a produção de NLRP3 assim como também a produção de pró-IL1 $\beta$  e pró-IL-18, substratos necessários para a ação do inflamassoma (LAMKANFI; DIXIT, 2012; LATZ; XIAO; STUTZ, 2013). Estudos recentes demonstraram que, além desta importante indução, este primeiro sinal promovido pelos PRRs de membrana também promove a fosforilação do NLRP3, evento essencial para a subsequente oligomerização deste receptor (SONG et al., 2017). O segundo sinal é o sinal já discutido previamente, ou seja, a ativação do NLRP3 em si a partir de eventos relacionados a DAMPs.

O estímulo orquestrado por estes dois sinais leva a oligomerização de um grande número de receptores NLRP3, que por sua vez se ligam a proteínas ASC, se ligando subsequentemente a pró-caspases, formando uma plataforma multiproteica, explicando o motivo do inflamassoma ser considerado um complexo de alta massa molecular (LU; WU, 2015). Curiosamente, nem todos os tipos celulares necessitam dos dois sinais para apresentarem uma plataforma inflamassoma funcional, sendo por vezes necessário somente o primeiro, como em células dendríticas e monócitos. Teorias sugerem que isto se deve ao fato de os níveis de NLRP3 expressos nos mais diversos tipos celulares serem bastante variados, podendo se apresentar desde níveis basais extremamente baixos (macrófagos e células epiteliais) até níveis mais elevados (monócitos e células dendríticas) (HE; FRANCHI; NUNEZ, 2013; NETEA et al., 2009).

Graças ao processamento de citocinas chave no processo de inflamação, é possível afirmar que a ativação do inflamassoma leva a uma resposta intensamente pró-inflamatória, o que em um primeiro momento é benéfico no combate a infecções fúngicas, graças ao estímulo a uma polarização de resposta *Th1/Th17*, promovida pelas citocinas IL-18 e IL-1 $\beta$  respectivamente (VAN DE VEERDONK et al., 2011). Porém, a ativação exacerbada e/ou

constante desta via pode trazer danos a longo prazo, resultando na piora do quadro clínico do hospedeiro em casos específicos, como na aspergilose invasiva pulmonar em camundongos com fibrose cística (MORETTI et al., 2014). Este balanço entre resposta inflamatória protetora e deletéria é um indicio da necessidade de uma regulação mais rígida em relação a ativação do inflamassoma, com o envolvimento de dois sinais distintos.

O primeiro patógeno fúngico cujo o reconhecimento mediante NLRs foi descrito foi *Candida albicans*. Simultaneamente, três estudos foram publicados indicando a ativação do receptor NLRP3 e montagem do inflamassoma frente a infecção por *C. albicans* (GROSS et al., 2009; HISE et al., 2009; JOLY et al., 2009), descrevendo também: os receptores de membrana (TLR-2 e dectina-1), as vias de sinalização do primeiro sinal (SyK dependente) e os mecanismos de segundo sinal (produção de ROS, efluxo de potássio e liberação de catepsina B) envolvidos. Estes três estudos também compartilhavam a indicação de que, havendo deleção de qualquer uma das principais proteínas envolvidas na plataforma do inflamassoma NLRP3, havia um pior prognóstico da infecção para o hospedeiro. Outro estudo demonstrou que, além do NLRP3, o reconhecimento de *C. albicans* pelo inflamassoma NLRC4 também era importante, especialmente no contexto de infecções orais (TOMALKA et al., 2011). Apesar deste estudo, o inflamassoma NLRP3 ainda é tido como central no combate à candidíase.

A partir da demonstração de importância do reconhecimento de um patógeno fúngico a partir do NLRP3, diversos outros gêneros de fungos foram estudados, em busca da real importância deste receptor no reconhecimento e montagem de respostas antifúngicas (Tabela 1). O reconhecimento da forma hifal do *A. fumigatus*, causador da segunda infecção fúngica mais prevalente após a candidíase, promove uma ativação do NLRP3, sendo esta dependente da via SyK (e consequentemente da ativação de dectina-1), da produção de ROS e do efluxo de potássio (SAÏD-SADIER et al., 2010). Um estudo mais recente demonstrou que, além do receptor NLRP3, a ativação do receptor AIM-2 também era essencial para o reconhecimento efetivo do fungo e a ativação mais robusta de uma resposta inflamatória (KARKI et al., 2015). Este trabalho demonstrou que NLRs em um contexto fúngico são capazes de realizar um “*cross-talk*”, ou seja, mais de um receptor ser ativado pelo mesmo patógeno e produzirem uma resposta ampliada, evento já considerado corriqueiro entre os PRRs de membrana. Indo além, o trabalho também mostrou que dois receptores distintos do tipo NLR são capazes de se

oligomerizar e formar uma única plataforma inflamassoma, a partir do recrutamento simultâneo de ASC e de caspases pró-inflamatórias (caspase-1 e caspase-8).

Tabela 1: Fungos estudados quanto à ativação do inflamassoma, com ênfase nas condições para tal ativação e consequência da deleção de seus componentes para o hospedeiro.

Agente Infecioso	Inflamassoma Envolvido	Via de Ativação do NF- $\kappa$ B	Mecanismos de Ativação do Inflamassoma	Deleção de Componentes do Inflamassoma	Referência Bibliográfica
<i>C. albicans</i>	NLRP3/NLRC4	TLR2/ Dectina-1/ SyK	ROS/ K <sup>+</sup> / Catepsina B	Susceptibilidade do Hospedeiro	Hise et al., 2009 Gross et al., 2009 Joly et al., 2009 Tomalka et al., 2011
<i>A. fumigatus</i>	NLRP3/AIM-2	SyK	ROS/ K <sup>+</sup>	Susceptibilidade do Hospedeiro	Saïd-sadier et al., 2010 Karki et al., 2015
<i>C. neoformans</i>	NLRP3	SyK	ROS/ K <sup>+</sup> / Catepsina B	Susceptibilidade do Hospedeiro	Lei et al., 2013 Guo et al., 2014 Chen et al., 2015
<i>T. schoenleinii</i>	NLRP3	Não Estudado	ROS/ K <sup>+</sup> / Catepsina B	Não Estudado	Li et al., 2013
<i>M. canis</i>	NLRP3	Dectina-1/ SyK	ROS/ K <sup>+</sup> / Catepsina B	Não Estudado	Mao et al., 2014
<i>Malassezia spp.</i>	NLRP3	Dectina-1/ SyK	K <sup>+</sup>	Não Estudado	Kistowska et al., 2014
<i>P. brasiliensis</i>	NLRP3	Dectina-1/ SyK/ MyD88	ROS/ K <sup>+</sup> / Catepsina B	Susceptibilidade do Hospedeiro	Tavares et al., 2013 Feriotti et al., 2017
<i>F. pedrosoi</i>	NLRP3	Dectina-1; 2; 3 SyK	ROS/ K <sup>+</sup> / Catepsina B	Sem Prejuízo ao Hospedeiro	Castro et. Al., 2017

Fungos causadores de dermatofitoses também foram descritos como ativadores de NLRP3. O inflamassoma NLRP3 se mostrou importante no combate contra *Trichophyton schoenleinii* (LI et al., 2013) e *Microsporum canis* (MAO et al., 2014), sendo que produção de ROS, efluxo de potássio e liberação de catepsina B foram considerados essenciais para a ativação do mesmo. O estudo realizado com *M. canis* também indicou a necessidade da ativação de dectina-1 e da via mediada por SyK, sendo que esta necessidade também foi encontrada para algumas espécies do gênero *Malassezia*, um fungo comensal causador de infecções cutâneas (KISTOWSKA et al., 2014). Considerando patógenos primários, nosso grupo verificou a importância do NLRP3 contra o *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo termodimórfico com grande incidência na América Latina. Novamente foi verificada a

importância de *dectina-1*, SyK e dos eventos relacionados ao segundo sinal (TAVARES et al., 2013). Recentemente, esta ativação do NLRP3 pelo *P. brasiliensis* foi confirmada em modelo de infecção murina, indicando também que a deleção de elementos relacionados ao inflamassoma NLRP3 levava à uma diminuição da resposta protetora *Th1/Th17*, com consequente piora no controle da carga fúngica pulmonar e hepática e maior mortalidade ao hospedeiro (FERIOTTI et al., 2017).

Nosso grupo também descreveu a ativação do NLRP3 em infecções promovidas pelo fungo demáceo *Fonsecaea pedrosoi*, causador de doença dérmica crônica denominada cromoblastomicose. A resposta inflamatória promovida pelo inflamassoma era dependente do reconhecimento fúngico por *dectina-1*, *dectina-2* e *dectina-3*, além da via de sinalização dependente de SyK e do efluxo de potássio, liberação de catepsina B e produção de ROS. Interessantemente, a deleção do receptor NLRP3 ou da proteína efetora caspase-1 não promoveram nenhum impacto no hospedeiro durante a infecção murina (CASTRO et al., 2017). Em conjunto, os estudos envolvendo a ativação do inflamassoma por patógenos fúngicos reforçam a importância dos CLRs contra infecções fúngicas, acrescentando o inflamassoma NLRP3 como outro componente central na imunidade antifúngica (Figura 1) (TAVARES; BÜRCEL; BOCCA, 2015). Esta intercomunicação principalmente entre *dectina-1* e NLRP3 sugere que parte da importância na montagem de resposta antifúngica creditada aos CLRs se deve em parte ao NLRP3.

O primeiro estudo envolvendo a ativação do NLRP3 pelo *C. neoformans* revelou que uma cepa proveniente de infecção não era capaz de ativar o inflamassoma NLRP3, em sua forma usual de levedura capsular. No entanto, quando o fungo era induzido a formar biofilme, a ativação do inflamassoma era observada. Enquanto nenhuma produção significativa de IL-1 $\beta$  era observada quando células do sistema imune interagiam com as leveduras, a interação com a forma de biofilme levava a altas produções desta citocina, sendo esta produção dependente da ativação canônica do NLRP3, ou seja, sendo necessária a ativação do receptor NLRP3, do adaptador ASC e da proteína caspase-1. Foi verificado também que esta ativação era dependente dos mecanismos propostos para a ativação do inflamassoma, ou seja, a inibição na produção de ROS, o bloqueio do efluxo de potássio e o impedimento da liberação de catepsina B impediam a produção de IL-1 $\beta$  frente à infecção pelo biofilme do *C. neoformans*. Ultimamente, o estudo também demonstrou que a deleção do receptor NLRP3 ou do adaptador ASC levava ao agravamento da criptococose no hospedeiro, indo em

concordância com os resultados encontrados para a grande maioria dos patógenos fúngicos (LEI et al., 2013). Curiosamente, a infecção neste estudo foi realizada com a forma leveduriforme do fungo, que era incapaz de promover a ativação do inflamassoma *in vitro*.

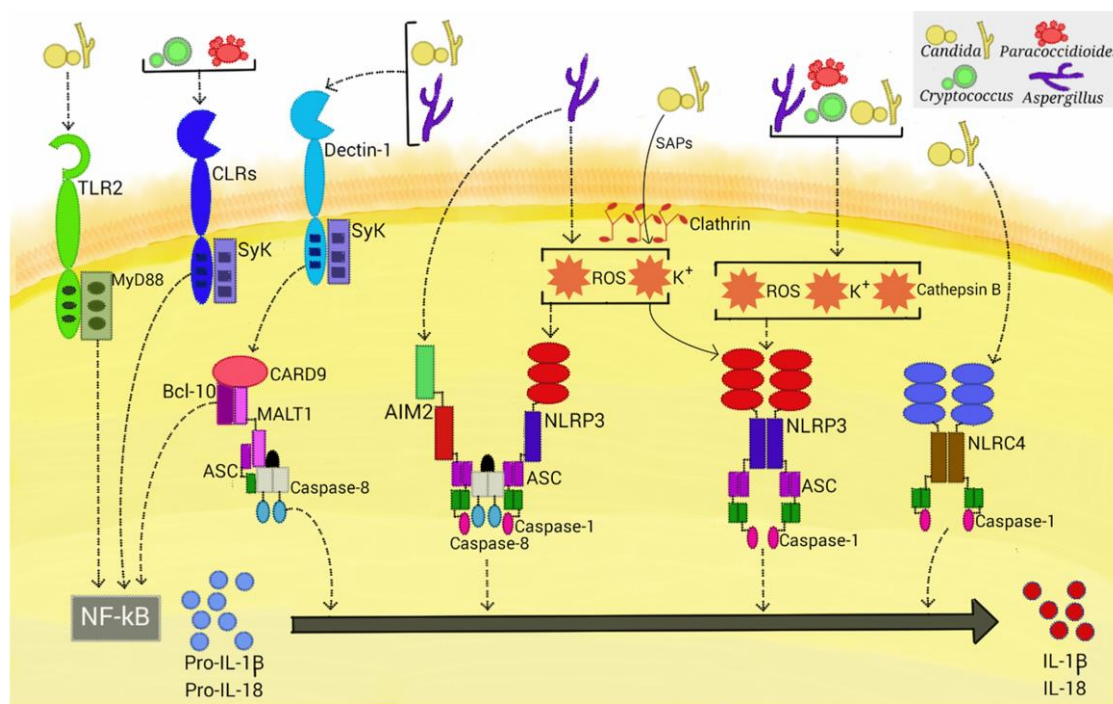


Figura 1 – Esquema representativo do reconhecimento de patógenos fúngicos promotores de doenças sistêmicas com subsequente ativação de plataformas de inflamassoma, destacando receptores, eventos necessários para a ativação intracelular e principais proteínas envolvidas. Retirado de (TAVARES; BÜRCEL; BOCCA, 2015).

Após este primeiro trabalho, outros dois estudos sugeriram e demonstraram que a ativação do inflamassoma NLRP3 pelo *C. neoformans* não era tão direta quando comparado com outros fungos, necessitando-se de morfologias diferenciais ou pré-requisitos para que o fungo fosse reconhecido pelo receptor intracelular. Um aspecto essencial na modulação da ativação do inflamassoma durante a infecção por *C. neoformans* é o componente principal de sua cápsula polissacarídica, a glucuronoxilomanana (GXM). Utilizando o mutante acapsular de *C. neoformans* *cap59Δ* e seu tipo selvagem encapsulado H99 observou-se que a linhagem *cap59Δ* induz significativamente a ativação do inflamassoma e consequente produção de IL-1 $\beta$  tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em comparação com a cepa H99. Este estudo também demonstrou de que era necessário o fungo viável para a ativação do inflamassoma e de que a reposição artificial de polissacarídeos capsulares secretados na cepa mutante inibia esta

ativação (GUO et al., 2014). Por último, reportou-se que as leveduras capsulares viáveis de *C. neoformans* eram capazes de ativar o inflamassoma NLRP3, desde que previamente opsonizadas e fagocitadas. As particularidades da ativação do inflamassoma por leveduras opsonizadas incluem: a participação de caspase-8 para a completa efetividade do inflamassoma; a diferença no nível de ativação verificado entre diferentes sorotipos e uma ativação menos robusta da via quando em comparação com os respectivos mutantes acapsulares (CHEN et al., 2015). No geral, os estudos demonstram que o *C. neoformans* ativa o inflamassoma NLRP3 e que o mesmo é importante para o hospedeiro no combate a infecção. Especificamente, foi demonstrado que a presença da cápsula ou de seus componentes é capaz de inibir pelo menos parcialmente a ativação do inflamassoma, provavelmente pela prevenção de reconhecimento do fungo pelos PRRs de membrana plasmática.

### **Estratégias de evasão da resposta imune do gênero *Cryptococcus***

A capacidade de um microrganismo sobreviver dentro de um hospedeiro susceptível, coloniza-lo, proliferar e promover uma patologia a partir de um determinado número de células é denominada virulência. A virulência de um patógeno é considerada amplamente subjetiva, pois geralmente é medida a partir do valor do inóculo necessário para promover 50% de letalidade em um hospedeiro, sendo desta forma regida por variáveis referentes às condições da cepa utilizada, a via de infecção e o hospedeiro afetado. Desta forma, alguns autores defendem que todos estes fatores devem ser levados em consideração, para se criar um valor global que permitiria a comparação entre patógenos distintos entre si, valor este denominado de potencial patogênico (CASADEVALL, 2017).

Fatores de virulência são considerados certos componentes, mecanismos ou ações que permitem que o patógeno alcance a capacidade supracitada (CROSS, 2008). Existem diversos argumentos contraditórios acerca do que se enquadraria ou não dentro destes fatores. Desde a concretização da teoria do germe e a percepção de que existiam microrganismos que provocavam ou não a patologia no hospedeiro (patógeno contra comensal), tentou se achar quais eram as características que separavam estes dois tipos de microrganismos. Muitos destes achados foram contraditos, principalmente quando se descobriu o fato de que microrganismos comensais também podiam promover patologias, porém estes estudos foram essenciais para



pavimentar a base de conhecimento atual e direcionar novos achados. Atualmente o que se busca é um entendimento mais aprofundado destes fatores de virulência, em um contexto molecular, genético e de interação com o hospedeiro, visando alvos específicos para a terapia e prevenção de infecções (ALLEN et al., 2014; AZEVEDO; RIZZO; RODRIGUES, 2016).

Fungos patogênicos oportunistas e primários costumam possuir uma gama de fatores de virulência, que garantem a sobrevivência do microrganismo e a evasão do sistema imune nas interações com o hospedeiro susceptível. O *C. neoformans* apresenta fatores de virulência capazes de modular a efetividade das células imunes, principalmente em um contexto de imunocomprometimento. Interessantemente, preconiza-se que esses fatores de virulência foram selecionados graças ao stress ambiental pelo qual o fungo saprófita é submetido, como por exemplo na forma de amebas predadoras com mecanismos fagocíticos próximos aos executados pelos fagócitos mamíferos (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

Entre os fatores de virulência do *C. neoformans* considerados como clássicos podemos citar: Capacidade de crescimento a 37°C; Secreção de enzimas como fosfolipases (SANTANGELO et al., 2004), urease (FU et al., 2018), lacase (WILLIAMSON, 1997) e superóxido dismutases (COX et al., 2003) ; Presença de melanina em sua parede celular quando dentro do hospedeiro, em presença de fontes de L-DOPA (WILLIAMSON, 1997); presença de uma cápsula mucopolissacarídica, que geralmente se apresenta anexada à parede celular do fungo (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012) e a secreção de vesículas extracelulares que carregam alguns dos fatores de virulência supracitados (RODRIGUES et al., 2008).

As enzimas secretadas pelo *C. neoformans* são essenciais para o estabelecimento da doença em hospedeiros susceptíveis, sendo que mutantes que apresentem deleção nos genes codificantes destas enzimas se apresentam hipovirulentos quando comparados ao fungo selvagem (Figura 2). A depleção de fosfolipase B, enzima relacionada com a manutenção da integridade da parede fúngica e com a invasão do fungo em tecidos, leva a infecções mais brandas em modelos de meningite em coelhos, com menor mortalidade e carga fúngica (COX et al., 2001). A depleção de lacase também reduz a virulência do fungo durante a criptococose, observando-se a diminuição da deposição de melanina na parede fúngica como consequência direta da ausência da enzima (SALAS et al., 1996). Urease, enzima associada à transmigração cerebral promovida pelo fungo, é outra enzima que quando depletada resulta em hipovirulência ao fungo. Mutantes sem a expressão de urease apresentavam menor carga

fúngica cerebral, apesar de outros órgãos não apresentarem diferenças em sua carga fúngica (OLSZEWSKI et al., 2004). Outras enzimas, como DNAses e superóxido dismutases, também são associadas com uma maior virulência. Apesar de não haverem estudos com mutantes destas enzimas, verificou-se que cepas consideradas mais virulentas possuem uma produção aumentada destas enzimas (JACOBSON; JENKINS; TODD, 1994; SÁNCHEZ; COLOM, 2010).

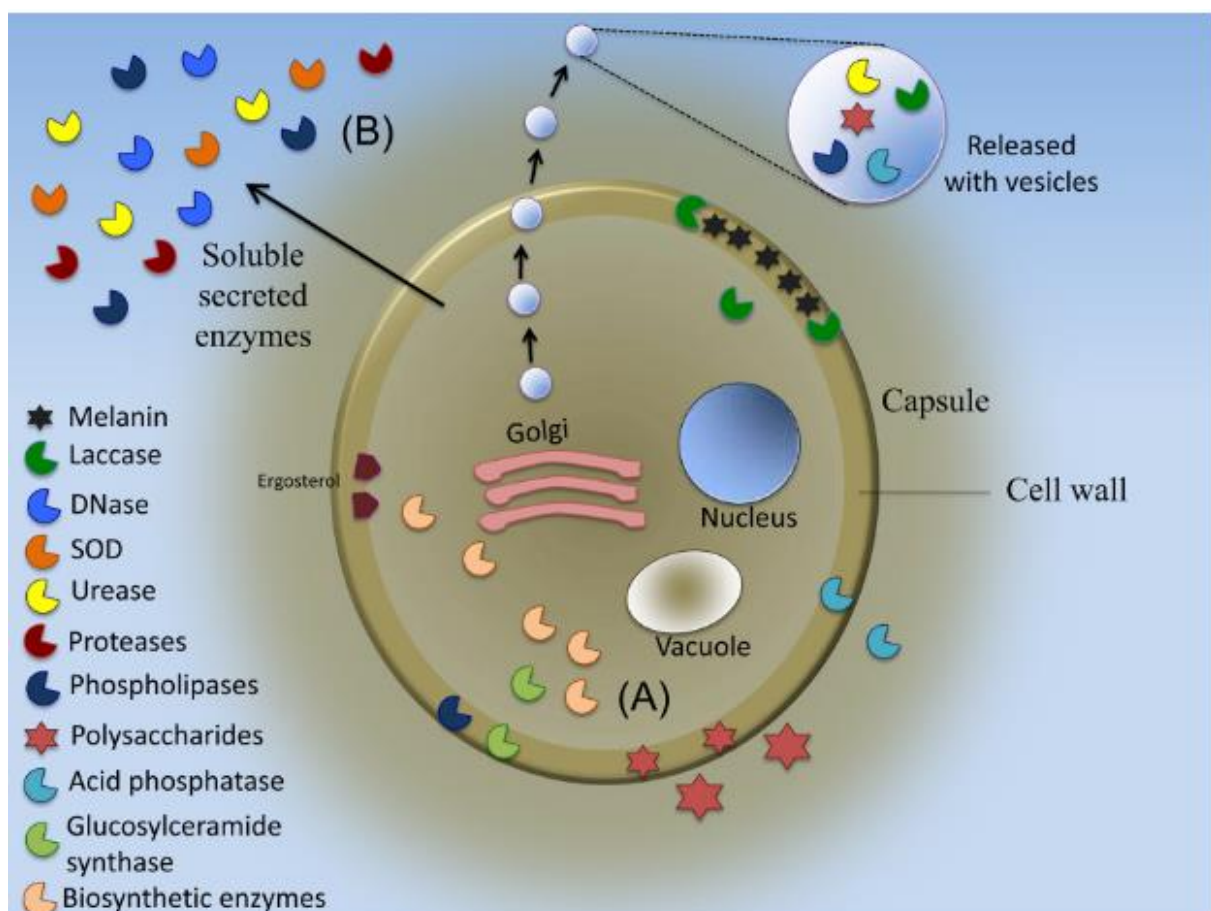


Figura 2 – Esquema demonstrando a localização de enzimas consideradas importantes para a virulência. Elas podem se localizar internamente, secretadas livremente ou dentro de vesículas extracelulares. Retirado de (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

Apesar da grande importância creditada às enzimas secretadas no contexto de virulência, o fator de virulência considerado como principal do gênero *Cryptococcus* é a sua cápsula polissacarídica, que é composta essencialmente pelos polissacarídeos glucoronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), além de uma pequena fração de manoproteínas (ZARAGOZA et al., 2009). Apesar de manoproteínas serem reconhecidas pelo receptor de manose, levando a ativação de uma resposta protetora previamente descrita, a



cápsula do *C. neoformans* é notoriamente conhecida pelos seus polissacarídeos, que são reconhecidos principalmente pelos TLRs 2 e 4. Interessantemente, a ativação destes receptores no contexto da criptococose não leva a sinalização pró-inflamatória esperada, e sim a uma imunossupressão e dificuldade na ativação celular apropriada. Credita-se esta ação supressora a ativação de outros receptores, como FcγRIIB e CD18, cuja ativação leva a regulação negativa do NF-κB, limitando assim a montagem de uma resposta pró-inflamatória (MONARI et al., 2006; MONARI; BISTONI; VECCHIARELLI, 2006). Além de conseguir subverter o reconhecimento e sinalização dos receptores de membrana, a cápsula concede ao fungo a capacidade de evadir a fagocitose, principalmente em macrófagos residentes, graças ao mascaramento de sua parede celular, impedindo que receptores fagocíticos reconheçam o fungo (KOZEL; GOTSCHLICH, 1982; PANEPINTO et al., 2007). Neste contexto, moléculas de GXM são capazes de interferir na deposição de complemento C3 na superfície do fungo, a partir da modificação do volume e compactação da cápsula, promovendo a internalização desta molécula em suas camadas, impedindo assim sua função opsonizante (ZARAGOZA; TABORDA; CASADEVALL, 2003). Estudos indicam que a cápsula também é importante para a sobrevivência do *C. neoformans* dentro das células do hospedeiro, graças à capacidade adquirida de resistir às espécies reativas de oxigênio geradas pela resposta imune (ZARAGOZA et al., 2008).

Entretanto, a cápsula do *C. neoformans* não concede ao fungo somente propriedades defensivas. Já são bem descritas as ações que os polissacarídeos de cápsula, especialmente o GXM, exercem sobre as células e moléculas do sistema imune, inibindo ou abortando totalmente o pleno funcionamento das mesmas. Uma característica notável destas intervenções é a extensa gama de funções e células que são afetadas, tanto na imunidade inata quanto adaptativa (MONARI; BISTONI; VECCHIARELLI, 2006; VECCHIARELLI et al., 2013). Alguns exemplos incluem: Inibir a adesão de neutrófilos ao epitélio ativado, interferindo nas integrinas dos neutrófilos e nas selectinas do epitélio (ELLERBROEK et al., 2002, 2004); Suprimir a produção de quimiocinas por neutrófilos (MONARI et al., 2002); Reduzir a proliferação e atividade de linfócitos T, tanto na apresentação de antígenos por células dendríticas quanto na presença de mitógenos diretos, por meio de mecanismos que envolvem a sinalização por CD45 e mantem a viabilidade dos linfócitos (MARIANO ANDRADE et al., 2003; PERICOLINI et al., 2010; YAUCH; LAM; LEVITZ, 2006); Reduzir diretamente a ativação e produção de moléculas co-estimulatórias em macrófagos e células

dendríticas, especialmente MHC de classe II (MONARI et al., 2005a; VECCHIARELLI et al., 2003); Promover a apoptose de linfócitos T, a partir da ativação da via Fas em macrófagos (MONARI et al., 2005b). Essas intervenções descritas contribuem no entendimento dos eventos imunossupressivos que são visualizados durante a criptococose, como a redução na migração celular leucocitária (LIPOVSKY et al., 1998) e a diminuição das respostas pró-inflamatórias durante a infecção (VECCHIARELLI et al., 1996), reforçando a importância da cápsula e seus componentes como principal fator de virulência do *C. neoformans*.

Na última década estudos desvendaram uma nova forma de interação entre fungos e os seus hospedeiros: a produção e secreção de vesículas extracelulares (EVs) (RODRIGUES et al., 2007). Esta estratégia é amplamente utilizada por microrganismos em geral, inclusive com um papel importante na virulência e patogênese destes seres (BROWN et al., 2015). Em *C. neoformans*, EVs são secretadas em tamanhos heterodoxos (20-400 nm) e com conteúdo diversificado (Figura 2). Dentro deste conteúdo destacam-se moléculas de GXM empacotadas e as enzimas previamente descritas associadas com virulência, como lacase, urease, fosfatase ácida, superóxido dismutase, tireodoxinas, catalase e proteínas de choque térmico, sendo que estas moléculas se encontram biologicamente ativas dentro das EVs (RODRIGUES et al., 2008). Recentemente, foi reportado que EVs de diferentes espécies fúngicas (*C. neoformans*, *P. brasilienses*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*) carregam porções não codificadoras de RNA mensageiro fúngico para o meio extracelular. Interessantemente, cerca de 10% dos RNAs identificados eram comuns às 4 espécies estudadas, além de sequências com características de microRNA silenciadores (miRNA) (PERES DA SILVA et al., 2015).

Com esta variedade de conteúdo, EVs de *C. neoformans* já apresentaram efeitos diversos em células do hospedeiro, como a sua incorporação por macrófagos, com consequente ativação e produção de citocinas (OLIVEIRA et al., 2010) e o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica frente à invasão promovida pelo fungo (HUANG et al., 2012). O fato de contribuir com a patogênese, carregando uma série de fatores de virulência, fez com que as EVs ganhassem a alcunha de “bolsões de virulência”. Atualmente cogita-se uma série de funcionalidades para a secreção de EVs, como o aumento de virulência, o auxílio à produção da capsula e até mesmo a comunicação com outros fungos e/ou células do hospedeiro (BIELSKA; MAY, 2015). Corroborando com esta hipótese, um estudo recente demonstrou que EVs de *C. gattii* eram capazes de promover um estado denominado “divisão de trabalho”, estado em que determinadas células entram em dormência

enquanto outras se multiplicam rapidamente. EVs derivadas de uma cepa hipervirulenta eram capazes de promover este estado em cepas hipovirulentas já fagocitadas por macrófagos, sendo que sem este estímulo o fungo era prontamente eliminado pelo fagócito (BIELSKA et al., 2018). Desta forma, é possível verificar duas das hipóteses das funções creditadas pelas EVs em um único exemplo: a comunicação entre indivíduos e o aumento da patogenicidade.

### **Meio Condicionado de *C. neoformans* e seu efeito na ativação do inflamassoma**

Em trabalho prévio, nosso grupo demonstrou que moléculas secretadas pela cepa selvagem B3501 possuíam a capacidade de inibir a ativação do inflamassoma em macrófagos murinos derivados de medula óssea (BÜRCEL, 2015). A metodologia utilizada envolvia a preparação de meio condicionado para a cepa B3501 (CM35) e para a correspondente mutante acapsular  $\Delta cap67$  (CMCAP), a partir de cultura por 5 dias em meio mínimo (MM). Os resultados demonstraram que macrófagos primados tratados com CM35 apresentavam uma redução robusta na secreção de IL-1 $\beta$ . Em contrapartida, o tratamento foi capaz de alterar a secreção de TNF- $\alpha$ , uma citocina independente da ativação de inflamassoma, indicando que a inibição promovida pelo CM35 se dava na via do inflamassoma.

Diversos tratamentos visando fracionar o meio condicionado quanto ao: tamanho de suas moléculas; afinidade polar; resistência ao calor e susceptibilidade a clivagem por proteases foram realizados. A molécula presente no CM35 se demonstrou pequena (<1kDa), polar, resistente ao calor (121°C) e resistente a ação de diversas proteases.

O estudo também avaliou a interferência do CM35 em outros eventos relacionados com a ativação do inflamassoma, como a liberação de LDH a partir da ativação do NLRP3 (evento indicativo de morte celular por piroptose) e a produção de pró-IL-1 $\beta$  intracelular (evento anterior a ativação do NLRP3, coordenado pela ativação de NF- $\kappa$ B). Macrófagos tratados com CM35 apresentavam uma proteção praticamente completa frente a ativação da piroptose, exibindo baixos níveis de LDH em seu sobrenadante. Em relação a produção de pró-IL-1 $\beta$ , macrófagos tratados com CM35 apresentavam um acúmulo significativo de níveis intracelulares desta citocina. Curiosamente, macrófagos tratados com CMCAP também apresentaram um acúmulo nos níveis de pró-IL-1 $\beta$ . Em conjunto, estes resultados confirmam que o tratamento com CM35 impactava significativamente o funcionamento do inflamassoma NLRP3 em macrófagos, inibindo eventos dependentes da ativação do mesmo (secreção de IL-

1 $\beta$  e morte celular por piroptose), assim como promovendo um acúmulo do substrato desta via, a pró-IL-1 $\beta$  intracelular.

Imagens obtidas por microscopia confocal mostraram que moléculas derivadas de GXM eram internalizadas por macrófagos tratados com CM35 total ou menor que 1kDa. Um extrato de polissacarídeos (PS) extraído de cápsula não foi capaz de mimetizar o efeito promovido pelo CM35, não alterando a secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos primados. Diferenças entre o GXM presente no CM35 e na cápsula reforçaram a necessidade de novos experimentos utilizando polissacarídeos derivados de outras fontes.

### **Justificativa**

A interação entre o *C. neoformans* e hospedeiros susceptíveis possui uma série de fatores ainda desconhecidos, sendo que fatores de virulência descritos a várias décadas foram recentemente associados com modulações promovidas pelo fungo (FU et al., 2018), enquanto novos fatores de virulência também ainda são desvendados (TAYLOR-SMITH; MAY, 2016). Logo, é de suma importância a realização destes estudos entre patógeno e hospedeiro, principalmente se considerando o *C. neoformans* um patógeno global, com limitações quanto a opções terapêuticas e com uma variada gama de fatores de virulência que são usualmente essenciais para o estabelecimento da doença.

O estudo descrito acima estabeleceu que moléculas secretadas pelo *C. neoformans* da cepa B3501 era capaz de inibir a ativação do complexo do inflamassoma NLRP3 quando ativado canonicamente por LPS e nigericina. Entretanto, algumas questões em aberto exigiam novos ensaios para uma análise mais completa como: o impacto promovido pelo CM35 nas proteínas participantes do complexo inflamassoma, especificamente na proteína efetora caspase-1; o impacto que a inibição do inflamassoma promovida pelo CM35 teria nas interações macrófago-*Cryptococcus*; o real papel das moléculas derivadas de GXM nas propriedades inibitórias do CM35 e a possível existência de outras moléculas presentes no meio condicionado e capazes de efeitos similares ao do CM35. Este presente trabalho analisa estas questões, trazendo um entendimento maior acerca da ação do CM35 e suas consequências.

Somadas as moléculas livremente secretadas pelo fungo, a importância das EVs em interações entre o gênero *Cryptococcus* e o hospedeiro começam a ser mais bem elucidadas, classificando assim este mecanismo de secreção como um potencial fator de virulência. Desta

---

forma, este trabalho também verifica se EVs carregam as mesmas moléculas presentes no CM35, verificando o impacto das EVs na ativação do inflamassoma NLRP3 canonicamente ativado.

---

## OBJETIVOS

### Geral

Tendo em vista a inatividade do sistema inflamassoma em macrófagos frente a moléculas secretadas pelo *C. neoformans*, este trabalho visa aprofundar os conhecimentos acerca da interação entre os componentes secretados livremente e em vesículas extracelulares pelo *C. neoformans* e o sistema inflamassoma NLRP3, avaliando sua ativação e as consequências que estas moléculas ocasionam na interação fungo – células da imunidade inata.

### Específicos

- Investigação do possível mecanismo de ação da inibição exercida por esta(s) molécula(s).
- Análise das consequências promovidas pelos componentes secretados em interação com macrófagos, analisando atividade fagocítica, atividade fungicida e eventos de vomocitose frente a infecção por *C. neoformans*.
- Investigação da importância de moléculas derivadas de GXM nas capacidades inibitórias exibidas pelo meio condicionado de *C. neoformans* e identificação de possíveis moléculas adicionais responsáveis.
- Realização um comparativo da imunomodulação induzida pelos componentes secretados livremente e dentro de vesículas extracelulares.

---

## METODOLOGIA

### Animais

Os animais utilizados para o estudo foram camundongos da linhagem C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade, obtidos por meio de endocruzamento (linhagem isogênica). A linhagem C57BL/6 é amplamente utilizada em modelos de estudo para infecção por *C. neoformans*, sendo considerada uma linhagem susceptível à infecção quando nesta idade, apresentando resposta imune polarizada para Th2 (BLACKSTOCK; MURPHY, 2004; CHEN et al., 2008). Todos os camundongos foram criados no biotério do Instituto de Biologia – UnB, sendo mantidos em padrão sanitário, recebendo água e alimentação “*ad libitum*”. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA-UnB), sob projeto intitulado: “Papel de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) na Infecção Murina por Patógenos Fúngicos” (UnBDoC n° 55924/2016) e conduzidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA)

### Cepas Fúngicas

Foram utilizadas três cepas de *C. neoformans*, H99 (*C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A - VNI), B3501 (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D- VNIV) e CAP67 (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D - mutante acapsular derivado da cepa B3501) (BULMER; SANS; GUNN, 1967). Estas cepas eram mantidas em meio de congelamento, composto de 70% de caldo Sabouraud (Himedia) e 30% glicerol (Vetec), armazenadas em alíquotas congeladas em -80°C por até um ano (SILVA; COSTA; RECHE, 2008). As alíquotas eram descongeladas e uma pequena alíquota era retirada e plaqueada em ágar Sabouraud, por 72 horas a 30°C. Após este período, as placas eram armazenadas a 4°C por até 30 dias. Antes dos ensaios, uma cultura era recuperada destas placas e cultivada em meio caldo Sabouraud, por 72 horas, a 30°C sob agitação de 120 RPM. Subsequentemente, o preparo das leveduras era realizado centrifugando uma alíquota a 1200xg por cinco minutos e ressuspendendo as células em tampão fosfato salina (PBS), repetindo esta operação por mais duas vezes. Após estas lavagens, o fungo estava pronto para ser utilizado.

---

**Obtenção de Macrófagos (BMMs e BMDMs) e Células Dendríticas (BMDCs) Murinos derivados de Medula Óssea**

Células de medula óssea (BMs) foram coletadas de camundongos C57BL/6, como descrito previamente (LUTZ et al., 1999). As BMs foram coletadas do interior do fêmur e tíbia dos camundongos, a partir da técnica de lavado femoral. Resumidamente, os camundongos foram sacrificados por meio de asfixia com CO<sub>2</sub>, seguido pela retirada do fêmur e tíbia das duas patas, separadamente. As epífises do fêmur e tíbia foram cortadas, e foi realizado um lavado do interior destes utilizando-se uma seringa de agulha fina contendo meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), obtendo-se assim as células. As células foram submetidas por um processo de lise de eritrócitos, a partir de um tampão de lise contendo cloreto de amônio em tampão Tris, e em seguida contadas em hemocitometro (Luna™ Automated Cell Counter – Logos Biosystems). Após a contagem, as células foram submetidas ao processo de diferenciação celular. Alternativamente, as BMs foram ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) e acondicionadas em criotubos, na concentração de 5x10<sup>6</sup>/mL. Os criotubos foram acondicionados em um compartimento denominado “Mr. Frosty” (Thermo Scientific), que mantém a viabilidade celular durante o congelamento, a partir de uma queda de temperatura constante (-1°C por minuto). Este compartimento permanece por 24 horas em freezer -80°C, sendo os criotubos transferidos após este período para um tanque de nitrogênio líquido. Prioritariamente ao início do procedimento de diferenciação, os criotubos foram submetidos a 37°C em banho-maria, para seu descongelamento, sendo transferidos para um tubo de plástico contendo 10 mL de RPMI-1640 aquecido a 37°C (MARIM et al., 2010). As células frescas ou descongeladas foram então analisadas quanto à quantidade e viabilidade, por meio do corante azul de tripan (Sigma).

Após a verificação quando a viabilidade, as BMs foram semeadas e cultivadas (2x10<sup>5</sup> células/mL) durante 8 dias em meio de cultura suplementado com 50 mM de 2-mercaptoetanol, adicionado de 20ng/ml de fator de crescimento de granulócitos-macrófagos murino (GM-CSF - Preprotech) para a obtenção de BMDCs e BMDMs, ou suplementado com 30% de meio condicionado de fibroblastos L929 (LCCM) secretores de fator de crescimento de macrófagos murinos (M-CSF) para a obtenção de BMMs. No terceiro dia de cultura, 100% de volume dos meios de cultura descritos foram acrescentados. No sexto dia de cultura, as placas contendo GM-CSF tiveram 50% do seu meio de cultura removido e renovado. No



oitavo dia de cultura, BMDCs não aderentes foram coletadas juntamente ao meio de cultura. BMMs e BMDMs firmemente aderidas foram coletadas utilizando-se um reagente modificado de tripsina (Tryple Express – Thermo Fisher). Ambas as células foram lavadas e plaqueadas com RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) para experimentos futuros.

A linhagem celular L929 é uma cultura de hibridomas murinos com característica de fibroblastos. Quando em cultura, esta linhagem celular apresenta a capacidade de expressar grandes quantidades de fator de crescimento de macrófagos (M-CSF) e uma pequena quantidade de fator de crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (ENGLÉN et al., 1995). Estes fatores são os responsáveis pela diferenciação das células de medula óssea em macrófagos primários no procedimento de diferenciação supracitado. Para a obtenção destes fatores, células L929 foram cultivadas em garrafas de cultura e deixadas em crescimento (90% de RPMI-1640 e 10% de SFB) até a obtenção da confluência (todo o espaço de cultivo preenchido). Atingindo este evento, o meio foi repostado e as células permaneceram em situação de cultivo por 7 dias. O sobrenadante resultante deste cultivo foi filtrado em membrana de 0,22 $\mu$ m para a remoção de restos celulares e manutenção da esterilidade, dando origem ao LCCM.

### **Obtenção do Meio Condicionado Bruto e seu Fracionamento**

As cepas B3501 e  $\Delta$ cap67, após preparadas como anteriormente descrito, foram cultivadas por 5 dias (rotação de 120RPM à 30°C), na concentração de  $1 \times 10^5$  leveduras/mL em meio mínimo (MM): glucose (15mM – Vetec), sulfato de magnésio (10mM – Isofar), fosfato monopotássico (29,4mM – Biotec), glicina (13mM – Invitrogen) e tiamina (3 $\mu$ M – Vetec), ajustado com hidróxido de potássio (2N) para o pH 5,5. O meio mínimo é indicado na literatura para promover o crescimento do *C. neoformans* em um ambiente de stress, induzindo o aumento de sua cápsula e alterando o padrão de enzimas e fatores de virulência secretados pelo fungo, quando comparado aos meios tradicionais de cultivo (CLARKE et al., 2016).

Após o período de cultivo, o meio de cultura com os fungos foi coletado e centrifugado por duas vezes a 5500xg (5 e 15 min.) para a remoção das células fúngicas. O sobrenadante resultante foi filtrado em membrana de porosidade 0,45 $\mu$ m, gerando os meios condicionados brutos. Estes meios passaram posteriormente por um fracionamento por

tamanho, através de um sistema de ultra filtração (Amicon - Millipore), com filtros de membrana variando entre 100kDa e 1kDa. O objetivo deste fracionamento foi a obtenção de uma fração dos meios condicionados com moléculas de tamanho menor que 1kDa. O líquido resultante da ultrafiltração foi liofilizado. O produto liofilizado foi ressuscitado em água padrão Milli-Q, sendo concentrado 10 vezes (10X), gerando assim os meios condicionados em concentração de uso, que para a cepa B3501 foi denominado CM35 e para a cepa  $\Delta$ cap67 foi denominado CMCAP.

### **Análise dos meios condicionados por espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa**

Metabólitos dos meios condicionados foram derivatizados como descrito previamente (KIM et al., 2013). Grupos cetônicos dos metabólitos foram derivatizados pela adição de 20 $\mu$ L de 30mg/mL metoxiamina em piridina (Sigma-Aldrich) e posterior incubação a 37°C por 90 minutos (1000 RPM). Após esta etapa, agrupamentos amina, hidroxila e carboxila foram modificados com 80 $\mu$ L de N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich) com 1% Cloreto de trimetilsililo (TMCS) (Sigma-Aldrich) a 37°C por 30 minutos (1000 RPM). Amostras derivatizadas foram analisadas no equipamento Agilent GC 7890A utilizando a coluna HP-5MS (30m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25 $\mu$ m - Agilent Technologies) acoplada a um quadrupolo singular MSD 5975C (Agilent Technologies). Amostras foram injetadas no modo direto com a temperatura do injetor ajustada para 250°C e a temperatura do forno equilibrada em 60°C. A temperatura de injeção foi mantida por 1 minuto, elevada para 325°C em uma taxa de 10°C/minuto, sendo mantida por 5 minutos a 325°C. Um padrão de éster metílico de ácido graxo (FAME) foi processado em paralelo para a calibração dos tempos de retenção. Os dados coletados foram processados no programa “Metabolite Detector” (HILLER et al., 2009), a partir da calibração dos índices de retenção baseados no padrão FAME, da deconvulação e de propriedades de alinhamento cromatográfico. Metabólitos foram identificados pela comparação com o banco de dados “FiehnLib” contendo também metabólitos adicionais (KIND et al., 2009). Metabólitos não identificados também foram buscados no banco de dados “NIST14 GC-MS”. Todas as identificações foram manualmente validadas. Intensidades extraídas dos metabólitos foram submetidas a análise multivariada de dados no programa “MetaboAnalyst” (PMID: 25897128) a partir da

---

normalização das medianas e de log, gerando resultados de “cluster” hierárquico e mapa de calor.

### **Obtenção de Polissacarídeos de Cápsula e Secretados pelo *C. neoformans***

Polissacarídeos (PS) de cápsula da cepa B3501 foram gentilmente cedidos pela Dr. Julie Wolf, da Einstein School of Medicine, obtido a partir de metodologia descrita anteriormente (BRYAN et al., 2005). Resumidamente, as leveduras foram tratadas com dimetilsulfóxido (DMSO) duas vezes por 30 minutos cada, sendo irradiadas posteriormente com radiação gama em PBS por 90 minutos. Após cada um dos tratamentos, os sobrenadantes eram coletados após centrifugação e concentrados em água utilizando o sistema de ultrafiltração Centricon (Merck Millipore) com membrana de 50 kDa.

Polissacarídeos secretados pelo fungo (exo-PS) foram obtidos a partir da coleta da camada viscosa retida na membrana de 10kDa retida durante o fracionamento do CM35 em tamanhos diferentes, conforme descrito acima (NIMRICHTER et al., 2007). O exo-PS foi removido da membrana com o auxílio de um rodo de células de cultura (cell scraper) estéril e armazenado a 4°C até sua utilização.

### **Detecção de GXM por ELISA**

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50µl da fração menor que 1 kDa de meio condicionado da cepa H99, obtida do sobrenadante de cultivo jovem (2 dias) e velho (15 dias). Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com solução de 1% de BSA, seguindo-se a adição do anticorpo anti-GXM 18B7. A detecção foi realizada utilizando-se um anticorpo anti-Fc murino conjugado a fosfatase alcalina (Southern Biotechnology). Todas as incubações foram realizadas por uma hora a 37°C e as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem TBS-T (Tris-HCl 10mM, Cloreto de sódio 150mM, Nitrato de sódio 1 mM, 0.1% Tween 20, pH 7.4) entre cada etapa. O substrato utilizado para a reação foi o p-nitrofenil fosfato, sendo a absorbância quantificada a 405nm em um espectrofotômetro de placa.

---

### **Captura de GXM por ELISA e Depleção de CMs**

Meios condicionados (CM35, CMCAP e MM) foram submetidos ao procedimento de captura de GXM por ELISA (RODRIGUES et al., 2007). Para tal, uma placa de 96 poços de alta aderência foi adsorvida com o anticorpo 18B7 (10 $\mu$ g/mL durante 1 hora a temperatura ambiente) e bloqueada com uma solução de BSA 1% (1 hora a 37°C). As lavagens entre estas etapas foram realizadas com PBS + 0,05% TWEEN-20. As amostras foram introduzidas aos poços no volume de 50 $\mu$ L, pelo período de 2 horas. Adicionalmente, o conjugado GXM-18B7 presente na placa de captura foi eluído em tampão glicina 0,1M (pH 2,6) e reintroduzido em menor volume de CM35 ou CMCAP (2:1), gerando um meio condicionado com alta concentração de GXM. Estas condições foram confirmadas por microscopia de fluorescência confocal.

### **Deteção de GXM por Microscopia de Fluorescência Confocal**

Para este ensaio, CM35 e seus variantes (depletado de GXM e enriquecido com GXM), foram utilizados em interação com BMMs. Para tal, as células foram plaqueadas em placa de cultura de 24 poços com uma lamínula circular depositada ao fundo. As células foram estimuladas com LPS por 4 horas e após este período entraram em interação com os meios condicionados.

Após 24 horas de interação, as culturas foram lavadas três vezes com PBS e as células foram permeabilizadas e fixadas com metanol puro (Vetec), durante dez minutos. Os cultivos foram então novamente lavados três vezes com PBS e bloqueados durante 60 minutos com uma solução de bloqueio (PBS + 10% de SFB). As culturas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (PBS + 2% SFB) e o anticorpo primário 18B7 (20 $\mu$ g/mL) foi incluído durante 60 minutos. Procedeu-se posterior lavagem das culturas com solução de lavagem, sendo em seguida adicionado o anticorpo “Alexa Fluor® 633 Goat Anti-Mouse IgG” (Life Technologies – anticorpo secundário acoplado ao fluoróforo Alexa 633, com ligação em porção Fc de anticorpo murino) por 60 minutos. Após o período de marcação, as células foram novamente lavadas com solução de lavagem, desta vez sendo acrescentada uma solução de DAPI (Life Technologies – marcador para núcleo de células de mamífero), por 5 minutos. As células foram então lavadas por uma última vez com solução de lavagem e as lamínulas circulares foram retiradas do fundo dos poços, sendo colocadas em uma lâmina de

microscopia tradicional. As lamínulas foram então fixadas com esmalte incolor e as amostras foram levadas para um microscópio de fluorescência denominado “TCS SP8” (Leica). As amostras foram lidas em filtros específicos para cada fluoróforo, em objetiva com aumento de 63X e imersão em óleo.

### **Isolamento de Vesículas**

As vesículas extracelulares foram isoladas a partir do meio condicionado bruto da cepa B3501, obtido como descrito acima. Após a etapa de filtração em 0,45 $\mu$ m, o meio condicionado bruto é concentrado no sistema de ultrafiltração (Amicon – Millipore), com filtro de membrana de 100kDa. As vesículas são recuperadas a partir da coleta do líquido presente dentro do sistema de ultrafiltração (~15mL), que contém uma grande concentração de vesículas retidas pela membrana de filtração. Esta suspensão de vesículas foi lavada por ultracentrifugação (Optima™ MAX Benchtop – Beckman Coulter) à 100.000xg durante 1 h. As preparações foram submetidas a ciclos repetidos de lavagens e de ultracentrifugação para o aumento da pureza (BROWN et al., 2015). Finalmente, a suspensão foi submetida a uma técnica de ELISA de captura para GXM, reduzindo assim a presença do principal contaminante destas preparações (descrita detalhadamente acima).

Para a confirmação do isolamento e purificação as vesículas foram fixadas com fixador de Karnovsky (0,1M) por 4 horas e posteriormente lavadas duas vezes e ressuspendidas em tampão cacodilato de sódio (0,05M), descansando por uma noite à 4°C. Esta suspensão foi acomodada em cubetas de cristal próprias do aparelho de espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano - Malvern). Previamente uma cubeta contendo tampão cacodilato de sódio (0,05M) foi utilizada para a medição do background da suspensão de vesículas. Logo após a leitura do branco, a cubeta com a suspensão de vesículas foi analisada pelo aparelho. Após esta etapa, as suspensões de vesículas obtidas posteriormente foram quantificadas por meio de ensaio colorimétrico para a detecção de ergosterol (AmplexRed Cholesterol Assay Kit - ThermoFischer), tendo sua concentração adequada para os testes de interação com células murinas.

---

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As vesículas purificadas foram processadas para a análise por MET. Resumidamente, as vesículas foram fixadas com fixador de Karnovsky (0,1M) por 4 horas e posteriormente lavadas 2X e ressuspensas em tampão cacodilato de sódio (0,05M), descansando por uma noite à 4°C. A suspensão de vesículas foi então corada a partir da metodologia de contrastação negativa, utilizando o ácido fosfotúngstico (PTA) 1% como corante. Após 5 minutos de contrastação em um “grid” com *formvar*, utilizando a técnica de gota, os grids repousaram durante 30 minutos em papel filtro para a remoção do excesso de amostra e foram levados para o microscópio de transmissão JEM-1011 (JEOL), para a obtenção das imagens.

### **Microscopia de Varredura (MEV)**

As vesículas purificadas foram processadas para a análise por MET. Resumidamente, as vesículas foram pré-fixadas com tampão Karnovsky (0,1M) por 2 horas. Posteriormente, a suspensão de vesículas foi pós-fixada com tetróxido de ósmio por 30 minutos. As amostras passaram por sucessivas lavagens em acetona, com aumento seriado na concentração (50%, 70%, 90% e duas vezes de 100%). Após a etapa de desidratação, as amostras passaram por etapa de secagem a ponto crítico. Por fim, as amostras foram metalizadas, cobertas com uma lâmina de platina. As amostras metalizadas foram levadas para o microscópio de varredura JSM-7000F (JEOL), para a obtenção das imagens.

### **Ensaio de Interação com Células Murinas**

As células murinas BMMs, BMDCs ou BMDMs foram cultivadas ( $1 \times 10^6$  células/mL) e estimuladas ou não com LPS (0,5µg/mL) durante 4h, fornecendo o primeiro sinal de ativação do complexo inflamassoma. Após este período de ativação das células, adicionou-se aos poços os meios condicionados (CM35 e CMCAP, a 10% v/v), MM (10% v/v), PS derivados de cápsula (200µg/mL), exo-PS secretados em cultura (200µg/mL), vesículas extracelulares da cepa B3501 (40 ou 80ng de ergosterol/mL) intactas ou rompidas após interação com soro fetal bovino (SFB 10% por 18 horas), metabólitos aromáticos (Sigma-Aldrich, a 100, 333, 500 ou 1000µM): Ácido fenil-láctico (PLA); Ácido 3-(4-hidroxifenil)láctico (HPLA) e Ácido 3-indol láctico (ILA), carboidratos (Sigma-Aldrich, a

100 $\mu$ M): Sorbitol (SOR); Manitol (MAN); Trealose (TRE); Glicerilfosforilcolina (GPC) e Glicerilfosforiletanolamina (GPE), fosfatidilcolina, fosfocolina ou colina (Sigma-Aldrich, a 100, 200, 400 ou 800 $\mu$ M). Por último, as células foram estimuladas ou não com nigericina (20 $\mu$ M/mL), fornecendo o segundo sinal para a ativação do complexo inflamassoma. Alternativamente, as células estimuladas com LPS ou não foram infectadas com as cepas H99 ou  $\Delta$ cap67, opsonizadas com o anticorpo 18B7 (10 $\mu$ g/mL – anticorpo opsonizante primário com ligação em GXM).

O sobrenadante obtido destas culturas foi utilizado para medir a secreção das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Células foram coradas para a observação do índice de fagocitose. Células foram coletadas para a detecção da ativação de caspase-1 utilizando citometria de fluxo. Células também foram lisadas para a extração de RNA em tampão Qiazol®, para a detecção da expressão de RNA dos genes codificantes de *il1b* e *nfkbl*.

### **Dosagem de Citocinas por ELISA**

Para a dosagem das citocinas, foram utilizados os kits “Mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!®” e “Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!®” (Ebioscience). Os resultados foram obtidos no espectrofotômetro de placa “Multiskan™ FC Microplate Photometer” (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 450 nm. As absorbâncias da curva e das amostras foram processadas em um programa denominado SoftMax (Molecular Devices). A curva de calibração utilizada foi na escala “log-log” e a concentração das amostras foi calculada em pg/mL.

### **Detecção de Caspase-1 e Caspase-8 Ativa por Citometria de Fluxo**

As células murinas, ao final do ensaio de interação com nigericina ou infecção com  $\Delta$ cap67, foram recuperadas com o agente de dissociação Tryple Express (Gibco). A concentração celular de cada grupo experimental foi ajustada para  $5 \times 10^5$ . Para a marcação, o kit FAM-FLICA™ Caspase-1 Assay Kit ou alternativamente o kit FAM-FLICA™ Caspase-8 Assay Kit (Immunochemistry) foram utilizados na concentração de 1:30 do volume final. A marcação das células e subsequente leitura no citômetro de fluxo seguiram as indicações fornecidas pelo fabricante.



Resumidamente, após 45 minutos de marcação a 37°C, as células foram diluídas em tampão fornecido pelo kit, centrifugadas por 5 minutos a 300xg, ressuspensas em tampão e deixadas em repouso por 10 minutos, promovendo a saída das células dos peptídeos não ligados às caspases ativas. Adicionalmente, as células que receberam estímulo com nigericina foram duplamente marcadas com iodeto de propídeo (PI). Após este período as células foram novamente centrifugadas, ressuspensas em tampão e levadas para a leitura no citômetro de fluxo (FACSVerse – BD Biosciences).

Um “gate” inicial foi realizado na análise das células tratadas com nigericina, que selecionou as células positivas no canal PE (FL-2 – PI). Foi realizado um “gate” para todos os grupos em uma população homogênea, com característica morfológica de macrófagos e a fluorescência foi adquirida no canal FITC (FL-1 – FAM FLICA), na forma de histograma (Figura 3). Os dados de mediana de fluorescência foram utilizados para a comparação entre os grupos. Para a validação do experimento, células consideradas como controle positivo (LPS e nigericina ou LPS e  $\Delta$ cap67) foram levadas ao citômetro sem a marcação FAM-FLICA, para o ajuste da morfologia (geração do “gate” morfológico) e a exclusão de autofluorescência. Os resultados e análises estatísticas foram obtidos a partir do programa de análise citométrica “FlowJo”.

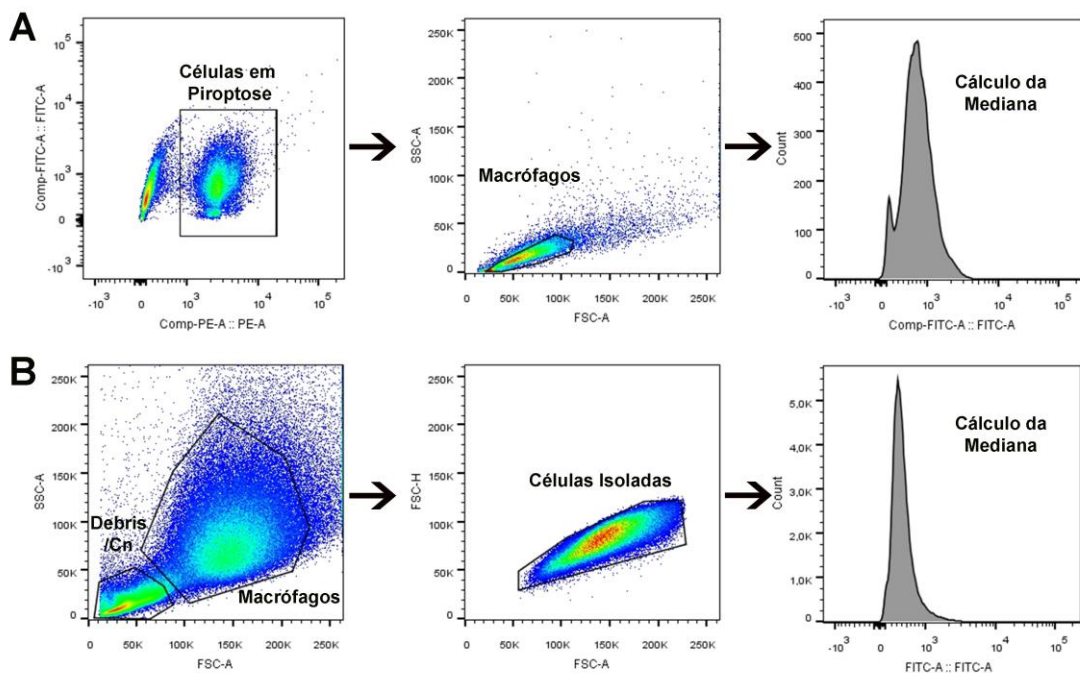


Figura 3 – Esquema de “gates” utilizados para análise citométrica de caspase-1 ativa. A – “Gates” utilizados para as amostras ativadas por nigericina, a partir da dupla marcação FITC/PE. B – “Gates” utilizados para as amostras ativadas por infecção com  $\Delta$ cap67, a partir de marcação simples FITC.



---

### Ensaio de PCR em Tempo Real

Células foram lisadas utilizando o tampão Trizol (Invitrogen), para a obtenção de RNA. Posteriormente, adicionou-se clorofórmio puro aos extratos e as amostras foram centrifugadas (10.000xg por 15min), formando-se uma bicamada. Após a coleta da porção apolar do extrato, adicionou-se álcool isopropílico e as amostras passaram por nova centrifugação (10.000xg por 10min). O sobrenadante foi descartado e os tubos deixados em fluxo de ar para a secagem completa. Adicionou-se álcool etílico e centrifugou-se novamente as amostras (7.000xg por 7min). O sobrenadante foi descartado e os tubos deixados em fluxo de ar para a secagem completa. Adicionou-se 30 $\mu$ L de água Milli-Q, ressuspendendo o material genético presente no tubo. A concentração e a pureza do RNA extraído foi avaliada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), aferindo a absorbância em 260 nm e a razão de A260/A280. As amostras de RNA foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL) para avaliar a integridade e qualidade do RNA. A síntese de DNA cíclico (cDNA) foi realizada a partir de 1  $\mu$ g de RNA total de cada amostra, utilizando o kit RT2 First Strand Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Para a PCR em tempo real, o kit GoTAQ® qPCR Master Mix (Promega, A6001) foi utilizado, observando as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 1/5 da reação de cDNA foi inserida em reação de amplificação de PCR em tempo real, em um volume final de 10  $\mu$ L (5  $\mu$ L de GoTAQ® qPCR Master Mix (Promega), 2,0  $\mu$ L de cDNA, 2,6  $\mu$ L de água deionizada e 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo específico. Todos os oligonucleotídeos foram validados previamente. Os genes analisados foram *illb* (Forward: GTGTGTGACGTTCCCATAGACA; Reverse: CAGCACGAGGCTTTTTTGTG) e *nfb1* (Forward: AGCCAGCTTCCGTGTTTGTG; Reverse: AGGGTTTCGGTTCAGTTTCC). Todas as amplificações foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os resultados obtidos foram calculados a partir do Ct obtido por cada amostra para o gene constitutivo *gapdh* (Forward: TGAAGCAGGCATCTGAGGG; Reverse: CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG) comparado com o Ct do gene de interesse (*illb* ou *nfb1*). Para o cálculo comparativo  $\Delta\Delta$ Ct, o grupo não tratado foi escolhido e normalizado para o valor “1” (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

---

### **Análise de Índice de Fagocitose**

Após serem primadas ou não com LPS (0,5µg/mL) e tratadas ou não com CM35 por 18 horas, BMMs foram infectadas com a cepa H99 opsonizada com 18B7 (2:1). Alternativamente, o estímulo com LPS e tratamento com CM35 foram realizados por apenas 3 horas. Após 2 horas de interação, os co-cultivos foram gentilmente lavados com PBS por três vezes e as células foram fixadas e coradas utilizando-se o kit de corantes Panótico Rápido (LaborClin), que contém um fixador a base de metanol e dois corantes hematológicos. As placas de cultivo foram analisadas sobre um microscópio ótico invertido, sendo o índice de fagocitose calculado a partir da multiplicação entre a porcentagem de macrófagos que realizaram fagocitose e o número de leveduras fagocitadas a cada 100 macrófagos. Alternativamente, os macrófagos foram lisados, as leveduras intracelulares recuperadas e plaqueadas em ágar Sabouraud após diluição seriada. Após incubadas por 3 dias a 30°C, as colônias foram contabilizadas.

### **Ensaio de Atividade Fungicida em Sistema Transwell**

Neste ensaio foi utilizado um aparato denominado Transwell® (Corning). Neste aparato, o poço de cultura fica separado verticalmente por uma plataforma, que se localiza no centro do poço. Desta maneira, o poço fica com duas câmaras, uma superior e outra inferior, onde é possível o cultivo de dois tipos celulares distintos. A grande vantagem deste sistema é que a plataforma, além de aportar uma cultura, também age como um filtro, permitindo a passagem de substâncias com menos de 0,80 µm, no caso deste trabalho. Neste ensaio, os dois cultivos celulares dividem o mesmo meio de cultivo, não interagindo necessariamente com os mesmos estímulos, mas dividindo necessariamente substâncias menores que 0,80 µm que estejam em solução no meio de cultivo, como por exemplo, citocinas e pequenas moléculas secretadas pelo fungo. Desta forma, é possível verificar a resposta de um grupo celular que, mesmo não sendo infectado e ativando-se em um momento inicial, responde às substâncias geradas por outro grupo celular.

Para este ensaio, BMMs foram plaqueadas tanto na câmara superior quanto inferior do “Transwell”. Os macrófagos da câmara superior ficaram em repouso durante a primeira parte do experimento, enquanto os macrófagos da câmara inferior receberam os estímulos. Estas células receberam estímulo com LPS (0,5µg/mL) e após 4 horas foram infectadas com as

cepas B3501 ou  $\Delta$ cap67 (5:1) opsonizadas com 18B7, ou não infectados. Alternativamente, as câmaras inferiores receberam somente as cepas B3501 e  $\Delta$ cap67 na mesma concentração em meio contendo LPS (0,5 $\mu$ g/mL), porém sem o plaqueamento de macrófagos. Após 20 horas de interação, os macrófagos da câmara superior de todos os grupos foram infectados pela cepa H99 expressando GFP (2:1), opsonizada com 18B7. Após 3 horas de interação as leveduras extracelulares foram retiradas do cultivo, com três lavagens com PBS. Após 21 horas, as leveduras extracelulares foram novamente retiradas do cultivo, os macrófagos lisados com SDS 0,05% e as leveduras recuperadas. As leveduras foram quantificadas por citometria de fluxo (Attune NxT – Thermofisher), sendo realizado um “gate” para a demarcação de população uniforme e outro para a análise somente de células apresentando positividade no canal FITC (FL-1 – GFP). O aparelho permite a sucção de um volume pré-determinado de cada amostra, permitindo assim o cálculo de concentração de leveduras por mL a partir da obtenção do número de eventos obtidos.

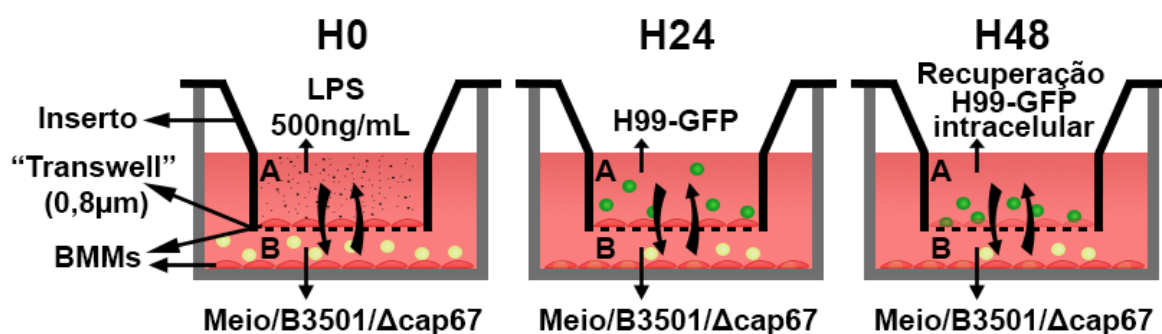


Figura 4 – Desenho experimental do ensaio de atividade fungicida em sistema “Transwell”, destacando os eventos executados em cada período do ensaio quanto a câmara superior (A) e inferior (B).

### Ensaio de Quantificação de Eventos de Extrusão por Citometria

A cepa H99 foi marcada com a sonda fluorescente “Calcofluor White” (10 $\mu$ g/mL por 10 minutos), sendo lavada com PBS três vezes após a marcação. As células BMMs foram infectadas pela cepa H99 marcada (10:1), opsonizada com o anticorpo 18B7 (20 $\mu$ g/mL), sendo tratadas concomitantemente com CM35 ou PBS (controle negativo). Para a análise, o sobrenadante e o lisado celular dos cultivos foram coletados no período de 2, 6, 12 e 24 horas de interação. Após duas horas de interação, todos os tempos de cultivo tiveram seu sobrenadante retirado (sendo o do grupo de 2 horas armazenado) e foram lavados 3 vezes com PBS morno, para a retirada das leveduras não fagocitadas. Após as lavagens, os cultivos

receberam meio RPMI + SFB suplementado com fluconazol (10 $\mu$ g/mL). Nos períodos de tempo supracitados, o sobrenadante foi coletado, seguido de uma nova lavagem com PBS morno e posterior lise dos macrófagos como solução de SDS 0,05%. Desta forma, foram obtidas leveduras extracelulares e intracelulares nos tempos de interação propostos. Após cada coleta, as leveduras foram fixadas com paraformaldeído a 1% e armazenadas em local escuro a 4°C, para posterior leitura no citômetro de fluxo.

O aparelho utilizado para a análise do experimento foi o citômetro “BD LSRFortessa” (BD), no filtro de fluorescência “Pacific Blue”, com excitação no laser UV. A dinâmica da leitura envolveu a criação de um “gate” em uma população homogênea com morfologia característica de leveduras de *C. neoformans* e a alta fluorescência presente pela marcação com o “Calcofluor White”, procedido pela contagem dos eventos pelo período de 4 minutos para cada amostra. O volume de sucção da amostra por segundos é fornecido pelo fabricante do aparelho, permitindo assim a conversão do número de eventos obtidos em cada amostra para leveduras/mL.

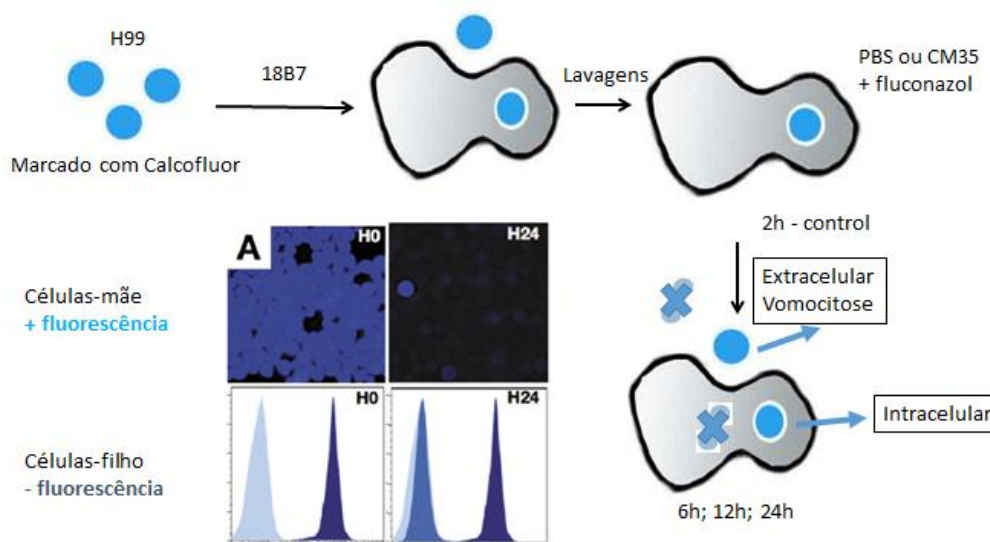


Figura 5 – Desenho experimental do ensaio de quantificação de eventos de extrusão por citometria, demonstrando as etapas realizadas até a obtenção das leveduras intracelulares e extracelulares e imagem representativa da perda de fluorescência após replicações em leveduras marcadas com calcofluor. Imagem modificada de (ALANIO; DESNOS-OLLIVIER; DROMER, 2011).

---

### **Análise Estatística**

Os resultados apresentados nesse trabalho referem-se a um experimento representativo, com grupos em triplicata, de pelo menos dois ensaios independentes. A não ser quando especificado na legenda, todas a análise estatística neste trabalho foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.2 (GraphPad Software). Os gráficos foram desenhados utilizando o modelo de colunas, com representação de desvio padrão entre amostras (SD) nas barras de erro. A análise estatística foi realizada a partir do teste “One-way ANOVA”, com pós teste de “Tukey”. Dados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

---

## RESULTADOS

### **CM35 também é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ em macrófagos diferenciados por GM-CSF e células dendríticas**

Estudo prévio realizado pelo grupo e descrito na introdução deste trabalho demonstrava o impacto do tratamento com CM35 na secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos diferenciados por M-CSF (BÜRCEL, 2015). A diferenciação por M-CSF gera um perfil de macrófago associado a processos anti-inflamatórios, denominado de “macrófago M2” ou macrófago alternativamente ativado. Enquanto isso, a diferenciação por GM-CSF leva ao macrófago classicamente ativado, denominado macrófago M1 (MARTINEZ; GORDON, 2014). Tendo em vista as diferenças fenotípicas apresentadas por estes perfis, decidimos avaliar qual seria o impacto do tratamento do CM35 em células diferenciadas com GM-CSF, no caso macrófagos M1 e células dendríticas.

Os resultados demonstraram que ambas as células apresentaram os mesmos perfis de secreção de IL-1 $\beta$  que os macrófagos M2, frente ao tratamento com diferentes meios condicionados. Enquanto CM35 era capaz de promover uma inibição robusta na secreção da citocina, CMCAP e MM não promoviam o mesmo nível de inibição nos macrófagos com perfil M1 (Figura 6A). Curiosamente, MM não foi capaz de promover inibição significativa em células dendríticas, provavelmente pela diferença nos pré-requisitos para a ativação e funcionamento do inflamassoma entre este tipo celular e macrófagos, verificado também pelo fato do grupo ativado somente com LPS ser capaz de secretar níveis detectáveis de IL-1 $\beta$  (Figura 6C). Assim como visto no trabalho anterior, nenhum dos tratamentos foi capaz de interferir com a secreção da citocina independente de inflamassoma TNF- $\alpha$  (Figuras 6B e 6D), indicando que nestas células a ação do CM35 também se restringe à sinalização promovida pelo NLRP3.

### **CM35 é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ promovida por outros estímulos secundários, porém não de TNF- $\alpha$ mesmo quando adicionado previamente**

Tendo em vista que a ativação do inflamassoma por nigericina representa somente um dos possíveis eventos necessários para a ativação do NLRP3, a promoção do efluxo de potássio. Desta forma, conduzimos um ensaio visando a ativação do inflamassoma por um estímulo mais complexo, a infecção pela cepa acapsular  $\Delta$ cap67. Estudos indicam que, além

do efluxo de potássio, a produção de ROS mitocondrial e a liberação de catepsinas no citoplasma a partir da permeabilização do fagolisossomo são necessários para esta ativação pelo *C. neoformans* (CHEN et al., 2015; GUO et al., 2014).

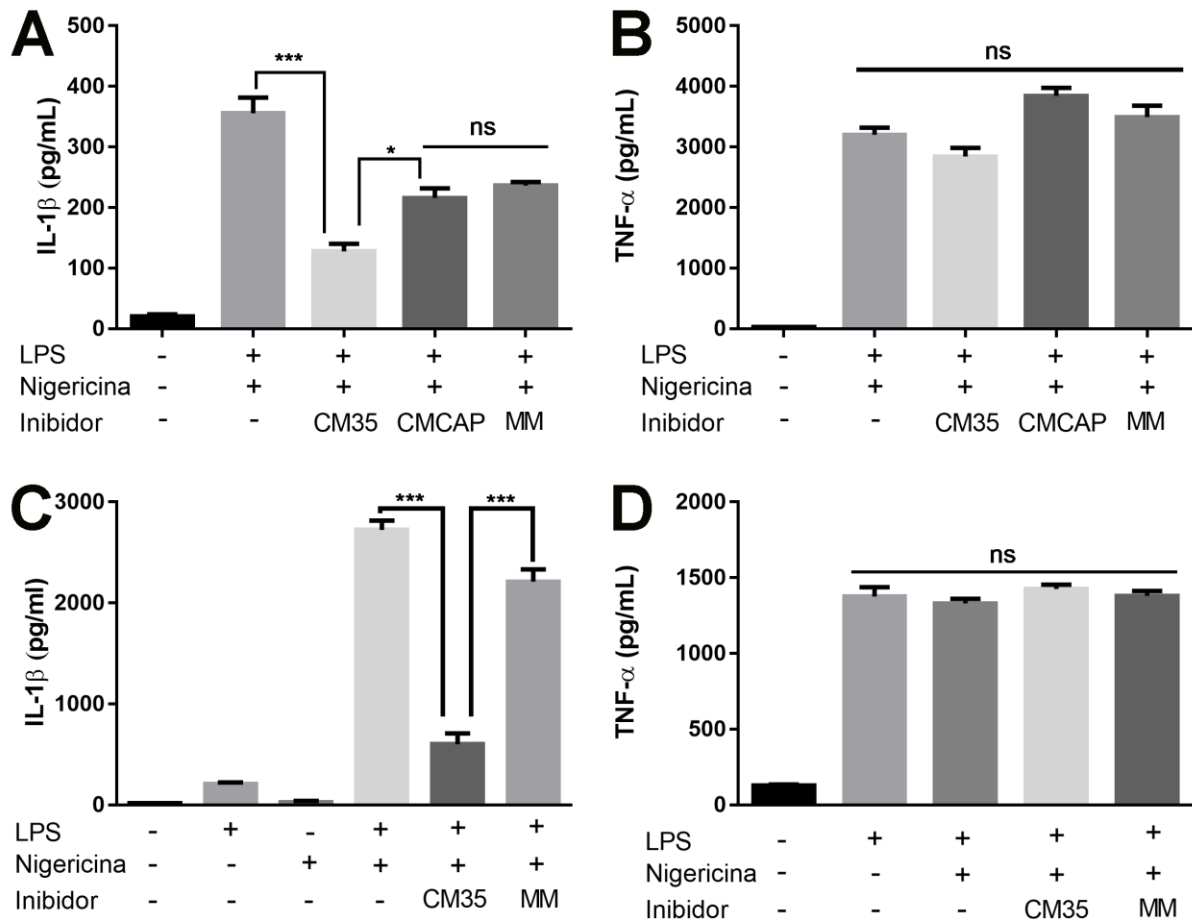


Figura 6 - CM35 também é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos diferenciados por GM-CSF e células dendríticas. A e C - Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMDMs (A) ou BMDCs (C) estimuladas com LPS + nigericina e CM35, CMCAP ou MM. B e D - Níveis de produção de TNF- $\alpha$  após ensaio de interação entre BMDMs (B) ou BMDCs (D) estimuladas com LPS + nigericina e CM35, CMCAP ou MM. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*:  $P \leq 0.033$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

Os resultados obtidos a partir da interação de BMMs com a cepa  $\Delta cap67$  mostraram perfil semelhante ao obtido com o estímulo com nigericina. Novamente, os macrófagos tratados com CM35 apresentaram menor secreção de IL-1 $\beta$  quando comparados ao grupo controle positivo (Figura 7A). Interessantemente, assim como visto no ensaio com células dendríticas, o tratamento com MM ou com glicina não foi capaz de promover a inibição na secreção da citocina frente a infecção pelo fungo.

Outro ensaio importante realizado neste contexto foi o tratamento de BMMs com meios condicionados previamente ao estímulo com LPS, para confirmar se estes tratamentos não exerciam nenhuma alteração na via de sinalização de NF- $\kappa$ B. Como esperado, o tratamento prévio de BMMs com CM35, CMCAP ou MM por 18 horas não foi capaz de inibir a secreção de TNF- $\alpha$  após estímulo de LPS por 4 horas (Figura 7B), confirmando que as propriedades inibitórias do CM35 se restringem a via do inflamassoma, e não ao primeiro sinal fornecido por estímulos extracelulares.

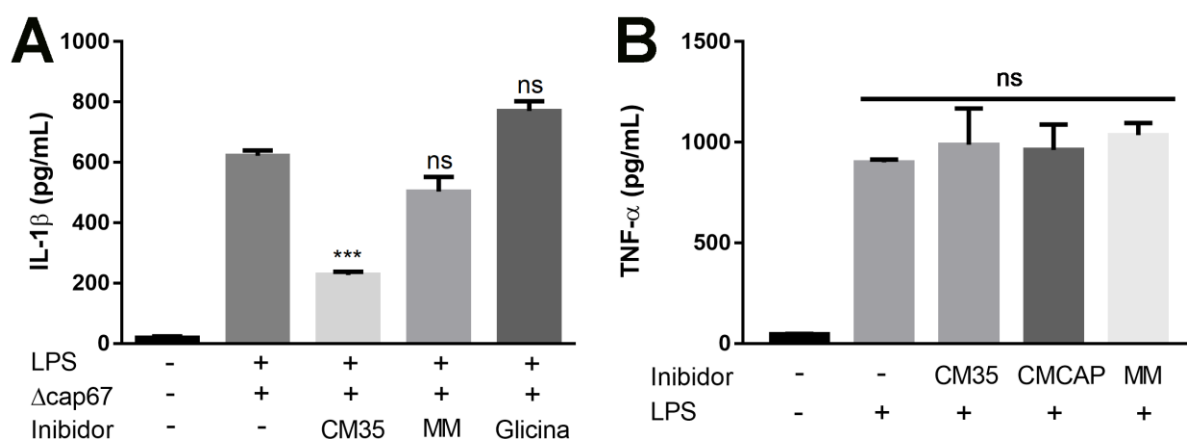


Figura 7 - CM35 é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$  promovida por outros estímulos secundários, porém não de TNF- $\alpha$  mesmo quando adicionado previamente. A – Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS +  $\Delta$ cap67 e CM35, MM ou glicina. B - Níveis de produção de TNF- $\alpha$  após ensaio de interação entre BMMs tratadas com CM35, CMCAP ou MM e estimuladas posteriormente com LPS. Comparações foram realizadas com o grupo controle positivo LPS +  $\Delta$ cap67 (A). Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

### Inibição da secreção de IL-1 $\beta$ promovida pelo CM35 envolve inibição da ativação de caspase-1 e caspase-8

Tendo em vista que a inibição do inflamassoma promovida pelo CM35 afetou eventos usualmente dependentes da ativação de caspase-1 em macrófagos (processamento e secreção de IL-1 $\beta$  e morte celular por piroptose), foram desenhados ensaios visando a detecção da porção ativa desta enzima e visualização de possível inibição exercida pelo CM35 em sua autoclivagem. A detecção de qualquer alteração nos níveis de caspase-1 ativa é um forte indicativo que a ativação e montagem da plataforma de inflamassoma está afetada, considerando que a ativação desta enzima é a última etapa estrutural na sinalização dependente da ativação de NLRPs.



A metodologia empregada foi a recuperação das células intactas após a interação e a marcação das mesmas com um peptídeo específico para caspase-1 ativa, ligado a um fluoróforo (YVAD-FLICA-FAM). Na análise por citometria de fluxo, a presença de maior fluorescência nas células era um indício direto da ativação da caspase-1.

Ambas as metodologias apresentaram resultados semelhantes, comprovando a hipótese de que o tratamento de macrófagos com CM35 é capaz de inibir a ativação de caspase-1. Foi verificado que, independente do estímulo utilizado (nigericina ou infecção por  $\Delta$ cap67), a adição de CM35 ao cultivo foi capaz de reduzir a presença de caspase-1 ativa no interior destas células (Figura 8A-D). Em contrapartida, a adição de MM não foi capaz de alterar significativamente a presença de caspase-1 ativa, independente do estímulo utilizado. Em conjunto, estes resultados indicam que, mesmo não sendo total, o tratamento com CM35 promove um impedimento para a autoclivagem da caspase-1, inibindo sua ativação em ambiente intracelular e consequente secreção para o meio extracelular.

Tendo em vista o impacto moderado visualizado na ativação de caspase-1, decidimos investigar a inibição promovida pelo CM35 na ativação de caspase-8, enzima que, apesar de usualmente associada com a ativação não canônica de inflamassomas, é descrita como um importante regulador da funcionalidade do inflamassoma NLRP3 (GURUNG et al., 2014). Os resultados obtidos a partir da análise citométrica da ativação de caspase-8 foi semelhante aos dados obtidos para caspase-1. O tratamento com CM35 foi capaz de reduzir a ativação intracelular de caspase-8, enquanto o tratamento com MM não trouxe nenhuma inibição significativa (Figura 9A e B). Desta forma, as análises citométricas em conjunto indicam que o CM35 é capaz de promover alterações na proteína efetora (caspase-1) e em uma proteína reguladora (caspase-8) no inflamassoma NLRP3, fatores que sugerem uma possível inibição em etapas anteriores na montagem do inflamassoma.

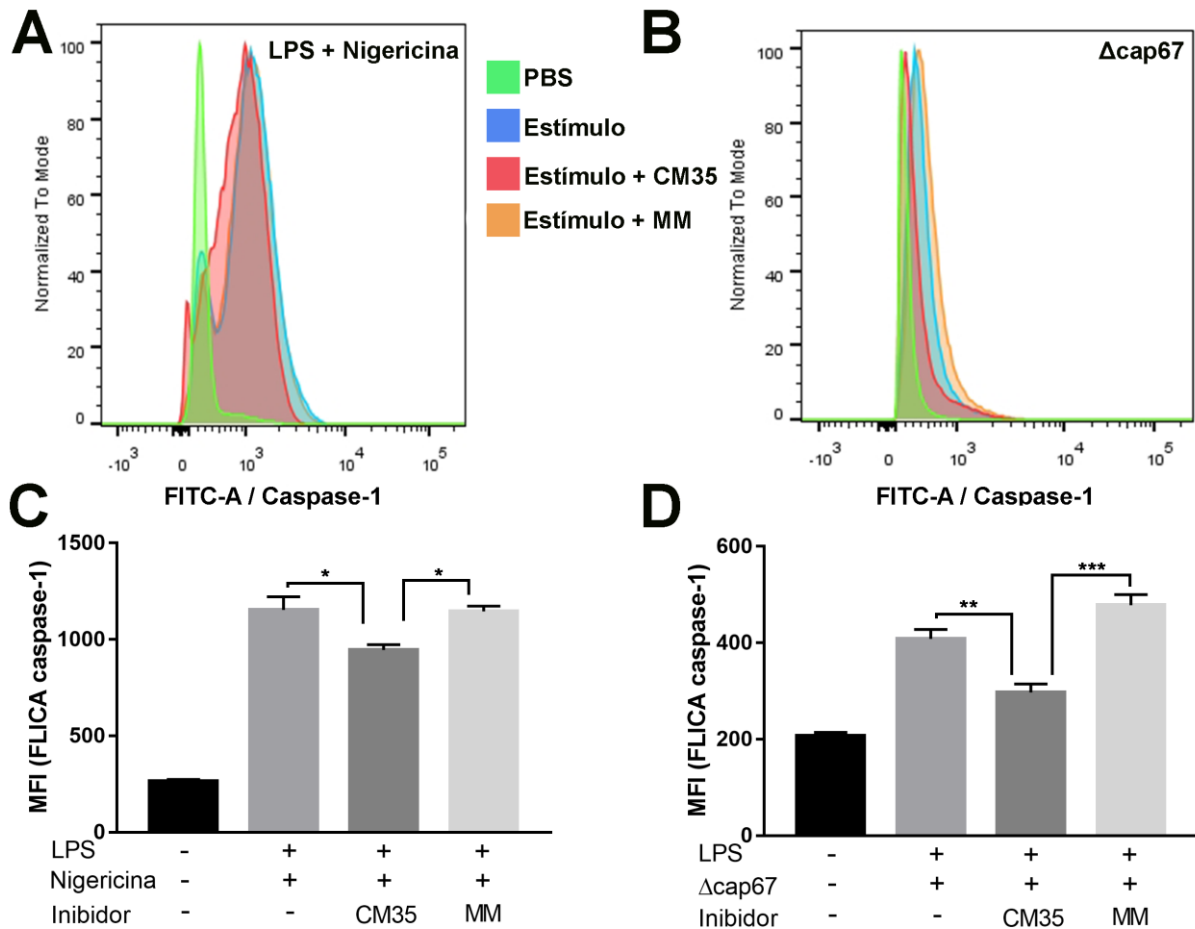


Figura 8 - Inibição da secreção de IL-1 $\beta$  promovida pelo CM35 envolve a inibição na ativação de caspase-1. A e C – Níveis intracelulares de caspase-1 ativa em BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas ou não com CM35 e MM. Gráficos representativos da fluorescência registrada no filtro FITC (A) e da mediana de fluorescência em cada grupo (C). B e D – Níveis intracelulares de caspase-1 ativa em BMMs estimuladas com LPS +  $\Delta$ cap67 e tratadas ou não com CM35 e MM. Gráficos representativos da fluorescência registrada no filtro FITC (B) e da mediana de fluorescência em cada grupo (D). Amostras foram comparadas e sua significância indicada como \*:  $P \leq 0.033$ ; \*\*:  $P \leq 0.002$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

### Tratamento com meios condicionados induz a transcrição de gene *il1b*

Após a confirmação que o tratamento de macrófagos com CM35 inibia a ativação de caspase-1 e tendo em vista que CM35 e CMCAP promovem um aumento nos níveis proteicos intracelulares de pró-IL-1 $\beta$  em macrófagos estimulados, decidimos investigar se o acúmulo desta citocina estava diretamente ligado com uma menor efetividade do inflamassoma ou se haviam outros fatores envolvidos. Portanto, analisamos o perfil de expressão gênica dos macrófagos submetidos a estes tratamentos.

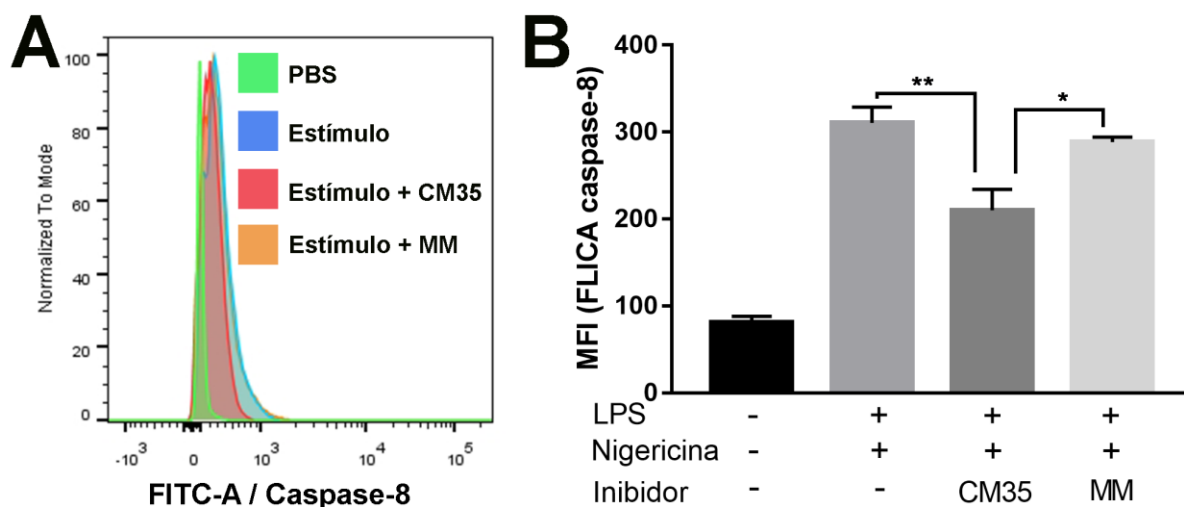


Figura 9 - Inibição da secreção de IL-1 $\beta$  promovida pelo CM35 envolve a inibição na ativação de caspase-8. A e B – Níveis intracelulares de caspase-1 ativa em BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas ou não com CM35 e MM. Gráficos representativos da fluorescência registrada no filtro FITC (A) e da mediana de fluorescência em cada grupo (B). Amostras foram comparadas e sua significância indicada como \*:  $P \leq 0.033$ ; \*\*:  $P \leq 0.002$ .

Macrófagos estimulados e tratados com CM35 e CMCAP apresentarem níveis significativamente elevados de transcrição do gene *il1b* quando comparados ao grupo que somente foi estimulado com LPS e nigericina, enquanto aqueles tratados com MM não apresentaram diferença (Figura 10A). Em relação a expressão do gene *nfkb1*, CM35 e MM promoveram uma expressão elevada em comparação ao grupo controle, enquanto CMCAP não apresentou alterações significativas (Figura 10B). Comparativamente, a transcrição do gene *il1b* se apresentou muito mais elevada frente ao tratamento por CM35 quando comparada ao nível de transcrição de *nfkb1*. Vale salientar que os lisados celulares para extração de DNA foram obtidos 24 horas após o estímulo com LPS, o que ajudaria a explicar a baixa transcrição destes genes no grupo positivo, embora exista uma modulação positiva em comparação ao grupo negativo. Estes resultados demonstram que os meios condicionados são capazes de interferir intensamente com a transcrição do gene *il1b*, mesmo após 24 horas do primeiro estímulo pró-inflamatório, fato que corrobora com os níveis proteicos de pró-IL-1 $\beta$  visualizados nos macrófagos tratados com estes meios.

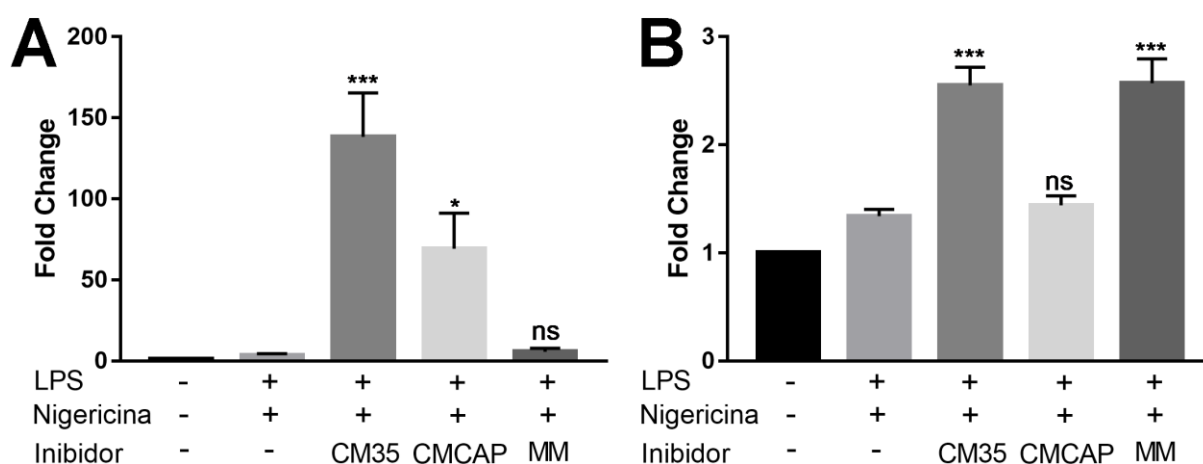


Figura 10 - Tratamento com meios condicionados induz a transcrição de gene *illb*. A-B – Níveis de transcritos dos genes *illb* (A) e *nfkb1* (B) em lisados de BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas ou não com CM35, CMCAP ou MM. Os transcritos do gene *gapdh* foram utilizados como valor constitutivo e os valores do grupo controle negativo normalizados como padrão. Comparações foram realizadas com o grupo controle positivo LPS + nigericina. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como \*:  $P \leq 0.033$ ; \*\*:  $P \leq 0.002$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

### Fagocitose é prejudicada em macrófagos tratados previamente com CM35

Apesar de aparentemente não promover impacto na ativação dos PRRs de membrana e na sinalização decorrente da ativação de NF- $\kappa$ B (Figura 7B e 14B), o tratamento com CM35 afeta vias de sinalização intracelular e inibe o processamento e secreção de citocina chave na resposta pró-inflamatória. Essas duas características inibidas pelo CM35 se encontram presentes na sinalização promovida pelo receptor Fc $\gamma$ IIa, que reconhece o fungo opsonizado pelo anticorpo 18B7 (MONARI et al., 2006; VAN DEN HERIK-OUDIJK et al., 1995). Sendo a fagocitose um evento importante e que dita o desfecho da interação entre macrófagos e o *C. neoformans*, investigamos o impacto que a inibição na ativação do inflamassoma promovida pelo CM35 poderia gerar neste mecanismo.

O tratamento com CM35, CMCAP ou MM por 3 horas anteriormente à infecção pela cepa H99 não foi capaz de alterar a fagocitose do fungo. Nem mesmo o estímulo com LPS por 3 horas alterou a capacidade fagocítica apresentada pelas BMMs (Figura 11A). Em contrapartida, macrófagos tratados com CM35 por um longo período (18 horas) antes de serem infectados apresentaram capacidade fagocítica significativamente reduzida (Figura 11B). Interessantemente, o estímulo prolongado com LPS neste ensaio aumentou a capacidade fagocítica, porém não foi o suficiente para reverter o impacto exercido pelo tratamento com o meio condicionado. Conclui-se então que as capacidades inibitórias

apresentadas pelo CM35 também incluem o impacto na fagocitose do *C. neoformans* opsonizado com o anticorpo 18B7, apesar dos resultados indicarem que este impacto se apresenta em tempos tardios e não durante o início da interação entre levedura e macrófago.

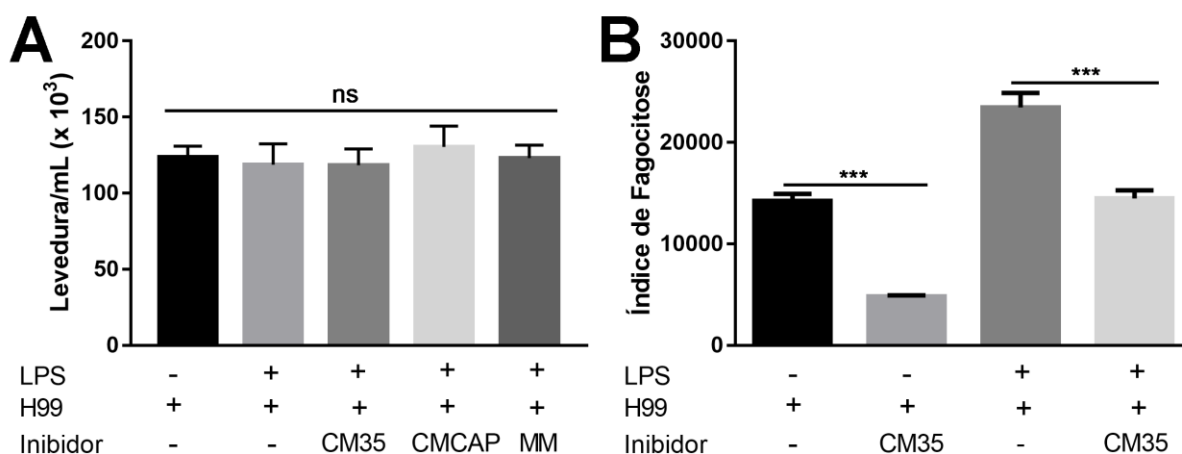


Figura 11 - Fagocitose é prejudicada em macrófagos tratados previamente com CM35. A – Número de colônias contabilizadas em placas ágar Sabouraud, derivadas de leveduras intracelulares obtidas após lise de BMMs estimuladas ou não com LPS e tratadas com meios condicionados por 3 horas e infectadas posteriormente com H99 por 2 horas. B – Índice de fagocitose calculado a partir do número de leveduras intracelulares em BMMs estimuladas ou não com LPS e tratadas ou não com CM35 por 18 horas e infectadas posteriormente com H99 por 2 horas. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

### **Infecção por B3501 impacta atividade fungicida em macrófagos adjacentes não infectados em primeiro momento**

Como descrito anteriormente, a montagem de uma resposta pró-inflamatória polarizada Th1 é importante para o controle da criptococose e melhor prognóstico para o hospedeiro. Neste contexto, a produção de citocinas derivadas do inflamassoma é importante para a manutenção desta resposta pró-inflamatória (UPADHYA et al., 2016). Tendo em vista as diferenças apresentadas nos níveis de produção de IL-1 $\beta$  em infecções pelas cepas B3501 e  $\Delta$ cap59 (CHEN et al., 2015) e a diferença na inibição da secreção desta citocina pelos meios condicionados CM35 e CMCAP, decidimos investigar se a ativação e inibição diferencial do inflamassoma seriam capazes de modular a capacidade fungicida de macrófagos presentes no microambiente.

Estudos prévios realizados pelo grupo haviam mostrado que macrófagos primados e tratados com meios condicionados e infectados com H99 opsonizado com 18B7 não apresentavam diferenças quanto a capacidade fungicida, visualizada a partir da quantificação da carga fúngica após 24 horas de infecção (BÜRCEL, 2015). Vale ressaltar que os

tratamentos foram realizados por um curto período de tempo antes da infecção, e como visto no ensaio de fagocitose, talvez este período de tempo seja insuficiente para que impactos na capacidade fungicida sejam notados. Desta forma, decidimos realizar um ensaio utilizando o sistema “Transwell” (Figura 4), sendo deixado um período de 24 horas entre infecções. O objetivo era verificar o impacto de um microambiente contendo macrófagos infectados por B3501 ou  $\Delta$ cap67 em macrófagos que, apesar de dividirem o mesmo microambiente, não foram infectados por estas cepas.

O primeiro passo foi a validação da metodologia, visando a verificação de que não haveria migração de leveduras de *C. neoformans* de uma câmara para outra, no caso, da câmara inferior para a superior. Para tal, foram utilizadas cepas não fluorescentes para as infecções da câmara inferior (B3501,  $\Delta$ cap67 ou macrófagos não infectados), enquanto na câmara superior macrófagos foram infectados com H99 expressando GFP. Cerca de 99% das leveduras obtidas a partir da lise de macrófagos nas câmaras superiores dos três grupos experimentais apresentaram fluorescência positiva para o canal FITC, demonstrando expressaram GFP (Figura 12). Este dado mostra que somente a cepa H99 foi recuperada para a análise, indicando que não há migração de leveduras da câmara inferior para a câmara superior e validando assim o ensaio.

Os resultados dos ensaios de “Transwell” demonstraram que macrófagos inseridos em um microambiente contendo macrófagos infectados por B3501 estão mais susceptíveis ao crescimento intracelular do *C. neoformans*. Este fato foi verificado pela maior carga fúngica intracelular apresentada por macrófagos presentes na câmara verticalmente adjacente a câmara dos macrófagos infectados por B3501, quando comparados a macrófagos presentes em câmaras verticalmente adjacentes a macrófagos infectados por  $\Delta$ cap67 ou não infectados (Figura 13A). Curiosamente, não houve diferença significativa na carga fúngica intracelular entre os grupos verticalmente adjacentes aos macrófagos infectados por  $\Delta$ cap67 ou não infectados, indicando que a ativação dos macrófagos pelo fungo acapsular e subsequente secreção de IL-1 $\beta$  não auxiliaram na contenção do crescimento intracelular do *C. neoformans* em macrófagos adjacentes. Neste contexto, as moléculas secretadas no meio durante a interação entre macrófagos e B3501 são as prováveis responsáveis pela susceptibilidade apresentada pelos macrófagos inseridos neste microambiente. Outro fator interessante investigado foi que na ausência de macrófagos nas câmaras inferiores, as cepas B3501 e  $\Delta$ cap67 não eram capazes de modular a capacidade antifungicida de macrófagos adjacentes,

sendo que os macrófagos nas câmaras superiores verticalmente adjacentes a estes fungos apresentavam as mesmas cargas fúngicas intracelulares que os macrófagos em câmara adjacente a meio de cultivo (Figura 13B). Este resultado indica a importância da cepa B3501 estar inserida em um ambiente estressor para que suas moléculas secretadas apresentem capacidades inibitórias, como as vistas no CM35, obtido através do crescimento fúngico em meio mínimo estressor.

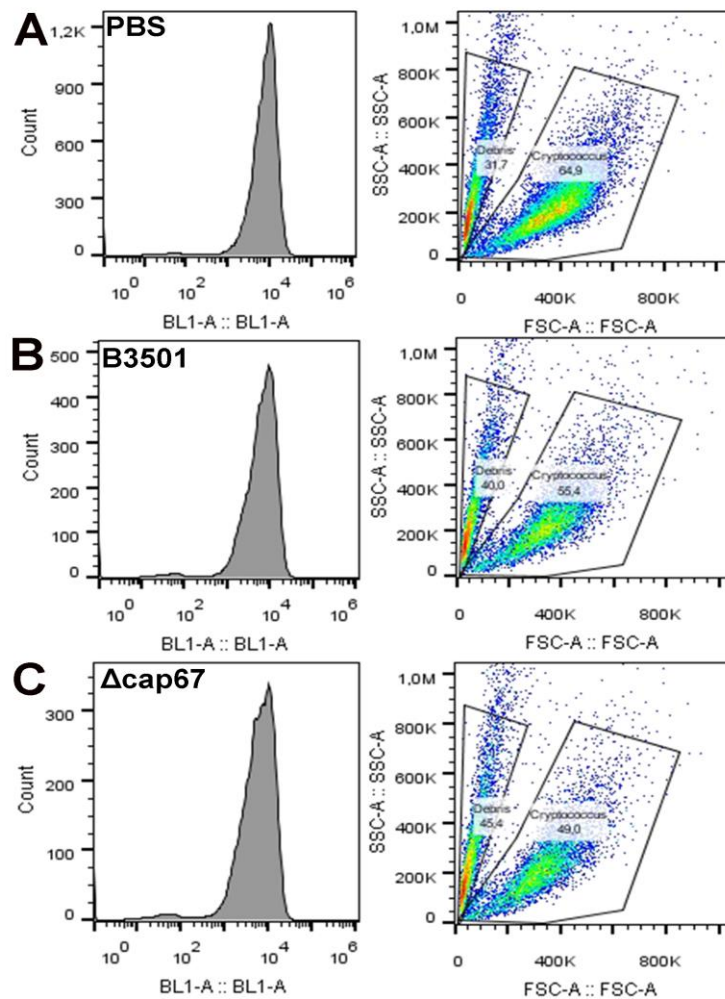


Figura 12 – Validação da integridade de membrana no Sistema “Transwell”. Análise citométrica de leveduras intracelulares em BMMs infectadas com H99 expressando GFP (2:1) na câmara superior do aparato. BMMs na câmara inferior foram estimuladas com LPS somente (A) ou infectadas concomitantemente (5:1) pelas cepas B3501 (B) ou  $\Delta cap67$  (C).



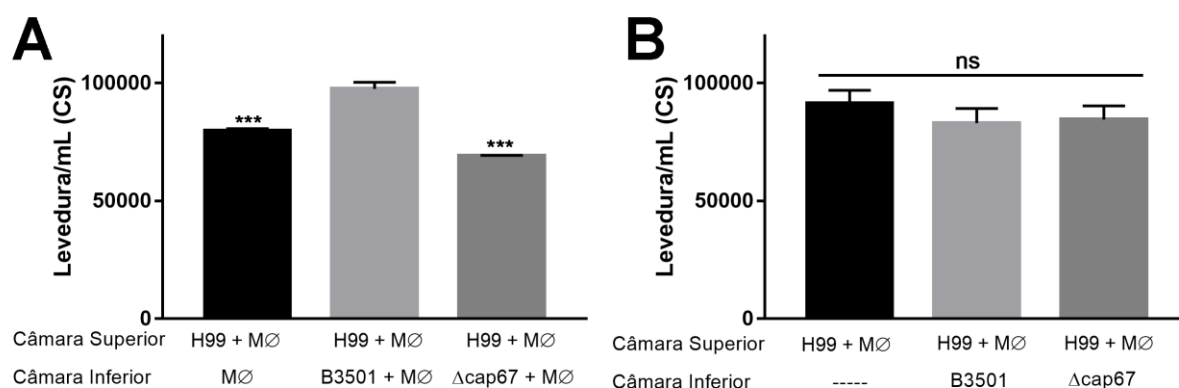


Figura 13 - Infecção por B3501 impacta atividade fungicida em macrófagos adjacentes não infectados em primeiro momento. A – Análise citométrica de leveduras intracelulares em BMMs infectados por H99 expressando GFP (2:1) na câmara superior do aparato. BMMs na câmara inferior foram estimuladas com LPS somente ou infectadas concomitantemente (5:1) pelas cepas B3501 ou  $\Delta$ cap67. B - Análise citométrica de leveduras intracelulares em BMMs infectados por H99 expressando GFP (2:1) na câmara superior do aparato. A câmaras inferiores receberam meio de cultivo com LPS somente ou com a presença de B3501 ou  $\Delta$ cap67. Comparações foram realizadas com o grupo de macrófagos na câmara inferior infectados com B3501 (A). Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

### CM35 potencializa os eventos de vomocitose entre *C. neoformans* e macrófagos murinos

Após investigar o impacto de moléculas secretadas pela cepa B3501 nas funções fagocíticas e fungicidas de macrófagos, o próximo passo foi investigar relações mais específicas da interação entre essas células e o *C. neoformans*. Investigamos assim o mecanismo de vomocitose, classificado como uma exocitose não lítica em que tanto a célula mamífera quanto a célula fúngica permanecem viáveis após o evento. Para tal, foi desenhada uma análise citométrica envolvendo a detecção de leveduras intracelulares e extracelulares que não passaram por processo de replicação, através da marcação destas leveduras com a sonda “Calcofluor White” (Figura 5). O objetivo foi o de quantificar as leveduras que se encontravam presentes no interior dos macrófagos no início do ensaio e que ao longo do ensaio migrariam para o meio extracelular, contabilizando somente leveduras que apresentassem uma alta fluorescência para “Calcofluor White” e excluindo as que apresentassem baixa intensidade de fluorescência, ou seja, derivadas de replicação por brotamento.

Este ensaio demonstrou que macrófagos tratados com o CM35 concomitantemente à infecção não eram capazes de reter o fungo em ambiente intracelular, favorecendo assim os eventos de vomocitose. Após 12 horas de infecção, macrófagos tratados com CM35 apresentavam mais leveduras com alta fluorescência em seu meio extracelular, quando comparados aos macrófagos que não receberam nenhum tratamento (Figura 14A). Este



fenômeno se repetiu no tempo de 24 horas, com uma quantidade ainda maior de leveduras com alta fluorescência no meio extracelular de macrófagos tratados, indicando um impacto contínuo do CM35 em relação ao mecanismo de vomocitose. Interessantemente, no tempo de 6 horas não houve nenhuma alteração entre os grupos, indicando que um período de tempo considerável é necessário para que os efeitos do CM35 comecem a aparecer, assim como nos ensaios de fagocitose e efeito fungicida.

Adicionalmente, o número de leveduras intracelulares com alta fluorescência apresentou uma queda maior nos macrófagos tratados com o CM35 quando comparados a macrófagos não tratados, sendo esta diferença perceptível após 12 horas de interação (Figura 14B). Corroborando com os dados de vomocitose, macrófagos tratados com CM35 apresentaram um número ainda menor de leveduras intracelulares com alta fluorescência no tempo de 24 horas e um número equiparável ao dos macrófagos não tratados no tempo de 6 horas.

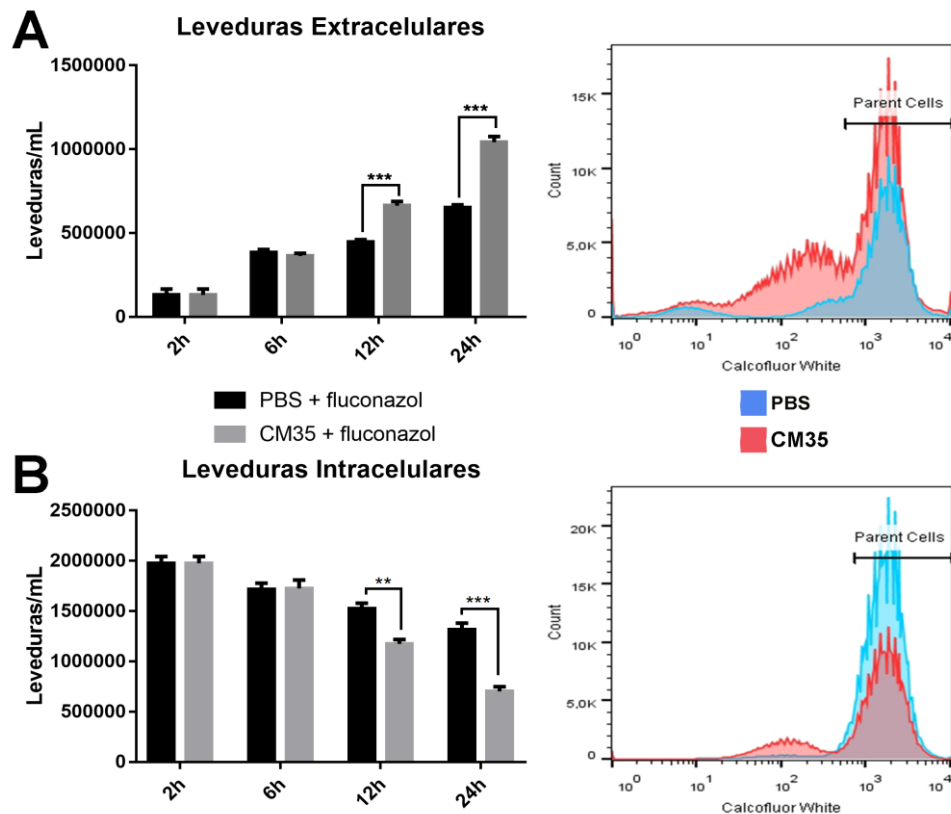


Figura 14 - CM35 potencializa os eventos de vomocitose entre *C. neoformans* e macrófagos murinos. A e B – Análise citométrica de leveduras extracelulares presentes no sobrenadante (A) e intracelulares presentes no lisado (B) de BMMs tratadas ou não com CM35 e infectadas com a cepa H99 (10:1), marcadas com alta fluorescência para “Calcofluor White”. Todos os cultivos receberam fluconazol (10 $\mu$ g/mL). As leveduras foram recolhidas nos tempos de 2, 6, 12 e 24 horas, sendo os histogramas representativos do tempo de 24 horas. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como \*\*:  $P \leq 0.002$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

Quando observados em conjunto, nota-se que os resultados referentes a leveduras intracelulares foram inversamente proporcionais aos obtidos referentes a leveduras extracelulares, reforçando a hipótese de que estas leveduras detectadas no ambiente extracelular se encontravam anteriormente em ambiente intracelular. O fato de que o tratamento com CM35 não interfere na viabilidade de macrófagos é outro indício que reforça a hipótese que o mecanismo pelo qual estas leveduras se encontram no ambiente extracelular é o de vomocitose. Outro dado importante encontrado nestes resultados é que o acréscimo concomitante de CM35 e o *C. neoformans* no ensaio de co-cultivo com macrófagos não foi capaz de alterar a fagocitose das leveduras, não apresentando diferenças entre as células tratadas e não tratadas quanto ao número de leveduras em meio intracelular no tempo de 2 horas de interação (Figura 14B), corroborando com os resultados obtidos nos ensaios de fagocitose.

### **Polissacarídeos secretados contendo GXM não são capazes de inibir a secreção de IL-1 $\beta$**

Baseando-se no fato de que o meio condicionado obtido da cepa capsular de *C. neoformans* (CM35) apresentava ações inibitórias mais pronunciadas quando comparado ao meio condicionado obtido da cepa acapsular (CMCAP), ensaios foram planejados para verificar se a molécula inibitória presente no CM35 não seria derivada de GXM. Esta hipótese havia sido investigada, porém de maneira limitada, considerando que moléculas de GXM que constituem a cápsula se diferem em vários aspectos daquelas que são secretadas no meio de cultivo (FRASES et al., 2008).

Para tal, inicialmente foi verificado se exopolissacarídeos secretados durante o crescimento da cepa B3501 em MM eram capazes de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ , assim como o meio condicionado resultante. Assim como os polissacarídeos de origem capsular, o ensaio com exopolissacarídeos demonstrou que, independente da origem dos polissacarídeos, eles não mimetizavam as inibições promovidas pelo CM35, mantendo os níveis de secreção de IL-1 $\beta$  praticamente inalterados (Figura 15). Considerando que estes exopolissacarídeos foram obtidos de uma membrana de 10kDa e que a fração considerada ativa foi a menor que 1kDa, novos ensaios foram desenhados visando a investigação mais profunda da presença ou ausência de papel inibitório da GXM diretamente no meio condicionado.

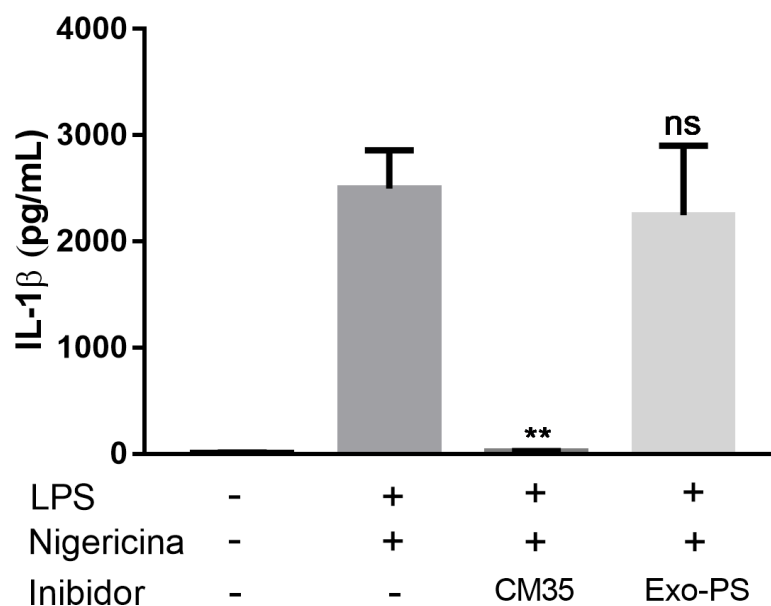


Figura 15 - Polissacarídeos secretados contendo GXM não são capazes de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ . Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMDCs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35 ou exopolissacarídeos (exo-PS). Comparações foram realizadas com o grupo controle positivo. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*\*:  $P \leq 0.002$ .

Para investigar mais precisamente a presença de GXM no meio condicionado, realizamos um ensaio mais sensível de detecção de GXM na fração menor que 1kDa. Com o apoio do Dr. Radamés Cordero, da “Johns Hopkins School of Public Health”, realizamos um ensaio de detecção de GXM em meios condicionados de H99 cultivados em MM por 2 ou 15 dias. Para tal, foi realizado um ensaio de ELISA utilizando os meios condicionados e concentrações seriadas do anticorpo 18B7.

Resultados demonstraram que concentrações entre 10 a 20 $\mu$ g/mL do anticorpo eram suficientes para a detecção de GXM em ambos os meios condicionados testados, não havendo diferença no sinal entre o meio condicionado jovem e antigo (Figura 16). Este resultado demonstra com maior sensibilidade a presença de moléculas derivadas de GXM em frações menores que 1kDa de meios condicionados de *C. neoformans*, corroborando com resultados obtidos em ensaios prévios, em que foi utilizada a concentração de 20 $\mu$ g/mL. Outro fator interessante que este ensaio indicou foi que as moléculas derivadas de GXM apresentam um grau significativo de estabilidade, tendo em vista que o sinal obtido pelo anticorpo 18B7 permanece inalterado mesmo nos cultivos de 15 dias.

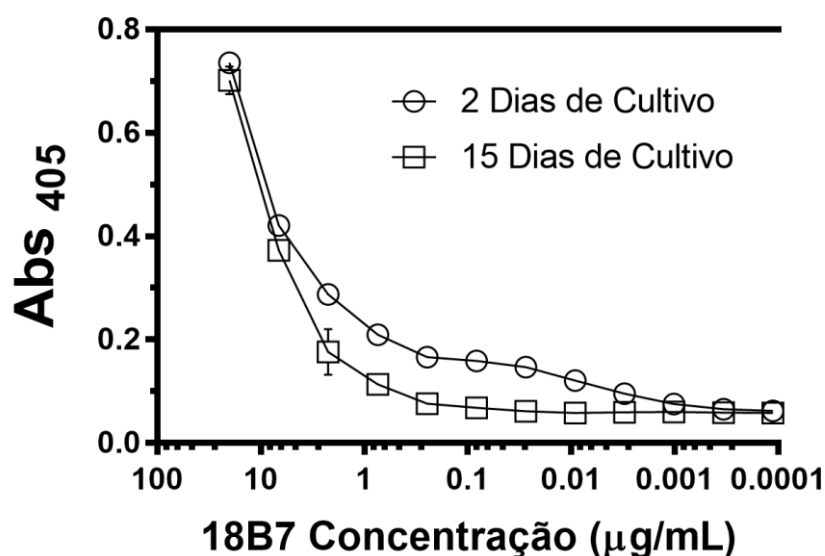


Figura 16 – Detecção de GXM em CMs por ELISA. Absorbância quantificada a partir da detecção de GXM pelo anticorpo 18B7 (20 µg/mL – 0,1 ng/mL) em frações abaixo de 1kDa de meios condicionados derivados de culturas (2 ou 15 dias) de H99.

Após a confirmação da presença de moléculas derivadas de GXM nas frações menores que 1kDa de meio condicionado de *C. neoformans* e da constatação de que o anticorpo 18B7 é capaz de se ligar nessas moléculas, fez-se um procedimento de captura de GXM por ELISA nos meios CM35, assim como em CMCAP e meio mínimo para controle. O objetivo era a maior redução possível de GXM no CM35, a fim de se verificar se sua depleção alteraria as ações inibitórias visualizadas previamente. Outro procedimento realizado foi a eluição de GXM da placa de ELISA e sua reincorporação no CM35, obtendo assim um meio condicionado enriquecido com estas moléculas.

A efetividade do procedimento de captura de GXM por ELISA foi confirmada a partir do processamento de CM35 total pelo ELISA. A técnica empregada para a detecção do GXM nas amostras processadas foi a de internalização dos meios condicionados por macrófagos e subsequente captura de imagens por microscopia de fluorescência confocal. As imagens confirmaram a eficácia do processamento, apresentando uma quantidade significativa de GXM nos macrófagos tratados com CM35 pré-ELISA (Figura 17A), uma depleção de GXM nos macrófagos tratados com CM35 após o ELISA de captura (Figura 17B) e a maior presença desta molécula nos macrófagos tratados com CM35 enriquecido com GXM recuperado das placas de ELISA (Figura 17C).

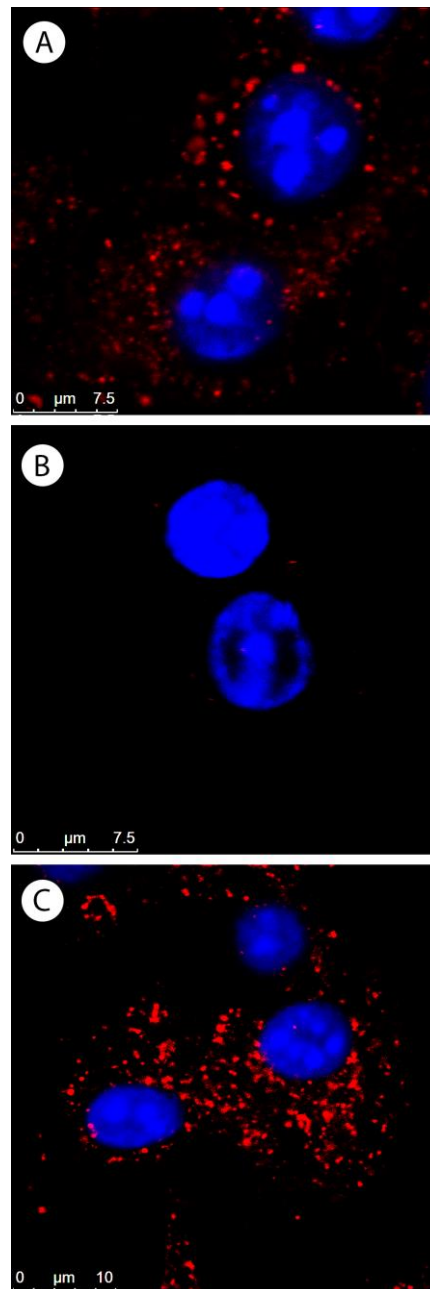


Figura 17 – Validação da técnica de captura de GXM por ELISA. BMMs foram tratados com CM35 total (A), CM35 após o processamento de captura de GXM por ELISA (B) e CM35 reconstituído com GXM recuperada das placas de ELISA (C). Células foram marcadas para o conteúdo nuclear (azul – marcado com DAPI) e para GXM (vermelho – Alexa Fluor 633). Imagens foram obtidas utilizando microscopia confocal de fluorescência.

Com a obtenção das frações menores que 1kDa de CM35, CMCAP e MM processadas quanto a concentração de GXM, o próximo passo foi a realização de ensaios de interação para a verificação das características inibitórias destes meios processados frente à ativação do inflamassoma. Os resultados obtidos foram próximos aos já observados anteriormente com os meios condicionados sem processamento. Mesmo com a depleção de GXM, CM35 continuou

apresentando redução significativa na secreção de IL-1 $\beta$ , enquanto CMCAP e meio mínimo apresentaram apenas redução moderada (Figura 18A). A reincorporação e enriquecimento de GXM também não foi capaz de alterar o padrão inibitório promovido pelo CM35, fato visualizado a partir da manutenção da inibição na secreção de IL-1 $\beta$  independentemente da quantidade de GXM presente no meio condicionado (Figura 18B). O processamento de CMCAP também não promoveu nenhuma alteração no padrão inibitório exibido previamente (Figura 18C), fato já esperado devido à ausência de GXM neste meio condicionado.

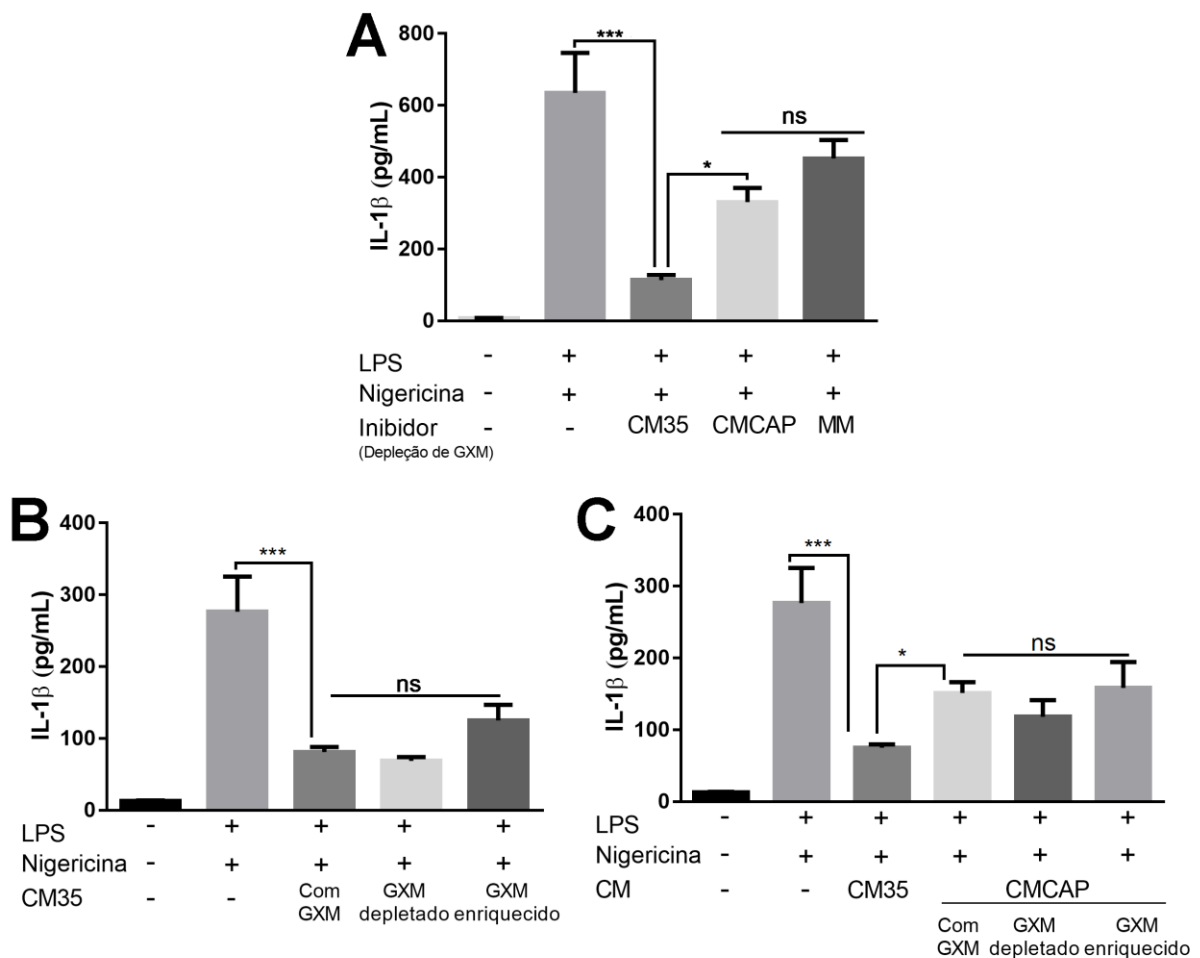


Figura 18 - Processamento de meios condicionados por ELISA de captura de GXM não altera suas características inibitórias. A – Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, CMCAP e MM após processamento por ELISA de captura de GXM. B - Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, CM35 após processamento por ELISA de captura de GXM ou CM35 enriquecido com material recuperado de ELISA. C - Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, CMCAP, CMCAP após processamento por ELISA de captura de GXM ou CMCAP enriquecido com material recuperado de ELISA. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*:  $P \leq 0.033$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

Em conjunto, estes resultados trouxeram uma melhor compreensão da presença de moléculas derivadas de GXM na fração menor que 1kDa do meio condicionado derivado de *C. neoformans* e da ausência de importância destas moléculas nos efeitos inibitórios apresentados pelo CM35. O tratamento de células com exopolissacarídeos contendo GXM não foi capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ . A manipulação direta da concentração de GXM no CM35 também não foi capaz de alterar suas propriedades inibitórias, demonstrando que tanto a ausência quanto uma maior presença destas moléculas não interferem na inibição do inflamassoma promovida pelo CM35.

### **Fosfolipídio e seus precursores e carboidratos associados com virulência não estão associados a capacidade inibitória de CM35**

Tendo confirmado que GXM e moléculas derivadas não eram as responsáveis pela inibição do inflamassoma apresentada pelo CM35, investigamos outras moléculas presentes neste meio condicionado que poderiam estar relacionadas com esta modulação. Inicialmente, decidimos verificar carboidratos, devido à grande concentração desta classe macromolecular e ao fato de carboidratos simples corresponderem às características procuradas, uma molécula pequena, polar, resistente ao calor e à ação de proteinases.

Devido as diferenças apresentadas entre CM35 e CMCAP, foram testados carboidratos que já apresentaram algum tipo de associação com a formação e espessamento da cápsula polissacarídica, estando assim também relacionados com o grau de virulência apresentado pelo fungo. Desta forma, cinco carboidratos foram escolhidos para o teste de interação com macrófagos, sendo dois poliálcools, um dissacarídeo e dois gliceróis que atuam como cabeças polares de fosfolipídios, respectivamente: sorbitol, manitol, trealose, glicerilfosforilcolina e glicerilfosforiletanolamina. Nenhum dos carboidratos foi capaz de promover uma redução significativa da secreção de IL-1 $\beta$  por macrófagos estimulados (Figura 19C).

Outra molécula que se apresentou promissora em análises iniciais do conteúdo presente no CM35 foi a fosfocolina. A detecção desta molécula no meio condicionado era um fato interessante de ser investigado, pois a molécula já havia sido descrita na literatura como capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$  (HECKER et al., 2015), contudo que a mesma molécula também se apresentasse significativamente no CMCAP. Portanto, investigamos o papel de três moléculas envolvidas em sua biossíntese: a precursora colina, fosfocolina e o produto fosfatidilcolina. Assim como os carboidratos testados, nenhuma das três moléculas foi capaz

de inibir a secreção de IL-1 $\beta$  por macrófagos em nosso modelo de ativação. Surpreendentemente, o oposto foi observado em ensaio inicial, com várias concentrações diferentes da molécula estimulando uma maior produção da citocina (Figura 19A). Devido a característica apresentada por estas moléculas de potencializar a secreção de IL-1 $\beta$ , investigamos a associação de colina e fosfatidilcolina com o CMCAP e seus possíveis efeitos. Curiosamente, a suplementação de CMCAP com estas moléculas promoveu um pequeno aumento na produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos ativados, porém não de maneira tão robusta quanto observado anteriormente (Figura 19B). Desta forma, o papel da fosfocolina e seus derivados não foi elucidado somente com estes resultados, entretanto ficou claro que estas moléculas não participavam da inibição promovida pelo CM35, principal alvo de investigação deste trabalho.

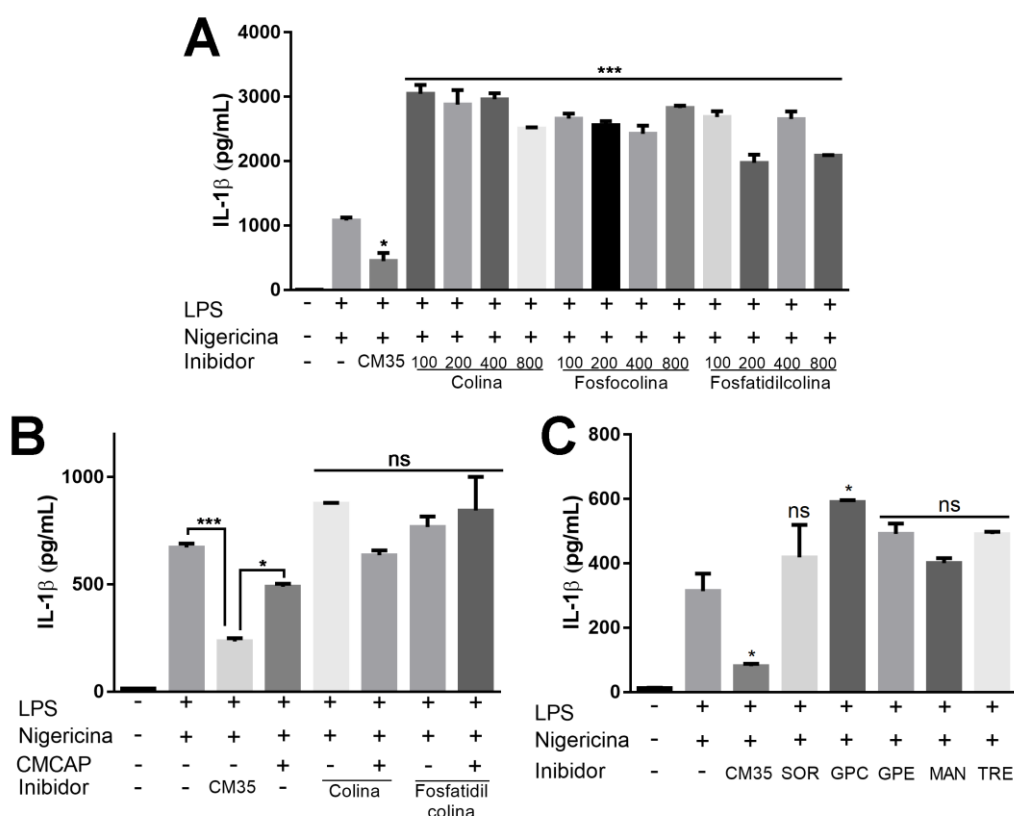


Figura 19 - Fosfolipídio e seus precursores e carboidratos associados com virulência e não estão associados a capacidade inibitória de CM35. A – Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, colina, fosfocolina ou fosfatidilcolina. B - Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, CMCAP, colina (100 $\mu$ M), fosfatidilcolina (100 $\mu$ M) ou combinações de CMCAP e colina ou fosfatidilcolina. C - Níveis de produção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35 ou carboidratos. SOR: Sorbitol; GPC: glicerilfosforilcolina; GPE: glicerilfosforiletanolamina; MAN: manitol; TRE: trealose. Comparações foram realizadas com o grupo controle positivo. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*:  $P \leq 0.033$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .



### ILA participa de inibição do inflamassoma promovida por CM35

Após alguns resultados negativos, decidiu-se realizar uma técnica mais sensível para a detecção de moléculas presentes diferencialmente entre o CM35 e o CMCAP. Para tal, realizamos uma análise qualitativa de moléculas por espectrometria de massa, com o apoio do Dr. Ernesto Nakayasu, da “Pacific Northwest National Laboratory”. Os resultados obtidos indicaram a presença de três metabólitos aromáticos que se apresentavam significativamente mais expressos no CM35 do que no CMCAP: Ácido fenil-láctico (PLA); Ácido 3-(4-hidroxifenil) láctico (HPLA) e Ácido 3-indol láctico (ILA) (Figura 20). Apesar de não existirem indícios da atuação destes metabólitos na patogenicidade do *C. neoformans* e nem em relação a alguma influência destes metabólitos quanto a ativação ou inibição do inflamassoma, decidiu-se investiga-las devido as características físico-químicas que se encaixavam com o que buscávamos e ao fato de suas estruturas moleculares se assimilarem com a de anti-inflamatórios clássicos (ex.: ácido acetilsalicílico).

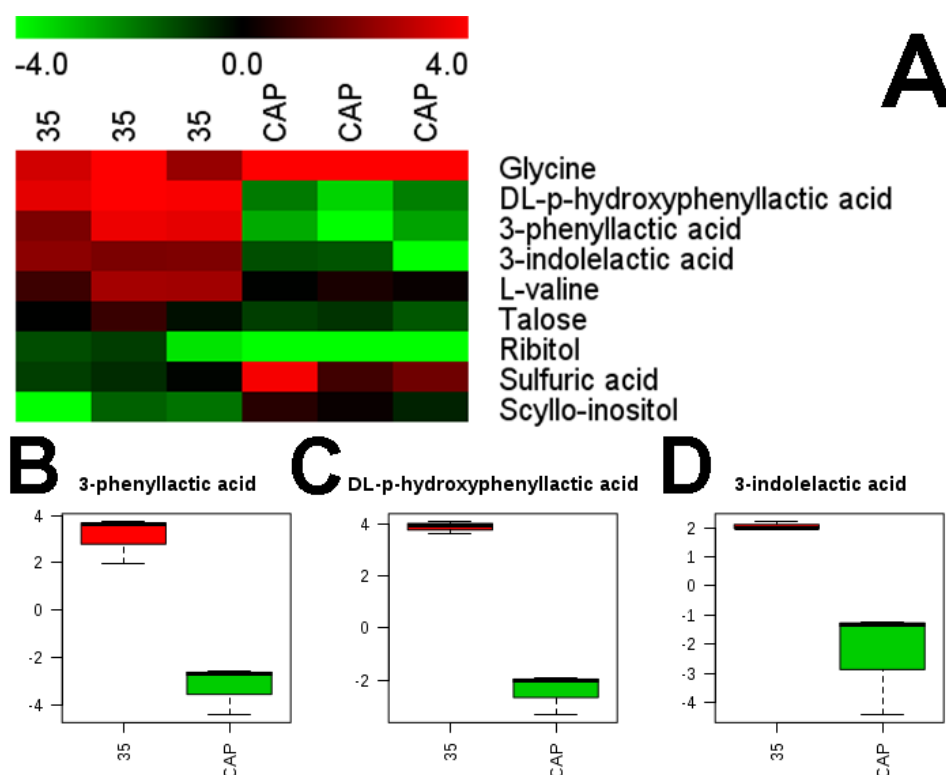


Figura 20 – Análise diferencial de conteúdo presente em CM35 e CMCAP por espectrometria de massa. A – Mapa de calor referente a intensidade extraída de moléculas analisadas em amostras de CM35 e CMCAP, com intensidade relativa para cada molécula representada por cores (verde: baixa concentração; vermelho: alta concentração). B, C e D – Gráficos comparativos dos valores obtidos na análise de mapa de calor para metabólitos aromáticos encontrados em CM35 e CMCAP, sendo eles: PLA (A); HPLA (B) e ILA (C).

Ensaio de interação entre macrófagos estimulados e metabólitos aromáticos demonstraram que nenhum dos metabólitos era capaz de mimetizar a inibição do inflamassoma promovida pelo CM35. Entretanto, o tratamento de macrófagos com metabólitos sozinhos ou em combinação demonstrou a capacidade do metabólito ILA em inibir significativamente a ativação canônica do inflamassoma, mesmo que em níveis mais moderados do que quando comparado ao CM35.

Primeiramente, verificou-se que a adição de uma concentração alta de ILA por si só era capaz de inibir significativamente a secreção de IL-1 $\beta$  em cultura de macrófagos estimulados com LPS e nigericina, enquanto a adição de PLA ou HPLA não era suficiente para se alcançar tal efeito (Figura 21A). A adição de HPLA somente conseguiu inibir a secreção de IL-1 $\beta$  quando associado ao ILA, enquanto PLA somente apresentou algum efeito significativo quando presente no tratamento conjunto com os três metabólitos. Interessantemente, a combinação de ILA com outros metabólitos acabou por reduzir sua eficácia, fato parcialmente explicado pela redução em sua concentração final, mas também indicativo que os outros metabólitos possam agir como antagonistas quando em associação, fato visualizado na diferença significativa de inibição promovida pela associação PLA e ILA comparada a associação HPLA e ILA (Figura 21A). Assim como com o tratamento com CM35, o tratamento com nenhum metabólito sozinho ou em associação foi capaz de afetar a secreção de TNF- $\alpha$ , indicando que a inibição promovida pelo ILA é igualmente seletiva para a via de sinalização do inflamassoma (Figura 21B).

Após a confirmação do impacto no processamento e secreção de IL-1 $\beta$  exercido pelo ILA e suas associações, investigou-se se outros eventos relacionados com a ativação do inflamassoma também poderiam se apresentar alterados na presença dos metabólitos. Inicialmente, ensaios de liberação de LDH a partir de piroptose estimulada por nigericina demonstraram que, apesar da menor liberação de LDH apresentada pelos macrófagos tratados pelos metabólitos, os metabólitos não eram capazes de prevenir a morte celular por piroptose de maneira tão significativa quanto o tratamento com CM35 (Figura 22). Desta forma, concluiu-se que o tratamento com metabólitos, inclusive o ILA, não apresentou grande impacto nos eventos de piroptose.

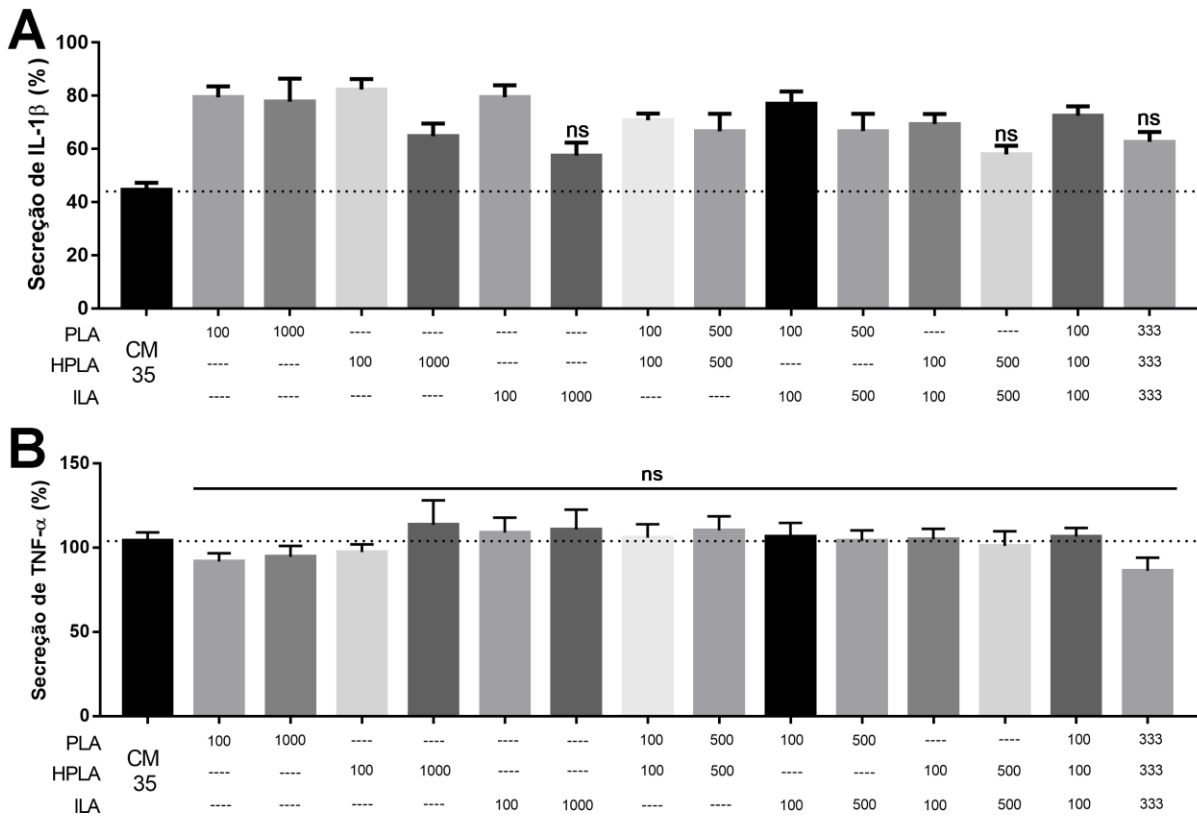


Figura 21 - ILA participa de inibição do inflamassoma promovida por CM35. A - Porcentagem de secreção de IL-1 $\beta$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, PLA, HPLA ou ILA sozinhas ou em combinação. Níveis de secreção do controle positivo foram normalizadas para o valor de 100%. B - Porcentagem de secreção de TNF- $\alpha$  após ensaio de interação entre BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, PLA, HPLA ou ILA sozinhas ou em combinação. Níveis de secreção do controle positivo foram normalizadas para o valor de 100%. Comparações foram realizadas com o grupo tratado com CM35. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo, demonstrando similaridade entre as amostras.

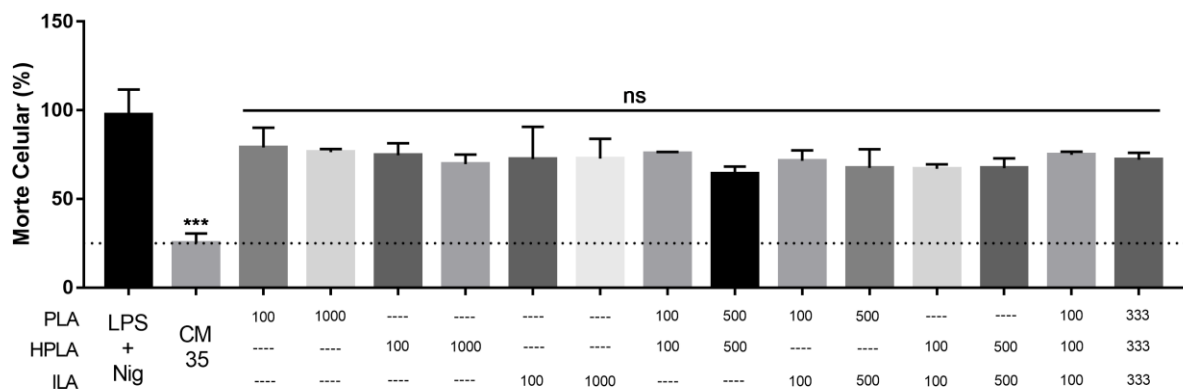


Figura 22 – Metabólitos não previnem morte celular por piroptose. Porcentagem de morte celular de BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, PLA, HPLA ou ILA sozinhas ou em combinação. As porcentagens foram obtidas a partir da geração de uma curva padrão de morte celular a partir das absorbâncias medidas no ensaio, com o grupo não tratado representando o valor 0% e um grupo tratado com DMSO (15%) representando o valor 100%. Comparações foram realizadas com o grupo controle positivo. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

O próximo passo foi analisar se o tratamento com metabólitos era capaz de inibir a ativação e autoclivagem da proteína caspase-1, a partir de análise citométrica com o peptídeo YVAD-FLICA. Os resultados demonstraram que, referente a ativação de caspase-1, somente o tratamento com ILA foi capaz de inibir este evento. Curiosamente, associações com HPLA e PLA não foram capazes de inibir significativamente a ativação da enzima como foram com a secreção de IL-1 $\beta$ , reforçando a hipótese que estes metabólitos podem agir como antagonistas ao ILA (Figura 23A). Diferentemente da inibição promovida pelo CM35, a inibição promovida pelo ILA somente foi efetiva quando o inflamassoma foi ativado por nigericina, não sendo observado nenhum impacto em macrófagos ativados pela infecção com  $\Delta$ cap67 e tratados com ILA (Figura 23B). Outro fator diferencial entre a inibição visualizada entre CM35 e ILA foi a incapacidade que o tratamento com o metabólito apresentou em inibir a ativação de caspase-8, sendo que nenhum outro metabólito também alterou esta ativação (Figura 23C).

Em conjunto, os resultados demonstram que o metabólito ILA tem participação nas propriedades inibitórias apresentadas pelo CM35. Contudo, diferenças na efetividade da inibição promovida por ILA indicam que esta molécula não é a única responsável por estes efeitos. Apesar das semelhanças estruturais e da concentração significativa no CM35, os metabólitos PLA e HPLA não apresentaram propriedades inibitórias significativas que mimetizassem o CM35.

### **Vesículas extracelulares de *C. neoformans* lisadas promovem inibição na secreção de IL-1 $\beta$ similar ao CM35**

Após a confirmação de que CM35 era capaz de afetar respostas pró-inflamatórias, incluindo ensaios que demonstraram impacto direto na efetividade de macrófagos frente à infecção por *C. neoformans*, decidimos realizar ensaios para verificar se a efetividade do CM35 se limitava a um microambiente restrito, atuando somente em uma interação direta do fungo internalizado com as células fagocíticas e células adjacentes ou se a inibição promovida por estas moléculas secretadas poderiam alterar outras células além do microambiente de infecção, como indicava o ensaio de atividade fungicida no sistema “Transwell” (Figura 13). Para tal, o primeiro passo foi verificar se vesículas extracelulares (EVs), possuíam a mesma capacidade inibitória do CM35, tendo em vista os indícios presentes na literatura de que estas vesículas são produzidas durante a criptococose e que pacientes infectados produzem

anticorpos em seu soro que são capazes de reconhecer EVs, indicando uma possível migração pelo organismo do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2007, 2008).

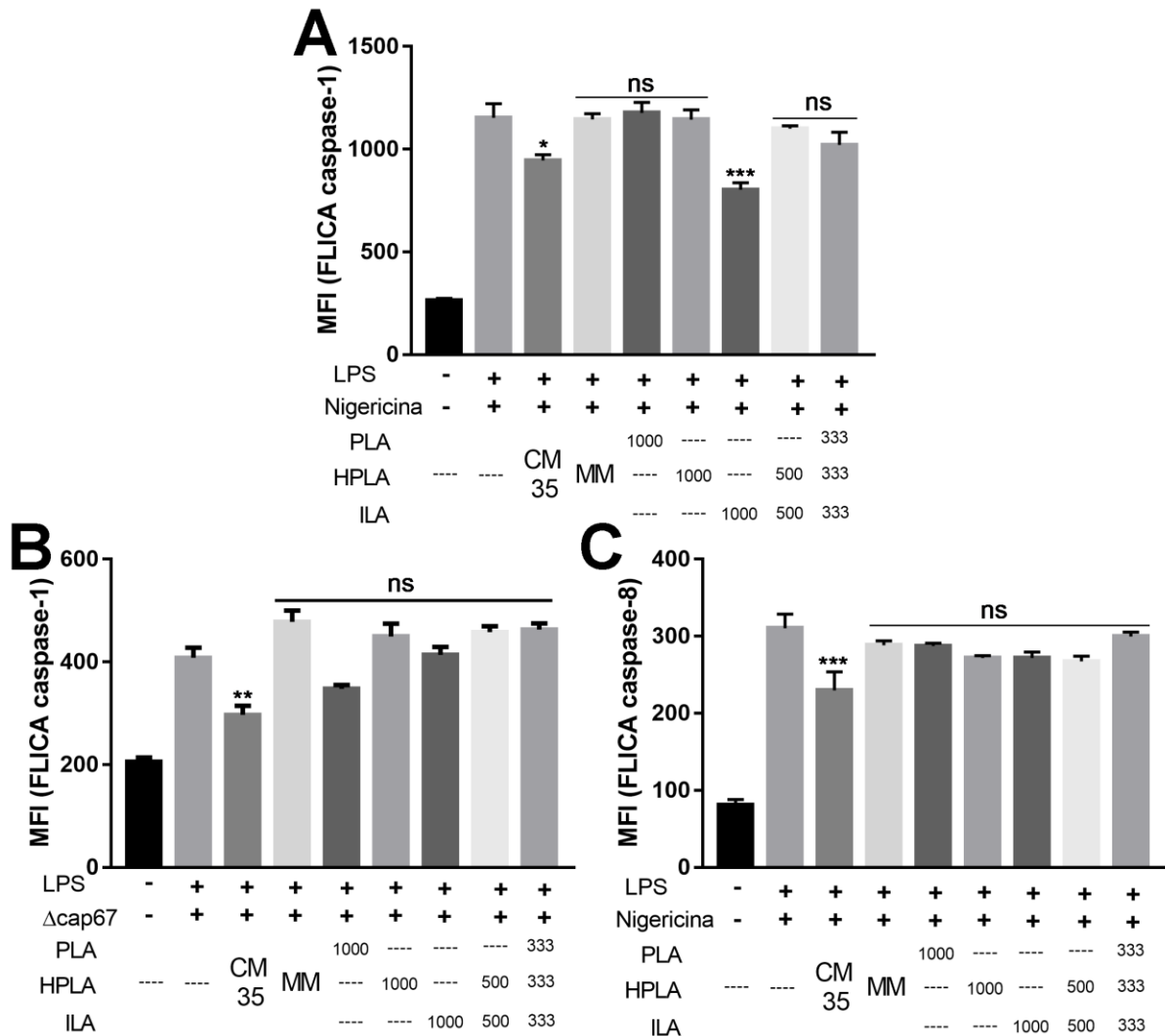


Figura 23 - ILA apresenta padrões diferentes de CM35 quanto à inibição da ativação de caspase-1. A - Níveis intracelulares de caspase-1 ativa em BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, MM e metabólitos sozinhos ou em conjunto. B - Níveis intracelulares de caspase-1 ativa em BMMs estimuladas com LPS, infectadas com  $\Delta cap67$  e tratadas com CM35, MM e metabólitos sozinhos ou em conjunto. C - Níveis intracelulares de caspase-8 ativa em BMMs estimuladas com LPS + nigericina e tratadas com CM35, MM e metabólitos sozinhos ou em conjunto. Gráficos representativos da mediana de fluorescência registrada no filtro FITC. Comparações foram realizadas com o grupo controle positivo. Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*:  $P \leq 0.033$ ; \*\*:  $P \leq 0.002$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

O processo de isolamento de EVs, embora bem documentado e com protocolos detalhados na literatura (BROWN et al., 2015), ainda é um processo complexo e pouco reprodutível, que possui diversas etapas críticas e rendimento considerado não uniforme. Desta forma, a padronização do processo de isolamento e purificação de vesículas deve ser

sempre o primeiro passo de um grupo que deseja trabalhar com estas estruturas. Em nosso laboratório, as vesículas obtidas se apresentaram em um padrão próximo ao encontrado na literatura vigente (RODRIGUES et al., 2007), apresentando-se bem delimitadas, circulares e com diâmetro entre 50 à 300nm (Figura 24). Outra característica usual das vesículas de *C. neoformans* observada nos ensaios de caracterização foi o alto índice de heterodispersão (pdi) apresentado por estas vesículas, ou seja, elas apresentavam tamanhos significativamente diferentes de diâmetro em uma solução (Figura 24A).

Após as etapas de padronização, as vesículas obtidas foram utilizadas em ensaios de interação com células dendríticas estimuladas para a ativação do inflamassoma. O ensaio se baseou na característica exibida por EVs derivadas de *C. neoformans* de se romper na presença de albumina, sendo assim criado dois grupos de vesículas: íntegras e rompidas (WOLF; RIVERA; CASADEVALL, 2012). Vesículas íntegras foram consideradas aquelas que foram adicionadas em co-cultivo sem a presença de soro fetal bovino (SFB), enquanto vesículas rompidas foram consideradas aquelas que foram adicionadas em co-cultivo com a adição de SFB (Figura 25).

A presença de EVs do fungo B3501 isoladamente não foi suficiente para a ativação das BMDCs, visto que o tratamento destas células apenas com as vesículas não estimulou a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Figura 26A e 30B). Fornecendo estímulos adicionais de LPS e nigericina, o tratamento com vesículas novamente não impactou a secreção de TNF- $\alpha$  (Fig.30A), indicando que as vesículas, independentemente de seu estado, não eram capazes de interferir na via de sinalização de nf- $\kappa$ B. No entanto, ao se analisar a secreção de IL-1 $\beta$ , as EVs apresentaram capacidades modulatórias distintas enquanto íntegras ou rompidas. O tratamento das BMDCs com vesículas íntegras potencializava a produção e secreção de IL-1 $\beta$ , quando adicionadas aos estímulos LPS e nigericina (Fig.30B). Quando rompidas, as vesículas liberavam seu conteúdo vesicular no co-cultivo, conteúdo este que foi capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$  por células estimuladas (Fig. 30B). Em conjunto, os resultados demonstram a capacidade que as vesículas extracelulares e seu conteúdo possuem em modular a via de sinalização do inflamassoma, sendo que somente a citocina dependente deste complexo teve sua produção e secreção alterada durante os ensaios de interação. Interessantemente, o estado de integridade das vesículas foi um fator determinante para o desfecho desta modulação, com um robusto aumento de atividade na presença de EVs íntegras e inibição significativa na presença de conteúdo vesicular.



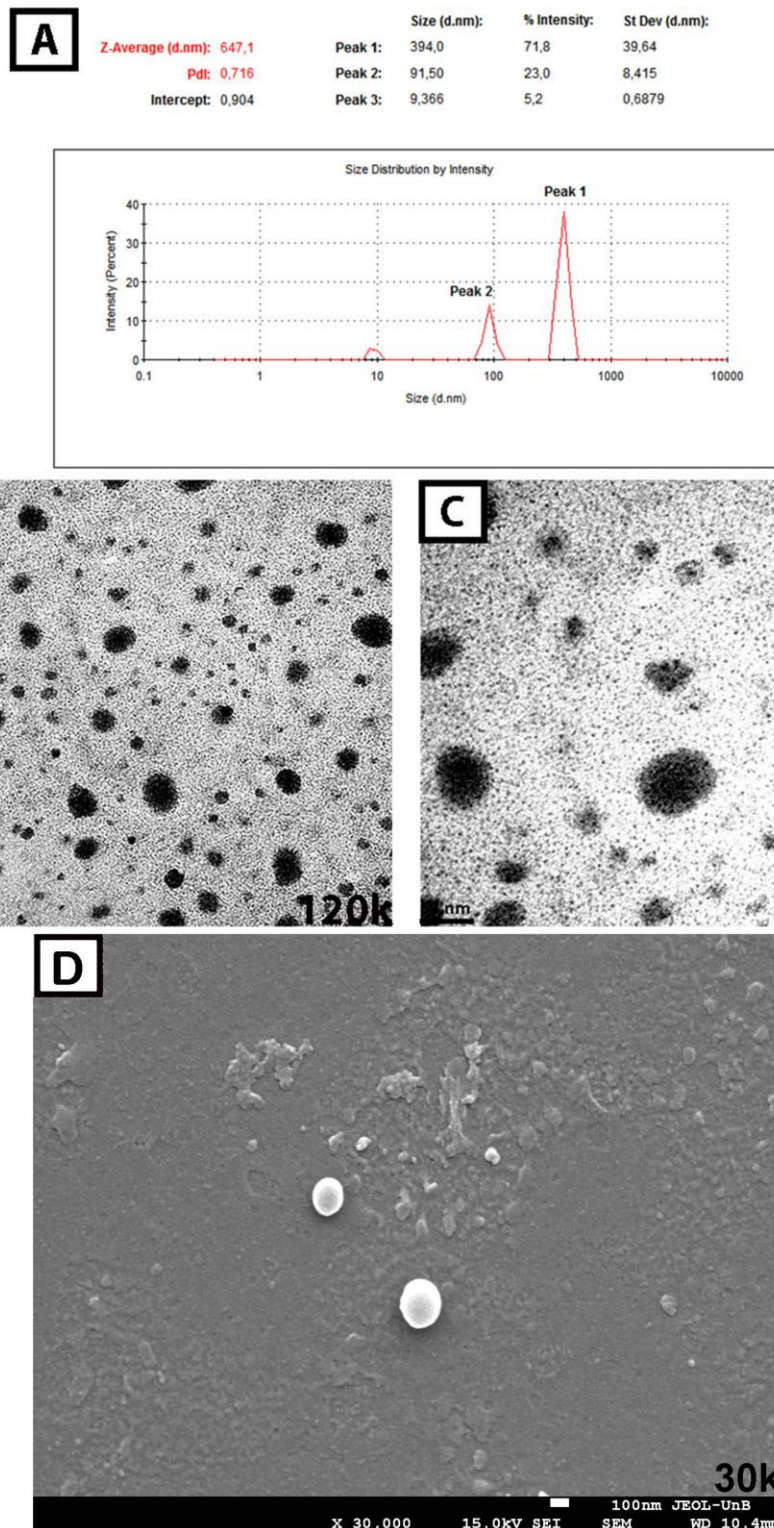


Figura 24 – Caracterização de vesículas extracelulares secretadas por *C. neoformans*. A – Análise de suspensão vesicular por espalhamento dinâmico de luz (DLS), demonstrando o diâmetro das partículas presentes. O gráfico representa a média de três leituras, sendo representativo de três leituras independentes. B, C – Imagens de suspensão vesicular contrastadas negativamente com PTA, obtidas em microscopia eletrônica de transmissão, nos aumentos de 120 mil vezes e 300 mil vezes, respectivamente. D – Imagens de suspensão vesicular metalizadas com platina, obtidas em microscopia eletrônica de varredura, no aumento de 30 mil vezes.

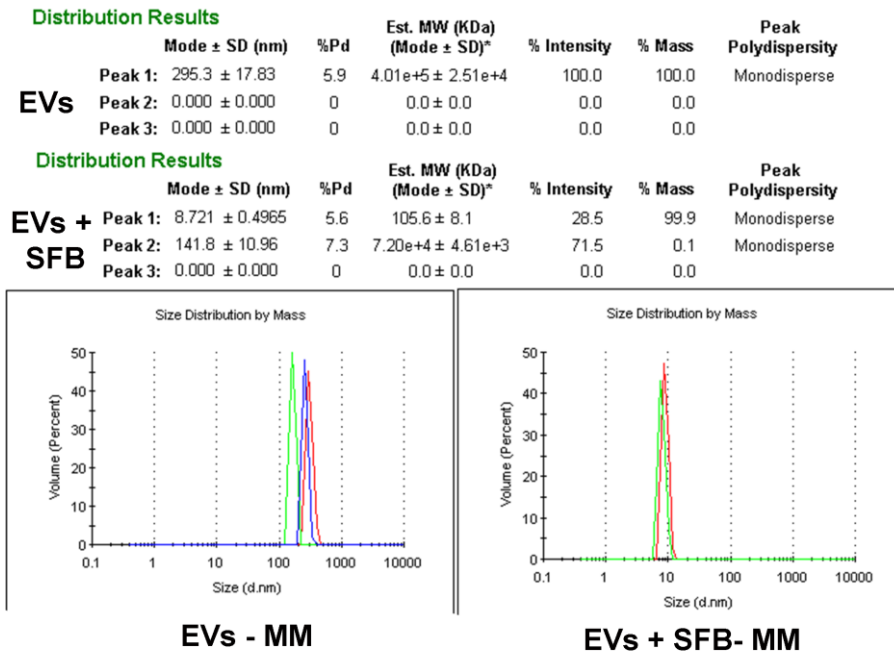


Figura 25 – Incubação com SFB rompe EVs de *C. neoformans*. Análise de suspensão vesicular por espalhamento dinâmico de luz (DLS), demonstrando o diâmetro das partículas presentes em vesículas íntegras (EVs) ou rompidas (EVs + SFB)

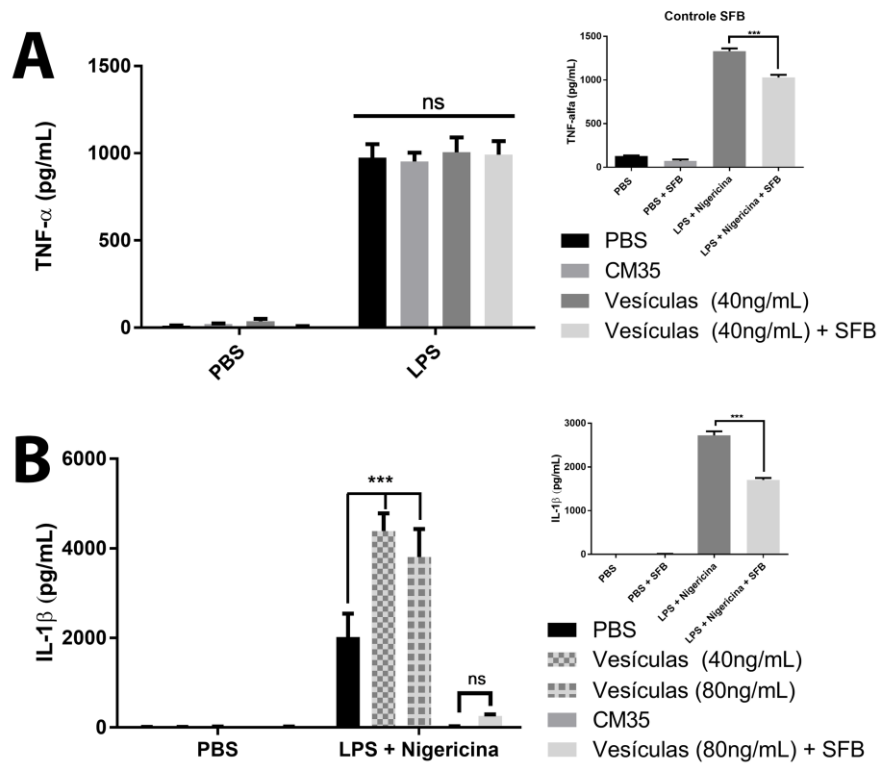


Figura 26 – Vesículas extracelulares de *C. neoformans* lisadas promovem inibição na secreção de IL-1 $\beta$  similar ao CM35. A;B – Detecção por ELISA da produção de TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) por BMDCs estimuladas por LPS, nigericina e tratadas por vesículas extracelulares (40 ou 80ng de ergosterol/mL) ou CM35. Nos cantos superiores direitos estão representados os controles experimentais acrescidos de soro fetal bovino (SFB). Amostras foram comparadas e sua significância indicada como ns: não significativo; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .



---

## DISCUSSÃO

O atual conhecimento acerca da interação fúngica com vias de sinalização dos inflamassomas ainda é escasso. Apesar da descrição dos principais receptores envolvidos e de grande parte dos sinais de dano exigidos para a ativação do inflamassoma por fungos, os mecanismos acerca da modulação e/ou evasão desta resposta imune ainda estão pouco elucidados. Neste contexto, o verdadeiro impacto da ativação do inflamassoma durante infecções fúngicas ainda não é totalmente caracterizado, apesar dos avanços realizados durante os últimos anos. Neste trabalho, demonstramos que moléculas secretadas pelo *C. neoformans* são capazes de inibir especificamente a ativação canônica da via de sinalização do inflamassoma NLRP3 e diminuir a atividade anticriptocócica de macrófagos, permitindo assim a sobrevivência e replicação do fungo quando em interação com fagócitos. Adicionalmente, determinamos que moléculas derivadas de GXM não participam destes processos em nossos modelos de estudo e também indicamos uma molécula que se apresentou parcialmente responsável pelas propriedades inibitórias apresentadas pelo meio condicionado do *C. neoformans*.

A ativação do inflamassoma está associada com a montagem de uma resposta pró-inflamatória, principalmente pela função desta via no processamento das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Muito além de simplesmente ativarem macrófagos e neutrófilos, ambas são citocinas-chave no desenvolvimento da polarização Th17 e Th1, respectivamente (VAN DE VEERDONK et al., 2011). Vale ressaltar que o inflamassoma NLRP3 é implicado como uma das principais vias de sinalização associadas com diversos modelos autoimunes (SHEN et al., 2018). Além disto, como o balanço Th1/Th17 é amplamente descrito como uma resposta protetora frente a infecção por patógenos fúngicos, defeitos no inflamassoma NLRP3 estão associados com um pior prognóstico para o hospedeiro em modelos de infecção, desde uma severa susceptibilidade em candidíase (GROSS et al., 2009) até uma moderada susceptibilidade em criptococose (LEI et al., 2013). Por outro lado, defeitos no NLRP3 também já foram associados com uma melhor no prognóstico em aspergilose associada com fibrose cística (MORETTI et al., 2014) ou não apresentaram nenhum impacto durante o curso da doença em cromoblastomicose (CASTRO et al., 2017). Desta forma, é possível afirmar que a ativação do inflamassoma é um evento protetor na maioria das infecções fúngicas, ainda que a importância desta ativação seja variável entre os patógenos.

Como a formação da plataforma do inflamassoma a partir de sua ativação canônica envolve várias proteínas e uma sinalização “downstream”, existem várias etapas que podem ser inibidas para a prevenção da formação deste complexo, prevenindo assim os eventos celulares que são inflamassoma dependentes. Uma única interferência geralmente é suficiente para desfazer toda a via de sinalização e conseqüentemente a função do inflamassoma, desde a ativação dos receptores intracelulares até a autoclivagem das caspases (SHEN et al., 2018). As conseqüências da ativação do inflamassoma também podem ser diretamente inibidas, como por exemplo a prevenção da formação de poros na membrana por agentes citoprotetores, como a glicina (FINK; COOKSON, 2006). Este trabalho demonstrou que o meio condicionado da cepa B3501 de *C. neoformans*, apesar de promover uma robusta inibição na secreção de IL-1 $\beta$  e LDH (BÜRCEL, 2015), impactou de maneira moderada a ativação de caspase-1 e caspase-8.

É conhecido o fato de que IL-1 $\beta$  pode ser secretada a partir de diferentes mecanismos, dependendo também do grau de ativação celular, como por exemplo a partir de poros formados por Gasdermina-D ou através de rupturas na membrana plasmática durante a piroptose (EVAVOLD et al., 2017). Neste modelo, glicina não foi capaz de prevenir a formação de poros em macrófagos imortalizados, conseqüentemente prevenindo a liberação de LDH, mas não a secreção de citocinas. Estudos também descreveram que macrófagos em processo de morte por piroptose são a principal fonte de secreção de IL-1 $\beta$  em modelos *in vitro*, com macrófagos peritoneais apresentando ativação de caspase-1 e um aumento robusto da secreção da citocina que coincidem com o instante em que a célula morria. Interessantemente, a inibição na ativação de caspase-1 nestes modelos reduziu a secreção de IL-1 $\beta$ , contudo não preveniu a morte celular. (CULLEN et al., 2015; LIU et al., 2014). Em conjunto, estes estudos mostram que a secreção de IL-1 $\beta$  e a morte celular por piroptose podem ocorrer de forma independente, mesmo ambos eventos sendo usualmente dependentes da ativação de caspase-1. Essa ativação diferencial parece depender do estímulo utilizado para a ativação do inflamassoma, do tipo celular analisado e do modelo de inibição utilizado.

Em nosso modelo, meio mínimo contendo glicina impactou tanto na secreção de IL-1 $\beta$  quanto LDH, interagindo por um prolongado tempo com macrófagos que foram posteriormente estimulados com nigericina. Interessantemente, este impacto não ocorreu quando o tratamento com MM foi realizado em células dendríticas ou macrófagos infectados

---

com  $\Delta\text{cap67}$ , se aproximando dos resultados apresentados pela literatura (FINK; COOKSON, 2006).

Outro aspecto interessante apresentado em nosso modelo de inibição de inflamassoma foi o acúmulo intracelular de pro-IL-1 $\beta$  em células estimuladas e tratadas com CM35 (BÜRCEL, 2015). Está bem elucidado que nem a ativação nem a inibição de caspase-1 por si só é capaz de impactar os níveis intracelulares de pró-IL-1 $\beta$  em células estimuladas, indicando que a produção desta citocina é estável independente de sua clivagem ocorrer ou não (SANZ; VIRGILIO, 2000). Uma possível explicação para a estabilidade dos níveis intracelulares durante a inibição de caspase-1 é que a pró-IL-1 $\beta$ , juntamente com outras proteínas intracelulares não relacionadas com o inflamassoma, estão presentes no meio extracelular de células que apresentam o inflamassoma NLRP3 ativo (CULLEN et al., 2015). Por outro lado, um aumento ou diminuição nas reservas intracelulares desta citocina impacta de maneira direta a secreção de IL-1 $\beta$ , (ZASŁONA et al., 2017), demonstrando os níveis da citocina madura não interferem com a produção de sua pré-forma, mas a produção de pró-IL-1 $\beta$  está intimamente ligada com o processamento e secreção de IL-1 $\beta$ .

Em nosso modelo, o aumento nos níveis de pró-IL-1 $\beta$  ocorreu concomitantemente a uma redução na secreção de IL-1 $\beta$ , fato que não pode ser totalmente explicado pela inibição visualizada na ativação de caspase-1 e caspase-8. Um dos aspectos diferenciais de nosso modelo é a prevenção da morte celular por piroptose, fato sugestivo de que possivelmente as proteínas intracelulares são retidas durante a ativação do NLRP3 nos grupos tratados pelo CM35. Adicionalmente, transcritos de IL-1 $\beta$  apresentaram-se altamente expressos nestas células, indicando uma produção robusta de pró-IL-1 $\beta$ , mesmo após 24 horas do estímulo inicial. Tomados em conjunto, estes dados indicam que o tratamento com o CM35 impacta de forma significativa as etapas de processamento e secreção de IL-1 $\beta$ , provavelmente em conjunto. Esta hipótese é confirmada pelo fato que, mesmo estas células apresentando níveis altos de pró-IL-1 $\beta$  e seus transcritos, a célula se apresenta incapaz de secretar a citocina madura.

A incapacidade do meio mínimo por si só impactar negativamente a ativação de caspase-1 também é um dado importante, considerando que sua adição no cultivo é suficiente para reduzir a secreção de IL-1 $\beta$  e impedir a piroptose, mesmo que não tão significativamente quanto o CM35 (BÜRCEL, 2015). Este fato foi explicado pela presença considerável de glicina no meio de cultivo. A glicina é um agente citoprotetor que é capaz de bloquear efluxo

iônico, bloqueando assim a piroptose (FINK; COOKSON, 2006). É possível que a glicina também afete a ativação do inflamassoma pela nigericina em nosso modelo, baseando-se que seu mecanismo de ação promove o efluxo de potássio intracelular. Este mecanismo de ação explicaria a razão do MM e glicina não afetarem de maneira significativa a secreção de IL-1 $\beta$  por BMDCs, que não são tão dependentes do segundo estímulo, e por BMMs estimuladas a partir da infecção por  $\Delta$ cap67, visto que mais de um estímulo intracelular ocorre neste modelo de ativação de inflamassoma. Desta forma, a incapacidade de inibição apresentada pelo MM nos ensaios de detecção de caspase ativa indica que as ações promovidas pelo CM35 observadas neste trabalho não são simplesmente pela presença de glicina no meio de cultivo, e sim por características próprias derivadas de suas moléculas.

Apesar da importância da ativação do inflamassoma na montagem de uma resposta imune frente a infecções fúngicas, pouco se sabe sobre os mecanismos utilizados por patógenos fúngicos para evadir esta resposta. Os primeiros estudos acerca da ativação do inflamassoma NLRP3 por agentes fúngicos demonstraram que a morfogênese era importante, a partir da observação que certas morfologias induziam respostas mais robustas comparadas com outras, como por exemplo hifas de *C. albicans* e fragmentos hifais de *A. fumigatus* induzindo uma maior secreção de IL-1 $\beta$  quando comparados a leveduras e conídios da mesma espécie. (CHENG et al., 2011; SAÏD-SADIER et al., 2010). Neste âmbito, *C. neoformans* é reconhecidamente um ruim ativador de inflamassoma, sendo necessárias algumas condições específicas para que sua presença induza a ativação do receptor NLRP3. O GXM é considerado o principal fator responsável pela evasão do fungo quanto a ativação da via do inflamassoma, a partir da proteção contra fagocitose e da prevenção de seu reconhecimento por receptores extracelulares (CHEN et al., 2015; GUO et al., 2014; LEI et al., 2013). Considerando uma modulação direta da via do inflamassoma por patógenos fúngicos visando impactar a atividade fungicida de células imunes, o único exemplo descrito até hoje surpreendentemente envolve a ativação desta via por hifas internalizadas de *C. albicans*, que ativam o inflamassoma NLRP3 a partir da secreção de um peptídeo tóxico denominado candidalisina e conseqüentemente levam à perfuração da célula e morte via piroptose (KASPER et al., 2018; WELLINGTON et al., 2014).

Apesar da falta de mais evidências acerca da inibição do inflamassoma a partir de patógenos fúngicos, outros patógenos intracelulares como bactérias e vírus já possuem mecanismos bem elucidados de supressão da via NLRP3. As bactérias do gênero *Yersinia* que

atuam como patógenos humanos apresentam um sistema de secreção conservado, denominado sistema de secreção tipo III (T3SS). Este sistema é considerado um fator de virulência para estas bactérias, mesmo sendo capaz de ativar o inflamassoma. Este sistema é responsável pela liberação de proteínas efetoras conhecidas como proteínas externas de *Yersinia* (Yops). Destas proteínas, duas são descritas como inibidoras da ativação do inflamassoma: YopK, que está relacionada a prevenção do reconhecimento de T3SS por receptores NLR (BRODSKY et al., 2010) e YopM, que é relacionada com o bloqueio direto de caspase-1, inibindo sua maturação e efetividade (LAROCC; COOKSON, 2012). Defeitos em ambas proteínas efetoras de *Yersinia* levam a uma ativação mais robusta do inflamassoma e consequente morte bacteriana durante a infecção, reforçando a importância da inibição desta via para a sobrevivência do patógeno.

Vírus da família *Poxviridae* produzem proteínas homólogas a proteínas mamíferas que são responsáveis pela supressão do inflamassoma, conhecidas como proteínas apenas com pirina (POP) e serpinas. Estas proteínas se ligam as porções pirina de ASC ou caspase, impedindo o acoplamento destas proteínas e desta forma a montagem própria do complexo inflamassoma e sua funcionalidade. Acredita-se que a produção destas proteínas é muito importante para a replicação viral no interior de células do hospedeiro, demonstrando assim mais uma vez a importância que a inibição do inflamassoma possui para que a infecção por patógenos intracelulares obtenha sucesso (TAXMAN; HUANG; TING, 2010). Tendo como base estes mecanismos citados, não é surpreendente que o *C. neoformans*, conhecido por ser um patógeno intracelular facultativo, seja capaz de secretar moléculas que especificamente interferem com a ativação do inflamassoma. Devido à importância desta via para o combate a patógenos fúngicos, também é possível hipotetizar que outros mecanismos fúngicos para a inibição do inflamassoma irão ser descobertos em um futuro próximo.

A importância da ativação do receptor IL-1R durante a criptococose é controversa. Enquanto existe um consenso em relação a importância da secreção de IL-18, o papel da secreção de IL-1 $\beta$  já foi descrito como dispensável para a proteção do hospedeiro (WANG et al., 2011). Um estudo recente, ao contrário, demonstrou que a sinalização promovida por IL-1R era essencial para a polarização Th1/Th17 em modelos crônicos de infecção, consequentemente auxiliando na eliminação da carga fúngica no hospedeiro (SHOURIAN et al., 2018). Este estudo sugeriu que estudos anteriores não conseguiram avaliar a importância desta sinalização por utilizarem modelos de infecção virulentos e muito agudos, creditando a

---

efetividade e importância do IL-1R a momentos mais tardios da infecção. De toda forma, estes estudos corroboram e reforçam a importância que os componentes da via NLRP3 apresentam durante a criptococose (LEI et al., 2013).

Nós demonstramos que macrófagos tratados com CM35 sofrem um impacto em sua atividade anticriptocócica, perdendo a capacidade de fagocitar leveduras, de controlar a carga fúngica intracelular e expulsando mais leveduras para o meio extracelular pelo mecanismo de vomocitose, especialmente após contato prolongado com o meio condicionado. Além disso, não observamos alterações significativas na fagocitose, atividade fungicida ou nos eventos de vomocitose em tempos iniciais de tratamento e infecção, reforçando a hipótese que a inibição promovida por CM35 não afeta imediatamente as funções dos macrófagos. A secreção de citocinas dependentes do inflamassoma está geralmente relacionada a uma liberação única e em alta concentração, associada a morte celular por piroptose. Essa liberação em alta concentração de citocinas pró-inflamatórias acaba por ativar outras células ao seu redor, que não necessariamente tiveram sua via de inflamassoma ativada em um primeiro momento, auxiliando desta forma na ativação de um maior número de células e manutenção de um microambiente pró-inflamatório (LIU et al., 2014). Por outro lado, a inibição de caspase-1 reduz drasticamente a promoção do microambiente pró-inflamatório. No geral, a ativação do inflamassoma pode ser relacionada com uma resposta imune mais efetiva contra o *C. neoformans*, polarizando uma resposta Th1 e promovendo uma ativação mais apropriada de macrófagos. Conseqüentemente, a inibição desta ativação pode tornar os macrófagos menos responsivos e eficazes no combate ao fungo, como demonstrado neste trabalho.

O mecanismo de vomocitose/extrusão foi primeiramente descrito em leveduras de *C. neoformans*, sendo considerado inicialmente um evento exclusivo deste patógeno (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006). Estudos posteriores demonstraram que macrófagos infectados com *C. neoformans* promoviam rápidos e intensos eventos de polimerização de actina em seus fagossomos, momentos antes da extrusão do fungo (JOHNSTON; MAY, 2010). Esta dinâmica de interação indicava que a vomocitose era um evento promovido pelo próprio fungo, sendo sugerido na época que o macrófago tentava impedir esta ação a partir da polimerização de actina. Entretanto, estudos identificaram este mesmo fenômeno sendo realizado por outros fungos (BAIN et al., 2012), por bactérias (HAGEDORN et al., 2009; HYBISKE; STEPHENS, 2007) e até mesmo por protozoários

(REAL et al., 2014), levantando questionamentos se a extrusão era realmente promovida por patógenos ou pelo fagócito.

Atualmente, vomocitose é definida como um mecanismo de exocitose não lítica, mediada pelas células do hospedeiro, em que tanto as células do hospedeiro quanto as células fúngicas sobrevivem. O estímulo à vomocitose tende a abrandar o curso da doença, sendo considerado assim um mecanismo protetor em modelos de criptococose (GILBERT et al., 2017). Apesar das vias de sinalização e causas envolvidas na vomocitose ainda estarem pouco elucidadas, uma das hipóteses mais aceitas sugere que macrófagos que realizam vomocitose são aqueles que não conseguem controlar o crescimento fúngico intracelular, optando por liberar o fungo para o meio extracelular ao invés de se tornar um bolsão de replicação para o fungo. Neste sentido, Alanio e colaboradores demonstraram que o desfecho da infecção está altamente relacionado com a taxa de crescimento intracelular em cepas virulentas de *C. neoformans*, mostrando que uma alta taxa de replicação geralmente corresponde com uma maior mortalidade do hospedeiro, enquanto uma menor taxa de replicação corresponde a um aumento de migração do fungo para o sistema nervoso central (ALANIO; DESNOS-OLLIVIER; DROMER, 2011), corroborando com esta hipótese.

Nossos resultados mostraram que, quando tratados pelo CM35, macrófagos apresentavam uma taxa aumentada de vomocitose, sugerindo que a inibição do inflamassoma, com redução de resposta inflamatória e prevenção da piroptose, promovida pelo meio condicionado pode ter estimulado o macrófago a realizar a vomocitose como alternativa para expulsar o fungo que tinha condições para crescer em seu interior. Em conjunto, os resultados de interação entre macrófagos e o *C. neoformans* reforçam a hipótese das moléculas presentes no CM35 agirem como possíveis fatores de virulência, tendo em vista as alterações significativas que o tratamento com o meio condicionado promove em diversos mecanismos vitais para a defesa do hospedeiro durante a infecção.

Pela diferença apresentada entre CM35 e CMCAP nos primeiros ensaios realizados, acreditou-se inicialmente que componentes capsulares seriam os responsáveis pelos efeitos inibitórios apresentados pelo CM35. GXM se apresentava como uma excelente candidata para a molécula responsável pela ação do CM35, por suas características físico-químicas e imunomodulatórias. Como dito anteriormente, a cápsula criptococócica é por muitas vezes classificada como o principal fator de virulência pertencente ao *C. neoformans* (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012), especialmente na relação de modulação do sistema imune do hospedeiro



pela GXM (VECCHIARELLI et al., 2013). Além do mais, já foram descritas atividades imunomodulatórias divergentes de acordo com a massa molecular apresentada pela GXM (ALBUQUERQUE et al., 2014), fator que se encaixava com o fato que somente as frações menor que 1kDa do CM35 possuíam a capacidade de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ . Estes fatores motivaram ensaios mais aprofundados acerca da possível participação de GXM nesta modulação negativa do inflamassoma. Todavia, os resultados deste ensaio demonstraram que GXM secretada pelo fungo ou presente no meio condicionado não eram capazes de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3.

Os dados obtidos por nosso modelo de ativação de inibição do inflamassoma são diferentes dos já relatados pela literatura, em que a presença de polissacarídeos secretados e incorporados diretamente em um mutante acapsular foram suficientes para prevenir a ativação do inflamassoma (GUO et al., 2014). Vale ressaltar que o resultado obtido por nós não era totalmente inesperado, tendo em vista que nosso grupo também realizou ensaios que envolviam a incorporação de polissacarídeos em mutante acapsular com o crescimento do mesmo em CM35. Apesar da confirmação quanto a incorporação da GXM em sua parede celular, o mutante acapsular ainda assim era capaz de ativar o inflamassoma em interação com macrófagos primados com LPS (dados não mostrados). Além da diferença quanto a metodologia de recobrimento da levedura acapsular, outras diferenças entre o experimento realizado por nosso grupo são a utilização do anticorpo 18B7 e o estímulo prévio das células com LPS, que podem explicar as diferenças apresentadas entre os ensaios.

A eliminação das moléculas derivadas de GXM como possíveis responsáveis pela ação inibitória apresentada pelo CM35 suscitou a hipótese de que as moléculas responsáveis por este efeito poderiam também se apresentar no CMCAP, porém em menores concentrações. Fontes de carboidratos são vitais para a produção dos polissacarídeos que constituem a cápsula do *C. neoformans* e, assim como os polissacarídeos, os carboidratos complexos gerados pelos fungos são secretados para o meio (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012; RODRIGUES et al., 2007). Alguns destes carboidratos estão intimamente ligados com o espessamento da cápsula polissacarídica, como o manitol (GUIMARÃES et al., 2010), sendo que os gliceróis acoplados a fosfolipídios GPC e GPE também se mostraram importantes para este espessamento quando o fungo infectava macrófagos ou amebas, situações consideradas estressantes para o fungo (CHRISMAN et al., 2011). Por fim, alguns carboidratos, como sorbitol e trealose, não interferem diretamente na produção capsular,



porém apresentam importância para a sobrevivência do fungo em temperaturas elevadas (37°C) e proteção contra elementos estressores, contribuindo assim diretamente com a virulência do fungo (PETZOLD et al., 2006). Ainda que todos estes carboidratos apresentassem relações próximas com a biossíntese capsular, com parâmetros de virulência e apresentassem também as características físico-químicas buscadas em nosso trabalho, o tratamento dos macrófagos por estes carboidratos não foi capaz de impactar na ativação do inflamassoma NLRP3, excluindo assim a possibilidade de uma destas moléculas ser a responsável pelas propriedades apresentadas pelo CM35.

Outra classe de moléculas presente em quantidade elevada nas porções externas da membrana fúngica e conseqüentemente em seu meio de cultivo são os fosfolipídios, com destaque para a fosfatidilcolina (SHEA; HENRY; DEL POETA, 2006). A biossíntese deste fosfolipídio envolve primariamente duas vias, sendo a principal derivada da obtenção de nutrientes e tendo como substratos a produção prévia de colina e fosfocolina (COLE; VANCE; VANCE, 2012). Colina e fosfocolina já foram descritas na literatura como inibidoras da secreção de IL-1 $\beta$  em leucócitos mononucleares ativadas por LPS e ATP (HECKER et al., 2015). Em nosso modelo, ambas as moléculas não foram capazes de inibir a secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos estimulados com LPS e nigericina, tanto sozinhos quanto em combinação com CMCAP. As diferenças visualizadas podem ser explicadas pelo fato destas duas moléculas serem classificadas como antagonistas específicos de receptores nicotínicos de acetilcolina, sendo também capazes de bloquear o receptor P2X7, responsável pelo reconhecimento de ATP (RICHTER et al., 2016). De fato, o mesmo estudo realizou o tratamento de células de linhagem com LPS e nigericina e não obteve impacto na secreção de IL-1 $\beta$  ao adicionar colina ou fosfocolina, resultado similar dos obtidos em nosso trabalho (HECKER et al., 2015). Este dado distancia estas moléculas de serem as responsáveis pelas características apresentadas pelo CM35, visto que o mesmo promove inibição em células ativadas por nigericina. O efeito oposto é descrito com o tratamento de macrófagos estimulados com LPS e tratados com fosfatidilcolina, sendo observada a ativação do inflamassoma NLRP3 (YEON et al., 2017). Em nosso modelo, fosfatidilcolina não apresentou inibição na ativação do inflamassoma, porém apresentou um aumento robusto na secreção de IL-1 $\beta$  quando adicionada nas células estimuladas por LPS e nigericina. Desta forma, este fosfolipídio também foi excluído como molécula-alvo em nossas investigações.

Em estudos publicados em anos recentes, várias enzimas e proteínas relacionadas com vias de biossíntese metabólica foram descritos como importantes para a patogênese em modelos de criptococose, especialmente aquelas relacionadas com o metabolismo de glicose. Defeitos nas enzimas piruvato e hexose quinases e também na produção de acetil-Coa impactaram em características de virulência expressas pelo fungo, resultando em menor mortalidade para o hospedeiro nos modelos de infecção testados (HU et al., 2008; PRICE et al., 2011).

Ainda assim, nosso conhecimento acerca de metabólitos aromáticos derivados do metabolismo de aminoácidos que são secretados pelo *C. neoformans* e seu impacto no hospedeiro durante a infecção ainda é severamente limitado. É conhecido que permeases que realizam o transporte de aminoácidos são importantes para a proteção da levedura quando ameaçada por condições de stress impostas pelo ambiente ou pelo hospedeiro. Mutantes de *C. neoformans* com defeito nestas enzimas apresentam características de virulência reduzida, reforçando a importância da obtenção de aminoácidos durante a infecção (MARTHO et al., 2016). Outro estudo relacionado com metabolismo energético nocauteou do *C. neoformans* uma pequena molécula supostamente envolvida no ciclo do ácido cítrico. A levedura mutante desenvolvida apresentava um aumento nas características de virulência e uma maior expressão de aminoácidos (por exemplo: triptofano), promovendo maior taxa de mortalidade para o hospedeiro infectado pelo mutante (MCCLELLAND et al., 2016). Outro aspecto interessante que o estudo trouxe foi a demonstração de que a carga fúngica intracelular em macrófagos infectados pela levedura mutante só se apresentava aumentada na presença de NADPH exógeno, um cofator vital para a produção de ILA a partir de indol-3-piruvato.

ILA é um metabólito aromático derivado da via do triptofano. Este metabólito é produzido por uma ampla variedade de organismos e microrganismos, desde bactérias do solo até humanos. A produção de ILA por fungos é usualmente descrita em espécies endofíticas ou fitopatogênicas, tendo associação com a colonização de tecidos vegetais. A via de degradação do triptofano que leva a produção do ILA possui um produto intermediário denominado indolpiruvato, que é transformado em ILA como resultado de uma reação de oxirredução mediada pela enzima NADPH dependente indol-3-lactato desidrogenase. Apesar desta via e das enzimas participantes não estarem com os genes plenamente anotados em *C. albicans* e *C. neoformans*, existem relatos na literatura da presença de ILA no meio condicionado de ambas leveduras patogênicas (GUNASEKARAN, 1980). Além disso, o mesmo estudo demonstrou

que a presença de uma fonte de nitrogênio era necessária para a produção de ILA, sendo que em nosso modelo o nitrogênio era fornecido pela presença de tiamina no MM. A presença de uma fonte de nitrogênio é considerada essencial para a sobrevivência e replicação do *C. neoformans* dentro de um hospedeiro, pois o metabolismo deste elemento tem papel fundamental na expressão de determinados fatores de virulência (LEE et al., 2011).

No contexto de patogênese, não há nenhuma associação na literatura entre o ILA e infecções fúngicas, apesar de Zelante e colegas correlacionarem a produção de catabólitos derivados do triptofano por bactérias da microbiota intestinal murina, entre eles o ILA, com uma proteção da mucosa contra inflamação e consequente resistência em modelos de candidíase, sendo esta proteção mediada pela produção de IL-22 (ZELANTE et al., 2013). Mesmo que não existam relatos associando a produção de metabólitos aromáticos diretamente com a inibição do inflamassoma, está bem elucidado que moléculas pequenas com similaridades estruturais são utilizadas para a obtenção deste efeito. Gliburida é um dos inibidores da ativação de NLRP3 mais utilizados, agindo em canais de potássio ATP-dependentes, bloqueando o efluxo de potássio e assim prevenindo a ativação do receptor. A gliburida é funcionalmente caracterizada como uma sulfonilureia, porém também apresenta hidrocarbonetos aromáticos em sua estrutura (PERREGAUX et al., 2001). Interessantemente, nem todos os fármacos que apresentam agrupamentos sulfonilureia são capazes de prevenir a secreção de IL-1 $\beta$  a partir da inibição do inflamassoma, além de relatos de fármacos sulfonilureia que previnem a ativação do inflamassoma por outros mecanismos que não o bloqueio do efluxo de potássio (COLL et al., 2015). Estas divergências entre agrupamentos, efetividade na inibição do inflamassoma e mecanismos empregados para tal efeito demonstram que ainda há espaço para novas descobertas referentes a moléculas com potencial de inibir esta via de sinalização.

Apesar de terem sido relatadas em fungos há apenas uma década, vesículas extracelulares já foram descritas e amplamente estudadas em uma série de organismos, tanto uni quanto pluricelulares. Em todos estes modelos, além da secreção e transporte de componentes importantes para a célula, vesículas extracelulares também estão associadas à comunicação e a interação com outras células, tendo esta função já sido descrita em protozoários, helmintos (COAKLEY; MAIZELS; BUCK, 2015), células mamíferas (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013), micobactérias (RATH et al., 2013) e até mesmo em infecções virais (NOLTE-'T HOEN et al., 2016; RAAB-TRAUB; DITTMER, 2017). Uma

---

das características mais importantes visualizada em todos estes modelos é a função comunicativa e de modulação desempenhada pelas EVs, seja entre células da mesma espécie como entre células de espécies distintas.

Os resultados obtidos nos ensaios de interação entre vesículas extracelulares de *C. neoformans* e células dendríticas demonstraram ações semelhantes às já descritas na literatura, apesar de algumas particularidades observadas. Já foram descritas modulações positivas em macrófagos quando estimulados com vesículas extracelulares, inclusive com estímulo à secreção de TNF- $\alpha$  por estas células, sem a necessidade de estímulos prévios (OLIVEIRA et al., 2010). Curiosamente, este mesmo estudo também demonstrou que o tratamento com EVs estimulava a produção de óxido nítrico, consequentemente melhorando a atividade fungicida dos macrófagos em interação com EVs, quando comparados com macrófagos não tratados. Em nossos ensaios, vesículas isoladamente não foram capazes de promover tal estímulo, somente em associação com estímulo prévio (LPS). A concentração elevada utilizada no estudo descrito (400ng/mL), juntamente com o tipo de célula imune e as diferentes cepas de *C. neoformans* utilizadas para a obtenção de vesículas podem explicar as diferenças observadas.

Em contrapartida, ainda não foram descritas na literatura capacidades inibitórias de vesículas de *C. neoformans* em interação com células imunes. Sabe-se que vesículas extracelulares fúngicas, entre elas a de *C. neoformans*, apresentam miRNA entre seus componentes (PERES DA SILVA et al., 2015). A presença destas moléculas indica a possibilidade destas vesículas serem capazes de silenciar determinadas ações na célula-alvo, como por exemplo, em células imunes. Entretanto, a hipótese atual deste trabalho é que a ação inibitória verificada na secreção de IL-1 $\beta$  nestes ensaios seja promovida pela mesma molécula presente no meio condicionado do fungo. O real papel da secreção e presença de EVs durante a criptococose ainda é pouco elucidado, carecendo informações sobre o impacto das mesmas em células do hospedeiro e células fúngicas adjacentes. Entre as informações descritas na literatura, temos que EVs podem potencializar a função anticriptocócica de macrófagos (OLIVEIRA et al., 2010), enquanto outros estudo demonstram que a presença de EVs facilita a transmigração da levedura para o sistema nervoso central (HUANG et al., 2012) ou até mesmo auxilia na replicação intracelular de cepas hipovirulentas (BIELSKA et al., 2018). Em conjunto, essas informações demonstram o papel ambíguo descrito atualmente para as EVs. Interessantemente, uma dualidade quanto a modulação das células dendríticas entre vesículas

---

íntegras e o conteúdo vesicular foi encontrada em nosso modelo, indicando dois momentos distintos de interação com desfechos diferentes. Apesar de se apresentar como um ensaio piloto, toda informação acerca das interações entre EVs fúngicas e o hospedeiro são de grande importância para o maior entendimento deste que é considerado um novo fator de virulência do fungo.

Em conclusão, este trabalho apresentou uma série de impactos promovidos pelo meio condicionado derivado da cultura de *C. neoformans* selvagem, especialmente na via de sinalização do inflamassoma NLRP3. O tratamento com CM35 deixou os macrófagos menos responsivos e eficazes em modelos de infecção *in vitro*, indicando um possível novo mecanismo de resistência do fungo no interior do hospedeiro susceptível. Nós também desvendamos a participação do metabólito aromático ILA nas propriedades inibitórias apresentadas pelo CM35, molécula esta nunca antes relatada na literatura apresentando este efeito. Diferentemente do que está reportado na literatura, em nosso modelo de ativação do inflamassoma o GXM não se apresentou como um importante inibidor, assim como carboidratos associados a virulência e moléculas da via de produção de fosfatidilcolina. De toda forma, mais ensaios acerca do meio condicionado de *C. neoformans* são essenciais para a determinação das peculiaridades do mecanismo de ação inibitório e em qual etapa a via de sinalização do inflamassoma está sendo inibida, determinação de outras moléculas que possivelmente contribuam com ILA para esta inibição e qual é o impacto destas moléculas no curso da criptococose com modelos de infecção *in vivo*.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALANIO, A.; DESNOS-OLLIVIER, M.; DROMER, F. Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-macrophage interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in. **MBio**, v. 2, n. 4, p. 1–10, 2011.

ALBUQUERQUE, P. C. et al. *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan fractions of different molecular masses are functionally distinct. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 147–161, 2014.

ALLEN, R. C. et al. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 300–8, abr. 2014.

ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173–1185, dez. 2015.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Current biology : CB**, v. 16, n. 21, p. 2161–5, 7 nov. 2006.

AZEVEDO, R.; RIZZO, J.; RODRIGUES, M. Virulence Factors as Targets for Anticryptococcal Therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 29, 30 nov. 2016.

BAIN, J. M. et al. Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 9, p. 677–678, 2012.

BAUERNFEIND, F. et al. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 2, p. 613–7, 15 jul. 2011.

BAUERNFEIND, F.; HORNUNG, V. Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. **EMBO molecular medicine**, v. 5, n. 6, p. 814–26, jun. 2013.

BEN-ABDALLAH, M. et al. Fungal-Induced Cell Cycle Impairment, Chromosome Instability and Apoptosis via Differential Activation of NF- $\kappa$ B. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002555, 1 mar. 2012.

BIELSKA, E. et al. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1556, 19 dez. 2018.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. **What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen?** **FEMS Yeast Research**, 2015.

BIONDO, C. et al. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. **European journal of immunology**, v. 35, n. 3, p. 870–8, mar. 2005.

BLACKSTOCK, R.; MURPHY, J. W. Age-related resistance of C57BL/6 mice to *Cryptococcus neoformans* is dependent on maturation of NKT cells. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5175–80, set. 2004.

BRODSKY, I. E. et al. A *Yersinia* Effector Protein Promotes Virulence by Preventing Inflammasome Recognition of the Type III Secretion System. **Cell Host & Microbe**, v. 7, n. 5, p. 376–387, maio 2010.

- BROWN, L. et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–30, 2015.
- BRYAN, R. A. et al. Radiological Studies Reveal Radial Differences in the Architecture of the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 2, p. 465–475, fev. 2005.
- BULMER, G. S.; SANS, M. D.; GUNN, C. M. *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1475–1479, 1967.
- CAMPUZANO, A. et al. Dectin-3 Is Not Required for Protection against *Cryptococcus neoformans* Infection. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169347, 20 jan. 2017.
- CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: Break and enter or use a Trojan horse? **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1389–1392, 2010.
- CASADEVALL, A. The Pathogenic Potential of a Microbe. **mSphere**, v. 2, n. 1, 22 fev. 2017.
- CASTRO, R. J. A. DE et al. The Major Chromoblastomycosis Etiologic Agent *Fonsecaea pedrosoi* Activates the NLRP3 Inflammasome. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 20 nov. 2017.
- CHANG, Y. C. et al. Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 4985–4995, 1 set. 2004.
- CHARALAMBOUS, L. T. et al. Prevalence, healthcare resource utilization and overall burden of fungal meningitis in the United States. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 215–227, 1 fev. 2018.
- CHARLIER, C. et al. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 120–127, 1 jan. 2009.
- CHEN, G. et al. Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2379–91, jun. 2008.
- CHEN, G. Y. Regulation of the gut microbiome by inflammasomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 105, p. 35–40, abr. 2017.
- CHEN, M. et al. Internalized *Cryptococcus neoformans* Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 10, p. 4962–4972, 2015.
- CHEN, S. H. M. et al. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of medical microbiology**, v. 52, n. Pt 11, p. 961–70, 1 nov. 2003.
- CHENG, S.-C. et al. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 2, p. 357–366, ago. 2011.
- CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids Trigger *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002047, 26



maio 2011.

CLARKE, S. C. et al. Integrated Activity and Genetic Profiling of Secreted Peptidases in *Cryptococcus neoformans* Reveals an Aspartyl Peptidase Required for Low pH Survival and Virulence. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. e1006051, 15 dez. 2016.

COAKLEY, G.; MAIZELS, R. M.; BUCK, A. H. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 477–489, 2015.

COLE, L. K.; VANCE, J. E.; VANCE, D. E. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 754–761, maio 2012.

COLL, R. C. et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Nature Medicine**, v. 21, n. 3, p. 248–255, 16 mar. 2015.

COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166–75, jan. 2001.

COX, G. M. et al. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 173–180, 1 jan. 2003.

CROSS, A. S. What is a virulence factor? **Critical care (London, England)**, v. 12, n. 6, p. 196, jan. 2008.

CULLEN, S. P. et al. Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 $\beta$  Secretion by Triggering Necrosis. **Cell Reports**, v. 11, n. 10, p. 1535–1548, jun. 2015.

CUNHA, C.; ROMANI, L.; CARVALHO, A. Cracking the Toll-like receptor code in fungal infections. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 10, p. 1121–37, out. 2010.

DAN, J. M. et al. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2362–7, jun. 2008.

DENHAM, S.; BROWN, J. Mechanisms of Pulmonary Escape and Dissemination by *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 25, 17 fev. 2018.

DENNING, D. W. Minimizing fungal disease deaths will allow the UNAIDS target of reducing annual AIDS deaths below 500 000 by 2020 to be realized. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, p. 20150468, 5 dez. 2016.

ELLERBROEK, P. M. et al. Cryptococcal Glucuronoxylomannan Inhibits Adhesion of Neutrophils to Stimulated Endothelium In Vitro by Affecting Both Neutrophils and Endothelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4762–4771, 1 set. 2002.

ELLERBROEK, P. M. et al. Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 6, p. 581–92, jun. 2004.

ENGLER, M. et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. **Journal of immunological methods**, v. 184, p. 281–283, 1995.

ERDEI, J. et al. Induction of NLRP3 Inflammasome Activation by Heme in Human Endothelial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–14, 20 mar. 2018.



- ESPINEL-INGROFF, A.; KIDD, S. Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada. **Infection and Drug Resistance**, p. 89, maio 2015.
- EVAVOLD, C. L. et al. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. **Immunity**, p. 1–10, 2017.
- FELDMESSER, M. et al. *Cryptococcus neoformans* Is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225–4237, 1 jul. 2000.
- FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 273–278, jun. 2001.
- FERIOTTI, C. et al. NOD-Like Receptor P3 Inflammasome Controls Protective Th1/Th17 Immunity against Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, p. 1–15, 10 jul. 2017.
- FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. July, p. 1812–1825, 2006.
- FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1–23, 5 abr. 2018.
- FRASES, S. et al. *Cryptococcus neoformans* Capsular Polysaccharide and Exopolysaccharide Fractions Manifest Physical, Chemical, and Antigenic Differences. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 2, p. 319–327, fev. 2008.
- FU, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, 2018.
- GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 76–86, maio 2015.
- GILBERT, A. S. et al. Vomocytosis of live pathogens from macrophages is regulated by the atypical MAP kinase ERK5. **Science Advances**, v. 3, n. 8, p. e1700898, 16 ago. 2017.
- GILES, S. S. et al. Elucidating the Pathogenesis of Spores from the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3491–3500, 1 ago. 2009.
- GRINGHUIS, S. I. et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 $\beta$  via a noncanonical caspase-8 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 13, n. 3, p. 246–254, 2012.
- GROSS, O. et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 433–436, 1 abr. 2009.
- GUIMARÃES, A. J. et al. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 740–753, 2010.
- GUNASEKARAN, M. Synthesis of Tryptophol and Indolelactic Acid by *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 72, n. 3, p. 578, maio 1980.
- GUO, C. et al. Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 10, p. 845–854, out. 2014.

- GURUNG, P. et al. FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1835–1846, 15 fev. 2014.
- HAGEDORN, M. et al. Infection by Tubercular Mycobacteria Is Spread by Nonlytic Ejection from Their Amoeba Hosts. **Science**, v. 323, n. 5922, p. 1729–1733, 2009.
- HE, Y.; FRANCHI, L.; NUNEZ, G. TLR Agonists Stimulate Nlrp3-Dependent IL-1 Production Independently of the Purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 334–339, 1 jan. 2013.
- HECKER, A. et al. Phosphocholine-Modified Macromolecules and Canonical Nicotinic Agonists Inhibit ATP-Induced IL-1 $\beta$  Release. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 2325–2334, 1 set. 2015.
- HILLER, K. et al. MetaboliteDetector: Comprehensive Analysis Tool for Targeted and Nontargeted GC/MS Based Metabolome Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 9, p. 3429–3439, maio 2009.
- HISE, A. G. et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 5, p. 487–97, 8 maio 2009.
- HOLE, C. R. et al. Mechanisms of dendritic cell lysosomal killing of *Cryptococcus*. **Scientific reports**, v. 2, p. 739, jan. 2012.
- HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 847–856, 2008.
- HU, G. et al. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 1456–1475, set. 2008.
- HUANG, S. H. et al. *Cryptococcus neoformans*-Derived Microvesicles Enhance the Pathogenesis of Fungal Brain Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- HYBISKE, K.; STEPHENS, R. S. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 27, p. 11430–5, 2007.
- IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753–64, out. 2005.
- JACOBSON, E. S.; JENKINS, N. D.; TODD, J. M. **Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus** *Infection and Immunity*, 1994. Disponível em: <<http://iai.asm.org/>>. Acesso em: 7 nov. 2018
- JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. 27–28, 2010.
- JOLY, S. et al. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 6, p. 3578–81, 15 set. 2009.
- JORGENSEN, I.; MIAO, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens.

---

**Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 130–142, maio 2015.

KANNEGANTI, T.-D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 10, p. 688–698, 17 out. 2010.

KARKI, R. et al. Concerted Activation of the AIM2 and NLRP3 Inflammasomes Orchestrates Host Protection against *Aspergillus* Infection. **Cell Host & Microbe**, p. 1–12, 2015.

KASPER, L. et al. The fungal peptide toxin Candidalysin activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4260, 15 dez. 2018.

KECHICHIAN, T. B.; SHEA, J.; DEL POETA, M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 4792–8, out. 2007.

KIM, Y.-M. et al. Salmonella modulates metabolism during growth under conditions that induce expression of virulence genes. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 6, p. 1522, 2013.

KIND, T. et al. FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10038–10048, 15 dez. 2009.

KISTOWSKA, M. et al. *Malassezia* yeasts activate the NLRP3 inflammasome in antigen-presenting cells via Syk-kinase signalling. **Experimental dermatology**, v. 23, n. 12, p. 884–9, dez. 2014.

KOZEL, T.; GOTSCHLICH, E. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 129, n. 4, p. 1675–1680, 1982.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193–203, mar. 2011.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes and their roles in health and disease. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 28, n. May, p. 137–61, jan. 2012.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013–1022, maio 2014.

LAROCK, C. N.; COOKSON, B. T. The *Yersinia* Virulence Effector YopM Binds Caspase-1 to Arrest Inflammasome Assembly and Processing. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 6, p. 799–805, dez. 2012.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 6, p. 397–411, jun. 2013.

LAZERA, M. S. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 379–383, 2000.

LEE, I. R. et al. Nitrogen Metabolite Repression of Metabolism and Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 188, n. 2, p. 309–323, jun. 2011.

LEI, G. et al. Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3

- inflammasome. **Cell research**, v. 23, n. 7, p. 965–8, jul. 2013.
- LEV, S. et al. Pho4 Is Essential for Dissemination of *Cryptococcus neoformans* to the Host Brain by Promoting Phosphate Uptake and Growth at Alkaline pH. **mSphere**, v. 2, n. 1, 22 fev. 2017.
- LI, H. et al. Human pathogenic fungus *Trichophyton schoenleinii* activates the NLRP3 inflammasome. **Protein & Cell**, v. 4, n. 7, p. 529–538, 18 maio 2013.
- LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 401–416, jul. 2009.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual review of microbiology**, v. 60, p. 69–105, jan. 2006.
- LIPOVSKY, M. M. et al. Cryptococcal Glucuronoxylomannan Induces Interleukin ( IL ) -8 Production by Human Microglia but Inhibits Neutrophil Migration toward IL-8. **The Journal of infectious diseases**, v. 177, p. 260–263, 1998.
- LIU, T. et al. Single-Cell Imaging of Caspase-1 Dynamics Reveals an All-or-None Inflammasome Signaling Response. **Cell Reports**, v. 8, n. 4, p. 974–982, ago. 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LOFTUS, B. J. et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5713, p. 1321–4, 25 fev. 2005.
- LU, A.; WU, H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. **FEBS Journal**, v. 282, n. 3, p. 435–444, fev. 2015.
- LUTZ, M. B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of Immunological Methods**, v. 223, n. 1, p. 77–92, 1999.
- MA, H. et al. Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2156–2160, 2006.
- 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**, v. 176, n. 5, p. 3053–3061, 21 fev. 2006.
- MAO, L. et al. Pathogenic Fungus *Microsporium canis* Activates the NLRP3 Inflammasome. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 882–892, 9 dez. 2014.
- MARIANO ANDRADE, R. et al. Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* exacerbates in vitro yeast cell growth by interleukin 10-dependent inhibition of CD4+ T lymphocyte responses. **Cellular Immunology**, v. 222, n. 2, p. 116–125, abr. 2003.
- MARIM, F. M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15263, jan. 2010.
- MARTHO, K. F. C. et al. Amino Acid Permeases and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0163919, 3 out. 2016.

- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, 3 mar. 2014.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 229–65, jan. 2009.
- MCCLELLAND, E. E. et al. A Small Protein Associated with Fungal Energy Metabolism Affects the Virulence of *Cryptococcus neoformans* in Mammals. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005849, 1 set. 2016.
- MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 6, p. 561–570, jan. 2009.
- MIAO, E. A et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via IpaF. **Nature immunology**, v. 7, n. 6, p. 569–75, jun. 2006.
- MIAO, E. A et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 7, p. 3076–80, 16 fev. 2010.
- MISAWA, T. et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 14, n. 5, p. 454–460, 17 maio 2013.
- MITCHELL, T.; PERFECT, J. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–548, 1995.
- MONARI, C. et al. Modulation of C5aR Expression on Human Neutrophils by Encapsulated and Acapsular *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3363–3370, 1 jul. 2002.
- MONARI, C. et al. Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. **The Journal of infectious diseases**, v. 191, n. 1, p. 127–37, 1 jan. 2005a.
- MONARI, C. et al. *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Induces Expression of Fas Ligand in Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3461–3468, 4 mar. 2005b.
- MONARI, C. et al. Microbial Immune Suppression Mediated by Direct Engagement of Inhibitory Fc Receptor. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 6842–6851, 15 nov. 2006.
- MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 537–42, jun. 2006.
- MORETTI, S. et al. IL-37 Inhibits Inflammasome Activation and Disease Severity in Murine Aspergillosis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 11, p. e1004462, 2014.
- MUÑOZ-PLANILLO, R. et al. K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142–1153, jun. 2013.
- MURDOCK, B. J. et al. Interleukin-17A Enhances Host Defense against Cryptococcal Lung Infection through Effects Mediated by Leukocyte Recruitment, Activation, and Gamma Interferon Production. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 937–948, mar. 2014a.

MURDOCK, B. J. et al. Early or Late IL-10 Blockade Enhances Th1 and Th17 Effector Responses and Promotes Fungal Clearance in Mice with Cryptococcal Lung Infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 8, p. 4107–4116, 15 out. 2014b.

NAKAMURA, K. et al. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 47, n. 1, p. 148–54, jun. 2006.

NAKAMURA, K. et al. Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 11, p. 1115–1119, 2007.

NAKAMURA, K. et al. Deoxynucleic Acids from *Cryptococcus neoformans* Activate Myeloid Dendritic Cells via a TLR9-Dependent Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 4067–4074, 2008.

NAKAMURA, Y. et al. Molecular analysis of CAP59 gene sequences from five serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 992–995, 2000.

NAKAMURA, Y. et al. Dectin-2 Deficiency Promotes Th2 Response and Mucin Production in the Lungs after Pulmonary Infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 2, p. 671–681, fev. 2015.

NETEA, M. G. et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 in monocytes and macrophages. **Blood**, v. 113, n. 10, p. 2324–2335, 5 mar. 2009.

NIMRICHTER, L. et al. Self-Aggregation of *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Is Dependent on Divalent Cations. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 8, p. 1400–1410, ago. 2007.

NOLTE-‘T HOEN, E. et al. Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 33, p. 9155–9161, 16 ago. 2016.

O’MEARA, T.; ALSPAUGH, J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, jul. 2012.

O’MEARA, T. R. et al. Global analysis of fungal morphology exposes mechanisms of host cell escape. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6741, 31 dez. 2015.

OLIVEIRA, D. L. et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1601–1609, 2010.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, maio 2004.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Cryptococcal Urease Promotes the Accumulation of Immature Dendritic Cells and a Non-Protective T2 Immune Response within the Lung. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 932–943, mar. 2009a.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Role of Dendritic Cells and Alveolar Macrophages in Regulating Early Host Defense against Pulmonary Infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3749–3758, 1 set. 2009b.



- PANEPINTO, J. C. et al. Binding of Serum Mannan Binding Lectin to a Cell Integrity-Defective *Cryptococcus neoformans* ccr4 Mutant. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4769–4779, 1 out. 2007.
- PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS (London, England)**, v. 23, n. 4, p. 525–30, 20 fev. 2009.
- PERES DA SILVA, R. et al. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 7763, 14 jul. 2015.
- PERICOLINI, E. et al. Role of CD45 Signaling Pathway in Galactoxylomannan-Induced T Cell Damage. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12720, 14 set. 2010.
- PERREGAUX, D. G. et al. Identification and characterization of a novel class of interleukin-1 post-translational processing inhibitors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 299, n. 1, p. 187–97, out. 2001.
- PETZOLD, E. W. et al. Characterization and Regulation of the Trehalose Synthesis Pathway and Its Importance in the Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5877–5887, 1 out. 2006.
- 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, maio 2009.
- PRICE, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* Requires a Functional Glycolytic Pathway for Disease but Not Persistence in the Host. **mBio**, v. 2, n. 3, 7 jun. 2011.
- RAAB-TRAUB, N.; DITTMER, D. P. Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 559–572, 2017.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017.
- RAPOSO, G.; STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.
- RATH, P. et al. Genetic regulation of vesiculogenesis and immunomodulation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Pnas**, v. 110, n. 49, p. E4790–E4797, 2013.
- REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1549–1564, 2014.
- RICHTER, K. et al. Phosphocholine – an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of  $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28660, 28 set. 2016.
- 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**, v. 6, n. 1, p. 48–59, 2007.
- RODRIGUES, M. L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58–67, jan. 2008.



- ROHATGI, S. et al. Fc Gamma Receptor 3A Polymorphism and Risk for HIV-Associated Cryptococcal Disease. **mBio**, v. 4, n. 5, 27 ago. 2013.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–88, abr. 2011.
- SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen. **Future Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1297–1313, 2012.
- SAÏD-SADIER, N. et al. Aspergillus fumigatus stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. **PLoS one**, v. 5, n. 4, p. e10008, jan. 2010.
- SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of Cryptococcus neoformans. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 2, p. 377–86, 1 ago. 1996.
- SÁNCHEZ, M.; COLOM, F. Extracellular DNase activity of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 1, p. 10–13, jan. 2010.
- SANTANGELO, R. et al. Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in a Murine Model. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2229–2239, 1 abr. 2004.
- SANZ, J. M.; VIRGILIO, F. D. Kinetics and Mechanism of ATP-Dependent IL-1 Release from Microglial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4893–4898, 1 maio 2000.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–32, 19 mar. 2010.
- SHAO, X. et al. An Innate Immune System Cell Is a Major Determinant of Species-Related Susceptibility Differences to Fungal Pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3244–3251, 22 ago. 2005.
- SHEA, J. M.; HENRY, J. L.; DEL POETA, M. Lipid metabolism in Cryptococcus neoformans. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 469–479, jun. 2006.
- SHEN, H. H. et al. NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 7, p. 694–702, 2018.
- SHOHAM, S. et al. Toll-Like Receptor 4 Mediates Intracellular Signaling Without TNF- Release in Response to Cryptococcus neoformans Polysaccharide Capsule. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4620–4626, 1 abr. 2001.
- SHOURIAN, M. et al. Contribution of IL-1RI Signaling to Protection against Cryptococcus neoformans 52D in a Mouse Model of Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 19, 19 jan. 2018.
- SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Yeasts maintenance for freezing at – 20 0 C. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 73–74, 2008.
- SMITH, L. M.; DIXON, E. F.; MAY, R. C. The fungal pathogen Cryptococcus neoformans manipulates macrophage phagosome maturation. **Cellular microbiology**, p. 1–12, 2014.
- SONG, N. et al. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. **Molecular Cell**, v. 68, n. 1, p. 185–197.e6, out. 2017.

SORRELL, T.; ELLIS, D. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 14, p. 42–43, 1997.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 2001.

SUN, D. et al. Real-Time Imaging of Interactions of Neutrophils with *Cryptococcus neoformans* Demonstrates a Crucial Role of Complement C5a-C5aR Signaling. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 1, p. 216–229, jan. 2016a.

SUN, D. et al. Intravascular clearance of disseminating *Cryptococcus neoformans* in the brain can be improved by enhancing neutrophil recruitment in mice. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 7, p. 1704–1714, jul. 2016b.

TAKAHARA, D. T. et al. First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, p. 371–376, dez. 2013.

TAVARES, A. H. et al. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 12, p. e2595, jan. 2013.

TAVARES, A. H.; BÜRCEL, P. H.; BOCCA, A. L. Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004948, 2015.

TAXMAN, D. J.; HUANG, M. T.-H.; TING, J. P.-Y. Inflammasome Inhibition as a Pathogenic Stealth Mechanism. **Cell Host & Microbe**, v. 8, n. 1, p. 7–11, jul. 2010.

TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 67–74, dez. 2016.

TERRA, J. K. et al. Cutting Edge: Resistance to *Bacillus anthracis* Infection Mediated by a Lethal Toxin Sensitive Allele of *Nalp1b/Nlrp1b*. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 1, p. 17–20, 1 jan. 2010.

TOMALKA, J. et al. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002379, dez. 2011.

UPADHYA, R. et al. Induction of Protective Immunity to *Cryptococcal* Infection in Mice by a Heat-Killed, Chitosan-Deficient Strain of *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 7, n. 3, 6 jul. 2016.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. **European journal of immunology**, v. 41, n. 8, p. 2260–8, ago. 2011.

VAN DEN HERIK-OUDIJK, I. E. et al. Identification of signaling motifs within human Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIb isoforms. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 2202–11, 15 abr. 1995.

VECCHIARELLI, A. et al. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. **Infection and immunity**, v. 64, n. 7, p. 2846–2849, 1996.

- VECCHIARELLI, A. et al. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation solar strains of *Cryptococcus neoformans* to acti-differentiation , as documented by the enhance- maturation , indicating a new pathway by. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, p. 370–378, 2003.
- VECCHIARELLI, A. et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1107–1116, 2013.
- VELAGAPUDI, R. et al. Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4345–4355, 1 out. 2009.
- VÉNÉREAU, E.; CERIOTTI, C.; BIANCHI, M. E. DAMPs from Cell Death to New Life. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. AUG, p. 1–11, 18 ago. 2015.
- VOELZ, K.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Cytokine Signaling Regulates the Outcome of Intracellular Macrophage Parasitism by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3450–3457, 1 ago. 2009.
- VU, K. et al. Invasion of the Central Nervous System by *Cryptococcus neoformans* Requires a Secreted Fungal Metalloprotease. **mBio**, v. 5, n. 3, 3 jun. 2014.
- WALSH, N. M. et al. Characterization of C-type lectins reveals an unexpectedly limited interaction between *Cryptococcus neoformans* spores and Dectin-1. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173866, 10 mar. 2017.
- WANG, J. P. et al. Contributions of the MyD88-dependent receptors IL-18R, IL-1R, and TLR9 to host defenses following pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26232, jan. 2011.
- WELLINGTON, M. et al. *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 2, p. 329–340, 2014.
- WILLIAMSON, P. R. **Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*** **Frontiers in Bioscience**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.bioscience.org/1997/v2/e/william/william.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2018.
- WOLF, J. M.; RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Serum albumin disrupts *Cryptococcus neoformans* and *Bacillus anthracis* extracellular vesicles. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 762–773, 2012.
- WOZNIAK, K. L. et al. Role of IL-17A on Resolution of Pulmonary *C. neoformans* Infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17204, 17 fev. 2011.
- YAUCH, L. E. et al. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5373–82, set. 2004.
- YAUCH, L. E.; LAM, J. S.; LEVITZ, S. M. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 11, p. e120, nov. 2006.
- YEON, S. H. et al. Oxidized phosphatidylcholine induces the activation of NLRP3 inflammasome in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 1, p. 205–215, jan. 2017.

---

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043–57, out. 2008.

ZARAGOZA, O. et al. **The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans***. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 68

ZARAGOZA, O.; TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. **European journal of immunology**, v. 33, n. 7, p. 1957–67, jul. 2003.

ZASŁONA, Z. et al. The Induction of Pro-IL-1 $\beta$  by Lipopolysaccharide Requires Endogenous Prostaglandin E 2 Production. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 9, p. 3558–3564, 1 maio 2017.

ZELANTE, T. et al. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 372–385, ago. 2013.

ZHANG, Y. et al. TLR9 signaling is required for generation of the adaptive immune protection in *Cryptococcus neoformans*-infected lungs. **The American journal of pathology**, v. 177, n. 2, p. 754–65, ago. 2010.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221–5, 13 jan. 2011.



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 16 de agosto de 2016.

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**PAPEL DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO (PRRS) NA INFECÇÃO MURINA POR PATÓGENOS FÚNGICOS.**", UnBDoC n.º 55924/2016, sob responsabilidade do Professor Aldo Henrique F P Tavares foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *MUS MUSCULUS* (120 machos). A presente aprovação é válida pelo período de 14/06/2016 a 1º/01/2020.



*Paula Galera*

Profa. Dra. Paula Diniz Galera  
Cóordenadora da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.



---

**Anexo II – Produção Científica Durante Período de Doutorado (2015 – 2018)**

- **Artigos Completos Publicados em Periódicos**
  - TAVARES, A. H.; BÜRCEL, P. H.; BOCCA, A. L. Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004948, 2015.
  - SIQUEIRA, I. M. et al. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). **Medical Mycology**, v. 54, n. 2, p. 177–188, 1 fev. 2016.
  - CASTRO, R. J. A. DE et al. The Major Chromoblastomycosis Etiologic Agent *Fonsecaea pedrosoi* Activates the NLRP3 Inflammasome. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 20 nov. 2017.
  
- **Resumos Publicados em Anais de Congressos**
  - BÜRCEL, PEDRO HENRIQUE; MARINA, C. L. F. ; MAY, R. C. ; Anamelia L. Bocca ; TAVARES, A. H. F. P. . Macrophage immune modulation by Secreted Molecules from *Cryptococcus neoformans* during infection. In: 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 2018, Amsterdam. **Medical Mycology**, 2018. v. 56. p. S27-S27. Apresentação Oral.
  
- **Apresentações de Trabalho**
  - Pedro Henrique Miranda Bürgel, Clara Luna Freitas Marina, Daniel Paiva Agostinho, Anamelia Lorenzetti Bocca, Aldo Henrique Tavares. Immunomodulatory role of secreted molecules and extracellular vesicles in cryptococcosis. In: 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, 2017, Foz do Iguaçu. Apresentação em Poster.
  - Pedro Henrique Miranda Bürgel, Clara Luna Freitas Marina, Robin C. May, Anamelia Lorenzetti Bocca, Aldo Henrique Tavares. Imunomodulação de macrófagos por moléculas secretadas pelo fungo *Cryptococcus neoformans* no curso de infecção. In: II Simpósio de Imunologia do Centro Oeste, 2018, Brasília. Apresentação Oral.