



Universidade De Brasília
Faculdade De Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular
Laboratório de Imunologia Aplicada

Viviann Christina Rebouças Simões

Papel do ergosterol na ativação de macrófagos infectados in vitro com o Cryptococcus neoformans

BRASÍLIA,

2023

Viviann Christina Rebouças Simões

Papel do ergosterol na ativação de macrófagos infectados in vitro com o Cryptococcus neoformans

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca.

BRASÍLIA

2023

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada. Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: CAPES/CNPq/FAPDF



Universidade De Brasília

Faculdade De Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório de Imunologia Aplicada

Dissertação de Mestrado

VIVIANN CHRISTINA REBOUÇAS SIMÕES

*Papel do ergosterol na ativação de macrófagos infectados in vitro com o Cryptococcus
neoformans*

Banca examinadora:

Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Prof. Dra. Mirelle Garcia Silva Bailão

Prof. Dra. Rosangela Vieira de Andrade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativas globais e regionais da incidência da presença do antígeno criptocócico, meningite criptocócica e mortes relacionadas à criptococose (modificado de Rajasingham et al, 2022).

Figura 2: Ciclo de infecção do *C. neoformans* (modificado de Bermas & Geddes-McAllistor, 2020)

Figura 3: A via de ativação do macrófago influencia diretamente na morte do *C. neoformans* (modificado de Wager, Wormley, 2015).

Figura 4: Primeiras alterações morfológicas em *Cryptococcus spp.* dentro do hospedeiro e seus mecanismos de disseminação através das barreiras epiteliais respiratórias e hematoencefálicas (modificado de Diniz-Lima et al, 2022).

Figura 5: Meios de secreção vesicular do *Cryptococcus neoformans*.

Figura 6: Termotolerância do mutante ERG6 a mudança de temperatura.

Figura 7: Ensaio de sobrevivência a fagocitose a 30°C, 35°C e 37°C.

Figura 8: Interação do mutante ERG6 com BMDM estimula produção de citocinas e peróxido de hidrogênio, mas não a produção de Óxido Nítrico

Figura 9: As EVs do Mutante ERG6 estimulam a produção de óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio.

Figura 10: As EVs lisadas e intactas do mutante ERG6 estimulam a produção de citocinas.

Figura 11: Análise da expressão de genes na interação de BMDM com as EVs de H99 e o mutante ERG6 por RT-PCR Real Time.

Figura 12: Quantificação de LDH para avaliação da citotoxicidade das nanopartículas.

Figura 13: Os lipídeos incorporados nas nanopartículas são capazes de causar a morte celular dos BMDM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de genes e primers utilizados na análise por RT-PCR Real Time.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	11
1.2. INTERAÇÃO FUNGO-MACRÓFAGOS.....	13
1.3. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	17
1.4. VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	19
1.5. ERGOSTEROL.....	22
2. OBJETIVOS	
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
2.2. OBJETIVOS GERAIS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. CEPAS.....	26
3.2. CURVA DE CRESCIMENTO.....	27
3.3. DIFERENCIAÇÃO DE BMDM.....	28
3.4. INTERAÇÃO DAS EVS, DO <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> E DAS NANOPARTÍCULAS COM O BMDM.....	29
3.5. ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA A FAGOCITOSE EM MACRÓFAGOS.....	29
3.6. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA.....	30
3.7. QUANTIFICAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	30
3.8. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	31
3.9. EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	31
3.10. QUANTIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES	32
3.11. QUANTIFICAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE.....	33
3.12. RT-PCR REAL TIME	34
3.13. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34
4. RESULTADOS	
4.1.O MUTANTE Δ ERG6 APRESENTA TERMOSENSIBILIDADE A 37OC REDUZINDO SUA CAPACIDADE DE CRESCIMENTO.....	34

4.2. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA APÓS A FAGOCITOSE DO MUTANTE ERG6Δ EM BMDM.....	35
4.3. O MUTANTE ΔERG6 ESTIMULA A PRODUÇÃO DE CITOCINAS, E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂) MAS NÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) <i>IN VITRO</i>	36
4.4. AS VESÍCULAS EXTRACELULARES INTACTAS E LISADAS DO MUTANTE ΔERG6 ESTIMULAM A PRODUÇÃO DE CITOCINAS, ÓXIDO NÍTRICO (NO) E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)....	39
4.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE POR RT-PCR REAL TIME	41
4.6. NANOPARTÍCULAS COM ESTERÓIS DA VIA DO ERGOSTEROL INDUZEM A LISE CELULAR DOS BMDM.....	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

RESUMO

O ergosterol é um componente da membrana fúngica que auxilia na proteção contra estresses oxidativos e resistência a estresses ambientais, além de ser um alvo importante na terapia antifúngica. A deleção de genes da via do ergosterol demonstrou interferência na sobrevivência e na virulência de diversos fungos. A fim de entender melhor como a ausência do Ergosterol pode interferir na sobrevivência do *C. neoformans* e na ativação da resposta imunológica, avaliamos a termosusceptibilidade da linhagem nocaute, e a resposta imunológica de macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos (BMDM) ao interagir com o mutante. Também utilizamos as vesículas extracelulares (EVs) lisadas e intactas do mutante e do selvagem para avaliar a ativação da resposta imunológica. O mutante Δ erg6 possui em sua membrana outros lipídeos como Lanosterol e Esqualeno, então avaliamos também se esses lipídeos podem ativar a resposta imunológica utilizando nanopartículas com os lipídeos incorporados durante a interação com BMDM. Os resultados demonstraram que o mutante Δ erg6 sobrevive a 37°C, porém não é capaz de proliferar nessa temperatura. Também mostramos que o mutante é capaz de estimular a resposta imunológica com a dosagem das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 e de Óxido Nítrico, mas em menores níveis que a cepa selvagem. Também encontramos resultados parecidos na interação com as EVs intactas do mutante e do selvagem com BMDM. Entretanto, as EVs produzidas pelo mutante Δ erg6 quando lisadas, estimulam maior produção de citocinas do que as EVs lisadas da linha selvagem, sugerindo a presença de diferentes componentes nas EVs dos mutantes. Demonstramos que as nanopartículas com os lipídeos presentes na membrana causam a morte celular dos BMDM, porém com baixa capacidade de induzir a produção das citocinas avaliadas neste trabalho. Dessa forma, conseguimos demonstrar que o mutante Δ erg6 permanece viável à temperatura corporal humana, mas sem capacidade de proliferação, e é capaz de produzir EVs que são capazes de estimular a ativação da resposta imune em BMDM.

ABSTRACT

Ergosterol is a fungal membrane component that assists in the protection against oxidative stress and resistance to environmental stress, besides being an important target in antifungal therapy. Genes deletion from Ergosterol pathway demonstrated interference in the survival and virulence of several fungi. In order to better understand how the Ergosterol absence can interfere in the *C. neoformans* survival and in the immune response activation, we evaluated the thermosusceptibility of the Δ erg6 mutant, which had the ERG6 gene deleted, and the immune response of macrophages from the bone marrow of mice (BMDM) when interacting with the mutant and comparing with the wild-type H99 strain. We also used lysed and intact extracellular vesicles (EVs) from the mutant and wild mice. The Δ erg6 mutant has other lipids such as Lanosterol and Squalene whether these lipids can activate the immune response using nanoparticles with incorporated lipids. The results showed that the Δ erg6 mutant survives at 37°C, although it is not able to proliferate at this temperature. We also showed that the mutant is capable of stimulating the immune response with dosages of Nitric Oxide and IL-1b, TNF-a and IL-6 cytokines, but at lower levels than the wild-type strain. We also observed similar results in the interaction with intact mutante EVs and wild with BMDM. However, the EVs produced by the Δ erg6 mutant, when lysed, stimulate greater cytokine production than the EVs lysed from H99. We demonstrated that nanoparticles with membrane lipids cause BMDM cell death by Lactate Dehydrogenase (LDH) dosages, even at low concentrations of lipids in nanoparticles. In this way, we managed to evaluate that the Δ erg6 mutant remains viable at human body temperature, but without proliferation capacity, and is capable of producing EVs that are capable of stimulating the immune response activation in BMDM.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada, que após a inalação por uma fonte ambiental, pode causar doenças respiratórias e neurológicas em humanos (ARAÚJO et al., 2015). Este fungo é um patógeno oportunista que se desenvolve em pacientes com deficiências no sistema imunológico, como paciente com HIV, câncer, quimioterapia ou em tratamentos com imunossupressores, como transplantados. Porém, também pode ser patogênico em pacientes imunocompetentes. A terapia antifúngica é limitada, com efeitos colaterais tóxicos e relato de resistência aos medicamentos, sendo estes impedimentos significativos para uma terapia eficaz (HULL, HEITMAN, 2002).

Em todo o mundo, a meningite criptocócica é responsável pela mortalidade de até 15% dos pacientes infectados com o vírus HIV (RAJASINGHAM, et al, 2017). Apesar do tratamento antirretroviral, a doença em pacientes portadores de HIV continua gerando preocupação devido à sua significativa taxa de morbimortalidade, cuja incidência varia de 0,04% a 12% por ano entre pacientes com HIV, tendo o número estimado de cerca de um milhão de casos por ano que resultam em cerca de 650 mil mortes no mesmo período (PARK et al., 2009). Em uma escala global, a meningite criptocócica apresenta uma incidência anual de aproximadamente 223.100 casos e 180 mil mortes, sendo 73% dos casos na África Subsariana e 19% no Sudeste Asiático (DENNING, 2016). A estimativa mundial por ano é de 152.000 casos de meningite criptocócica, resultando em 112.000 mortes (Figura 1). As regiões com maior prevalência são a África subsaariana (regiões do sul e leste com a África ocidental e central), a Ásia e o Pacífico, Globalmente, a criptococose resultou em 112.000 de 580.000 mortes relacionadas à AIDS em 2020 (RAJASINGHAM et al., 2022).

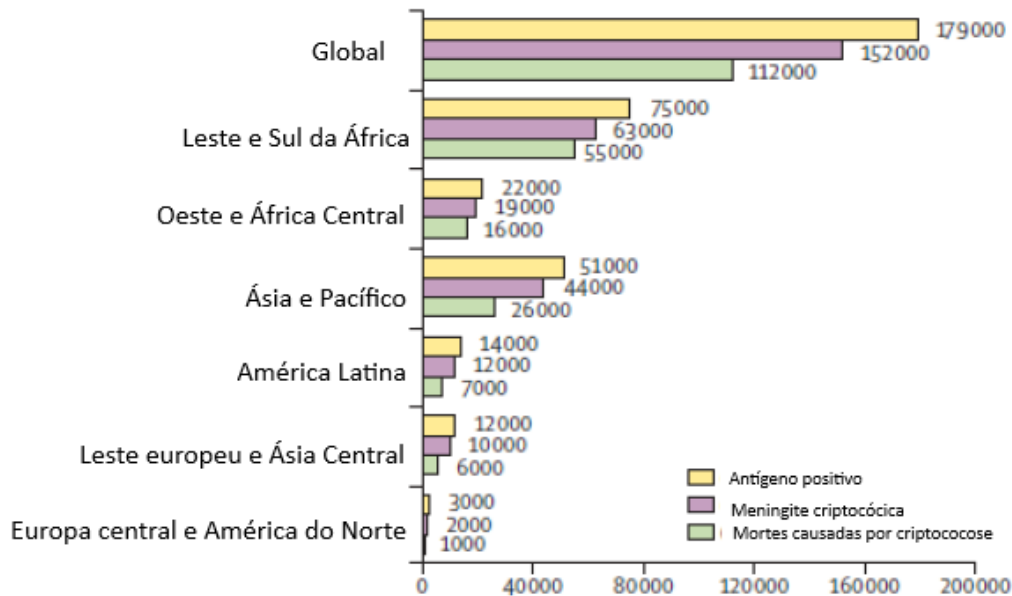


Figura 1: Estimativas globais e regionais da incidência da presença do antígeno criptocócico, meningite criptocócica e mortes relacionadas à criptococose. O Caribe, Oriente Médio e Norte da África não são mostrados aqui devido às incidências muito baixas (modificado de RAJASINGHAM et al, 2022).

O gênero *Cryptococcus* é muito heterogêneo e inicialmente foram descritos cinco sorotipos: A, B, C, D e híbrido AD (híbridos entre os sorotipos A e D), com base em reações de aglutinação da cápsula polissacarídica. *C. neoformans* foi originalmente classificado em dois sorotipos: *var. neoformans* (sorotipos A, D e o híbrido AD) e *var. gattii* (sorotipos B e C). Recentemente, *C. neoformans var. gattii* foi reconhecido como uma espécie independente, o *Cryptococcus gattii*. Além das diferenças observadas anteriormente, estudos moleculares e o sequenciamento genômico detectaram diferenças genéticas significativas entre os sorotipos A e D. Em seguida, o sorotipo A foi distinguido como um novo sorotipo, *var. grubii*. Atualmente, o gênero é classificado em dois sorotipos e uma espécie irmã: *C. neoformans var. neoformans* (D), *C. neoformans var. grubii* (A) e *C. gattii* (B, C) (LIN, HEITMAN, 2006).

Embora o *C. neoformans* tenha sido isolado pela primeira vez em suco de pêsego, as fontes saprofíticas mais importantes globalmente são as excretas de pombo (*Columba livia*) e o solo. O fungo não pertence a microbiota normal do solo, porém, as amostras positivas para *C. neoformans* foram principalmente de áreas frequentadas por pombos, galinhas, perus ou, ocasionalmente, outras espécies de aves. Recentemente, fontes arbóreas de *C. neoformans* têm sido cada vez mais relatadas em várias partes do mundo (K.J. KWON-CHUNG et al. 2014). No ambiente, o *C. neoformans* interage com amebas, sendo estas prováveis predadoras do

fungo. Esta interação permite que o fungo adquira e mantenha, na natureza, fatores de virulência importantes para a infecção dos mamíferos (Figura 2). Foram descritas alterações genômicas e fenotípicas pleiotrópicas, que aumentaram a sobrevivência do fungo, desenvolvimento de fatores de virulência como formação de cápsula, produção de urease e melanina, além da mutação no gene que codifica o transportador de oligopeptídeos (FU et al., 2021).

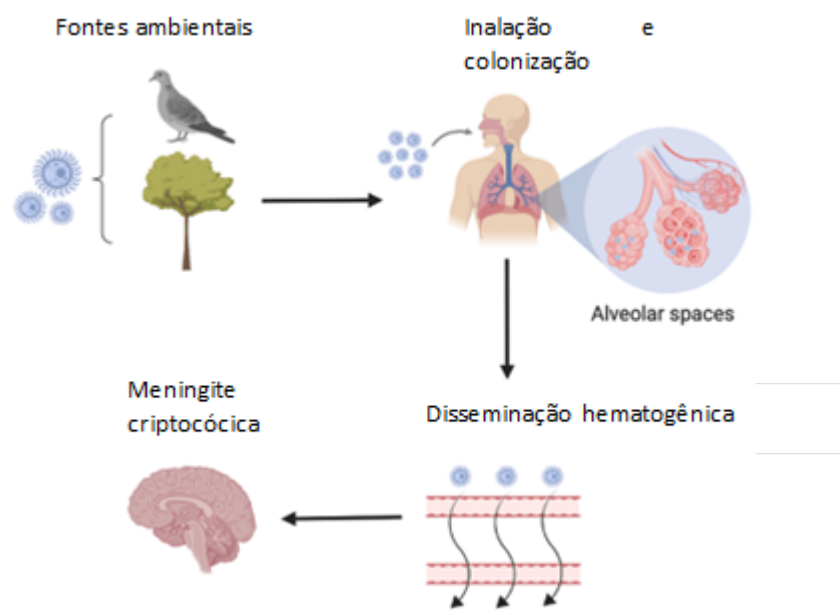


Figura 2: Ciclo de infecção do *C. neoformans*. Inalação de células criptocócicas dessecadas ou “esporos” de fontes ambientais, incluindo solo, plantas e excrementos de pássaros. Fungos inalados colonizam os espaços alveolares e atravessam a barreira hematoencefálica, disseminando para o sistema nervoso central (SNC), onde pode ocorrer meningite criptocócica (modificado de BERMAS & GEDDES-MCALLISTOR, 2020).

1.2. INTERAÇÃO FUNGO-MACRÓFAGO

A infecção humana ocorre por inalação de esporos ou levedura dessecada desse fungo, que entram no trato respiratório do hospedeiro. Na maioria das vezes, a infecção é assintomática, pois as células criptocócicas podem colonizar o trato respiratório do hospedeiro por meses ou mesmo anos sem causar nenhuma sintomatologia (COELHO et al., 2014). No entanto, a forma aguda da criptococose pode se desenvolver após a exposição a uma elevada carga fúngica (NOSANCHUK et al., 2000). Normalmente, as células fúngicas são eliminadas

ou restritas ao pulmão dentro dos granulomas, onde podem persistir em estado dormente indefinidamente sem produzir nenhum dano. Quando a imunidade do hospedeiro é suprimida ou comprometida, essas células criptocócicas dormentes podem ser reativadas e disseminadas por via hematogênica, e conseqüentemente podem causar infecções sistêmicas, acometendo diversos órgãos, causando danos ao hospedeiro em diferentes níveis, como o molecular, celular e tecidual (CASADEVALL et al., 2018). *C. neoformans* tem tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) e pode causar a meningite criptocócica (LIN, HEITMAN, 2006).

Após a sua inalação, podem ser eliminados pelos macrófagos pulmonares presentes nos alvéolos. Um outro mecanismo inato constitutivo é a presença de surfactantes, que possuem propriedades antimicrobianas. Além disso, linfócitos (como linfócitos TCD4+ e TCD8+) e outras células mielóides (como as células dendríticas e macrófagos jovens) também são recrutados para o órgão contribuindo para a eliminação do fungo (Figura 3) (ZARAGOZA et al., 2019).

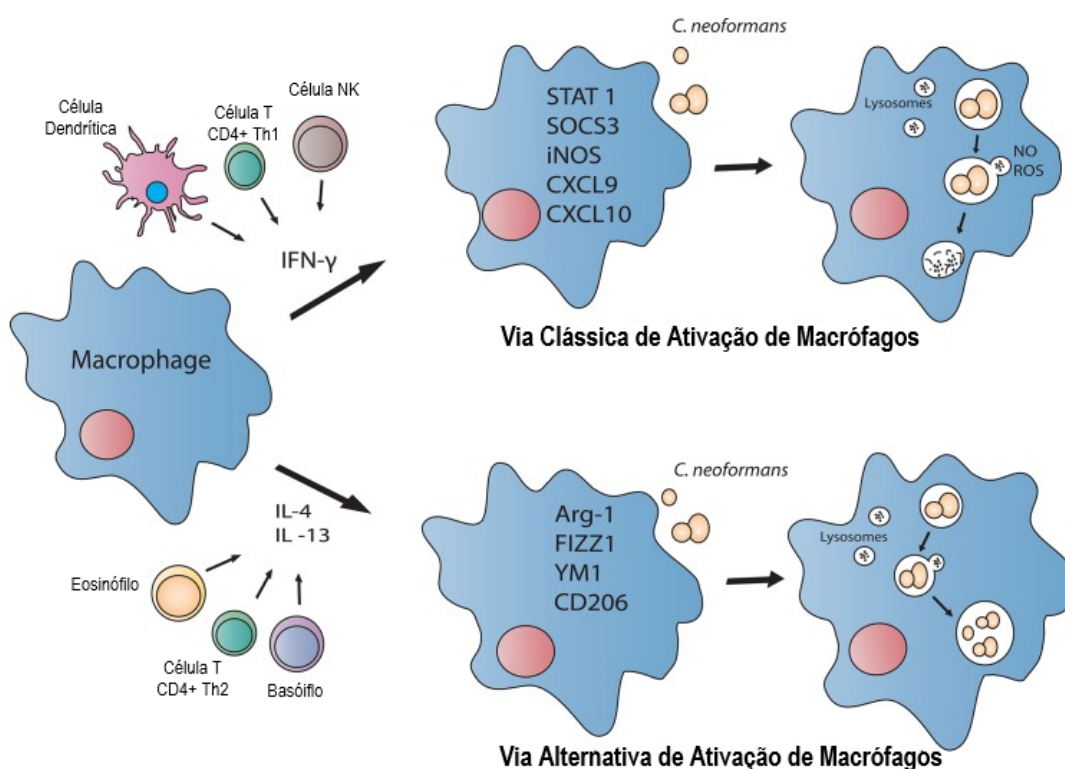


Figura 3: A via de ativação do macrófago influencia diretamente na morte do *C. neoformans*. Na presença da citocina IFN- γ do tipo Th1, os macrófagos polarizam para um fenótipo classicamente ativado (M1). Esses macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO, que contribuem para sua atividade anticriptocócica. No entanto, quando as citocinas do tipo Th2 IL-4 e/ou IL-13 são mais prevalentes, os macrófagos polarizam em direção a um fenótipo ativado alternativamente (M2). Macrófagos M2 não

possuem atividade anticriptocócica e são permissivos à proliferação intracelular de *C. neoformans* (modificado de WAGER, WORMLEY, 2015).

A interação dos macrófagos com o fungo ocorre pelo reconhecimento dos componentes da parede celular fúngica, como α -glucanas, β -glucanas, manose e quitina, que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) desencadeando ativação celular e a fagocitose da partícula fúngica. No entanto, este fungo possui uma cápsula, que é altamente antifagocítica, e sem as opsoninas, produzidas pelo hospedeiro, não há fagocitose significativa de células de levedura *in vitro*. Como o *C. neoformans* acapsular é facilmente fagocitado por meio de receptores de complemento e/ou receptores de β -glucana, foi levantada a hipótese de que a grande cápsula de polissacarídeo oculta a maioria dos ligantes PRR fúngicos, diminuindo assim a fagocitose pelas células hospedeiras (GILES et al., 2007). De fato, para uma fagocitose eficiente *in vitro*, é necessária a opsonização com anticorpo ou proteínas do sistema complemento, interagindo com os receptores para a porção Fc da IgG (FC γ R), receptores de complemento (CR3) e Dectina-1 (COELHO et al., 2014). Apesar das propriedades antifagocíticas da cápsula *in vitro*, a fagocitose de *C. neoformans* ocorre facilmente *in vivo*. Em relação aos esporos, esses são acapsulares e, portanto, com exposição maior de β -glucanas do que as leveduras. Os esporos como partículas infecciosas prontamente interagem com a Dectina-1 e outros PRRs de β -glucana, como o receptor do tipo Toll 2 (TLR-2) e são fagocitados (NAKAMURA et al., 2006; GILES et al., 2009; COELHO et al., 2014).

O reconhecimento da partícula de levedura não se limita aos PRRs extracelulares da célula imune, mas continua dentro do fagolisossomo, e até mesmo no citoplasma da célula, monitorando a presença de componentes fúngico. *O C. neoformans* não demonstrou interferir na maturação fagossômica, sendo que este é capaz de acidificar, apesar desta acidificação ser benéfica para a replicação fúngica. O fagossomo contendo *C. neoformans* é capaz de ser fundir com o lisossoma, formando o fagolisossoma, e este adquire rapidamente uma série de marcadores de maturação, entre eles os marcadores autofágicos, que se colocalizam também no fagolisossoma, como o LC3, no entanto, as leveduras não foram encontradas no interior de um compartimento autofágico (NICOLA et al., 2011). Os mediadores da autofagia podem desempenhar funções neste fagossomo distintas de suas funções canônicas; tais atividades hipotéticas explicariam por que a depleção de Atg2, Atg5 ou Atg9 diminui a captação e/ou

replicação de *C. neoformans* e por que a depleção de Atg5 afeta a sobrevivência após a interação com *C. albicans*, mas não com *C. neoformans* (NICOLA et al., 2012).

Apesar da maturação normal dos fagossomos, estes tornam-se permeáveis após a infecção por *C. neoformans* (TUCKER, CASADEVALL, 2002). A lise do fagossoma teria uma série de consequências como a perda de acidez, vazamento de enzimas fagossômicas que danificam macrófagos, fácil acesso fúngico a nutrientes citoplasmáticos e liberação de fortes componentes capsulares imunomoduladores no citoplasma. Até o momento, não está claro se a lise dos fagossomas reflete uma perda de integridade fagossômica devido ao dano no macrófago, um efeito direto do fungo ou uma combinação de ambos. A produção de urease diminui os danos do fagolisossomo, porém aumenta a exocitose não lítica, permitindo ao fungo disseminar quando é transportado pelos macrófagos (COELHO et al., 2014; JUNG et al., 2022).

Macrófagos humanos restringem o crescimento de *C. neoformans* por até 24 horas após a infecção, um achado indicativo de dano ao fungo. Dentro do fagolisossomo, a levedura é exposta simultaneamente a redução do pH, espécies reativas do oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e falta de nutrientes (SHOHAM, LEVITZ, 2005). Apesar de todo este arsenal, estes são neutralizados por mecanismos de sobrevivência da levedura. Após a fagocitose, a levedura regula positivamente a expressão gênica de enzimas de estresse oxidativo, resposta ao estresse nutricional e à maquinaria autofágica (DERENGOWSKI et al., 2013). Estes colaboram com as propriedades antioxidantes da melanina fúngica e da cápsula para proteger eficientemente o fungo do ataque do hospedeiro. Uma molécula antimicrobiana comprovadamente inibitória para *C. neoformans* em condições ácidas é o Óxido Nítrico (NO). A enzima que produz NO, iNOS (induzível óxido nítrico sintase), está presente em granulomas de *C. neoformans* no pulmão, e NO tem um papel protetor no modelo de criptococose murina (RIVERA et al., 2002; DENHAM et al., 2018).

Após a fagocitose, *C. neoformans* pode sofrer alterações morfológicas, como aumento capsular, que auxiliam sua sobrevivência dentro e até mesmo sua exocitose dos fagócitos do hospedeiro (BLISKA, CASADEVALL, 2009). Algumas dessas alterações incluem a formação de células gigantes fúngicas (células titânicas), disseminação célula a célula e exocitose não lítica (NLE) (Figura 4) (MA et al., 2006). A presença de mecanismos para escapar dos fagossomos ou atravessar para uma célula adjacente é uma evidência convincente da adaptação da levedura a um estilo de vida intracelular. Curiosamente, a permeabilidade fagossômica

sempre precede o NLE, enquanto os feixes de actina ao redor do fagossoma parecem neutralizar a fuga fúngica (JOHNSTON SA, MAY, 2010). A interferência com a maquinaria do citoesqueleto do hospedeiro diminui o NLE, e descobriu-se que as células da levedura interagem com as proteínas Rac1 do citoesqueleto do hospedeiro, sendo uma pequena proteína da família Rho de ligação ao GTP, promovendo a sua entrada na barreira hematoencefálica, indicando que o citoesqueleto do hospedeiro pode ser subvertido para promover a disseminação dos fungos (MARUVADA et al., 2012). A característica mais surpreendente do NLE é que não existem muitos danos aos macrófagos, com exceção da formação de vacúolos gigantes no citoplasma da célula hospedeira (ALVAREZ et al., 2006).

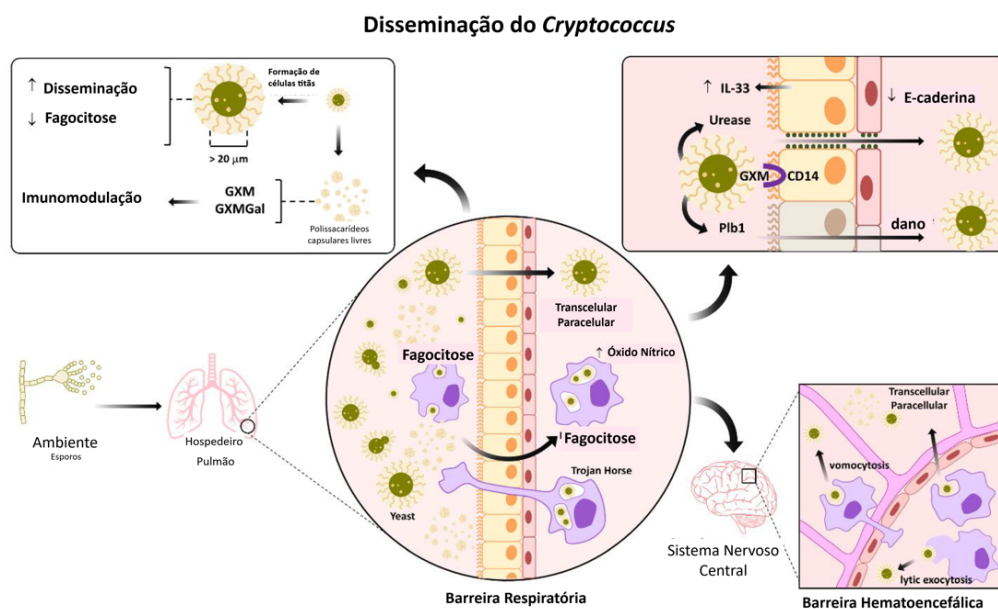


Figura 4: Primeiras alterações morfológicas em *Cryptococcus spp.* dentro do hospedeiro e seus mecanismos de disseminação através das barreiras epiteliais respiratórias e hematoencefálicas (modificado de DINIZ-LIMA et al, 2022).

1.3. FATORES DE VIRULÊNCIA

No microambiente dos hospedeiros, o fungo tem três caminhos para a sobrevivência e estabelecimento da infecção: a adaptação ao ambiente do hospedeiro, os mecanismos de evasão imune e a produção de fatores de virulência (ZARAGOZA, 2019).

Como qualquer outro patógeno microbiano, a sobrevivência no hospedeiro envolve a indução de mecanismos de adaptação à 37°C, diferentes fontes de nutrientes, pH e estresse oxidativo. Para a adaptação a essas condições, o *C. neoformans* induz múltiplos rearranjos metabólicos e ativação de diferentes vias de sinalização (KOZUBOWSKI, HEITMAN, 2009). No entanto, alguns aspectos desta adaptação são mais sensíveis, como os mecanismos que permitem o crescimento em nossa temperatura fisiológica. E, de fato, a maioria dos fungos patogênicos humanos são aqueles capazes de se replicar a 37°C. Isso indica que essa adaptação é provavelmente um dos principais fatores para se tornar um patógeno em um hospedeiro imunossuprimido ou não (BERGMAN, CASADEVALL, 2010).

Outro processo de adaptação necessário para a sobrevivência *in vivo* são aqueles necessários para a absorção de alguns nutrientes limitantes, mas essenciais, como os metais que são necessários para diversas reações metabólicas (GERWIEN et al., 2018). Dentre eles, o papel do ferro na virulência criptocócica é um dos mais estudados (KRONSTAD, 2013). Este metal é necessário para a atividade adequada de muitas enzimas na célula, e tanto as leveduras quanto as células hospedeiras desenvolveram mecanismos para competir com eficiência e obtê-lo de tecidos e fluidos corporais. No caso de *C. neoformans*, várias proteínas são necessárias para a absorção eficiente de ferro, como permeases de ferro, ferroxidases e a glicoproteína Cig1, que é quelante de grupos heme (BAIRWA, 2017).

O pH é outro fator que pode mudar, não só no hospedeiro, mas também no ambiente, e por esta razão, a capacidade de adaptação a diferentes pHs também é importante para sobreviver durante a infecção (SELVIG, ALSPAUGH, 2011). Uma das principais proteínas necessárias para a adaptação ao pH neutro é a Rim101, que codifica um fator de transcrição que responde ao pH alcalino (OST et al., 2015). Curiosamente, esta proteína também regula outras características importantes necessárias para a virulência, como a integridade da parede celular e a produção das cápsulas (O'MEARA et al., 2013).

A cápsula de *C. neoformans* é o fator antifagocítico fúngico mais bem estudado (GOMES et al., 2010). A cápsula inibe a fagocitose do fungo por macrófagos, células dendríticas, e neutrófilos e inibe a internalização de células fúngicas por células endoteliais. Os macrófagos alveolares podem ser considerados a primeira defesa do tecido do hospedeiro contra o *C. neoformans*. Estudos sobre o papel da cápsula na interação entre *C. neoformans* e macrófagos demonstraram que uma vez internalizado por macrófagos, *C. neoformans* pode (i) crescer e eventualmente lisar o macrófago, (ii) ser morto pelo macrófago, ou (iii) vivem dentro

do macrófago em equilíbrio por tempo indeterminado. Nos pulmões, todos os três resultados são possíveis. Curiosamente, a cápsula desempenha um papel importante não apenas na inibição da fagocitose, mas também na inibição da morte por macrófagos, demonstrado com ensaios utilizando as cepas criptocócicas acapsulares, que não são menos patogênicas. Por outro lado, embora outras espécies criptocócicas produzam uma cápsula semelhante, elas também não são patogênicas. Isso sugere que a cápsula é necessária, mas não o único fator para que as células fúngicas causem a doenças (POETA, M. 2004; Coelho et al., 2014).

A definição de fatores de virulência é complexa e muito heterogênea variando com os fungos, mas há consenso de que eles podem ser definidos como aqueles elementos de um patógeno que podem causar danos no hospedeiro, em determinadas condições da resposta imunológica do hospedeiro (CASADEVALL, PIROFSKI, 2009). Seguindo essa definição, *C. neoformans* produz várias enzimas como fatores de virulência, como proteases e lipases (ZARAGOZA, 2019). Essas enzimas também são produzidas por outros patógenos microbianos, incluindo fungos e bactérias. No caso do *C. neoformans*, existe outra enzima degradante, a urease, que também atua durante a infecção. A urease catalisa a degradação da ureia em CO₂ e amônia, e é necessária para a utilização do nitrogênio em vários organismos. A ausência dessa enzima resulta em um defeito de sobrevivência em pH ligeiramente básico (ZARAGOZA, 2019).

As fosfolipases clivam os fosfolipídios para produzir vários compostos biologicamente ativos. Essas enzimas alteram o microambiente da infecção e podem favorecer a sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro (SANTANGELO et al., 2004). As quinases desempenham papéis de sinalização em outras espécies semelhantes a leveduras, mas o papel metabólico e de regulação específico não teriam sido previstos em leveduras não patogênicas, sugerindo papéis na interação com o hospedeiro. Cepas com mutações no gene *PLB1* foram menos capazes de sobreviver em macrófagos em cultura celular. A cepa nocaute *plb1* teve uma diminuição de 50% na proliferação intracelular em comparação com o tipo selvagem. Além disso, a cepa mutante sofreu uma profunda mudança morfológica, produzindo células aumentadas que se aproximam do tamanho das células titânicas (ALSPAUGH, 2014).

1.4. VESÍCULAS EXTRACELULARES

Os fungos são capazes de secretar vesículas extracelulares (EVs), que contêm no seu interior proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, polissacarídeos, toxinas, alérgenos, pigmentos e até príons (BLEACKLEY et al., 2019). Muitas dessas moléculas estão associadas a aspectos da fisiológicos dos fungos, como metabolismo e biogênese da parede celular, mas também a respostas de estresse, resistência antifúngica e patogênese (RODRIGUES ET AL., 2008)

Com base em suas vias biossintéticas, as EVs são geralmente categorizadas em duas grandes classes: microvesículas (também chamadas de ectossomos ou micropartículas) e exossomos. As microvesículas são geralmente vesículas maiores, de 50 nm a 2.000 nm de diâmetro, formadas pelo brotamento direto da membrana plasmática. Os exossomos são EVs menores, variando de 30 a 150 nm de diâmetro, produzidos pela via endossomal. A biogênese dos exossomos começa quando os endossomos maturam para formar corpos multivesiculares (MVBs). Essas estruturas se fundem com a membrana plasmática e liberam suas vesículas luminais para o espaço externo (VAN NIEL et al., 2018).

As vesículas extracelulares produzidas por células fúngicas compartilham semelhanças morfológicas e bioquímicas com exossomos de mamíferos, incluindo uma capacidade de modular a função de células imunes (RODRIGUES et al., 2015). Em contraste com o que é observado para exossomos de mamíferos, as vias necessárias para a biogênese e liberação de vesículas extracelulares em células fúngicas permanecem praticamente desconhecidas. Uma característica notável dos exossomos de mamíferos e das vesículas extracelulares de fungos é a abundância de proteínas citoplasmáticas sem um peptídeo sinal que direciona as proteínas para o retículo endoplasmático em processos secretores convencionais (OLIVEIRA et al., 2010) (Figura 5).

Existem várias evidências mostrando que muitos tipos de células hospedeiras são capazes de internalizar EVs fúngicas (HUANG et al, 2012). Vesículas criptocócicas contendo GXM podem ser encontradas no citoplasma de macrófagos após a permeabilização de fagossomas por leveduras replicantes intracelularmente (TUCKER et al, 2002). Além disso, EVs isoladas de macrófagos infectados com *C. neoformans* mostraram picos adicionais pertencentes ao GXM criptocócico em frações de gradiente de sacarose (RODRIGUES et al., 2007).

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas de cortes transversais do tecido pulmonar de camundongos infectados com *C. neoformans* revelaram a presença de vesículas 2, 48 e 168 horas após a infecção (RODRIGUES et al., 2007). Extratos de EVs de *C. neoformans* reagem com soros de pacientes com criptococose (RODRIGUES et al., 2008), mostrando que os componentes de EV contêm proteínas imunogênicas. Além disso, EVs foram isolados do plasma e do cérebro de camundongos infectados com *C. neoformans* (HUANG et al., 2012). A presença de vesículas no sangue de camundongos 16 horas após a infecção com o *C. neoformans* sugere que o tamanho das EVs permite que elas se disseminem dentro do hospedeiro, embora ainda não saibamos quais distâncias as vesículas podem percorrer (HUANG et al., 2012). Há evidências *in vitro* de que as EVs criptocócicas são lisadas por proteínas séricas humanas como a albumina (BIELSKA et al., 2018) e a proteína de ligação de b-galactosídeo galectina-3 (ALMEIDA et al., 2017) após 60 a 90 segundos (ROBERTSON et al., 2012). Isso sugere que uma subpopulação de EVs fúngicas pode ser instável em fluidos corporais e que eles podem agir apenas localmente. No entanto, ainda não está claro como os EVs de *C. neoformans* interferem na virulência do fungo ou na estimulação do hospedeiro (HUANG et al., 2012).

1.1.ERGOSTEROL

O ergosterol, um 5,7-dieno oxisterol, é o esterol mais abundante nas membranas celulares dos fungos, regulando a sua permeabilidade e a fluidez (DOUGLAS et al., 2014). Devido às suas funções cruciais com propriedades estruturais únicas e etapas biossintéticas específicas, o ergosterol é o alvo da maioria dos antifúngicos disponíveis clinicamente (DHINGRA, CRAMER, 2017). O ergosterol e outros esteróis também podem participar de interações entre reinos. Nas plantas, o ergosterol representa um padrão molecular associado a micróbios reconhecido como um “antígeno não próprio” imunologicamente ativo (KLEMPNER et al., 2014). Os esteróis glicosilados têm sido associados à proteção imunológica do hospedeiro em modelo experimental *in vivo* com camundongos (RELLA et al., 2015). No entanto, ainda existem propriedades que estão em estudo (KOSELYNY et al., 2018).

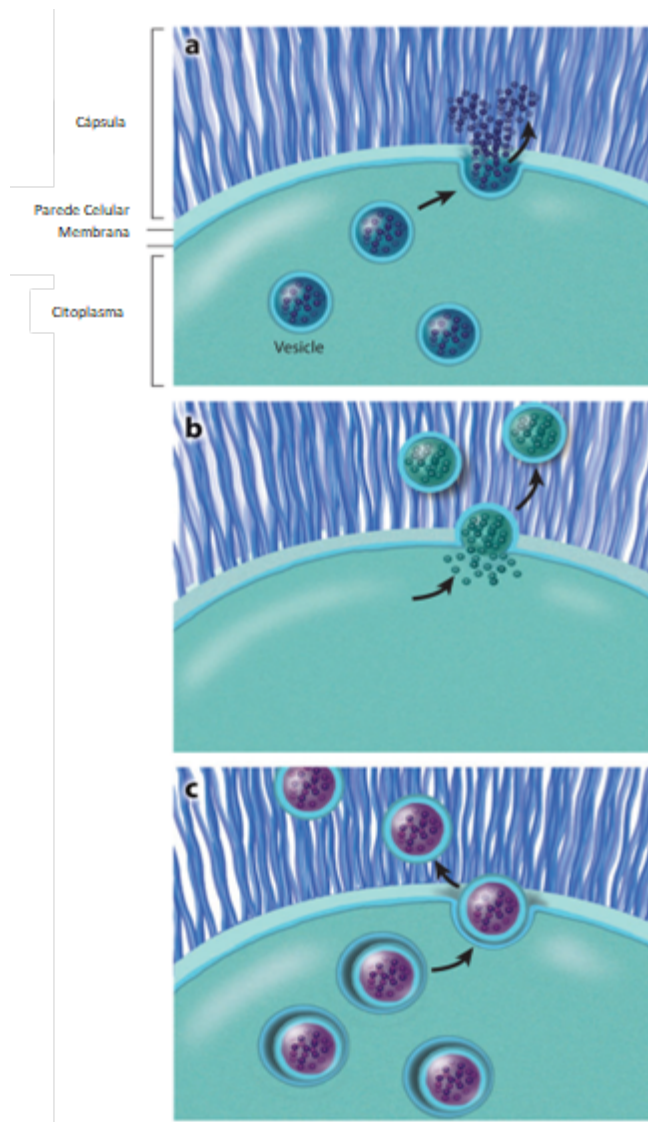


Figura 5: Meios de secreção vesicular do *Cryptococcus neoformans*. (a) As vesículas formadas pela via secretora clássica se fundem com a membrana plasmática para liberar seu conteúdo fora da célula. (b) Vesículas formadas por bolhas na membrana plasmática são liberadas da superfície celular. (c) As vesículas formadas dentro das estruturas ligadas à membrana intracelular são liberadas intactas na superfície celular (modificado de DOERING, 2009).

A complexa biossíntese do ergosterol envolve quase 30 enzimas conhecidas como proteínas Erg. A via de biossíntese de ergosterol pode ser dividida em três etapas: biossíntese de mevalonato, biossíntese de pirofosfato de farnesil e biossíntese de ergosterol (HU et al. 2017). A biossíntese do ergosterol começa com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA catalisada pela acetil-CoA acetiltransferase (Erg10). A condensação de um terceiro acetil-CoA em acetoacetil-CoA pela hidroximetilglutaril-CoA sintase (Erg13)

gera 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é posteriormente reduzido a ácido mevalônico pelas redutases de HMG-CoA (HMGR) Hmg1 e Hmg2. HMGR é a enzima limitante da taxa de biossíntese de ergosterol. A via do mevalonato é onipresente em eucariotos, archaea e algumas bactérias (HAYAKAWA et al. 2017). Na segunda etapa, o mevalonato é fosforilado pela mevalonato quinase (Erg12). A fosforilação adicional pela fosfomevalonato quinase (Erg8) produz mevalonato-5-pirofosfato. O isopentenil pirofosfato (IPP) é sintetizado através da descarboxilação pela mevalonato pirofosfato descarboxilase (Erg19). A IPP isomerase (Idi1) catalisa IPP em dimetilalil pirofosfato (DPP). Em seguida, o DPP condensa com outro IPP para formar o geranyl pirofosfato (GPP), e o GPP é condensado com um IPP adicional para formar o farnesil pirofosfato (FPP). Ambas as reações são catalisadas pela geranyl/FPP sintase (Erg20). Mutações nas duas primeiras etapas da via são letais, porque a biossíntese de vários produtos metabólicos essenciais é bloqueada (DAUM et al., 1998). Na última etapa, duas moléculas de FPP catalisadas pela esqualeno sintase (Erg9) são metabolizadas a esqualeno, que é o precursor de todos os esteróides. A epoxidação do esqualeno pela esqualeno epoxidase (Erg1) produz o esqualeno epóxido, que é então convertido em lanosterol pela lanosterol sintase (Erg7). A conversão de lanosterol em zimosterol é um processo complexo envolvendo várias reações de desmetilação, redução e dessaturação catalisadas pela lanosterol C-14 demetilase Erg11 e Erg24-Erg27, respectivamente. A esterol C-24 metiltransferase (Erg6) converte zimosterol em fecosterol, e a esterol C-8 isomerase (Erg2) catalisa fecosterol em episterol. Finalmente, o episterol é ainda mais dessaturado e reduzido a ergosterol por Erg3, Erg5 e Erg4 (KLUG, DAUM 2014) (Figura 3). Como o oxigênio é necessário para as múltiplas reações no último módulo, a disponibilidade de oxigênio afeta significativamente a síntese de ergosterol. As proteínas Erg da última etapa são os alvos dos azóis, uma classe importante de antifúngicos. Em particular, o Erg6 pode se tornar um alvo para a nova geração de agentes antifúngicos, pois não participa da biossíntese do colesterol (KODEDOVÁ, SYCHROVÁ 2015).

Para evitar o acúmulo excessivo de ergosterol, o ergosterol é transportado através de organelas ou secretado no meio de maneira dependente de ATP (JACQUIER, SCHNEITER, 2012). Como os esteróis são insolúveis em solução aquosa, o ergosterol pode ser transportado através de proteínas de ligação/transferência de lipídeos, como as proteínas Osh (SCHULZ, PRINZ 2007) e Arv1 (TINKELLENBERG et al. 2000). Células de levedura podem armazenar esteróis na forma de ésteres esterílicos (SE) catalisados por Are1 e Are2 em partículas lipídicas (LP). Para a secreção no meio ambiente, os esteróis devem ser acetilados primeiro e depois

transportados para a membrana plasmática. Proteínas de levedura Pry1 e Pry2 relacionadas a patógenos Pry1 e Pry2 são secretadas e ligam a acetatos de esteróis (CHOUDHARY, SCHNEITER 2012). As proteínas Erg estão predominantemente distribuídas no citoplasma e no retículo endoplasmático (ER) das células de levedura. Erg10p e Erg13p no primeiro módulo são encontrados quase inteiramente no citoplasma de *S. cerevisiae*. Surpreendentemente, Erg10p também é encontrado em peroxissomos da *Candida tropicalis*, que utiliza n-alcano (KURIHARA et al. 1992). A HMGR está localizada principalmente no RE, o que pode estar relacionado à regulação dessa enzima limitante da velocidade (KONING et al. 1996). As proteínas Erg da segunda e terceira etapas estão localizadas principalmente no citoplasma e no RE, respectivamente. Erg1p, Erg27p e Erg6p na terceira etapa são distribuídos entre ER e LP (OTT et al. 2005; KRISTAN, Rižner 2012). A localização dupla e a capacidade potencial de Erg1p, Erg27p e Erg6p de se deslocar entre duas organelas sugerem um novo método de regulação da biossíntese de ergosterol.

Uma preocupação sobre os achados resumidos acima está relacionada ao fato de que o ergosterol é um componente típico da membrana plasmática e, portanto, não é acessível ao reconhecimento pelos receptores de superfície dos macrófagos. No entanto, foi demonstrado que várias manoproteínas da parede celular de *C. albicans* e moléculas relacionadas, se ligam e transportam esteróis extracelulares (KOSELYNY et al., 2018), sugerindo uma distribuição externa. De fato, o ergosterol é o principal componente lipídico das vesículas extracelulares fúngicas (RODRIGUES et al., 2013). A passagem de vesículas contendo ergosterol através da parede celular indica que este esterol pode ser um componente transitório da parede celular (NIMRICHTER et al., 2016), e que pode facilitar o reconhecimento pelas células imunes. Além disso, vesículas contendo ergosterol liberadas extracelularmente por *C. albicans* promovem estimulação de macrófagos (VARGAS et al., 2015). Portanto, vários processos fisiológicos contribuem com a presença de ergosterol além da membrana celular e consequente participação em eventos imunológicos. Nesse cenário, Koselny e colaboradores. (2018) foram os primeiros a demonstrar que o ergosterol fúngico é imunologicamente ativo, o que abre vários caminhos de investigação sobre como o hospedeiro responde a esteróis e lipídios fúngicos em geral.

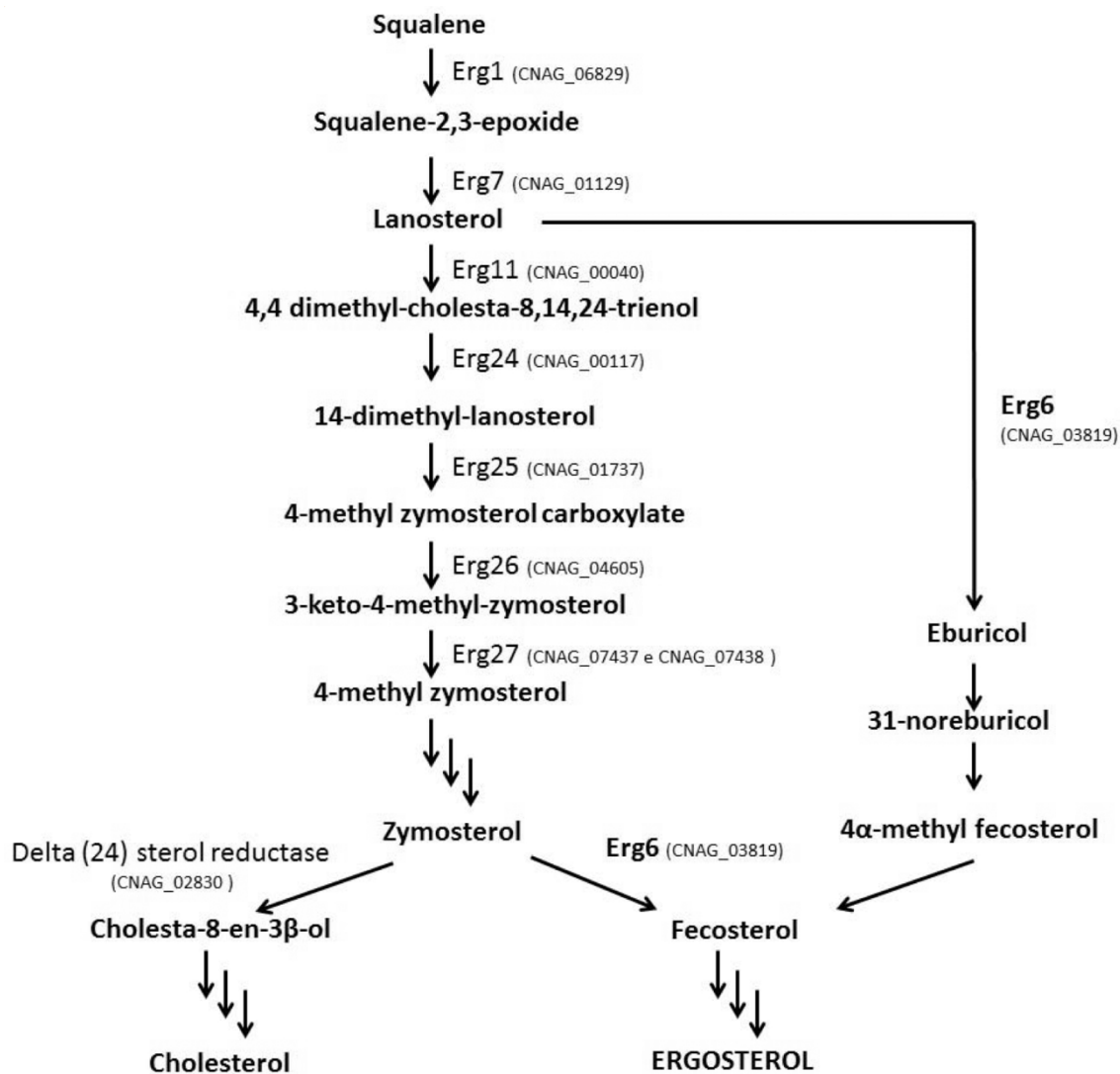


Figura 6: Vias de biossíntese de ergosterol em *C. neoformans*. A via mais comum em fungos para produzir ergosterol é via zymosterol. Uma via alternativa usa o eburicol. O CNAG refere-se à sequência genômica do Broad Institute Database H99 Genome Project (modificado de Oliveira et al, 2020).

Foi observado que a deleção do gene *ERG6* em *C. neoformans* mostrou uma alta capacidade pleiotrópica do gene. Inclusive, foram demonstrados diversos fenótipos alterados também aos mutantes de Δ erg6 de outros fungos ou até mesmo mutantes de outros genes da mesma via de biossíntese do ergosterol (OLIVEIRA et al., 2020). No entanto, os mecanismos pelos quais a ausência da enzima Erg6 afeta outras vias metabólicas são pouco conhecidos e são importantes de serem investigados, pois o entendimento do papel desta enzima em fungos fornecerá conhecimentos que certamente serão utilizados na identificação de novas drogas antifúngicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Diante da importância dos fatores de virulência dos fungos na relação com o hospedeiro e da necessidade de se conhecer mais sobre o papel da membrana celular neste processo, o objetivo deste trabalho foi analisar a ausência do ergosterol na resposta imunológica *in vitro* de macrófagos utilizando o mutante Δerg6 e as vesículas extracelulares secretadas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o papel dos mutantes Δerg6 na ativação de macrófagos derivadas de medula óssea de camundongos (BMDMs).
- Avaliar o papel das vesículas secretadas pelos mutantes Δerg6 na ativação de BMDMs.
- Analisar a influência dos lipídeos de membrana na produção de citocinas *in vitro*, utilizando nanopartículas contendo estes lipídeos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CEPAS

As linhagens do *C. neoformans* utilizadas neste trabalho foram H99 (WT) e o mutante *erg6* Δ (360.erg6 OLIVEIRA et al., 2020). Os estoques de cada uma das cepas estavam em tubos contendo uma mistura de 50% de YPD líquido e glicerol 50%, e armazenados a -80°C. Esses estoques foram utilizados para o repique por esgotamento em placas de Sabouraud Dextrose (SDA) a cada 15 dias. As placas foram incubadas a 30° C por 48 h e armazenadas a temperatura de 2-8°C. As colônias isoladas em cada uma das placas foram utilizadas diretamente em testes ou em inóculos em YPD caldo antes de cada um dos experimentos descrito a seguir.

3.2. CURVA DE CRESCIMENTO

Foram realizadas curvas de crescimento das linhagens de *C. neoformans* a 30°C por 18 horas, em seguida a 37 °C por 24 horas e depois retornou a 30°C a 150 rpm. Inóculos dos fungos foram feitos em YPD líquido. As células foram lavadas com solução salina, foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 1x10⁸ células/mL. Foram utilizadas placas de 96 poços estéreis e em cada poço utilizado foi pipetado 198 μ L de YPD e 2 μ L do inóculo a fim de ter uma concentração final de 1x10⁶. As placas foram incubadas utilizando o equipamento *Eon biotek* com agitação contínua e a cada 30 minutos as absorbâncias a 600 nm foram medidas ao longo de 96 h.

3.3. DIFERENCIAÇÃO DE BMDM

Os macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram diferenciados a partir de células de medula óssea obtidas de camundongos C57BL/6 entre 8 e 10 semanas de idade. Os macrófagos foram obtidos a partir da diferenciação das células de medula óssea incubados com GM-CSF (ImmunoTools) e β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), formando macrófagos com um perfil M1-like.

A extração das células de medula óssea foi realizada utilizando a técnica de lavagem femoral. Resumidamente, os camundongos foram sacrificados por meio de asfixia em câmara de CO₂, em seguida, realizada a retirada do fêmur e tibia das duas patas traseiras,

separadamente. Cada osso era cortado ao meio e, no interior, ocorria uma lavagem utilizando uma seringa de agulha 0,3 x 13 mm contendo meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), obtendo-se assim as células. Essas células foram submetidas por um processo de lise dos eritrócitos, a partir de um tampão de lise contendo cloreto de amônio em tampão Tris. Estas células posteriormente 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 6×10^6 /mL. Os criotubos eram acondicionados em um recipiente denominado “Mr. Frosty” (Thermo Scientific), que mantém a viabilidade celular durante o congelamento, a partir de uma queda de temperatura constante (-1°C por min). Após 24 h em freezer -80°C , os criotubos eram transferidos para um reservatório contendo nitrogênio líquido.

Para cada diferenciação celular, os criotubos eram descongelados a 37°C em banho-maria e as células eram transferidas para um tubo cônico de plástico contendo 10 mL de RPMI-1640 com 20% de SFB aquecido a 37°C (MARIM et al, 2010). Para contagem e análise da viabilidade celular foi utilizado o corante azul de tripan (Sigma). Para a obtenção de macrófagos com um perfil M1 pró-inflamatório, foram plaqueadas 2×10^6 células em 10 ml de meio composto por RPMI-1640 com gentamicina suplementado com 10% SFB e 20 ng/mL de GM-CSF (ImmunoTools) e $50 \mu\text{M}$ de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Após três dias, adicionou-se mais 10 mL de meio de diferenciação com GM-CSF e β -mercaptoetanol. No sexto dia de diferenciação, 10 mL do volume do meio de cultivo foram retirados, centrifugados e era adicionado 10 mL de meio novo descrito acima. No oitavo dia de cultivo, os macrófagos estavam aderidos. Assim, primeiro retirava-se o sobrenadante e as células aderidas eram recobertas com a solução de dissociação “Tryple Express” (Life Technologies), por 30 minutos a 37°C , que apresenta em sua composição uma enzima semelhante a tripsina, porém menos agressiva, que promove a dissociação dos BMMs do fundo da placa. Após a coleta, a solução foi substituída por meio RPMI-1640 + 10% de SFB, foi feita a contagem dos macrófagos, os quais estavam prontos para serem utilizados em experimentos futuros (LUTZ et al., 1999).

Os macrófagos foram então ressuspensos em meio de experimento (90% de RPMI-1640 e 10% de SFB,) e plaqueados em placa de 96 poços, na concentração de 1×10^6 células por mL, por duas horas em estufa a 37°C para aderência no fundo da placa. Após este tempo, o meio contido nas placas foi renovado e os experimentos subsequentes foram realizados (ZAMBONI e RABINOVITCH, 2003).

3.4. INTERAÇÃO DO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS, DAS EVS E DAS NANOPARTÍCULAS COM BMDM

Para analisar a influência das EVs, dos fungos e das nanopartículas na modulação da resposta imune dos macrófagos, estes foram incubados com 90 ng/mL de proteína de cada tipo de EVs, 1×10^5 /mL das duas cepas de *C. neoformans* e em diversas concentrações das nanopartículas. Foram incubadas 1×10^6 células por mL por poço em placa de 96 poços e posteriormente os sobrenadantes foram coletados para quantificação de citocina por ELISA e de lactato desidrogenase. Para a quantificação de peróxido de hidrogênio, foram utilizados os macrófagos que interagiram com as EVs, os fungos e as nanopartículas.

Como controle, as células foram incubadas somente com PBS (controle negativo), ou estimuladas com lipopolissacarídeos de *E. coli* (LPS - Sigma-Aldrich), responsável pelo primeiro sinal de ativação do inflamassoma, ou nigericina (Invivogen), responsável pelo segundo sinal, ou os dois (controle positivo). Os grupos experimentais foram as células somente com as vesículas, para investigar se elas são capazes de ativar o inflamassoma por si só; as células pré-ativadas com LPS, nigericina ou LPS + nigericina e incubadas com as EVs, os fungos ou as nanopartículas, a fim de saber se funcionam como primeiro ou segundo sinal para a ativação do inflamassoma. Além disso, também foram testados grupos com ou sem soro fetal bovino, já que este soro contém albumina, componente responsável pela desintegração das vesículas causando a liberação de seu conteúdo.

3.5. ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA A FAGOCITOSE EM MACRÓFAGOS

O teste de virulência em macrófagos foi realizado com uma cultura de macrófagos BMDM e interação com as cepas como citado anteriormente. A placa foi novamente incubada por 2 e 24 h na estufa a 37 °C, que é a temperatura ótima para macrófagos, com 5 % CO₂, overnight. Os macrófagos foram lisados através de ressuspensão das células em 100 µL de uma solução de SDS 0,5 % (m/v) estéril. A suspensão foi recolhida em um tubo de microcentrífuga estéril (um tubo para cada replicata) e então foi plaqueada em YPD. As placas foram incubadas a 30 °C e as UFC foram contadas após cerca de 48 h. Os dados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5 utilizando o teste estatístico 2 way ANOVA para a determinação dos valores P.

3.6. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

Os sobrenadantes obtidos a partir do ensaio de interação entre os macrófagos e as vesículas, os fungos e as nanopartículas foram utilizados para a dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , a partir da técnica de ELISA do tipo sanduíche. Foram utilizados kits comerciais, denominados Mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go! ®, Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go! ® e Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!® (Ebioscience). Todos os reagentes necessários para o procedimento estavam contidos nos kits (anticorpos primário e secundário, citocinas para curva padrão, diluentes, estreptavidina, subs trato, solução de parada e solução de lavagem). Após a reação, as placas foram analisadas no espectrofotômetro de placa “Multiskan™ FC Microplate Photometer” (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 450 nm. Resumidamente, o princípio do teste se baseia na geração de cor a partir da quebra de substrato por uma enzima acoplada indiretamente às citocinas presentes. Logo, quanto maior a presença destas citocinas na amostra, maior a coloração gerada na etapa de revelação. No ensaio, uma curva de concentrações conhecidas de citocinas é realizada, utilizando os padrões contidos nos kits. Tal curva é usada como referência para a dedução da concentração de citocinas presentes em cada uma das amostras, a partir da comparação entre as absorbâncias obtidas nos poços experimentais e na curva.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Os BMDM foram incubados com 90 ng/mL de proteína das EVs do selvagem e mutante e 1x10⁶/mL de *C. neoformans* H99 e Δ erg6 por 24 e 48 horas. Após a interação, alíquotas de 100uL da suspensão celular foram centrifugadas para depois desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 500 microlitros de Meio Vermelho de Fenol e foram transferidas para cada poço da placa de cultura de fundo chato (96 poços). Os ensaios foram feitos em quadruplicata (2 espontâneos e 2 com estímulo de PMA). Em 2 destes poços foram acrescentados 10uL de Acetato Miristato de Forbol (PMA) diluído em dimetil sulfóxido (DMSO), de maneira a se obter uma concentração final de 10ng por poço.

A placa foi incubada à 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e atmosfera úmida por 1 hora. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 10uL de NaOH 1N por poço. A absorbância foi determinada em um leitor de ELISA (espectrofotômetro), com filtro de 620nm, contra branco constituído por solução de vermelho de fenol. Os resultados foram

obtidos em densidade óptica (D.O.) e foram transformados em μM de H_2O_2 , mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

3.8. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de NO foi indiretamente determinada pela quantificação do catabólito nitrito (NO_2^-) pelo método da reação de Griess. Resumidamente, as amostras de sobrenadante de cultura celular foram incubadas com um volume igual de reagente de Griess (uma combinação de uma solução de sulfanilamida a 1% em ácido ortofosfórico a 5% e uma solução de cloridrato de naftil etilenodiamina a 0,1%) por 5 min em temperatura ambiente. A concentração de nitrito foi calculada com base em uma curva padrão de nitrito de sódio (1,56 a 100 μM) em meio experimental completo. O corante azo formado foi quantificado por espectrofotometria a 540 nm.

3.9. EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas foram isoladas a partir de sobrenadantes de cultura de *C. neoformans* das cepas H99 e Δerg6 , usando como base protocolos descritos na literatura (BROWN et al, 2015). O meio de cultura utilizado foi o YPD caldo - Kasvi na concentração 100%. Inicialmente, foram inoculadas uma alça bacteriológica de cada cepa de *C. neoformans* no meio de cultura citado anteriormente em frascos Erlenmeyer de 250 mL durante 2 dias a 30°C sob agitação de 120 rpm.

Após 2 dias em cultura, os fungos passaram pelo processo de lavagem com PBS estéril e foram semeados em SDA na concentração de $3,5 \times 10^7/\text{mL}$ durante 12 horas. As colônias que cresceram foram centrifugadas duas vezes em 15.000 g por 15 minutos, retirando o pellet entre as centrifugações a fim de usar o sobrenadante, onde estavam as vesículas. O sobrenadante, então, passou por filtração realizada com filtro de seringa com poros de 0,45 μm . O concentrado retido pela membrana passou por dois ciclos de ultracentrifugação a 100.000 g por 1 hora cada, sendo ressuspensionado em PBS estéril com gentamicina a 25 mg/L, a fim de se evitar contaminações durante o processo

O GXM, uma das principais moléculas constituintes da cápsula fúngica do *C. neoformans*, estava presente nas suspensões de vesículas, como visto em experimentos

anteriores realizados pelo grupo. Para a sua retirada, realizou-se um ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) de captura com afinidade por GXM usando o anticorpo 18B7 (RODRIGUES et al, 2007). Esse, é um anticorpo monoclonal murino (IgG1) que possui especificidade contra a GXM e é usado para opsonização de *C. neoformans* foi gentilmente cedido pelo Dr. Arturo Casadevall (Albert Einstein College of Medicine – Nova Iorque) (CASADEVALL et. al., 1998). Para isso, uma placa de ELISA de 96 poços foi sensibilizada com 50 µL do anticorpo na concentração de 10µg/mL, por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com PBS estéril e depois bloqueada com 50 µL albumina sérica bovina (BSA) a 1mg/mL por uma hora a 37°C. Depois disso, a placa foi lavada novamente três vezes com PBS a fim de retirar todo o BSA, já que a albumina possui a capacidade de romper as vesículas (WOLF, J.M. et. al. 2012) e foram adicionados 50 µL de vesículas previamente isoladas em cada poço, que ficaram por uma hora em temperatura ambiente e depois foram passadas a outros poços previamente tratados com 18B7 por mais uma hora

3.10. QUANTIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

As EVs foram quantificadas de forma indireta pela quantificação de proteínas com o kit Micro BCA - Thermofisher Scientific, utilizando as instruções do fabricante. O teste é colorimétrico e em uma placa de 96 poços, fez-se uma curva com concentrações padrão de albumina sérica bovina (BSA), em seguida, adicionou-se as amostras e em cada um dos poços se adicionou uma solução coquetel presente no kit, que reage com as moléculas a serem quantificadas, provocando mudança de cor, sendo detectada em espectrofotômetro por absorvância no comprimento de onda 562 nm.

3.11. QUANTIFICAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE

Para a análise de morte celular, um grupo adicional foi preparado na etapa do ensaio de interação entre macrófagos e os meios condicionados. Para preparar este grupo, as células não receberam nenhum tipo de estímulo até o momento de se adicionar a nigericina. Neste momento, ao invés de nigericina, estas células receberam DMSO em um volume que representa 20% do meio de cultivo. O DMSO agiu durante o mesmo tempo que a nigericina nos grupos

experimentais. Após este tempo, o sobrenadante foi coletado normalmente, e este grupo foi considerado como um controle de 100% de morte celular.

O sobrenadante obtido a partir do ensaio de interação foi utilizado para a dosagem da liberação de lactato desidrogenase (LDH) pelos macrófagos, a partir de técnica enzimática e colorimétrica. O LDH é uma enzima citosólica bastante estável que é liberada em eventos de lise celular, servindo como indicador de morte celular. Para a detecção foi utilizado um kit comercial, denominado CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). Todos os reagentes necessários para o procedimento estavam contidos no kit (diluyente, substrato e solução de parada). Após a parada da reação, as placas foram lidas no espectrofotômetro de placa Spectramax M5 (Molecular Devices), no comprimento de onda de 490 nm. Resumidamente, o princípio do teste se baseia na geração de cor a partir de reações enzimáticas, que envolvem a transformação de um sal em um composto colorido a partir de um substrato gerado pela quebra do LDH. Desta maneira, quanto maior o índice de morte celular no grupo, maior a quantidade de LDH liberada e maior a coloração obtida no final da reação.

Para a obtenção dos dados de porcentagem de morte celular, uma equação foi gerada no programa Excel (Microsoft), onde foi criada uma linha de tendência entre as absorbâncias do ponto 0% (grupo não tratado) e do ponto 100% (grupo tratado com DMSO). As absorbâncias dos grupos experimentais foram então adicionadas nesta equação, sendo obtida assim a porcentagem de morte celular de cada grupo.

3.12. RT-PCR REAL TIME

O RNA foi isolado de BMDM após interação com EVs de *C. neoformans* e Δ erg6 e foi transcrito reversamente. A análise quantitativa de PCR em tempo real foi realizada usando o sistema StepOnePlus Real-time PCR (Applied Biosystems). Todos os dados de expressão gênica são apresentados como a expressão relativa a GAPDH.

Genes	Primers
IL-1b	5'-AGAAGCTTCCACCAATACTC-3' 5'-AGCACCTAGTTGTAAGGAAG-3'

IL-18	5'- GACAGCCTGTGTTTCGAGGATATG-3' 5'- TGTTCTTACAGGAGAGGGTAGAC -3'
YM1	5'-GGGCATACCTTTATCCTGAG-3' 5'-ACACTGTGCCCATCTACGAG-3'
PTX3	5'- CGAAATAGACAATGGACTTCATCC -3' 5'- CATCTGCGAGTTCTCCAGCATG -3'
iNOS	5'- GAAACTTCTCAGCCACCTTGG -3 5'- CCGTGGGGCTTGTAGTTGA -3'
Arginase	5'- CATTGGCTTGCGAGACGTAGAC -3' 5'- GCTGAAGGTCTCTTCCATCACC -3'
Dectina-1	5'- ATGAAATATCACTCTCATATAG -3' 5'- TTACAGTTCCTTCTCACAGATAC -3'
GAPDH	5' GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3' 5'- ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA – 3'

Tabela 1: Lista de genes e primers utilizados na análise por RT-PCR Real Time.

3.13. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados apresentados nesse trabalho referem-se a um experimento representativo, com grupos em triplicata, de pelo menos dois ensaios independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software). Dados considerados significativos foram demonstrados com *, quando $P < 0,05$; com **, quando $P < 0,01$; com ***, quando $P < 0,001$; com ****, quando $P < 0,0001$ e com ns, quando $P > 0,05$.

4. RESULTADOS

Para avaliar a importância do ergosterol na interação entre células do hospedeiro e o *C. neoformans*, utilizamos o mutante para o gene ERG6 (Δ erg6) que foi gerado anteriormente (OLIVEIRA et al, 2020).

4.1. O mutante Δ erg6 apresenta termosusceptibilidade a 37°C reduzindo sua capacidade de crescimento

Já havia sido descrito que o mutante Δ erg6 perde a termotolerância observada pelo fungo selvagem. Nesse estudo, os autores observaram que a 30°C, o Δ erg6 apresentou o mesmo padrão de crescimento da cepa selvagem, apresentando a mesma viabilidade celular. Com o aumento da temperatura para 35 °C, evidenciaram que o mutante Δ erg6 apresentou um atraso para atingir a fase estacionária, quando comparado às linhagens selvagem e apresentou uma menor viabilidade celular. Quando atinge a temperatura de 37°C, o fungo é incapaz de se multiplicar (OLIVEIRA et al., 2020).

Com essas informações, avaliamos se essa incapacidade de crescimento a 37°C causava a morte do mutante ou se o fungo ficava em estado de latência. Inicialmente avaliamos a viabilidade celular dos dois isolados, a 30 e 37°C (Figura 7). Assim como descrito, o Δ erg6 tem uma taxa de crescimento menor a 37°C. A partir desta confirmação realizamos uma curva de crescimento em YPD líquido à 30 °C por 18 horas, até chegar na fase exponencial. Depois aumentou-se a temperatura a 37°C por 24 horas e, em seguida, retornou a temperatura a 30°C, como no início. O mutante Δ erg6 não apresentou crescimento durante as 24 horas a 37°C, mas evidenciou crescimento ao retornar a 30°C. Esses dados sugerem que o mutante fica em estado de latência a 37°C e que não ocorre a morte do Δ erg6.

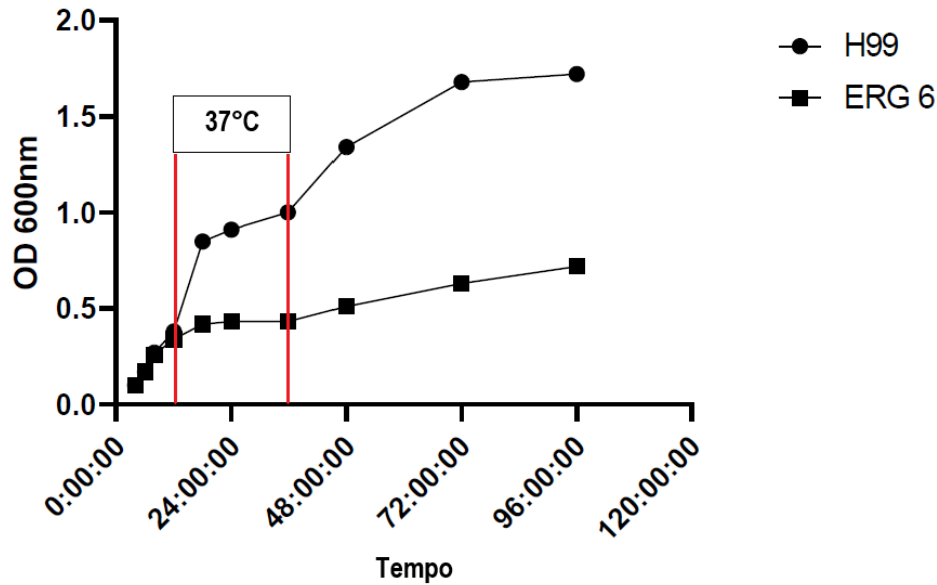


Figura 7: Termotolerância do mutante ERG6 a mudança de temperatura. A curva de crescimento foi realizada com diferentes temperaturas, iniciando a 30 °C, e após 18 h incubação, alternando para 37 °C e retornando para 30 °C após 24 h. A análise estatística foi realizada comparando os grupos do mutante Δ erg6 com os grupos da cepa selvagem H99.

4.2. Avaliação da sobrevivência após a fagocitose do mutante Δ erg6 em BMDM

Para avaliação a interação entre o mutante de Δ erg6 e os BMDM, analisamos a sobrevivência dos fungos nos macrófagos. As cepas em estudo foram submetidas a fagocitose por BMDM a 37°C que, posteriormente, foram lisados após 2 e 24 horas. Os fungos que foram internalizados, recuperados da lise celular, foram plaqueados e a contagem de UFC de cada uma das linhagens foi realizada. O resultado observado foi a redução na capacidade de sobrevivência de mutantes de Δ erg6 a 37°C em BMDM indicada pelo crescimento de um número reduzido de colônias (Figura 9), o que não foi observado na temperatura de 30°C, pois essa é a temperatura ideal para a proliferação do mutante. O aumento do número de fungos poderia ser decorrente da influência da temperatura na atividade microbicida pelos macrófagos.

Para confirmação dessa hipótese, foi realizado o mesmo experimento a 35°C, temperatura que permite estabilidade aos macrófagos durante a interação. Foi observado a capacidade de sobrevivência da fagocitose em BMDM em comparação ao teste a 37°C, porém menor capacidade de sobrevivência comparado ao selvagem. Esses dados corroboram os resultados obtidos pela curva de crescimento do Δ erg6, citados acima.

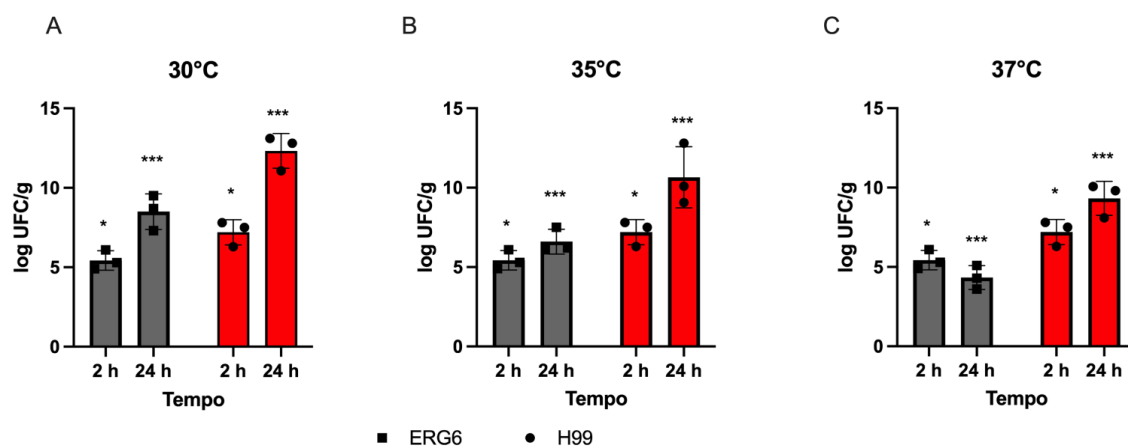


Figura 8: Ensaio de sobrevivência a fagocitose a (A) 30°C, (B) 35°C e (C) 37°C. BMDM foram incubados com o fungo mutante e o selvagem por 2h, representando a capacidade de fagocitose das células. Após este período os macrófagos foram lavados e incubados por mais 24h, representando a capacidade microbicida das células. P < 0,05; com **, quando P < 0,01; com ***, quando P < 0,001; com ****, quando P < 0,0001 e com ns, quando P > 0,05. A análise estatística foi realizada comparando os grupos do mutante Δerg6 com os grupos da cepa selvagem H99.

4.3. O mutante Δerg6 estimula a produção de citocinas e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mas não de óxido nítrico (NO) *in vitro*

Para verificar se o mutante Δerg6 estimula os BMDM a secretarem citocinas ou mediadores microbicidas, os fungos foram incubados com BMDM a 37°C por 24 horas. O sobrenadante resultante desta interação foi utilizado para a dosagem de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e Óxido Nítrico. Os BMDM também foram utilizados para a dosagem de Peróxido de Hidrogênio. Foi possível observar que o mutante Δerg6 , assim como o selvagem, são capazes de estimular a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . (Figura 8A e 8C). Quando estimulados com o LPS, os BMDM infectados responderam como o grupo não infectado, demonstrando que a infecção não interferiu com a produção destas citocinas. Não observamos a produção de IL-6 (Figura 8B), nem pelo mutante e nem pela estimulação do isolado selvagem. Com relação à produção de IL-1 β , o mutante não induziu a produção espontânea desta citocina e nem agiu como primeiro sinal, no entanto o mutante apresentou produção desta citocina quando não estimulados ou estimulados com nigericina. O fungo selvagem induziu uma melhor produção desta citocina, induzindo a produção tanto de forma espontânea como agindo como primeiro ou segundo sinal. Com relação aos intermediários

reativos do oxigênio e nitrogênio, tanto o mutante como o selvagem não induziram a produção de NO pelos BMDM, e níveis baixos deste mediador foram observados quando as células

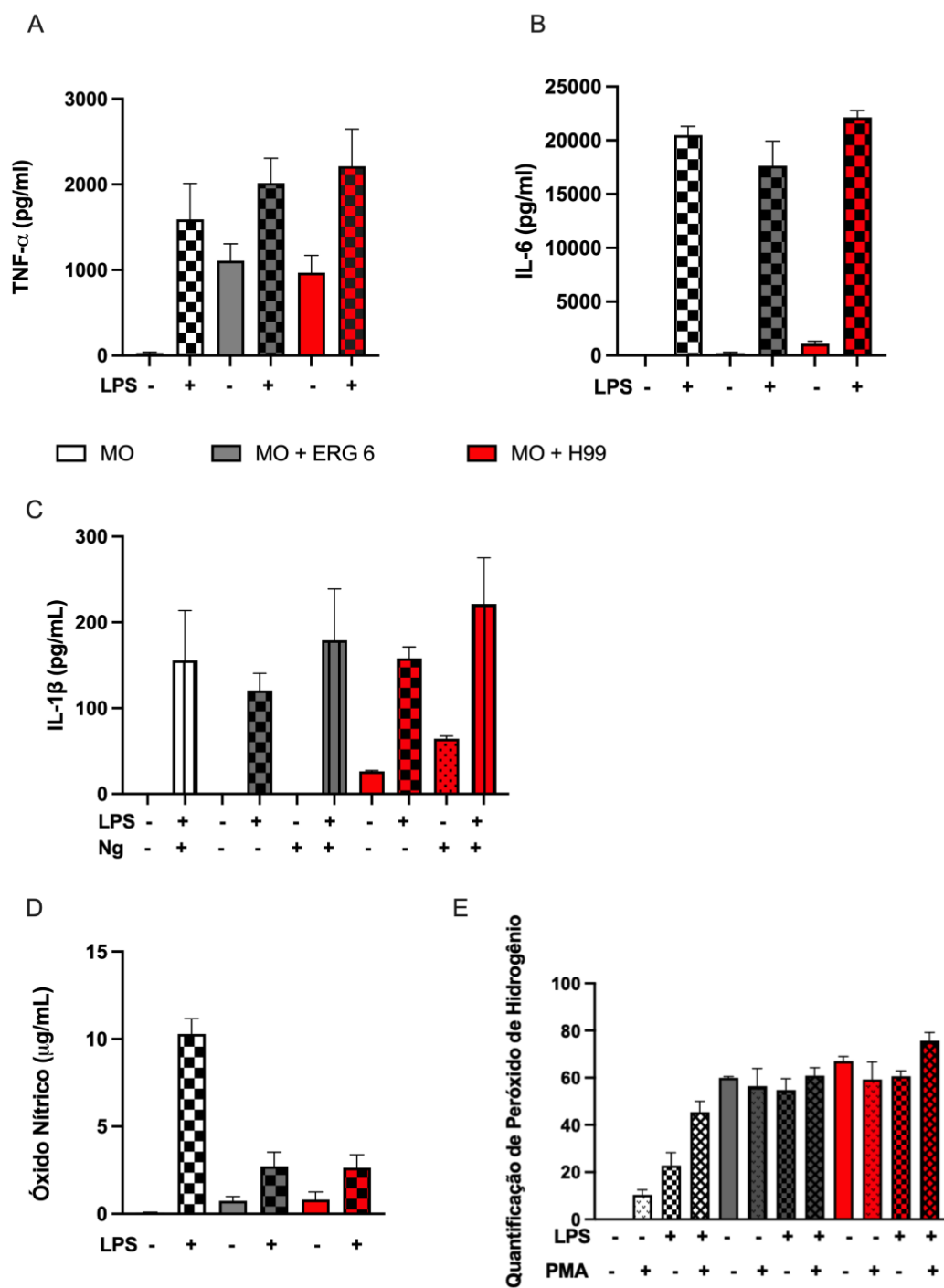


Figura 8: Interação do mutante ERG6 com BMDM estimula produção de citocinas e peróxido de hidrogênio, mas não a produção de Óxido Nítrico. (A) Dosagem de Óxido Nítrico; TNF- α ; (B) Dosagem de

IL-6; (C) Dosagem de IL-6; (D) Dosagem de IL-1 β ; (E) Dosagem de Peróxido de Hidrogênio. P <0,05; com **, quando P < 0,01; com ***, quando P < 0,001; com ****, quando P <0,0001 e com ns, quando P > 0,05. A análise estatística foi realizada comparando os grupos do mutante Δ erg6 com os grupos da cepa selvagem H99

foram estimuladas com LPS, confirmando a capacidade do fungo de detoxificar este mediador (Figura 8D). A produção de H₂O₂ foi observada com a incubação dos BMDMs com os fungos, e o tratamento de PMA não aumentou significativamente a sua produção. O estímulo de LPS com o PMA aumentou a produção de H₂O₂ de forma similar entre o mutante e o selvagem (Figura 8E).

4.4. As vesículas extracelulares intactas e lisadas do mutante Δ erg6 estimulam a produção de citocinas, óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Oliveira e colaboradores (2020) demonstraram que o mutante Δ erg6 produz vesículas extracelulares, mesmo na ausência de ergosterol. Para verificar se as EVs do mutante Δ erg6 induzem a ativação de BMDM estas foram incubadas com os macrófagos a 37°C por 24 horas. O sobrenadante resultante desta interação foi utilizado para a dosagem de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e Óxido Nítrico. Os macrófagos foram utilizados para a dosagem de Peróxido de Hidrogênio.

As EVs do mutante Δ erg6 estimularam a produção de NO e H₂O₂ nos mesmos níveis que o selvagem. O conteúdo das EVs do mutante apresentou um aumento da produção desta citocina, porém em níveis menores do que quando estimuados com LPS. A estimulação com LPS, mostra que o conteúdo das vesículas do mutante não tem capacidade de detoxificar a produção deste mecanismo microbicida (figura 10A e 10B). Em relação as citocinas, as EVs estimularam a produção de TNF- α em maiores níveis que o selvagem (Figura 11A). Não observamos diferenças entre os mutantes e a cepa selvagem na produção de IL-6 (Figura 11B), no entanto, as EVs das duas cepas induziram níveis elevados desta citocina. As EVs do mutante sozinhos não estimularam a produção de IL-1 β , mas ativam a sua produção agindo como o primeiro e segundo sinal, nos mesmos níveis da cepa selvagem (Figura 11C). Para avaliar os componentes que estão presentes dentro das EVs e se estimulam a resposta inflamatória dos BMDM, as EVs do mutante e do selvagem foram lisadas com SFB. As mesmas foram para

interação com BMDM a 37°C por 24 horas. O grupo das EVs lisadas do *erg6Δ* sem LPS estimulou a produção de IL-6 e TNF- α em maiores níveis do que as EVs lisadas da cepa selvagem, como na produção de IL-1 β , as EVs de *erg6Δ* sem LPS e nigericina também apresentou níveis maiores que o selvagem (Figura 11D).

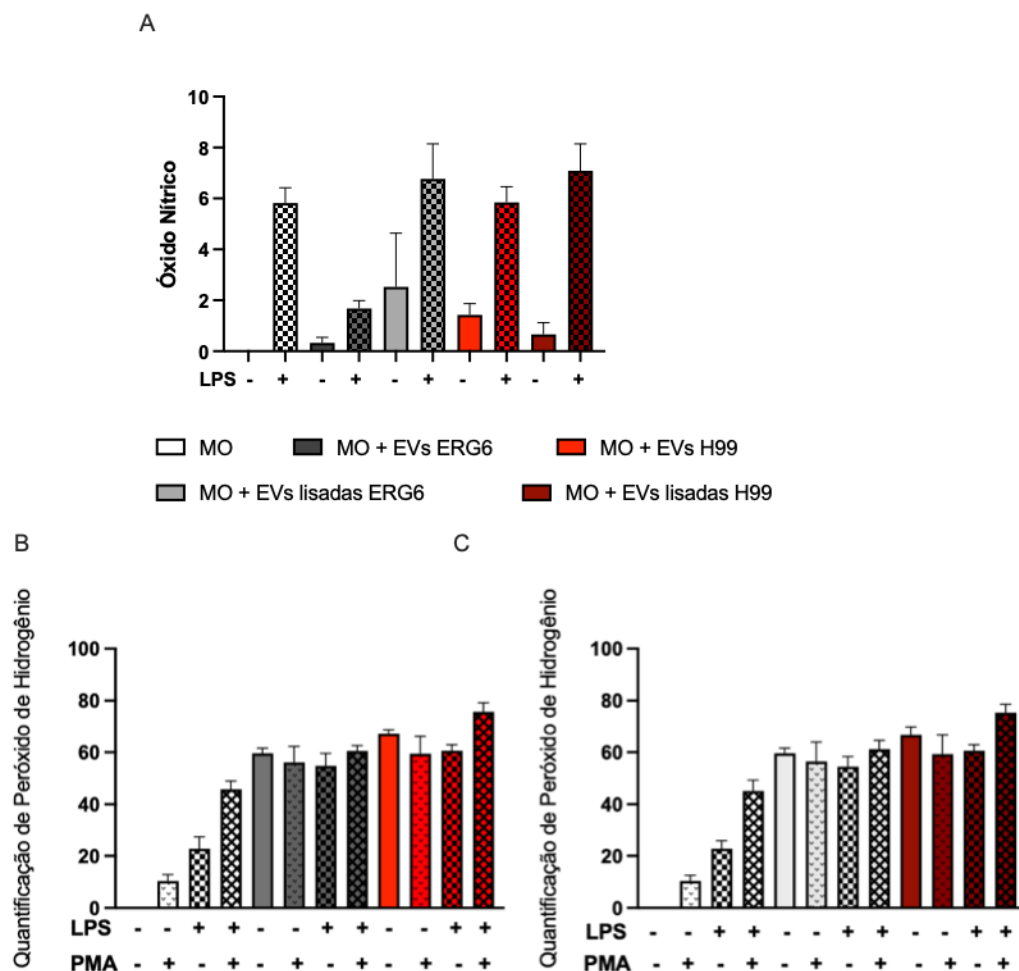


Figura 10: As EVs do Mutante ERG6 estimulam a produção de óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio. BMDM foram incubadas com EVs do fungo mutante e do selvagem, lisadas ou intactas por 24h. A seguir, o sobrenadante foi utilizado para dosagem de NO e as células para a dosagem de H₂O₂. (A) Dosagem de Óxido Nítrico; (B) Dosagem de Peróxido de Hidrogênio das EVs intactas e (C) das EVs lisadas. P < 0,05; com **, quando P < 0,01; com ***, quando P < 0,001; com ****, quando P < 0,0001 e com ns, quando P > 0,05. A análise estatística foi realizada comparando os grupos do mutante Δ erg6 com os grupos da cepa selvagem H99.

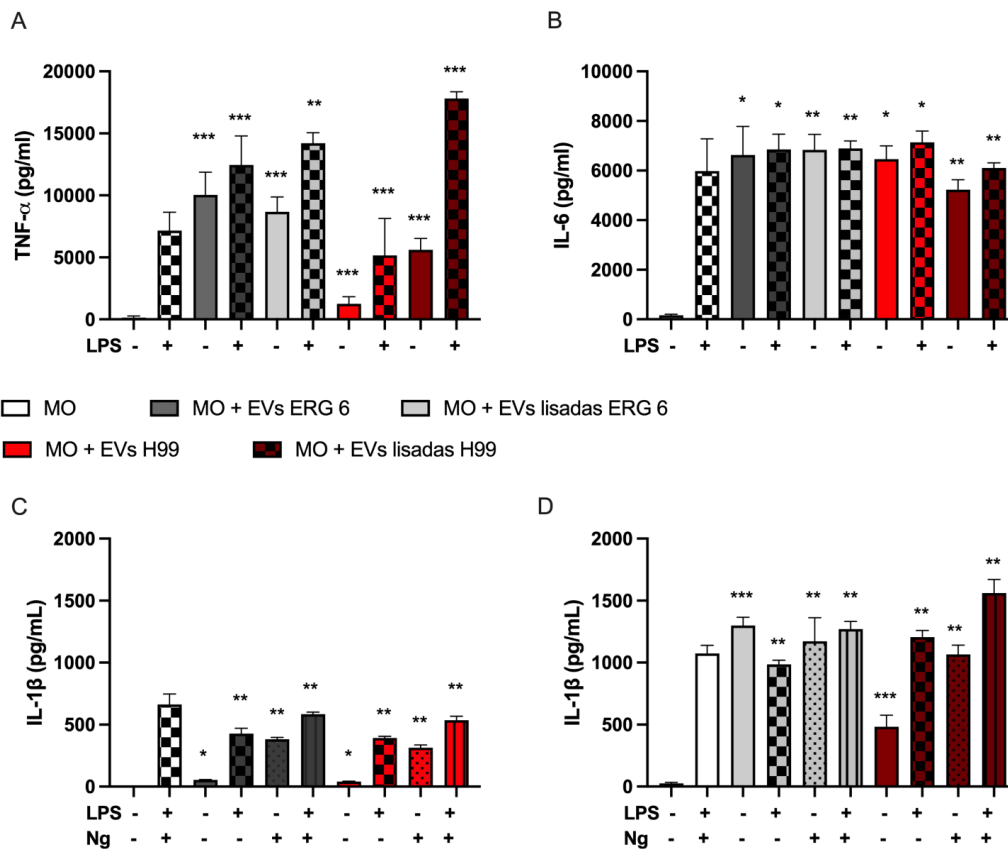


Figura 11: As EVs lisadas e intactas do mutante ERG6 estimulam a produção de citocinas. BMDM foram incubadas com EVs do fungo mutante e do selvagem, lisadas ou intactas por 24h. A seguir, o sobrenadante foi utilizado para dosagem das citocinas por Elisa. (A) Dosagem de TNF- α ; (B) Dosagem de IL-6; (C) Dosagem de IL-1 β das EVs intactas e (D) das EVs lisadas. P < 0,05; com **, quando P < 0,01; com ***, quando P < 0,001; com ****, quando P < 0,0001 e com ns, quando P > 0,05. A análise estatística foi realizada comparando os grupos do mutante Δ erg6 com os grupos da cepa selvagem H99.

Os dados demonstram que as EVs intactas entre as cepas selvagem e mutante estimulam a resposta inflamatória semelhante dos BMDM, mas as EVs lisadas do *erg6* Δ são capazes de estimular uma resposta inflamatória em níveis maiores que as da cepa selvagem. A hipótese é que a ausência do ergosterol mantém a estrutura externas das EVs semelhantes as cepas selvagens, mas o conteúdo interno demonstra ser diferente e pode ser explicado pela produção de outros tipos de moléculas de esteróis ou uma maior produção de fatores de virulência, compensando a ausência do ergosterol.

4.5. Análise da expressão de genes da resposta imune por RT-PCR REAL TIME

Para avaliar se as EVs estimulam a resposta inflamatória dos BMDM, as EVs do mutante e do selvagem foram lisadas com SFB. As mesmas foram para interação com BMDM a 37°C por 24 horas. O experimento também foi realizado com grupo de EVs intactas do mutante e do selvagem. O RNA dos BMDM após interação com EVs de *C. neoformans* selvagem e de Δ erg6 foi obtido e a expressão dos genes foi avaliada por RT-PCR real time.

Os genes que foram analisados sua expressão foram IL-1B, IL-18, YM1, PTX3, INOS, Arginase e Dectina-1. Após a interação dos BMDMs com as EVs lisadas de *C. neoformans* Δ erg6, visualizamos uma maior expressão dos genes IL-18, IL-1B e PTX3 em comparação a interação dos BMDMs com as EVs lisadas de *C. neoformans* selvagem. No caso dos genes YM1, Arginase, INOS e Dectina-1, a maior expressão foi no grupo das EVs da cepa selvagem. Entretanto, a interação dos BMDMs com as EVs intactas de *C. neoformans* selvagem demonstraram maior expressão de todos os genes avaliados do que a cepa mutante (Figura 12).

Esses resultados corroboram com os dados analisados da produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio, demonstrando maior estimulação da resposta inflamatória das EVs intactas da cepa selvagem e das EVs lisadas da cepa mutante em BMDM. Dessa forma, esses resultados sugerem que o conteúdo interno das EVs do Δ erg6 podem ser diferentes da cepa selvagem, o que pode ser explicado pela ausência do ergosterol.

4.6 - Nanopartículas com esteróis da via do ergosterol induzem a lise celular dos BMDM

Koselny e colaboradores (2018) demonstraram que o ergosterol pode representar um dos vários estímulos específicos que levam à ativação do inflamassoma mediada por fungos. Considerando estes achados realizamos os experimentos com ergosterol em lipossomas interagindo com macrófagos para avaliar a lise celular por piroptose e a liberação de IL-1 β .

Como o mutante Δ erg6 tem acúmulos de outros esteróis pela ausência da enzima ERG6, como lanosterol e esqualeno (OLIVEIRA et al, 2020), foi realizada a interação de BMDM com grupos de nanopartículas lipídicas contendo lanosterol, ergosterol e esqualeno, individualmente.

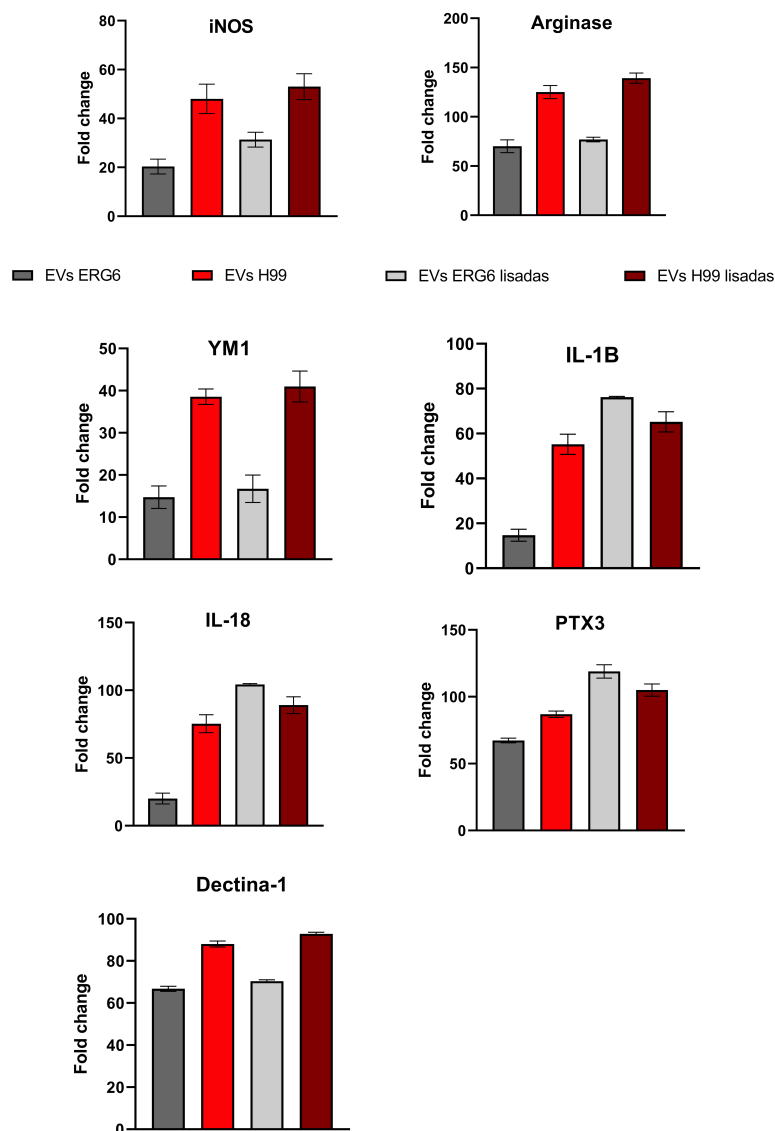


Figura 12: Análise da expressão de genes na interação de BMDM com as EVs de H99 e o mutante ERG6 por RT-PCR Real Time. BMDM foram incubadas com EVs do fungo mutante e do selvagem, lisadas ou intactas por 24h. A seguir, tiveram os genes diferencialmente expressos analisados. Análise da expressão dos genes Arginase, Dectina-1, IL-1b, IL-18, iNOS, PTX3 e YM1. A análise estatística foi realizada comparando os grupos do mutante Δ erg6 com os grupos da cepa selvagem H99.

A citotoxicidade das nanopartículas foi avaliada utilizando-se a quantificação de LDH (Figura 13), mas apenas as concentrações com 6,25 e 125ug dos esteróis de membrana foram utilizadas para realização do experimento, pois foram as únicas com possibilidade de manter os macrófagos viáveis para realizar a dosagem das citocinas.

As nanopartículas com ergosterol e lanosterol na concentração de 12,5 ug causaram a lise celular em maiores níveis que as nanopartículas com esqualeno. Esses dados corroboram com os resultados demonstrados por Koselny e colaboradores (2018), que o ergosterol causa a morte celular por piroptose, assim como o lanosterol, que está em maior concentração no mutante Δ erg6.

A dosagem das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 no sobrenadante da interação com os BMDM demonstraram baixos níveis de estimulação em relação ao controle positivo. O grupo de nanopartículas com esqualeno 6,25ug foi o único a estimular a produção de IL-1 β , mas também em níveis abaixo do controle positivo. Esses dados demonstram que a lise celular causada pelos lipídeos de membrana impede a produção de citocinas, pois causam a morte celular dos macrófagos (Figura 14).

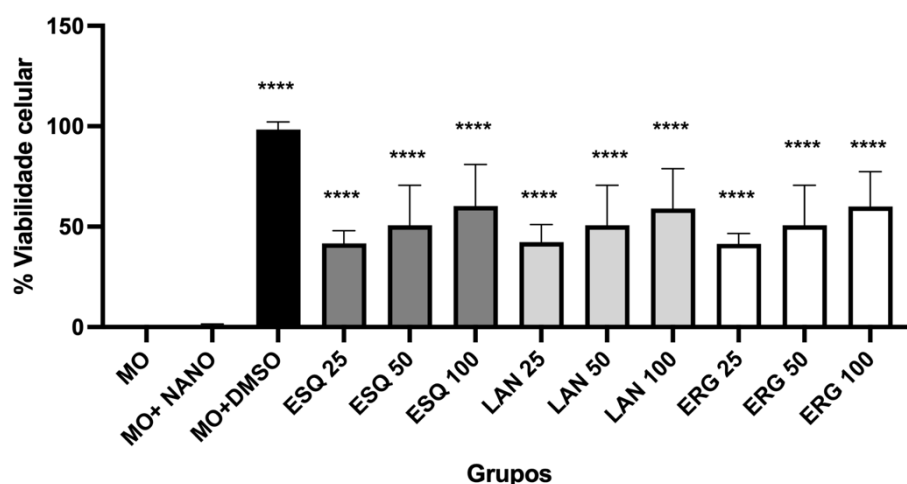


Figura 13: Quantificação de LDH para avaliação da citotoxicidade das nanopartículas. As BMDM foram incubadas com as nanopartículas em diferentes concentrações e a seguir o LDH foi quantificado conforme descrito em material e métodos. P < 0,05; com **, quando P < 0,01; com ***, quando P < 0,001; com ****, quando P < 0,0001 e com ns, quando P > 0,05. A análise estatística foi realizada comparando os grupos dos lipídeos com o controle positivo (MO+DMSO).

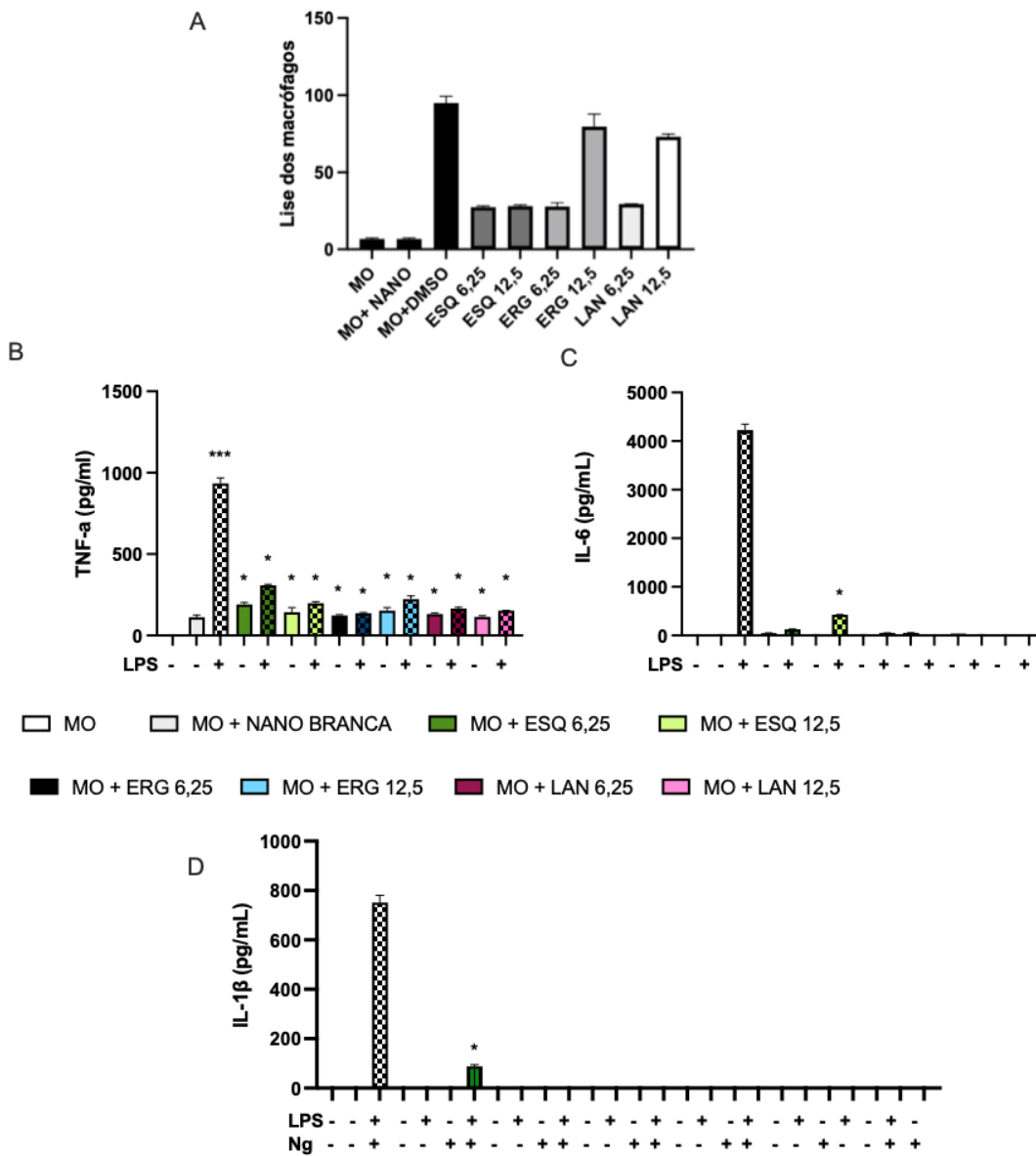


Figura 14: Os lipídeos incorporados nas nanopartículas são capazes de causar a morte celular dos BMDM, porém não altera a produção de citocinas. BMDM foram incubadas com EVs do fungo mutante e do selvagem, lisadas ou intactas por 24h. A seguir, o sobrenadante foi utilizado para dosagem de citocinas e a viabilidade celular por HDL. (A) Dosagem de LDH; (B) Dosagem de TNF- α ; (C) Dosagem de IL-6; (D) Dosagem de IL-1 β . P < 0,05; com **, quando P < 0,01; com ***, quando P < 0,001; com ****, quando P < 0,0001 e com ns, quando P > 0,05 A análise estatística foi realizada comparando os grupos dos lipídeos com o controle positivo.

5. DISCUSSÃO

A interação entre os fagócitos e os fungos é um ponto importante nos mecanismos de eliminação destes patógenos do organismo do hospedeiro. Os mecanismos desenvolvidos podem eliminar os fungos opsonizados ou não, através de mecanismos oxidativos e não oxidativos. O sistema mieloperoxidase, dos neutrófilos, contribui significativamente para a atividade antifúngica contra *C. neoformans*, dado que camundongos nocauteados para mieloperoxidase diminuíram drasticamente a sobrevivência após infecção criptocócica (ARATANI, 2006). Os mecanismos não oxidativos incluem mudanças estruturais induzidas por catepsina-B e a ruptura da parede celular fúngica em células dendríticas, enquanto relataram em neutrófilos o uso de explosão oxidativa quanto moléculas não oxidativas, como calprotectina e defensinas (MAMBULA et al., 2000).

Nos macrófagos, a atividade microbicida depende da ativação dos macrófagos, na qual as respostas do tipo Th1 resultam na regulação positiva de ROS, espécies reativas de nitrogênio, proteases e mediadores lipídicos, o que tornaria os macrófagos mais eficazes na morte de patógenos. A estimulação Th1 também pode diminuir a atividade da hidrolase fagossômica para aumentar a apresentação do complexo principal de histocompatibilidade e a estimulação da imunidade adaptativa (TROST et al., 2012). No entanto, no caso de infecção por *C. neoformans*, mesmo a estimulação de macrófagos por IFN- γ falhou em provocar uma morte eficiente *in vitro* (LEVITZ, FARRELL, 2010). Portanto, a contribuição das defesas oxidativas e não oxidativas dos macrófagos para o controle fúngico permanece pouco elucidada.

A hipótese do cavalo de Tróia consiste na disseminação do patógeno dentro dos macrófagos para entrada na barreira hematoencefálica. Nesse cenário, os macrófagos funcionam como um cavalo de Tróia, carregando o fungo por todo o corpo e contribuindo para a disseminação e o rompimento das barreiras epiteliais e endoteliais. Para o *C. neoformans*, um mecanismo de cavalo de Tróia para disseminação é apoiado pela observação de que a depleção de macrófagos alveolares impede a disseminação para o cérebro (KECHICHIAN et al., 2007). Da mesma forma, a injeção de macrófagos infectados *ex vivo* em camundongos resultou em aumento da carga fúngica cerebral (CHARLIER et al., 2009). No entanto, mecanismos alternativos de invasão do tecido cerebral são possíveis, como a entrada ativa de células endoteliais, por um mecanismo transcelular (CHANG et al., 2004), e proteínas de *C. neoformans* que contribuem para taxas diferenciais de infecção pulmonar/cérebro (HE et al.,

2012). Por exemplo, os mutantes da fosfolipase B reduziram a virulência e a invasão do cérebro (COX et al., 2001). Foi descoberto que a fosfolipase B interage com o citoesqueleto Rac1 do hospedeiro para promover a invasão cerebral, apoiando a ideia de que *C. neoformans* pode usar mecanismos transcelulares além do mecanismo do cavalo de Tróia (MARUVADA et al., 2012).

Durante a infecção, a urease também é necessária para a invasão cerebral. A urease promove o sequestro de células criptocócicas nos vasos microcapilares, e foi levantada a hipótese de que a amônia promove a adesão de *C. neoformans* por aumentar a expressão de adesinas no endotélio ou por um efeito tóxico direto na integridade das junções apertadas da barreira hematoencefálica que facilitaria a invasão cerebral. De acordo, as proteínas necessárias para a atividade da urease também são defeituosas na invasão cerebral (ZARAGOZA, 2019).

A mutação de genes que codificam enzimas que atuam na via do ergosterol já foram descritos para outros micro-organismos como os mutantes de ERG26 em *S. cerevisiae* (GACHOTTE et al., 1998), de ERG27 em *C. albicans*, ERG24 em *C. albicans* (Jia et al., 2002). Os mutantes de Δ erg6 em *C. lusitaniae*, (YOUNG et al., 2003) apresentaram taxa de crescimento reduzida e não atingiram a densidade óptica da linhagem selvagem, sendo que as células se apresentaram aumentadas e com grande quantidade de vacúolos. Vandeputte e colaboradores (2007) demonstraram que um isolado clínico com mutação em Δ erg6 em *C. glabrata* apresentou taxa de crescimento reduzido, quando comparada a linhagem selvagem.

Foi observado em *S. cerevisiae* que o gene ERG6 limita a taxa de difusão passiva tornando-a mais lenta e provocando o acúmulo de pequenas drogas lipofílicas pela membrana sem afetar um transportador de drogas, o Pdr5 (EMTER et al., 2002). Em *C. neoformans*, utilizando inibidores de Erg6, Nes et al., 2009 demonstraram que o fungo utiliza a enzima em uma etapa enzimática crítica para o controle da síntese de ergosterol e sua ausência provoca redução no crescimento do fungo e acúmulo de 4,4-dimetil esteróis.

Estes dados se explicam pelas características que parecem estar relacionadas à permeabilidade e fluidez da membrana foram identificadas, tais como sensibilidade a estresse osmótico e mudança na susceptibilidade de diversas drogas antifúngicas. A ausência do gene foi ainda capaz de afetar a sensibilidade ao estresse oxidativo e a capacidade do fungo em crescer em meios contendo estressores da parede celular. Além disso, mutante Δ erg6 em *C. neoformans* apresentou sensibilidade térmica com o aumento da temperatura, o que pode ser visto através de curvas de crescimento a três temperaturas diferentes. Esses resultados indicam

que a capacidade de sobrevivência do mutante é bastante afetada diante de alterações dos meios extracelulares. A partir dessa informação, acredita-se que se uma droga com esse alvo molecular for utilizada em um indivíduo infectado, o fungo terá sua capacidade de sobrevivência no organismo do hospedeiro reduzida, já que este apresenta defesas imunológicas que também afetam o fungo mais pronunciadamente (OLIVEIRA et al., 2020).

Com uma curva de crescimento onde alteravam-se as temperaturas, conseguimos observar que o fungo consegue sobreviver a 37°C, porém essa temperatura impede seu crescimento. Tal fato foi relatado anteriormente, sobre a incapacidade do mutante de crescer a essa temperatura (OLIVEIRA et al, 2020). Observamos também a sobrevivência após o estresse oxidativo liberado por células imunológicas após a fagocitose, avaliada com a contagem de colônia após a interação com BMDM, mas este apresentou menores concentrações do que a cepa selvagem, que pode ser explicado pela ausência do Ergosterol, por ser um protetor contra espécies reativas de oxigênio em fungos.

Esses dados corroboram com a apresentação de vários fenótipos alterados no mutante, dentre eles a capacidade de crescer em altas temperaturas e na produção de fatores de virulência alterada e suscetibilidade a altas concentrações de H₂O₂, dessa forma a redução da capacidade de sobrevivência em macrófagos, pode não estar relacionada apenas a alteração da via do ergosterol, mas na sua incapacidade de crescer em 37°C, além de alteração de outros fatores de virulência, como por exemplo, aqueles observados nos testes de fosfolipase B um dos fatores de virulência mais bem estudados em *C. neoformans*.(OLIVEIRA et al., 2020)

6. CONCLUSÃO

Apesar do mutante Δerg6 permanecer viável à temperatura corpórea do hospedeiro, mas não proliferar, é capaz de produzir vesículas capazes de estimular um processo inflamatório, com participação especial dos componentes anteriores à síntese do ergosterol, com ativação de macrófagos que auxiliem na sua disseminação.

Os estudos futuros sobre o Ergosterol, a via de biossíntese, as enzimas da via e sua relação com a virulência, sobrevivência e resistência a antifúngicos pode ser a chave para testar novos antifúngicos e terapias para o tratamento da criptococose e outras infecções fúngicas sistêmicas que são empecilhos para a saúde dos humanos, principalmente imunocomprometidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, Zancope-Oliveira RM, Almeida IC, Nosanchuk JD: Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol* 2008, 10:1695-1710.
- Alspaugh JA, Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect Immun*. 1991; 59(7):2291–96.
- Alspaugh, J. A. "Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis" *Fungal Genetics and Biology*. 2014
- Almeida F, Wolf JM, da Silva TA, DeLeon-Rodriguez CM, Rezende CP, Pessoni AM, Fernandes FF, Silva-Rocha R, Martinez R, Rodrigues ML et al.: Galectin-3 impacts *Cryptococcus neoformans* infection through direct antifungal effects. *Nat Commun* 2017, 8:1968.
- Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*. 2006; 16(21):2161–65.
- Aratani Y. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*. *J Med Microbiol*. 2006; 55(9):1291–99.
- Bairwa G, Hee Jung W, Kronstad JW. "Iron acquisition in fungal pathogens of humans. *Metallomics*". 2017; 9:215–227.
- Baker, L.G., Specht, C.A., Donlin, M.J., Lodge, J.K., 2007. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 6, 855–867.
- Ben-Abdallah M, Sturny-Leclère A, Avé P, Louise A, Moyrand F, et al. Fungal-induced cell cycle impairment, chromosome instability and apoptosis via differential activation of NF- κ B. *PLoS Pathog*. 2012; 8(3): e1002555.

Bergman A, Casadevall A. Mammalian endothermy optimally restricts fungi and metabolic costs. *MBio*. 2010;1: e00212–10.

Bielska E, Sisquella MA, Aldeieg M, Birch C, O'Donoghue EJ, May RC: Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nat Commun* 2018, 9:1556.

Biondo C, Midiri A, Messina L, Tomasello F, Garufi G, et al. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol*. 2005; 35(3):870–78.

Bitencourt TA, Rezende CP, Quaresimin NR, Moreno P, Hatanaka O, Rossi A, Martinez-Rossi NM, Almeida F: Extracellular vesicles from the dermatophyte *Trichophyton interdigitale* modulate macrophage and keratinocyte functions. *Front Immunol* 2018, 9:2343.

Bleackley, M. R., Dawson, C. S., and Anderson, M. A. (2019a). Fungal extracellular vesicles with a focus on proteomic analysis. *Proteomics* 19:e1800232.

Bliska JB, Casadevall A. Intracellular pathogenic bacteria and fungi—a case of convergent evolution? *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7:165–71.

Bocca AL, Coelho C, Casadevall A. Dectin-1 pathway activation is important to *Cryptococcus neoformans* killing. *J Immunol*. 2012; 188

Bose, I., Reese, A.J., Ory, J.J., Janbon, G., Doering, T.L., 2003. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 2, 655–663.

Boucher D, Chen KW, Schroder K. 2016. Burn the house, save the day: pyroptosis in pathogen restriction. *Inflammasome* 2:1– 6.

Caldas, H.; Herman, G.E. NSDHL, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the Golgi and accumulates on ER membranes and on the surface of lipid droplets. *Hum. Mol. Genet*. 2003, 12, 2981–2991.

Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun*. 2004; 72(9):4985–95.

Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chrétien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77(1):120–27.

Choudhary V, Schneiter R (2012) Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterolbinding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(42):16882–16887.

Cirigliano, A.; Macone, A.; Bianchi, M.M.; Oliaro-Bosso, S.; Balliano, G.; Negri, R.; Rinaldi, T. Ergosterol reduction impairs mitochondrial DNA maintenance in *S. cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 2019, 1864, 290–303.

Coelho, C; Bocca, A. L; Casadevall, A "The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*" *Annu Rev Pathol*. 2014; 9: 219–238.

Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2001; 39(1):166–75.

Cross CE, Bancroft GJ. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and β -glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. *Infect Immun*. 1995; 63(7):2604–11.

da Silva TA, Roque-Barreira MC, Casadevall A, Almeida F: Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. *Sci Rep* 2016, 6:35867.

Dan JM, Kelly RM, Lee CK, Levitz SM. Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*. 2008; 76(6):2362–67.

Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1471–1510.

de Jesús-Berrios M, Liu L, Nussbaum JC, Cox GM, Stamler JS, Heitman J. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Curr Biol*. 2003; 13(22):1963–68.

Derengowski LS, Paes HC, Albuquerque P, Tavares AHFP, Fernandes L, et al. The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii*

and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation into the mammalian host. *Eukaryot Cell*. 2013; 12(5):761–74.

Dhingra S, Cramer RA. 2017. Regulation of sterol biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development. *Front Microbiol* 8:92.

Denning, D. W. (2016). “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*, 371(1709).

Dromer, F., Ronin, O., et al., 1992. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. *J. Med. Vet. Mycol.* 30 (5), 395–397

Donald PR, Lamprecht JH, Freestone M, Albrecht CF, Bouic PJ, Kotze D, van Jaarsveld PP. 1997. A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1:518–522.

Douglas LM, Konopka JB. 2014. Fungal membrane organization: the eisosome concept. *Annu Rev Microbiol* 68:377–393.

Faro-Trindade I, Willment JA, Kerrigan AM, Redelinghuys P, Hadebe S, et al. Characterisation of innate fungal recognition in the lung. *PLoS ONE*. 2012; 7(4):e35675. [PubMed: 22536422]

Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun*. 2000; 68(7):4225–37. [PubMed: 10858240]

Gachotte, D; Barbuch, R; Gaylor, J. Nickel, E; Bard, M. (1998). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) involved in sterol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (23), 13794-13799.

Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect*. 2006; 8(4):1006–15.

Gehrmann U, Qazi KR, Johansson C, Hultenby K, Karlsson M, Lundeberg L, Gabrielsson S, Scheynius A. 2011. Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce

cytokine responses— novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. *PLoS One* 6: e21480.

Gerwien F, Skrahina V, Kasper L, et al. Metals in fungal virulence. *FEMS Microbiol Rev.* 2018; 42:1–21. .

Giles SS, Zaas AK, Reidy MF, Perfect JR, Wright JR. *Cryptococcus neoformans* is resistant to surfactant protein A mediated host defense mechanisms. *PLoS ONE.* 2007; 2(12):e1370.

Giles SS, Dagenais TRT, Botts MR, Keller NP, Hull CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009; 77(8):3491–500.

Goldman D, Cho Y, Zhao M, Casadevall A, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary *Cryptococcus neoformans* granulomas. *Am J Pathol.* 1996; 148(4):1275–82.

Gross NT, Hultenby K, Mengarelli S, Camner P, Jarstrand C. Lipid peroxidation by alveolar macrophages challenged with *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* or *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2000; 38(6):443–49.

Guillot L, Carroll SF, Badawy M, Qureshi ST. *Cryptococcus neoformans* induces IL-8 secretion and CXCL1 expression by human bronchial epithelial cells. *Respir Res.* 2008; 9(1):9.

Guo C, Chen M, Fa Z, Lu A, Fang W, Sun B, Chen C, Liao W, Meng G. 2014. Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Microbes Infect* 16:845– 854.

Hayakawa H, Sobue F, Motoyama K, Yoshimura T, Hemmi H (2017) Identification of enzymes involved in the mevalonate pathway of *Flavobacterium johnsoniae*. *Biochem Biophys Res Commun* 487: 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.120>

He X, Lyons DM, Toffaletti DL, Wang F, Qiu Y, et al. Virulence factors identified by *Cryptococcus neoformans* mutant screen differentially modulate lung immune responses and brain dissemination. *Am J Pathol.* 2012; 181(4):1356–66.

Heinsbroek SEM, Taylor PR, Martinez FO, Martinez-Pomares L, Brown GD, Gordon S. Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11):e1000218.

Hu Z, He B, Ma L, Sun Y, Niu Y, Zeng B (2017) Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian J Microbiol* 57(3):270–277.

Huang SH, Wu CH, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Brown RJ, Jong A: *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLoS One* 2012, 7:e48570.

Hull, C. M.; Heitman, J. “Genetics of *Cryptococcus neoformans*” (2002) *Annu. Rev. Genet.* 36:557–615.

N, Schneiter R (2012) Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129:70–78.

Jia, N; Arthington-skaggs, B; Lee, W; Pierson, C. A; Leesm N. D; Eckstein, J; Barbuch, R; Bard, M. (2002). *Candida albicans* Sterol C-14 Reductase, Encoded by the ERG24 Gene, as a Potential Antifungal Target Site. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (4), 947-957.

Joffe LS, Nimrichter L, Rodrigues ML, Del Poeta M. 2016. Potential roles of fungal extracellular vesicles during infection. *mSphere* 1(4): e00099-16. doi:10.1128/mSphere.00099-16.

Johnston SA, May RC. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8):e1001041.

Kechichian TB, Shea J, Del Poeta M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect Immun.* 2007; 75(10):4792–98.

Klemptner RL, Sherwood JS, Tugizimana F, Dubery IA, Piater LA. 2014. Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP). *Mol Plant Pathol* 15:747–761.

Klug L, Daum G (2014) Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res* 14(3):369.

Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol.* 2009; 11:370–380.

Kronstad JW, Hu G, Jung WH. "An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*". *Trends Microbiol.* 2013; 21:457–465.

Kyung J. Kwon-Chung, James A. Fraser, Tamara L. Doering, Zhuo A. Wang, Guilhem Janbon, Alexander Idnurm, and Yong-Sun Bahn (2014). “*Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis” Cold Spring Harb Perspect Med 2014;4:a019760.

Kmetzsch L, Joffe LS, Staats CC, de Oliveira DL, Fonseca FL, Cordero RJ, Casadevall A, Nimrichter L, Schrank A, Vainstein MH et al.: Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. Mol Microbiol 2011, 81:206-218.

Kodedová M, Sychrová H (2015) Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE 10(9):e0139306.

Koning AJ, Roberts CJ, Wright RL (1996) Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. Mol Biol Cell 7(5):769–789.

Koselny K, Mutlu N, Minard AY, Kumar A, Krysan DJ, Wellington M. 2018. A genome-wide screen of deletion mutants in the filamentous *Saccharomyces cerevisiae* background identifies ergosterol as a direct trigger of macrophage pyroptosis. mBio 9:e01204-18.

Kristan, K.; Rizner, T.L. Steroid-Transforming enzymes in fungi. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2012, 129, 79–91.

Kurihara T, Ueda M, Kanayama N, Kondo J, Teranishi Y, Tanaka A (1992) Peroxisomal acetoacetyl-CoA thiolase of an n-alkane-utilizing yeast *Candida tropicalis*. Eur J Biochem 210(3):999–1005.

Layer, J.V.; Barnes, B.M.; Yamasaki, Y.; Barbuch, R.; Li, L.; Taramino, S.; Balliano, G.; Bard, M. Characterization of a mutation that results in independence of oxidosqualene cyclase (Erg7) activity from the downstream 3-ketoreductase (Erg27) in the yeast ergosterol biosynthetic pathway. Biochim. Biophys. Acta 2013, 1831, 361–369.

Leber, R.; Landl, K.; Zinser, E.; Ahorn, H.; Spok, A.; Kohlwein, S.D.; Turnowsky, F.; Daum, G. Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. Mol. Biol. Cell 1998, 9, 375–386.

- Levitz SM, Farrell TP. Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by cultured human monocytes: role of the capsule, opsonins, the culture surface, and cytokines. *Infect Immun.* 1990; 58(5):1201–9.
- Lin, X., & Heitman, J. (2006). “The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex” *Annual Review of Microbiology*, 60(1), 69–105.
- Luo Y, Casadevall A. Intracellular cryptococci suppress Fc-mediated cyclin D1 elevation. *Commun Integr Biol.* 2010; 3(4):390–91.
- Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol.* 2006; 16(21):2156–60.
- Mambula SS, Simons ER, Hastey R, Selsted ME, Levitz SM. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2000; 68(11):6257–64.
- Man SM, Karki R, Kanneganti TD. 2017. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev* 277:61–75.
- Maruvada R, Zhu L, Pearce D, Zheng Y, Perfect J, et al. *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the blood-brain barrier. *Cell Microbiol.* 2012; 14(10):1544–53.
- Means TK, Mylonakis E, Tampakakis E, Colvin RA, Seung E, et al. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med.* 2009; 206(3):637–53.
- Mo, C.; Bard, M. A systematic study of yeast sterol biosynthetic protein-protein interactions using the split-Ubiquitin system. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1737, 152–160.
- Mo, C.; Valachovic, M.; Bard, M. The ERG28-Encoded protein, Erg28p, interacts with both the sterol C-4 demethylation enzyme complex as well as the late biosynthetic protein, the C-24 sterol methyltransferase (Erg6p). *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1686, 30–36.
- Mo, C.; Milla, P.; Athenstaedt, K.; Ott, R.; Balliano, G.; Daum, G.; Bard, M. In yeast sterol biosynthesis the 3-keto reductase protein (Erg27p) is required for oxidosqualene cyclase (Erg7p) activity. *Biochim. Biophys. Acta* 2003, 1633, 68–74.

Mullner, H.; Zweytick, D.; Leber, R.; Turnowsky, F.; Daum, G. Targeting of proteins involved in sterol biosynthesis to lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1663, 9–13.

Murphy JW, Hidore MR, Wong SC. Direct interactions of human lymphocytes with the yeast-like organism, *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Investig.* 1993; 91(4):1553–66. [PubMed: 8473499]

Nakamura K, Kinjo T, Saijo S, Miyazato A, Adachi Y, et al. Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Immunol.* 2007; 51(11):1115–19.

Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, et al. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J Immunol.* 2008; 180(6):4067–74.

Nicola AM, Robertson EJ, Albuquerque P, Derengowski LDS, Casadevall A. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. *mBio.* 2011; 2(4):e00167–11.

Nimrichter L, De Souza MM, Del Poeta M, Nosanchuk JD, Joffe L, Tavares PDM, Rodrigues ML. 2016. Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. *Front Microbiol* 8:1034.

Nosanchuk, J.D., Shoham, S., et al., 2000. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann. Intern. Med.* 132 (3), 205–208.

Oliveira, D. L.; Nakayasu E. S.; Joffe, L. S.; Guimarães, A. J.; Sobreira, T. J. P.; Nosanchuk, J. D.; Cordero, R. J. B.; Frases. S.; Casadevall, A.; Almeida, I. C.; Nimrichter, L; Rodrigues, M. L. (2010) Biogenesis of extracellular vesicles in yeast, *Communicative & Integrative Biology*, 3:6, 533-535.

Oliveira, F. F. M.; Paes, H. C.; Peconick, L. D. F.; Fonseca, F. L.; Marina, C. L. F.; Bocca, A. L.; Homem-de-Mello, M. , Rodrigues, M. L.; Albuquerque, P.; Nicola, A. M.; Alspaugh, J. A.; Felipe, M. S. S.; Fernandes, L. "Erg6 affects membrane composition and virulence of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*" 2020 *Fungal Genetics and Biology*, Volume 140.103368, ISSN 1087-1845.

Okagaki, L.H., Strain, A.K., Nielsen, J.N., et al., 2010. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog.* 6, e1000953

Ost KS, O'Meara TR, Huda N, et al. "The *Cryptococcus neoformans* alkaline response pathway: identification of a novel rim pathway activator". *PLoS Genet.* 2015;11:e1005159.

O'Meara TR, Holmer SM, Selvig K, et al. "*Cryptococcus neoformans* rim101 is associated with cell wall remodeling and evasion of the host immune responses". *MBio.* 2013;4:e00522–12.

Ott RG, Athenstaedt K, Hrastnik C, Leitner E, Bergler H, Daum G (2005) Flux of sterol intermediates in a yeast strain deleted of the lanosterol C-14 demethylase Erg11p. *Biochim Biophys Acta* 1735(2):111–118.

Park, B. J; Wannemuehlerb, K. A; Marstonc, B. J; Govenderd, N; Pappase, P. G; Chiller, T. M. (2009). "Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS" *Concise Communication*, 23 (4), 525-530.

Peres da Silva R, Heiss C, Black I, Azadi P, Gerlach JQ, Travassos LR, Joshi L, Kilcoyne M, Puccia R. 2015. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides* pathogenic species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. *Sci Rep* 5:14213.

Poeta, M. D; "Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*" *Eukaryotic Cell*, Oct. 2004, p. 1067–1075 Vol. 3, No. 5

Qin QM, Luo J, Lin X, Pei J, Li L, et al. Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 2011; 7(6):e1002078.

Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, J. B., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A. and Boulware, D. R. (2017) "Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis Radha". *Lancet Infect Dis.* 17(8): 873–881.

Rajasingham R, Govender NP, Jordan A, Loyse A, Shroufi A, Denning DW, Mehta DB, Chiller TM, Boulware DR. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2022 Dec;22(12):1748-1755. doi:

10.1016/S1473-3099(22)00499-6. Epub 2022 Aug 29. Erratum in: *Lancet Infect Dis.* 2022 Oct 31.

Reese, A.J., Doering, T.L., 2003. Cell wall alpha-1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol. Microbiol.* 50, 1401–1409.

Rella A, Mor V, Farnoud AM, Singh A, Shamseddine AA, Ivanova E, Carpino N, Montagna MT, Luberto C, Del Poeta M. 2015. Role of Sterylglucosidase 1 (Sgl1) on the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: potential applications for vaccine development. *Front Microbiol* 6:836.

Rivera J, Mukherjee J, Weiss LM, Casadevall A. Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide. *J Immunol.* 2002; 168(7):3419–27.

Rizzo J, Albuquerque PC, Wolf JM, Nascimento R, Pereira MD, Nosanchuk JD, Rodrigues ML: Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. *Fungal Biol* 2017, 121:602-614.

Robertson EJ, Wolf JM, Casadevall A: EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78:7977-7984.

Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 2008; 7:58-67.

Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, Alvarez M, Nakouzi A, Feldmesser M, Casadevall A: Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 2007, 6:48-59.

Rodrigues ML, Franzen AJ, Nimrichter L, Miranda K. 2013. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. *Curr Opin Microbiol* 16:414.

Rodrigues ML, Nakayasu ES, Almeida IC, Nimrichter L. 2014. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *J Proteomics* 97:177–186.

Sabiiti W, May RC. Capsule independent uptake of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* into brain microvascular endothelial cells. *PLoS ONE*. 2012; 7(4):e35455.

Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. 2015. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep* 16: 24–43.

Selvig K, Alspaugh JA. "pH response pathways in fungi: adapting to host-derived and environmental signals". *Mycobiology*. 2011;39:249–256.

Shakoury-Elizeh, M.; Protchenko, O.; Berger, A.; Cox, J.; Gable, K.; Dunn, T.M.; Prinz, W.A.; Bard, M.; Philpott, C.C. Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 14823–14833.

Shapiro S, Beenhouwer DO, Feldmesser M, Taborda C, Carroll MC, et al. Immunoglobulin G monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* protect mice deficient in complement component C3. *Infect Immun.* 2002; 70(5):2598–604.

Schulz TA, Prinz WA (2007) Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family. *Biochim Biophys Acta* 1771:769–780.

Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol.* 2005; 129(5):569–82.

Sorrell, T. C.; Ellis, D. H (1997). "Ecology of *Cryptococcus neoformans*." *Rev Iberoam Micol* 14: 42-43.

Snelgrove RJ, Edwards L, Williams AE, Rae AJ, Hussell T. In the absence of reactive oxygen species, T cells default to a Th1 phenotype and mediate protection against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol.* 2006; 177(8):5509–16.

Thi EP, Lambert U, Reiner NE. Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog.* 2012; 8(3):e1002551.

Tinkelenberg AH, Liu Y, Alcantara F, Khan S, Guo Z, Bard M, Sturley SL (2000) Mutations in yeast ARV1 alter intracellular sterol distribution and are complemented by human ARV1. *J Biol Chem* 275(52):40667–40670.

Trost M, English L, Lemieux S, Courcelles M, Desjardins M, Thibault P. The phagosomal proteome in interferon- γ -activated macrophages. *Immunity.* 2009; 30(1):143–54.

- Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(5):3165–70.
- Van Niel, G., D'angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228.
- Vandeputte, P; Tronchin, G; Bergès, T; Hennequin, C; Chabasse, D; Bouchara, J-P. (2007). Reduced Susceptibility to Polyenes Associated with a Missense Mutation in ERG6 Gene in Clinical Isolate of *Candida glabrata* with Pseudohyphal Growth. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 51 (3), 982-990.
- Vargas G, Rocha JDB, Oliveira DL, Albuquerque PC, Frases S, Santos SS, Nosanchuk JD, Gomes AMO, Medeiros LCAS, Miranda K, Sobreira TJP, Nakayasu ES, Arigi EA, Casadevall A, Guimaraes AJ, Rodrigues ML, Freirede-Lima CG, Almeida IC, Nimrichter L. 2015. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 17:389.
- Voelz K, Lammas DA, May RC. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77(8):3450–57.
- Wellington M, Koselny K, Sutterwala FS, Krysan DJ. 2014. *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages. *Eukaryot Cell* 13:329 –340.
- Weiss G, Bogdan C, Hentze MW. Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol*. 1997; 158(1):420–25.
- Wolf JM, Rivera J, Casadevall A. 2012. Serum albumin disrupts *Cryptococcus neoformans* and *Bacillus anthracis* extracellular vesicles. *Cell Microbiol* 14:762–773.
- Wormley FL, Jr., Perfect JR, Steele C, Cox GM. 2007. Protection against cryptococcosis by using a murine gamma interferon-producing *Cryptococcus neoformans* strain. *Infect Immun* 75:1453–1462.
- Young, L. Y; Hull, C. M; Heitman, J. (2003). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 2717-2724.

Zaragoza, O (2019). Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*, *Virulence*, 10:1, 490-501.

Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., et al. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat. Cell Biol.* 20, 332–343.