



Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS FOSFOLIPÍDIOS NO TAMANHO  
DA CÁPSULA E DO CORPO CELULAR DE *CRYPTOCOCCUS SPP***

**LAYSA MICHELLE RODRIGUES SANTOS**

**Brasília – DF  
2024**

**LAYSA MICHELLE RODRIGUES SANTOS**

**Avaliação dos efeitos dos fosfolipídios no tamanho da cápsula e do corpo celular de  
*Cryptococcus spp***

Dissertação apresentada à  
Universidade de Brasília como parte dos  
requisitos parciais para obtenção do título  
de mestre pelo Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Microbiana.

**Orientadora:**

Dr<sup>a</sup> Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola

**Brasília –DF  
2024**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, L. M. R.

Avaliação dos efeitos dos fosfolipídios no tamanho da cápsula e do corpo celular de *Cryptococcus spp.*

Laysa Michelle Rodrigues Santos

Brasília, 2024.

Número de páginas: 54

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana,

Universidade de Brasília, Brasília, DF.

*I- Palavras chaves: Cryptococcus spp., Criptococose; Cápsula; Corpo celular; Fosfolipídio; L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina.*

*II- Universidade de Brasília. PPG/BioMicro.*

*III- Avaliação dos efeitos dos fosfolipídios no tamanho da cápsula e do corpo celular de Cryptococcus spp*

*Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.*

*Eclesiastes 3:1*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Deus, pois toda honra e glória devo a ele.

À minha orientadora, a melhor que poderia existir, Pat, meu coração será sempre cheio de gratidão a você, por ter me dado a oportunidade de realizar um sonho e fazer parte dele de forma tão presente e inspiradora, com paciência, dedicação, carinho, cuidado e atenção. Você me inspirara a buscar o melhor sempre e a não desistir e nunca parar de tentar.

Agradeço ao Henrique, meu parceiro e companheiro do início ao fim, à Maria dos Reis e William, que me apoiaram e me ajudaram, oraram por mim e principalmente, acreditaram que eu conseguiria.

À minha mãe, minha vó e Maria Fernanda, que estiveram ao meu lado em todos os momentos e estarão em todos os próximos que vierem. Carinhosamente, à minha tia Rose, obrigada por ser um apoio e por acreditar.

Agradeço aos meus colegas do laboratório, pelas parcerias, ajudas, paciência, em especial à Lara, Stefânia e Talita.

À todos os professores que tive o prazer de conhecer e a honra de terem passado pela minha vida, contribuindo imensamente para minha jornada.

E as todos que direta ou indiretamente me ajudaram, torceram ou oraram para que eu chegasse até aqui, na concretização desse sonho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana (PPG-BioMicro).

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-Gaduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Prof. Dr<sup>a</sup> Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola.  
Apoio: CAPES.

**Avaliação dos efeitos dos fosfolipídios no tamanho da cápsula e do corpo celular de *Cryptococcus spp***

**LAYSA MICHELLE RODRIGUES SANTOS**

**DISSERTAÇÃO APROVADA DA EM: 04/10/2024**

---

Prof. Dr. Jhones do Nascimento Dias - Centro Universitário IESB  
(Membro externo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Diane Sthefany Lima de Oliveira – Hospital das Forças Armadas  
(Membro externo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Calliandra Souza – Universidade de Brasília - UnB  
Membro interno (Suplente)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola – Universidade de Brasília - UnB  
(Orientadora / Presidente)

**BRASÍLIA – DF**  
**2024**

## RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, sendo uma das principais micoses invasivas em humanos. Tem sido observado nos últimos anos um aumento do número da incidência de casos de infecções fúngicas, principalmente em pacientes que têm algum tipo de imunocomprometimento. Diversos estudos demonstraram que o aumento no tamanho da cápsula ou formação de células titãs de *Cryptococcus spp.* podem estar envolvidos em processos cruciais da adaptação inicial do fungo aos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Ambos os processos reduzem o reconhecimento e/ou fagocitose do fungo e outros mecanismos envolvidos na destruição do fungo pelo sistema imunitário. Além disso, a formação de células titãs sendo capazes de produzir células-filhas com capacidade de alterar seu tamanho, possivelmente estão envolvidas nos processos de latência desse patógeno oportunista. As células titãs são um potencial alvo de estudos da interação parasito-hospedeiro e já são citadas como um importante fator de virulência na criptococose. Nosso grupo havia demonstrado que a incubação de células de *C. neoformans* com fosfolipídios induz não só o aumento no tamanho da cápsula desse fungo, mas também a formação de células titãs. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi analisar como determinadas condições físicas e químicas podem afetar a forma como os fosfolipídeos induzem o aumento da cápsula e a formação de células titãs em *C. neoformans*. Observamos um maior indução do tamanho da cápsula do fungo após incubação com fosfolipídio L- $\alpha$ -fosfatidilcolina com maior grau de pureza, e quando o ensaio foi realizado em placas de 96 poços por 72 horas a 30°C, sob agitação. Em relação a formação de células titãs, em todas as condições avaliadas houve obtenção de células titãs quando adicionamos o fosfolipídio P1, no entanto usando o fosfolipídeo com menor grau de pureza em algumas situações não observamos aumento significativo no tamanho do corpo celular. Não observamos efeitos relacionados ao crescimento nas temperaturas de 37°C ou 30°C, nem na presença ou ausência de um filme para indução de hipóxia para as culturas. Esses resultados nos ajudam a esclarecer o papel de fosfolipídeos na indução de aumento da cápsula bem como na formação de células titãs em *C. neoformans*. No entanto, observamos que outros fatores precisam ser melhor estudados para uma melhor compreensão de fatores que sejam importantes na indução desses fenótipos em *C. neoformans* em resposta a fosfolipídeos.

Palavras chaves: *Cryptococcus spp.*, Criptococose; Cápsula; Corpo celular; Fosfolipídio; L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by yeasts of the genus *Cryptococcus*, and is one of the main invasive mycosis in humans. In recent years, an increase in the incidence of fungal infections has been observed, especially in patients with some type of immunocompromise. Several studies have shown that the increase in capsule size or formation of titan cells of *Cryptococcus spp.* may be involved in crucial processes of the initial adaptation of the fungus to vertebrate and invertebrate hosts. Both processes reduce the recognition and/or phagocytosis of the fungus and other mechanisms involved in the destruction of the fungus by the immune system. In addition, the formation of titan cells, which are capable of producing daughter cells with the ability to change their size, are possibly involved in the latency processes of this opportunistic pathogen. Titan cells are a potential target for studies of parasite-host interactions and are already cited as an important virulence factor in cryptococcosis. Our group had demonstrated that incubation of *C. neoformans* cells with phospholipids induces not only an increase in the size of the capsule of this fungus, but also the formation of titan cells. Thus, the objective of this study was to analyze how physical and chemical conditions can affect how phospholipids induce capsula enlargement and titan cell formation in *C. neoformans*. We observed a greater induction of fungal capsule size after incubation with the phospholipid L- $\alpha$ -phosphatidylcholine with a higher degree of purity, and when the assay was conducted in 96-well plates for 72 hours at 30°C, under agitation. Regarding the formation of titan cells, titan cells were obtained in all evaluated conditions when we added the phospholipid P1; however, using the phospholipid with a lower degree of purity, in some cases, we did not observe a significant increase in cell body size. We did not observe effects related to growth at temperatures of 37°C or 30°C, nor in the presence or absence of a film for hypoxia induction in the cultures. These results help clarify the role of phospholipids in inducing capsule enlargement as well as titan cell formation in *C. neoformans*. However, we observed that other factors need to be studied further for a better understanding of elements important in inducing these phenotypes in *C. neoformans* in response to phospholipids.

Keywords: *Cryptococcus spp.*, Cryptococcosis; Capsule; Cell body; Phospholipid; L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**nm** - nanômetros

**µg** – micrograma

**%** – Por cento

**µL** – Microlitro

**µm** – Micrômetros

**µM** – Micromolar

**CD206** - Receptor da manose

**CLRs** – Receptores de lectina do tipo C

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**CrAg** – Dosagem rápida de antígenos de *Cryptococcus*

**CrAg+** - Número de casos positivos para *Cryptococcus*

**D1** – Diâmetro da célula completa (Corpo celular + cápsula)

**D2** – Diâmetro do corpo celular

**DC-SING** – D inglês: “Dendritic cell-specific C-type lectin”

**GXM** – Glucuronoxilomanana

**h** – Hora

**HCO<sub>3</sub>** – Bicarbonato de sódio

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana

**IL**– Interleucina

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** - Fosfato de Potássio Dibásico Anidro

**LCR** – Líquido Cefalorraquidiano

**LFA** - Ensaio de fluxo lateral

**MCP-1** – Proteína quimiotática de monócitos-1

**mg** – Miligrama

**MgSO<sub>4</sub>** - Sulfato De Magnésio

**min** - minutos

**mL** – Mililitro

**mM** – Milimolar

**°C** – Graus Celsius

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OSB** – Proteína de ligação ao oxisterol humano

**P1** – Sigma Aldrich P3556- Tipo XVI-E, maior ou igual 99%, TLC

**P2** – Sigma Aldrich P5394- Tipo X-E, maior ou igual 40%, de origem enzimática

**PAMP** – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

**PBS** – Tampão de fosfato

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**PRRs** - Receptores de Reconhecimento de Padrões

**rpm** – Rotações por minuto

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TARV** – Terapia antirretroviral

**TLR** – Receptores *Toll Like*

**TNF-alfa** – Fator de necrose tumoral alfa

**UV** – Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 CRIPTOCOCOSE .....	13
1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	15
1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO .....	17
1.4 <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> .....	18
1.5 PATOGÊNESE E IMUNIDADE .....	18
1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA .....	21
1.7 CÉLULAS TITÃS .....	23
2. JUSTIFICATIVA .....	26
3. OBJETIVOS .....	26
2.1 OBJETIVO GERAL .....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Preparo da emulsão de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina .....	27
3.2 Ensaio de indução de cápsula e de células titãs .....	27
3.3 Coloração por tinta nanquim .....	28
3.4 Análises das células .....	29
3.5 Análises estatísticas .....	29
4. RESULTADOS .....	30
5. DISCUSSÃO .....	43
6. CONCLUSÃO .....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i> .....	14
Figura 2: Estimativas globais e regionais da carga de antigenemia criptocócica, meningite criptocócica e mortes .....	16
Figura 3: Esquema da interação de <i>C. neoformans</i> com células do sistema imunitário após a infecção.....	19
Figura 4: Imagem microscópica de células de <i>Cryptococcus spp</i> .....	25
Figura 5: Esquema ilustrativo do experimento realizado com células de <i>Cryptococcus</i> e fosfolipídeos .....	28
Figura 6: Esquema ilustrativo das condições testadas com células de <i>Cryptococcus</i> e fosfolipídeos .....	30
Figura 7: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> a 37°C sem filme .....	32
Figura 8: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> a 37°C com filme.....	33
Figura 9: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> a 30°C sem filme .....	34
Figura 10: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> a 30°C com filme.....	35
Figura 11: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> a 37°C com CO <sub>2</sub> , sem filme.....	36
Figura 12: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> a 37°C com CO <sub>2</sub> , com filme .....	37
Figura 13: Efeito da temperatura de incubação no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> em culturas crescidas com filme.....	38
Figura 14: Efeito da temperatura de incubação no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> em culturas crescidas sem filme .....	39
Figura 15: Efeito da presença ou ausência do filme no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> em culturas crescidas a 37°C.....	40
Figura 16: Efeito da presença ou ausência do filme no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> em culturas crescidas a 30°C.....	41
Figura 17: Efeito do crescimento sem agitação, a 5% CO <sub>2</sub> no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> em culturas crescidas a 37°C .....	42

# 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucariontes, que estão presentes em todos os ambientes e apresentam características reprodutivas capazes de se dispersar em diferentes substratos e ambientes, podendo ser desde decompositores de matéria orgânica morta até mesmo parasitas de plantas e animais, incluindo o ser humano. (MOLINARO, 2009; CASADEVALL & PERFECT; 1998, ALMEIDA et al., 2008).

Foi observado que nos últimos anos o aumento do número da incidência de casos de infecções fúngicas sistêmicas, principalmente em pacientes que têm algum tipo de imunocomprometimento, dentre eles os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) causada pelo HIV, pacientes transplantados, portadores de leucemias ou tratamento com corticosteróides ou pacientes hospitalizados por longos períodos (LOW e ROTSTEIN, 2011).

Globalmente, estima-se que a meningite criptocócica resulta em 19% da mortalidade relacionada com a AIDS (RAJASINGHAM et al., 2022). A meningoencefalite é considerada a forma letal, porém a infecção pulmonar é a forma mais frequente, considerando que, a via de infecção da criptococose é por inalação de células fúngicas. A criptococose também pode se apresentar de forma disseminada, acometendo órgãos como pele, rins, fígado e baço. As duas espécies, atualmente são reconhecidas como os agentes mais comuns são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (E SILVA, et al., 2023; DE OLIVEIRA; MELHEM, 2014). A AIDS está relacionada à criptococose por *C. neoformans*, além de outras condições imunossupressoras, como transplantes de órgãos e o uso extensivo de corticoides. Já a infecção por *C. gattii*, geralmente ocorre geralmente em indivíduos sem imunossupressão aparente (DE FERNANDES, 2000).

## 1.1 CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma infecção fúngica que tem como principais agentes etiológicos *C. gattii* e *C. neoformans*, que tem como característica infectar tanto indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos, respectivamente. A infecção ocorre através da inalação de partículas fúngicas, que podem atingir o pulmão, causando quadros clínicos respiratórios (figura 3), ou evoluir para uma meningoencefalite fatal. (DUTRA, 2017). A doença apresenta

ocorrência mundial e é considerada negligenciada, afetando desproporcionalmente países em desenvolvimento e com baixa renda. A criptococose é considerada a segunda causa mais comum de mortalidade em pacientes com AIDS, atrás apenas da tuberculose (RAJASINGHAM, 2017).



**Figura 1: Esquema representativo do ciclo de infecção de *Cryptococcus*.** Fonte: Imagem elaborada pela autora

O período de colonização fúngica e da progressão da doença são determinados por três fatores principais: 1) resposta imune do paciente; 2) virulência da cepa desta levedura e 3) quantidade de partículas infectantes inalada pelo hospedeiro (PERFECT et al., 2006). A patogênese da forma grave da criptococose apresenta sinais e sintomas relativos ao envolvimento das meninges e aumento da pressão intracraniana gerada pela infecção. Como por exemplo: febre, dor de cabeça, desorientação, vertigem, rigidez na nuca, tontura, hiporreflexia, sonolência, vômitos, afasia e paralisia dos nervos cranianos. (LACAZ et al., 2002).

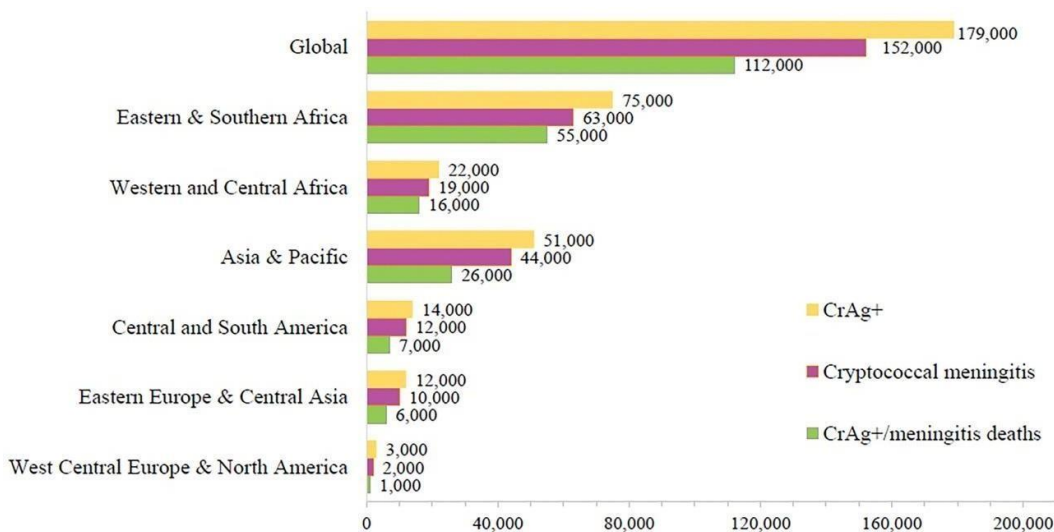
A criptococose se apresenta em duas formas distintas do ponto de vista clínico: a criptococose oportunista, associada a condições de imunodepressão celular, causada predominantemente por *C. neoformans*; e a criptococose primária de hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais causada predominantemente por

*Cryptococcus gattii*. Ambas causam meningoencefalite, de evolução grave e fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente (MORETTI et al., 2008).

Apesar de a infecção afetar principalmente indivíduos imunodeficientes, evidências sugerem que a exposição e infecção de *C. neoformans* é extremamente comum (LINDELL et al., 2006), porém, por mais que a exposição seja comum, a doença é relativamente rara. Ainda que seja comum o acometimento de indivíduos com AIDS e pacientes recém transplantados, a criptococose sintomática já foi observada em pacientes com câncer, usuários de drogas intravenosas, e indivíduos com várias condições autoimunes em tratamento com drogas imunossupressoras (ASLANYAN et al., 2017).

## **1.2 EPIDEMIOLOGIA**

A terceira região global com mais casos de morte por criptococose é a América Latina, com a letalidade intra-hospitalar destes casos variando entre 30 e 60%. Nesta região da América Latina, a meningite criptocócica é a segunda mais comum doença neurológica oportunista em pacientes com HIV, estando a toxoplasmose cerebral em primeiro lugar (VIDAL, 2021; FIRACATIVE, 2018). Estima-se cerca de 152.000 casos de meningite criptocócica, resultando em 112.000 mortes relacionadas à criptococose (figura 2) (RAJASINGHAM et al, 2022).



**Figura 2: Estimativas globais e regionais da carga de antigenemia criptocócica, meningite criptocócica e mortes (RAJASINGHAM et al., 2022).**

No Brasil, dentre a micoses sistêmicas e oportunistas, a criptococose é a principal causa associada à morte nos pacientes com AIDS. Cerca de 6% dos casos de AIDS no Brasil têm o diagnóstico de criptococose no mesmo período do diagnóstico desta imunodeficiência (PRADO, 2009), portanto, comportando-se como doença definidora. No Brasil, a criptococose não é de notificação obrigatória, por isso, a mortalidade real é desconhecida. Dados demonstraram que no período de 2000 a 2012 dos 4314 óbitos por criptococose associados a AIDS, 71.5% eram homens, com idade entre 20 e 59 anos representando 95,8% de todos estes óbitos (ALVES SOARES, 2017).

A mortalidade estimada em um ano em pacientes com AIDS e meningite criptocócica em países pobres é de até 70% e nos países ricos de 20 a 30% (WHO, 2018). A meningite criptocócica está relacionada até 19% mortalidade mundial ligada à AIDS, além de ser a principal causa de meningite em adultos na África subsaariana (MEYA, 2016; RAJASINGHAM et al., 2022).

Observou-se uma redução na carga global absoluta estimada de meningite criptocócica associada ao HIV comparando ao ano de 2014, provavelmente devido à expansão da terapia antirretroviral (TARV), porém, a doença criptocócica ainda é responsável por 19% das mortes relacionadas com a SIDA, semelhante às estimativas de 2014. Acredita-se que para acabar com



as mortes por meningite criptocócica até 2030, são extremamente necessários diagnósticos criptocócicos, tratamentos de meningite e implementação de rastreios preventivos (RAJASINGHAM et al., 2022).

### 1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou em 2011 diretrizes para diagnóstico e tratamento da doença criptocócica em pacientes infectados pelo HIV (World Health Organization et al., 2011). Recomendando punção lombar e dosagem rápida de antígenos de *Cryptococcus* (CrAg) no LCR para diagnosticar a criptococose. O exame do LCR em tinta nanquim é recomendado como alternativa ao teste CrAg se o acesso ao ensaio não estiver disponível ou se resultados rápidos não forem garantidos. E se, caso não houver possibilidade de punção lombar imediata ou se for contraindicada, as diretrizes de aconselhamento rápido da OMS recomendam o teste de soro ou plasma para CrAg. A OMS enfatizou que o valor de um teste rápido de CrAg (aglutinação em látex ou LFA) de LCR ou soro e observou que os ensaios de CrAg tinham maior sensibilidade e especificidade, além de serem mais fáceis de realizar e menos dependentes da habilidade do técnico do que o teste de tinta nanquim. O imunoensaio para CrAg é um teste de captura de antígeno que detecta antígeno capsular livre que foi liberado pela levedura em fluidos corporais como sangue, LCR ou urina (KOZEL & BAUMAN, 2012).

As diretrizes para o tratamento da criptococose foram publicadas em 2010 pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (Infectious Diseases Society of America/IDSA). O tratamento da infecção da criptococose depende da gravidade dos sintomas apresentados e da localização da infecção (MADA, 2022). Então, são utilizados alguns antifúngicos, tais como o fluconazol, a anfotericina B e a 5-flucitosina (QUEIROZ, 2012). O tratamento é dividido em três fases, inicia-se com a fase da indução, que tem objetivo de reduzir a maior quantidade possível de patógenos em um prazo de pelo menos duas semanas. A segunda é a fase de consolidação, que consiste em manter a carga fúngica baixa, para que seja comprovado, por meios de exames laboratoriais em um período de oito semanas, uma negativação da carga fúngica conforme parâmetros clínicos. E por último, a fase de manutenção ou supressão depende do estado imunológico do paciente e o período disso pode ser no prazo de um ano (PASA, 2011).

#### **1.4 CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS**

*C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo, geralmente presente na forma de levedura durante as infecções. Sua forma filamentosa é raramente encontrada em tecidos infectados, sugerindo um menor potencial virulento (LIN, 2009). Esse fungo apresenta-se como leveduras globulosas, de 3 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com brotamentos únicos ou múltiplos e são envolvidas por uma cápsula mucopolissacarídica (CASEDAVELL; PERFECT, 1998). É capaz de causar uma amplitude de infecções indo da colonização assintomática dos tecidos pulmonares à meningoencefalite letal (ASLANYAN et al., 2017).

*C. neoformans* é uma levedura patogênica encapsulada que pode alterar o seu tamanho durante a infecção. Em particular, este processo pode ocorrer aumentando o tamanho da cápsula sem modificar o tamanho do corpo celular, ou aumentando o diâmetro do corpo celular, o que é normalmente acompanhado também por um aumento da cápsula. Este último processo leva à formação de células de tamanho anormalmente aumentado denominadas células titãs (ZARAGOZA et al., 2009). A formação de células menores ou maiores do que as usuais, são denominadas de formas anãs ou microformas ( $< 1\mu\text{m}$  de diâmetro) e as células titãs ( $>10$  a  $100\mu\text{m}$  de diâmetro) devido a sua capacidade de alterar de tamanho (ZARAGOZA et al., 2010b; ZARAGOZA; NIELSEN, 2013).

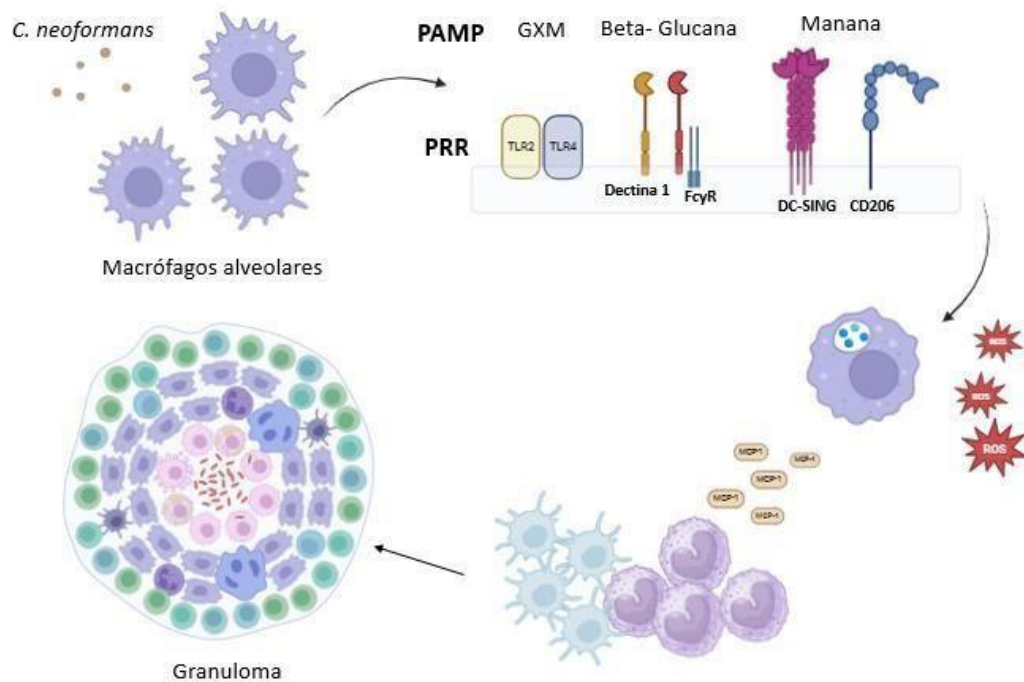
#### **1.5 PATOGÊNESE E IMUNIDADE**

O grande impacto da criptococose se dá principalmente nas pessoas com imunossupressão, particularmente do tipo celular, devido ao mecanismo imune para o controle e eliminação desse fungo, que envolve os fagócitos, como macrófagos, e células T auxiliaadoras (MILLER E MITCHELL, 1991).

As células fúngicas ou esporos entram nas vias aéreas durante a infecção, essa entrada pode ou não ser bloqueada por mecanismos/barreiras físicas da imunidade inata. Os que entram em geral de alguma maneira são contidos por uma resposta imune eficiente, não produzindo doença. Porém, esses fungos podem não ser totalmente destruídos, e permanecerem latentes provavelmente no interior de granulomas. Quando existe uma diminuição significativa na

resposta imune celular, como no caso da AIDS, o fungo volta a se multiplicar e se dissemina pelo organismo, apresentando tropismo pelo sistema nervoso central (SETIANINGRUM et al., 2019).

A resposta imune do hospedeiro envolve tanto a parte inata quanto a adaptativa. Quando o fungo alcança o trato respiratório inferior, encontra macrófagos alveolares, que já residem no tecido. Devido à sua cápsula, o *C. neoformans* dificulta essas células de fazerem seu reconhecimento e, apesar desse mecanismo não ser completamente entendido, sabe-se que as células imunes podem utilizar de proteínas do complemento, anticorpos ou dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para fazer reconhecimento e/ou internalização do fungo. Dentre esses PRRs se encontram os receptores de lectina do tipo C (CLRs), que reconhecem carboidratos da parede fúngica, como glucanas e mananas, receptores do tipo *Toll* (TLR), entre outros (figura 2) (HEUNG, 2017).



**Figura 3: Esquema da interação de *C. neoformans* com células do sistema imunitário após a infecção.** Fonte: Imagem elaborada pela autora.

Após a fagocitose, ocorre a ativação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio dentro do fagolisossomo, para que ocorra a eliminação do fungo (CAMPUZANO E WORMLEY, 2018). Além disso, estes macrófagos podem produzir MCP-1, que é uma importante quimiocina que faz o recrutamento de outras células do sistema imune, como monócitos e células dendríticas (DESHMANE et al., 2009).

As células dendríticas realizam a fagocitose e podem fazer o processamento de antígenos do fungo, para apresentá-los para as células T auxiliares, nos órgãos linfoides. As células T auxiliares passam por processo de diferenciação, podendo se tornar do perfil Th1, caracterizadas pela indução de citocinas pró-inflamatórias como Interferon-gama, IL-6, TNF-alfa; perfil Th17, produzindo principalmente IL-17; e perfil Th2, com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13; sendo esse último prejudicial na resposta a *C. neoformans*, pois está associado à disseminação do fungo. Essas células diferenciadas migram então para o local da infecção, ali vão liberar suas citocinas e traçar um perfil na resposta (ELSEGEINY et al., 2018; CAMPUZANO E WORMLEY, 2018).

A eliminação pulmonar de *C. neoformans*, normalmente está associada ao desenvolvimento de uma resposta imune com perfil mais pró-inflamatório. Essa resposta é desencadeada por macrófagos alveolares que, pela produção da MCP-1 e outros fatores, induzem o recrutamento de monócitos e células dendríticas para o local da infecção. Esse acúmulo celular pode gerar a formação de granulomas (ELSEGEINY et al., 2018).

Os granulomas sinalizam controle da doença e são formados por aglomerados de células como macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas. Os sintomas pulmonares geralmente ocorrem devido a esse mecanismo, que são parecidos com os de pneumonia, onde em radiografias é possível observar nódulos não calcificados e infiltrados (MAZIARS E PERFECT, 2016). Porém, em geral, esses granulomas se resolvem sozinhos sem necessidade de tratamento.

Existem várias evidências que o *C. neoformans* pode continuar viável dentro desses granulomas, em latência, e tendo sua replicação contida. Somente quando ocorre rompimento desse equilíbrio, principalmente por uma deficiência na resposta imune celular, é que as células fúngicas são reativadas, podendo se multiplicar e disseminar pelo corpo (GIBSON E JOHNSTON, 2015). O fungo pode atingir, de maneira menos frequente em outros órgãos como

pele, olhos e ossos. Mas, em pessoas severamente imunossuprimidas ele pode aparecer em qualquer órgão, sendo a manifestação mais grave a meningoencefalite (O'HALLORAN et al., 2017).

## 1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

Fator de virulência é definido como componentes do microrganismo que tem a capacidade de causar dano a um hospedeiro suscetível (CASADEVALL & PIROFSKI, 2009). *C. neoformans* tem vários fatores de virulência clássicos e bem definidos, entre esses se destacam: a produção de melanina, sua cápsula polissacarídica e a capacidade de crescimento na temperatura corporal humana (37°C) (IDNURM, 2005). Entretanto, a virulência de *C. neoformans* não se resume à esses fatores de maneira isolada. Casadevall & Pirofski (2009) descrevem que virulência existe apenas como um resultado da interação do patógeno com o hospedeiro. Conseqüentemente, a virulência de *C. neoformans* é uma ação conjunta desses elementos clássicos, e de outros elementos não descritos, que irão atuar como um todo na capacidade que esse fungo possui de causar uma doença quando este microrganismo estiver interagindo com um possível hospedeiro (CASADEVALL & PIROFSKI, 2009).

No meio ambiente, a cápsula pode proteger a levedura da dessecação e reduzir a sua ingestão por amebas e outros predadores presentes no solo (MCFADDEN et al., 2006). Já no hospedeiro humano, a presença de cápsula atua inibindo a fagocitose por células do sistema imunológico, ativa a cascata do complemento, inibe a migração de leucócitos, interfere na apresentação de antígenos e desregula a secreção de citocinas (PERFECT, 2005).

*C. neoformans* e *C. gattii* produzem a enzima fenoloxidase, que é identificada como uma lacase, que pode sintetizar melanina a partir de precursores como L- e D-DOPA, dopamina, epinefrina e norepinefrina (EISENMAN et al., 2007). A melanina, localizada na parede celular do fungo, pode funcionar como proteção contra radiações UV no ambiente e como fator de virulência no organismo hospedeiro, uma vez que protege a levedura contra os efeitos oxidantes provenientes das células de defesa. Além disso, a produção de melanina serve como uma característica de identificação de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* ao tornar as colônias pigmentadas em meios contendo compostos difenólicos. A produção de melanina também pode

interferir na suscetibilidade a antifúngicos e proteção contra temperaturas extremas (BUCHANAN & MURPHY, 1998; STEENBERGEN & CASADEVAL, 2003). Para obtenção do êxito da patogênese, é essencial que o patógeno consiga sobreviver e se estabelecer o hospedeiro. Fungos patogênicos que infectam humanos possuem uma característica em comum, que é a capacidade de sobreviver e crescer em ambientes com temperatura a 37°C (SRIKANTA et al., 2014). Adicionalmente, algumas cepas de *C. neoformans* podem sobreviver em condições ambientais de hipóxia, condições estas, semelhantes as do cérebro humano e decisiva para o estabelecimento da infecção (LIN & HEITMAN, 2006; LIN, 2009).

Existem diversos estudos a respeito da cápsula do *Cryptococcus spp.* que é essencial para a sobrevivência de *Cryptococcus* no hospedeiro e também está presente em isolados ambientais, envolvendo a parede celular da levedura e agindo contra a desidratação (BOSE et al., 2003). Considerada como a característica clínica mais relevante presente em fungos do gênero *Cryptococcus*, a presença de uma cápsula polissacarídica é considerado como o principal fator de virulência desse gênero de fungos (MCCLELLAND et al., 2006). O encapsulamento confere resistência às leveduras contra células fagocíticas devido a cápsula mascarar os principais epítomos reconhecidos por essas células, que se encontram na parede celular (KOZEL & MASTROIANNI, 1976; KOZEL & GOTSCHLICH, 1982). Além disso, a capacidade de modular a espessura da cápsula confere maior resistência a radicais oxidativos e eventos de desidratação para as leveduras (O'HALLORAN et al., 2008), sendo, nesses casos, as cepas consideradas como hiper virulentas (WILDER et al., 2002).

Como dito anteriormente, a cápsula polissacarídica confere resistência a múltiplos estresses, como desidratação, fagocitose por macrófagos e espécies reativas de oxigênio produzidas pelo fagolisossomo (ESHER et al., 2018). Sua estrutura, tamanho e composição varia de acordo com o ambiente em que o fungo está inserido. Por exemplo, o desenvolvimento da levedura em meio rico (condições laboratoriais) não induz a produção de cápsula, enquanto a interação com hospedeiros, como camundongos, cultura de células fagocíticas, o modelo invertebrado *Galleria mellonella* e amebas induz a produção da mesma (ESHER et al., 2018). Estímulos específicos que induzem a produção de cápsula em *C. neoformans* incluem a limitação de nutrientes, principalmente ferro, presença de soro mamífero e altas concentrações de CO<sub>2</sub> (ZARAGOZA et al., 2009).

Durante a infecção, cápsulas maiores evitam a fagocitose mediada pelo sistema complemento e contribuem para a sobrevivência intracelular através da resistência a espécies reativas de oxigênio, peptídeos antimicrobianos e antifúngicos (ESHER et al., 2018)

## 1.7 CÉLULAS TITÃS

A Tem-se discutido que as células titãs desempenham um importante papel na fase inicial da infecção por *Cryptococcus spp.*, pois essas células possuem diversas características que favorecem a sobrevivência fúngica no organismo hospedeiro, como aumento da resistência ao estresse oxidativo, redução da fagocitose e produção de células-filhas de tamanho normal (OKAGAKI et al., 2010; ZARAGOZA; GARCÍA-RODAS; NOSANCHUK, et al., 2010b). Essas funções seriam importantes para a aclimatação inicial do patógeno ao hospedeiro, no entanto, tais características também são vantajosas nos casos de infecção crônicas, onde o fungo permanece latente no organismo até um momento mais propício para a sua disseminação (DROMER et al., 1994).

O tamanho das células titãs é um dos fatores que fornecem proteção própria contra a fagocitose, no entanto, também foi observado que a presença destas células promove a proteção das células de tamanho normal por outro mecanismo modulatório ainda não esclarecido (OKAGAKI; NIELSEN, 2012). E, embora a presença de células fúngicas intracelulares seja mais benéfica para a disseminação do fungo para o sistema nervoso central (NIELSEN, 2009; DUTRA et al., 2017), foi observado que inóculos realizados com células titãs tiveram a presença do fungo detectada no cérebro mais rapidamente do que aqueles feitos sem as células gigantes (CRABTREE; OKAGAKI; WIESNER; et al., 2012).

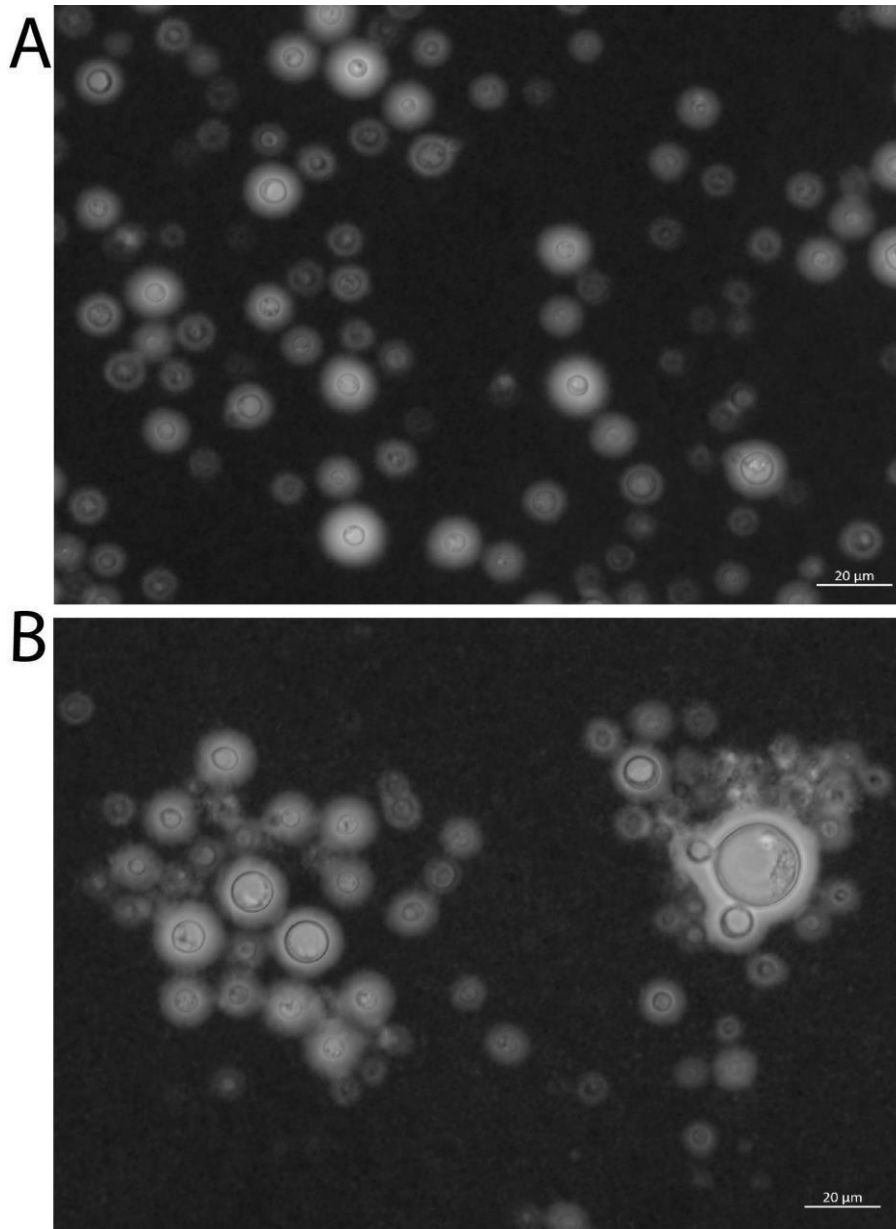
As células titãs são poliploides, o que sugere que provavelmente são decorrentes da replicação do material genético sem que ocorra o processo de divisão celular. Também já se observou que a cultura *in vivo* gera maior quantidade de células titãs e maior diâmetro celular que as culturas *in vitro* e, as culturas *in vitro* em meio mínimo produzem células titãs, enquanto não foram encontradas tais células em meio *Sabouraud* (ZARAGOZA; GARCÍA-RODAS; NOSANCHUK, et al., 2010b).

As células titãs são um potencial alvo de estudos da interação parasito-hospedeiro e já são citadas como um importante fator de virulência na criptococose (CRABTREE; OKAGAKI; WIESNER, et al., 2012). A mudança de padrão morfo genético de *C. neoformans* já vem sendo pesquisada e descrita (OKAGAKI et al., 2010, ZARAGOZA; GARCÍA- RODAS; NOSANCHUK, et al., 2010b), porém, embora tenha se passado décadas desde suas primeiras descrições (CRUICKSHANK et al., 1973), ainda existem muitas lacunas para a elucidação do seu mecanismo de formação e desencadeamento da indução do aumento das células.

Inicialmente um grande problema no estudo das células titãs era o fato que só conseguíamos observar essas células após a infecções de modelos animais e coleta e purificação de órgãos contendo as células fúngicas. Nos últimos anos, foram descritos alguns protocolos para a obtenção *in vitro* dessas células. No entanto, a produção dessas células após a infecção de modelos animais ainda parece ser mais eficaz do que as culturas *in vitro* (ZARAGOZA; GARCÍA-RODAS; NOSANCHUK, et al., 2010b) ou usando-se modelos não-vertebrados (GARCÍA-RODAS; CASADEVALL; RODRÍGUEZ-TUDELA, 2011).

As células desse fungo com corpo celular maior do que 10 micrômetros são chamadas de células titãs e podem alcançar tamanho aproximado de 50-100 micrômetros *in vivo*. Nessas células ocorrem mudanças nas cápsulas, que se apresentam mais densas e menos permeáveis, além de possuírem maior espessamento da parede celular (ZARAGOZA; RODRIGUES; JESUS et al., 2010b; ZARAGOZA; NIELSEN, 2013).





**Figura 4:** Imagem microscópica de células de *Cryptococcus spp.* crescidas em meio mínimo (A) ou em meio mínimo contendo fosfatidilcolina (B). A cápsula polissacarídica é evidenciada pela coloração negativa com tinta nanquim, as fotografias foram feitas em um microscópio Zeiss axion observer usando-se a objetiva de 40x. Fonte: Patrícia Albuquerque.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O *C. neoformans* é um patógeno oportunista, que demonstra grande importância clínica por se tratar de um causador de meningite criptococócica em indivíduos que possuem fatores de risco. O fato de poder causar uma doença que apresenta sintomas graves, driblando as barreiras do sistema imune e conseguindo chegar até o Sistema Nervoso Central, é extremamente importante desvendar os diversos mecanismos de virulência do fungo (BUCHANAN E MURPHY, 1998; NELSON, HAWKINS, E WOZNIAK, 2020).

Em estudo prévio do nosso grupo, demonstramos que fosfolípidos provenientes da membrana celular de macrófagos ou amebas podem desencadear um aumento significativo não só do tamanho da cápsula, mas também do tamanho do corpo celular em si, que normalmente é de 5 a 7 micrômetros (CHRISMAN et al., 2011). Com esse trabalho pretendemos analisar de maneira mais detalhada as condições experimentais que melhor induzem o aumento do tamanho da cápsula desse fungo, bem como a formação de células titãs em resposta a fosfolípidos. Acreditamos que isso nos ajudará a visualizar o papel dos fosfolípidos na indução de duas mudanças morfológicas importantes durante a interação desse fungo com diferentes hospedeiros. Além de auxiliar na compreensão do papel das células titãs e assim elucidar os mecanismos que ocorrem na infecção para assim ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos.

## **3. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar como determinadas condições físicas e químicas afetam a capacidade de fosfolípidos induzirem o aumento da cápsula e a formação de células titãs em *C. neoformans*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar o aumento da cápsula de *Cryptococcus spp.* considerando a influência da temperatura, fonte do fosfolípidos, presença de CO<sub>2</sub> e agitação durante a incubação das células fúngicas com dois fosfolípidos diferentes.

2. Avaliar quais das condições acima poderiam afetar a capacidade de fosfolipídeos desencadear a formação de células titãs de *Cryptococcus spp.*

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparo da emulsão de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina

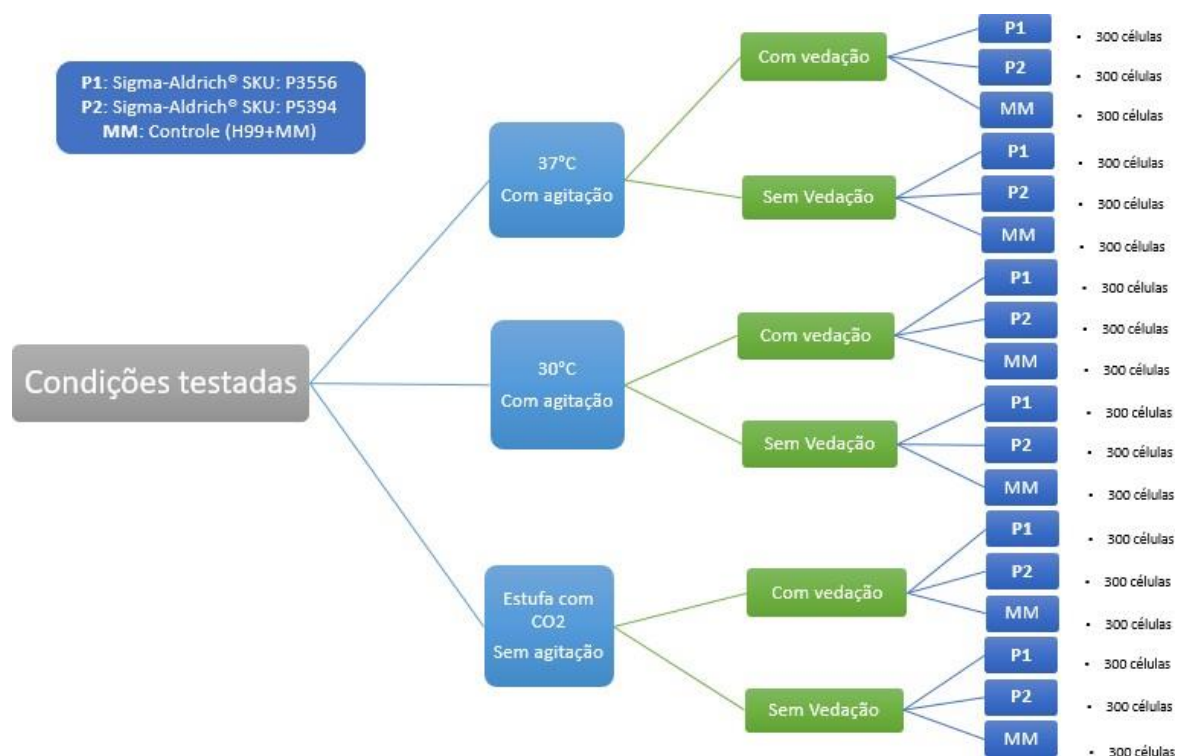
Foram usadas duas fontes diferentes de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina: P1 (Sigma Aldrich P3556- Tipo XVI-E, maior ou igual 99%, TLC) e P2 (Sigma Aldrich P5394- Tipo X-E, maior ou igual 40%, de origem enzimática). Foram preparadas emulsões a 1M em meio mínimo (MM) do fosfolipídeo L- $\alpha$ -fosfatidilcolina derivado de gema de ovo desidratada diretamente em meio mínimo logo antes dos experimentos.

#### 3.2 Ensaio de indução de cápsula e de células titãs

Foi realizado semeio da linhagem do isolado clínico de H99 de *C. neoformans* em placas de ágar *Sabouraud* incubadas a 30°C por 48 horas. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 ml de MM em tubos cônicos de 50 ml e incubadas por 24h a 30°C ou 37°C com 150 rpm de agitação. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas para sedimentação das células a 1200g/5 min, seguindo-se a três lavagens com PBS 1X. A seguir as células foram contadas em um hemocítmetro e diluídas para uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/mL em meio mínimo.

A seguir, 100 microlitros das suspensões de células ( $5 \times 10^4$  células/mL) foram então semeadas em placa de 96 poços, e cada poço recebeu em adição 100 microlitros de meio mínimo (controle sem fosfolipídeo) ou 100 microlitros da emulsão P1 ou P2 de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (concentração final de 1 mM). A seguir as placas foram incubadas por 72h em diferentes condições:

- Adição de P1 ou P2
- Crescimento com agitação a 30°C ou a 37°C
- Crescimento a 37°C com agitação ou sem agitação na estufa de CO<sub>2</sub> (37°C com 5% de CO<sub>2</sub>).
- Crescimento com as placas seladas com filme de alumínio (indução de hipóxia) ou sem filme de alumínio (normoxia)



**Figura 5: Esquema ilustrativo das condições testadas com células de *Cryptococcus* e fosfolipídeos.** O primeiro grupo foi incubado a 37°C com agitação, o segundo grupo a 30° C com agitação e o terceiro grupo foi incubado na estufa a 37° com a presença de CO2 e sem agitação. Em todas as condições, o MM é o controle, P1 representa as células do fungo com fosfolipídio P1 e P2 representa as células do fungo com fosfolipídio P2. Em cada experimento foram avaliadas 300 células. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

### 3.3 Coloração por tinta nanquim

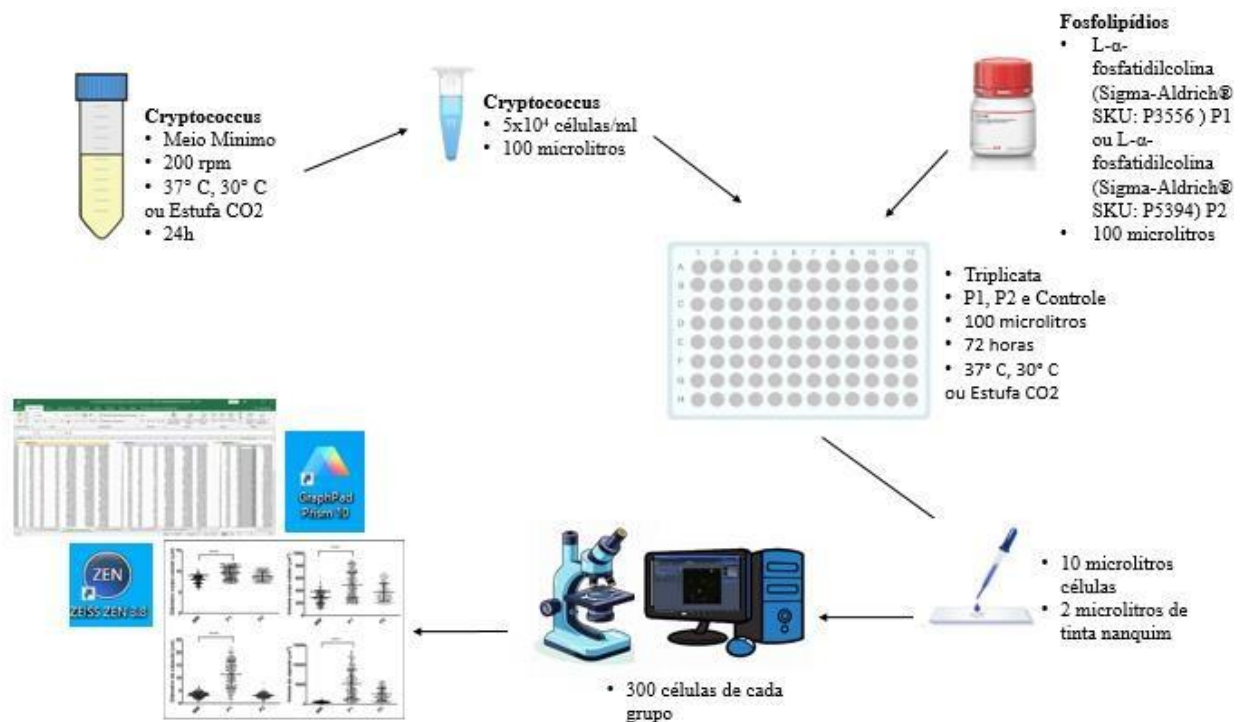
Após 72 horas, em uma lâmina devidamente identificada foram colocados 10µL da suspensão de células e 2µL de tinta nanquim. Após homogeneização das células ao pigmento, acima da suspensão de células se adicionou uma lamínula para que a amostra fosse observada e fotografada em microscópio (Zeiss Axio Observer Z1). Foram coletadas imagens com uma objetiva PlanNeoflour de 40x e abertura 0.75 utilizando o software ZEN 2.3 lite.

### **3.4 Análises das células**

Para a análise de células, foram avaliadas 300 células para cada condição experimental testada (Figura 6), seguindo os seguintes critérios: células de tamanho adulto e sem brotamentos, células em que foi possível determinar com exatidão os limites do corpo celular e da capsula, células em diferentes campos da lâmina escolhidos de maneira aleatória. Após a escolha da célula, foi medido o D1: diâmetro da célula completa (Corpo celular + cápsula) e o D2: diâmetro do corpo celular. Realizamos cálculo para obter o diâmetro da cápsula:  $D1 - D2$ . O tamanho do corpo celular foi dado calculando: \*Volume 1:  $\frac{4}{3} \times 3,14 \times (\text{Diâmetro total}/2)^3$ , onde o diâmetro total foi dado pela ferramenta “Draw Circle” circundando a extremidade da célula (incluindo a cápsula). \*Volume 2:  $\frac{4}{3} \times 3,14 \times (\text{Diâmetro do corpo celular}/2)^3$ , onde o diâmetro do corpo celular foi dado pela ferramenta “Draw Circle” circundando apenas a extremidade do corpo celular (excluindo a cápsula). \*O diâmetro capsular foi dado pela subtração “Diâmetro total - Diâmetro do corpo celular” e o \*Volume capsular foi dado pela subtração “Volume 1 - Volume 2”. Os valores foram organizados em planilhas do excel separados de acordo com as condições testadas.

### **3.5 Análises estatísticas**

As análises estatísticas realizadas nesse estudo foram feitas no software GraphPadPrism, versão 6.0 (GraphPad Software). Dados considerados significativos quando  $p < 0,05$ . A análise de regressão linear ( $r$ ) através do coeficiente de Pearson foi utilizada para avaliar a correlação dos resultados obtidos entre: diferentes temperaturas; tamanho da cápsula com adição de fosfolipídios; Presença de CO<sub>2</sub>; Presença do adesivo.



**Figura 6: Esquema ilustrativo do experimento realizado com células de *Cryptococcus* e fosfolipídios, utilizando placa de 96 poços para incubar as células do fungo com meio mínimo (controle), células do fungo com fosfolipídio P1 e células do fungo com fosfolipídio P2. Fonte: Imagem elaborada pela autora.**

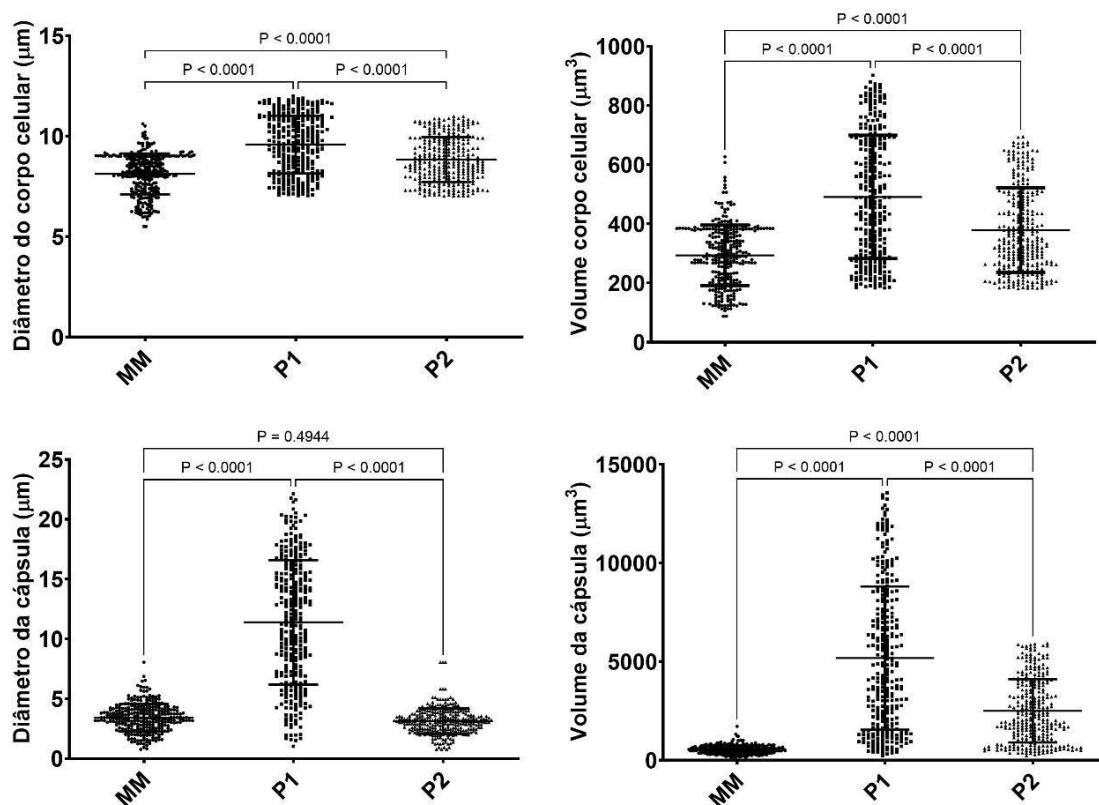
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito dos fosfolipídios na formação de células titãs

Os fosfolipídios, em particular a fosfatidilcolina, podem desencadear o aparecimento de células titãs *in vitro* (Chrisman et al., 2011). Por isso, incubamos as células com dois fosfolipídios diferentes, P1 (L-alfa-fosfatidilcolina: Tipo XVI-E, maior ou igual 99%, TLC, Sigma Aldrich P3556) e P2 (L-alfa-fosfatidilcolina: Tipo X-E, maior ou igual 40%, de origem enzimática, Sigma Aldrich P5394). Ao compararmos as células incubadas com os dois fosfolipídios observamos que na maioria das condições experimentais testadas ambas as amostras induziram um aumento da cápsula e do corpo celular quando comparadas ao controle de crescimento sem fosfolipídios (Figura 7, 8, 9, 10, 11 e 12). No entanto, em todas as

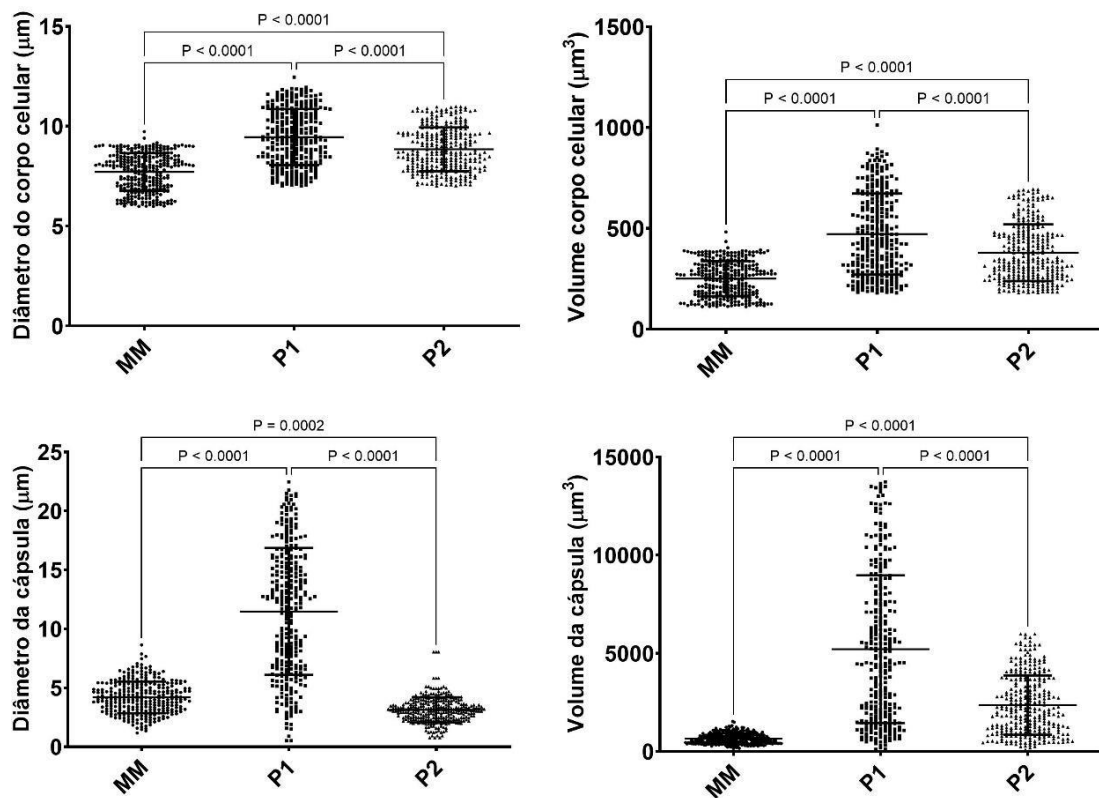
condições testadas pudemos observar que os fosfolipídeos de P1 foram capazes de induzir um aumento significativamente maior que as amostras de P2, e que em algumas condições o aumento não foi observado quando incubamos as amostras com P2. Quando as células foram crescidas na presença de P2 a 37°C com agitação e sem filme não observamos indução significativa no tamanho da cápsula, em comparação ao controle em meio mínimo apenas. Um resultado semelhante foi observado quando as células foram crescidas na presença de P2, tanto com filme quanto sem filme, na estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e sem agitação observamos que não só não houve aumento no tamanho da cápsula, mas as células apresentaram cápsulas ligeiramente menores que as do controle.

Não observamos diferenças na capacidade de P1 induzir o aumento da cápsula ou corpo celular quando as amostras foram incubadas sem filme alumínio a 37°C (Figura 7) ou a 30°C (Figura 9), na presença do filme sobre a placa simulando hipóxia/induzindo maiores concentrações de CO<sub>2</sub> a 37°C (Figura 8) ou 30°C (Figura 12), ou quando a placa foi incubada sem agitação a 37°C na presença de 5% CO<sub>2</sub> (Figura 11 e Figura 12). Esses dados sugerem as amostras do fosfolipídeo P1 seriam mais eficazes na indução da cápsula e na produção de células titãs. É importante salientar, no entanto, que os graus de pureza, bem como o tipo de purificação para obtenção dessas amostras é diferente, o que pode sugerir que contaminantes na amostra P2 poderiam interferir na indução dos efeitos, ou talvez mais provavelmente que a maior concentração L-alfa-fosfatidilcolina na amostra P1 possa ser um fator importante na otimização do protocolo. Uma vez que observamos efeitos muito mais significativos tanto na indução da cápsula quanto no aumento do tamanho do corpo celular quando as células foram crescidas na presença de P1, focaremos as demais análises nas amostras que foram incubadas com P1.

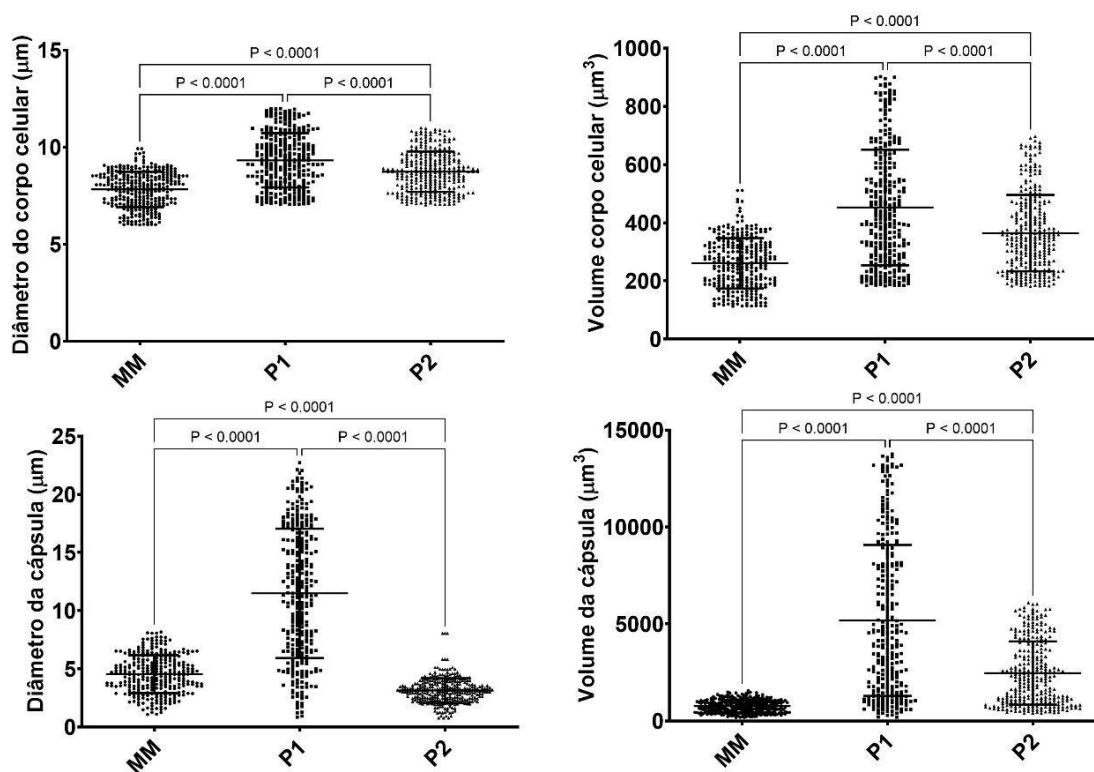


**Figura 7: Efeitos dos Fosfolípidos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* a 37°C sem filme.** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença dos fosfolípidos P1 ou P2 e incubadas a 37°C por 72 horas, com agitação e **sem filme**. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.

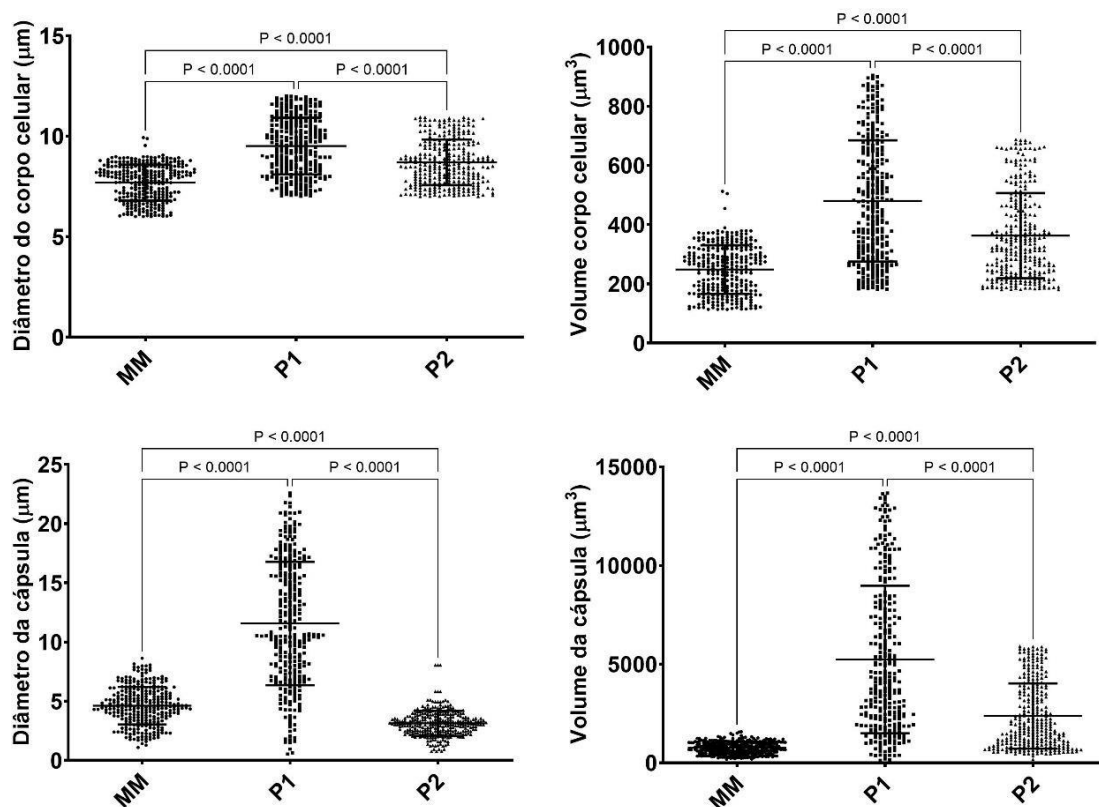




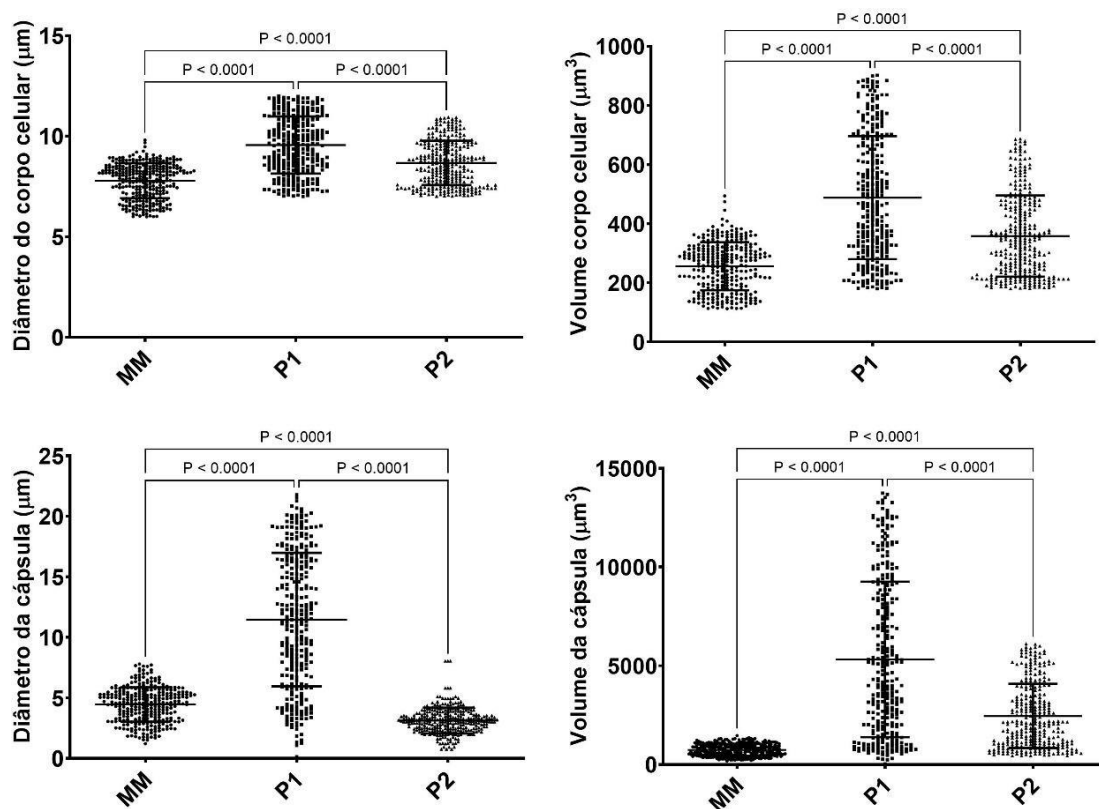
**Figura 8: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* a 37°C com filme.** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença dos fosfolipídeos P1 ou P2 e incubadas a 37°C por 72 horas, com agitação e **com filme**. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.



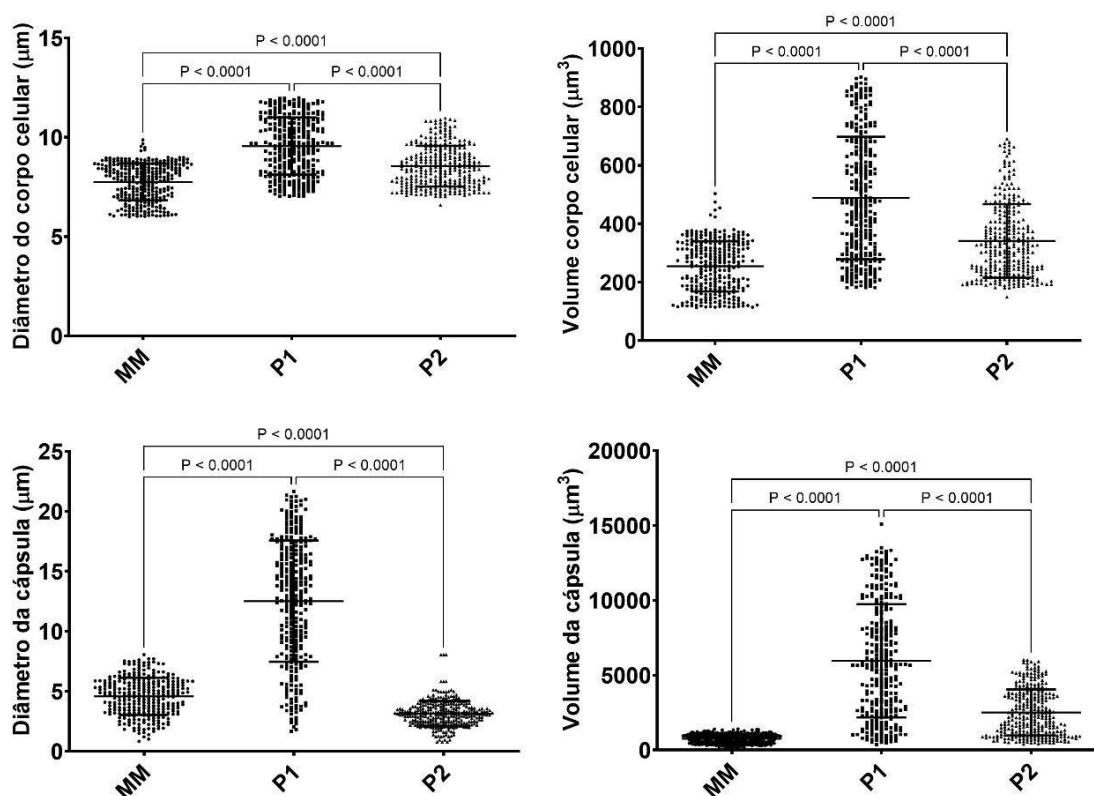
**Figura 9: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* a 30°C sem filme.** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença dos fosfolipídeos P1 ou P2 e incubadas a 30°C por 72 horas, com agitação e **sem filme**. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.



**Figura 10: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* a 30°C com filme.** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença dos fosfolipídeos P1 ou P2 e incubadas a 30°C por 72 horas, com agitação e **com filme**. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.



**Figura 11: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* a 37°C com CO<sub>2</sub>, sem filme.** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença dos fosfolipídeos P1 ou P2 e incubadas a 37°C com presença de CO<sub>2</sub> por 72 horas, sem agitação e **sem filme**. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.

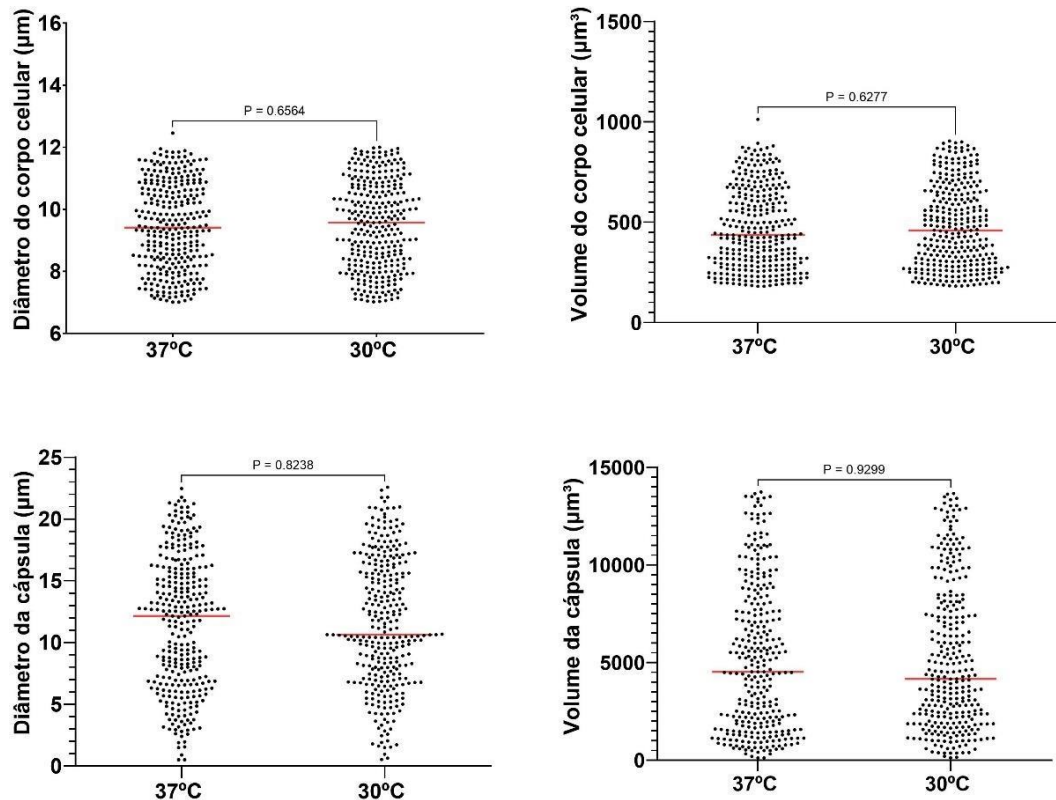


**Figura 12: Efeitos dos Fosfolipídeos P1 e P2 no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* a 37°C com CO<sub>2</sub>, com filme.** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença dos fosfolipídeos P1 ou P2 e incubadas a 37°C com presença de CO<sub>2</sub> por 72 horas, sem agitação e **com filme**. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.

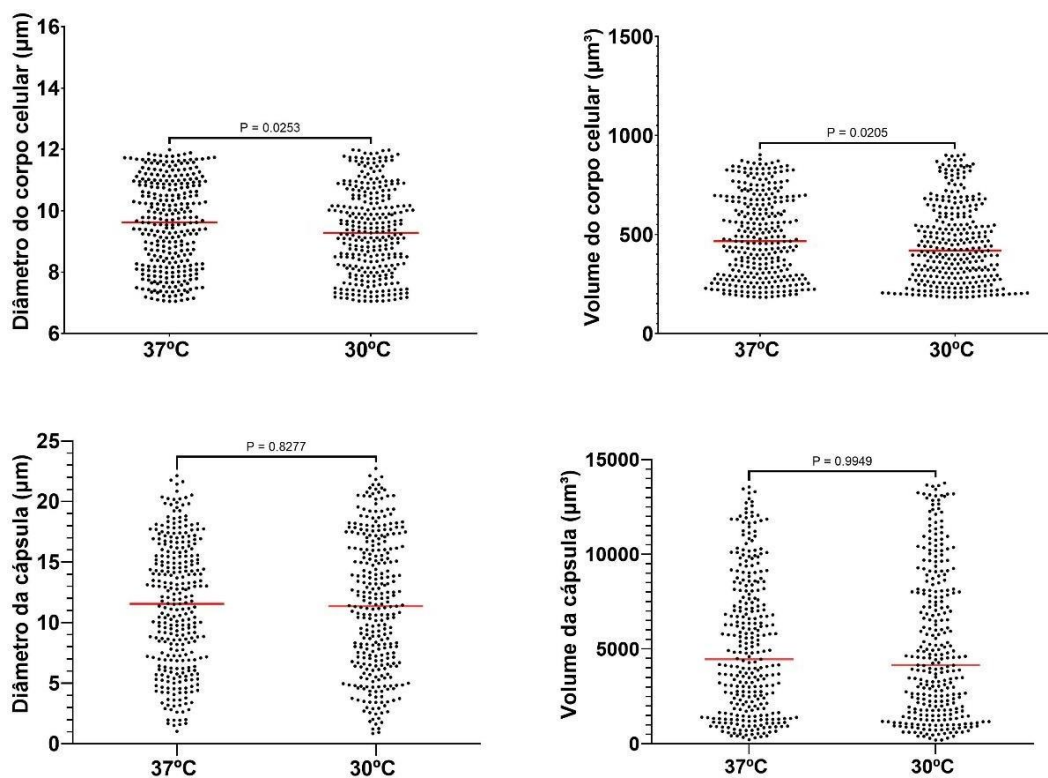
#### 4.2 Efeitos da temperatura na indução da cápsula e na formação de células titãs.

Estudos anteriores trouxeram que o *Cryptococcus* responde à temperatura fisiológica humana (37°C) ocasionando diversas alterações morfológicas, como o aumento do corpo celular e alteração da forma celular (Fries et al 1999; Dambuzza et al 2018). Avaliamos então se haveria alguma diferença na indução da cápsula ou formação de células titãs quando as culturas eram crescidas a 37°C ou 30°C com ou sem filme (Figura 11 e Figura 12). Na presença do filme

não observamos nenhuma diferença relevante entre os dois grupos (Figura 11), na figura 12 notamos apenas um pequeno aumento no tamanho do corpo celular nas culturas crescidas a a 37°C quando na ausência do filme. No entanto apesar de estatisticamente significativo esse aumento não parece ser biologicamente significante.



**Figura 13: Efeito da temperatura de incubação no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* em culturas crescidas com filme.** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença do fosfolípido P1 e incubadas a 37°C ou 30°C por 72 horas, com agitação e **com filme**. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.



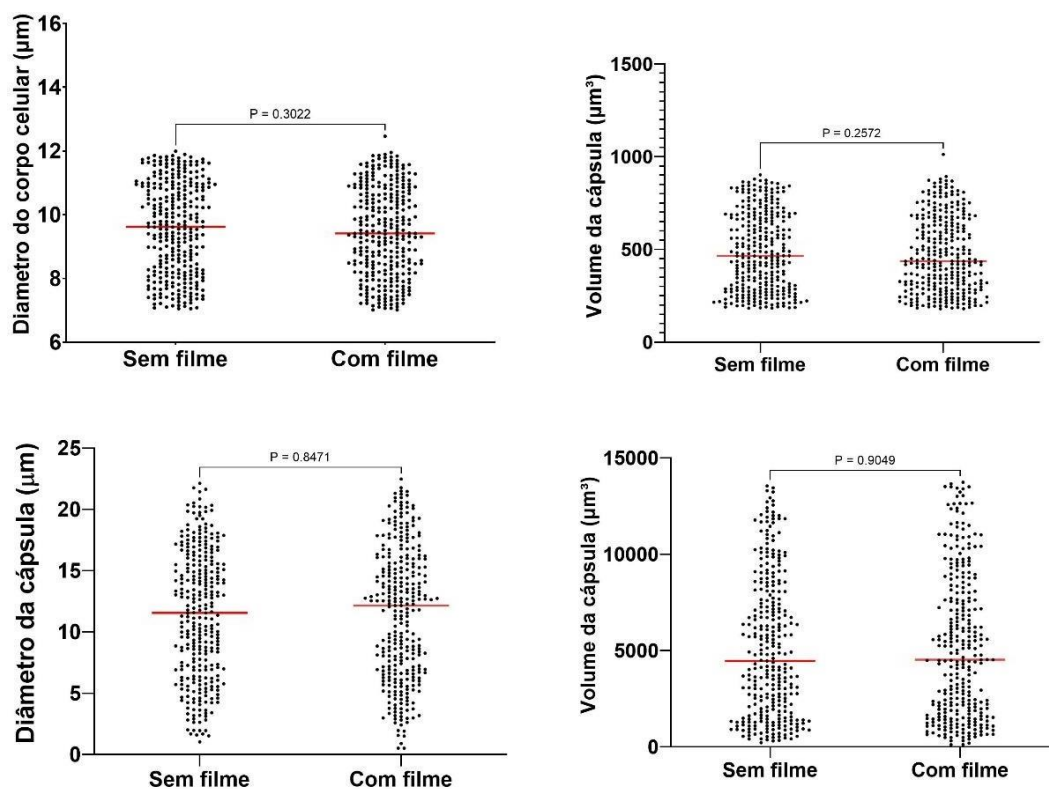
**Figura 14: Efeito da temperatura de incubação no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* em culturas crescidas sem filme.** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença do fosfolípido P1 e incubadas a 37°C ou 30°C por 72 horas, com agitação e **sem filme**. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.

#### 4.3 Efeitos do selo simulando condições de hipóxia/maior concentração de CO<sub>2</sub> na indução da cápsula e na formação de células titãs.

Este patógeno se adapta a nichos radicalmente diferentes durante a infecção. O CO<sub>2</sub> é um fator crítico que define a diferença entre um ambiente natural e o hospedeiro mamífero. A difusão de CO<sub>2</sub> para dentro ou para fora das células é facilitada por sua conversão em íons bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), que são utilizados na biossíntese de lipídios e outros processos celulares (HENRY R. P, 1996; TRIPP et al., 2001). Alguns trabalhos já demonstraram que a concentração de CO<sub>2</sub> é um fator importante para a formação de células semelhantes a titãs *in*

*vitro*. Por sua vez, o aumento da cápsula é também induzido em resposta às concentrações de 5% de CO<sub>2</sub>, o que é consistente com esse fator também favorecendo o crescimento do corpo celular.

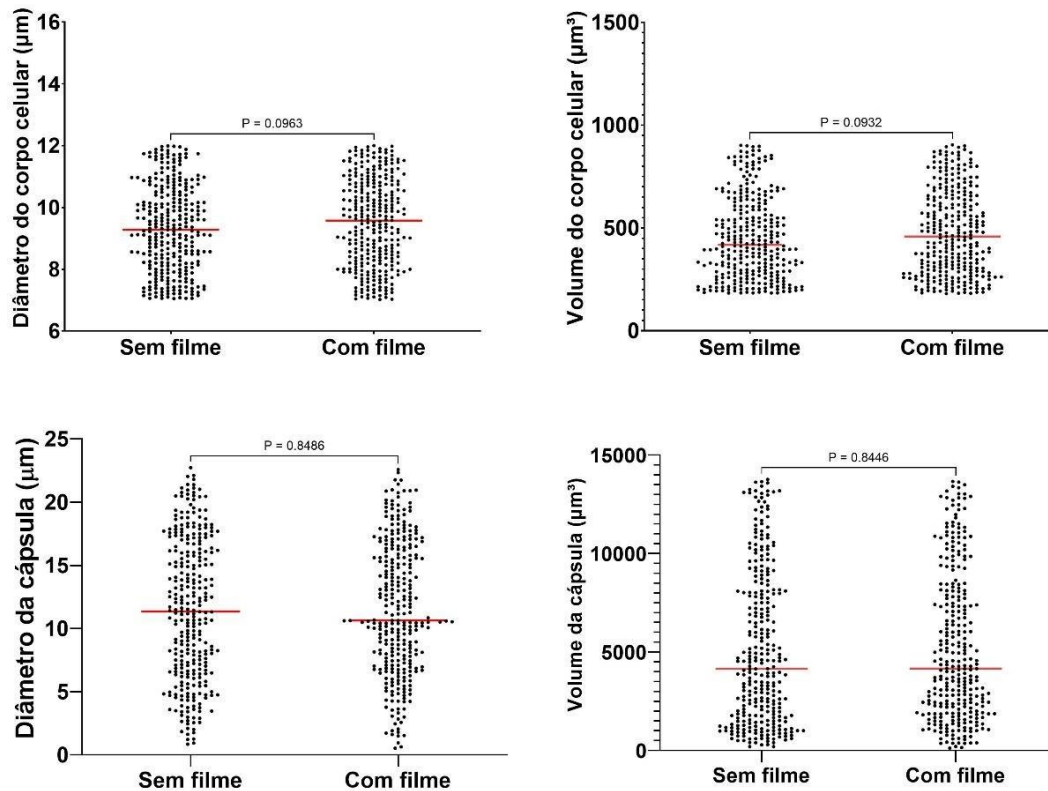
Estudos realizados anteriormente demonstraram que a incubação desse fungo em meios com baixo teor de nutrientes suplementados com soro em uma atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> induz o aumento do tamanho das células criptocócicas. Além disso, outros fatores, como limitação de oxigênio ou baixa densidade celular, aumentam o crescimento celular (MOGENSEN et al., 2006; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2018). Então, usamos selos de alumínio para fechar as placas e simular condições de hipóxia/maior concentração de CO<sub>2</sub> nas culturas. Não observamos diferenças significativas na capacidade de induzir cápsula ou formação de células titãs na presença ou ausência dos filmes quando as células foram crescidas com agitação a 37°C ou 30°C (Figura 13 e Figura 14).



**Figura 15:** Efeito da presença ou ausência do filme no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* em culturas crescidas a 37°C. Células de *C. neoformans* foram incubadas



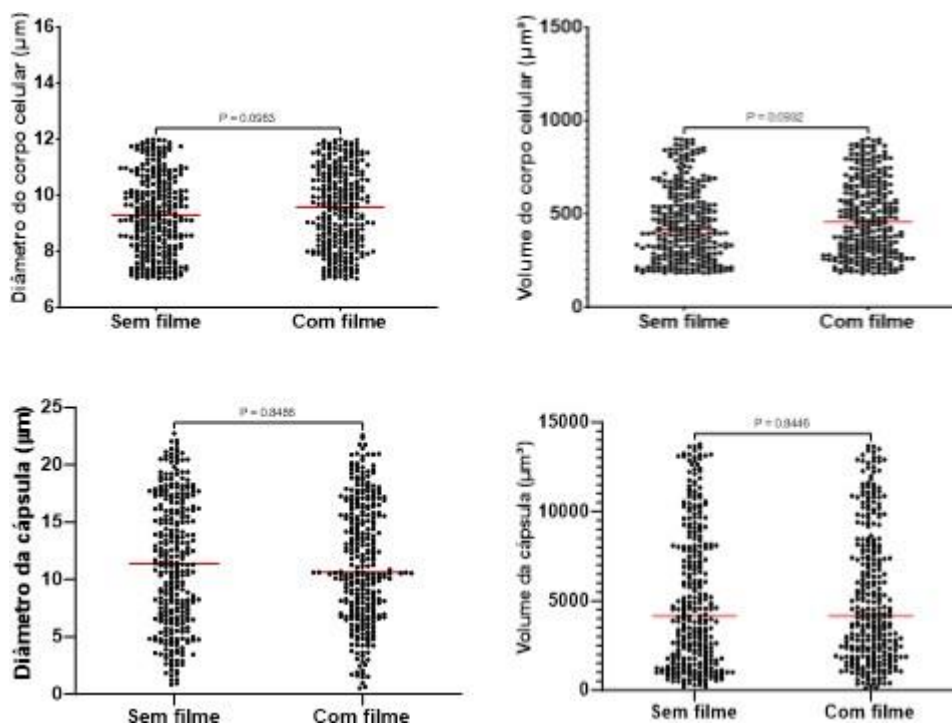
em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença do fosfolípido P1 e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 72 horas, com agitação, com ou sem filme. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.



**Figura 16: Efeito da presença ou ausência do filme no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* em culturas crescidas a  $30^\circ\text{C}$ .** Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml na presença do fosfolípido P1 e incubadas a  $30^\circ\text{C}$  por 72 horas, com agitação, com ou sem filme. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.

#### 4.4 Efeito do crescimento sem agitação em estufa de cultura de células (5% CO<sub>2</sub>)

Trevijano-Contador e colaboradores compartilha, dentre outros aspectos com o método introduzido por Dambuza e colaboradores, a incubação na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Então testamos incubar as células a 37° C sem agitação na presença de 5% de CO<sub>2</sub>, com os fosfolípidios P1 e P2, para comparação utilizamos o selo de vedação para induzir maior condição de hipóxia. Observamos que em comparação com o controle os grupos com fosfolípidios P1 e P2 demonstraram induzir o aumento da cápsula e corpo celular, sendo que o P1 demonstrou ser mais eficaz nas duas condições testadas (com filme e sem filme) como podemos observar nas figuras 11, 12 e 17. Ao comparar os resultados sem filme e com filme, observamos um ligeiro aumento nas condições com filme, mas que não parecem ser biologicamente relevantes.



**Figura 17:** Efeito do crescimento sem agitação, a 5% CO<sub>2</sub> no tamanho do corpo celular e no tamanho da cápsula de *C. neoformans* em culturas crescidas a 37°C. Células de *C. neoformans* foram incubadas em meio mínimo em uma densidade de 5x10<sup>4</sup> células/ml na presença do fosfolípido P1 e incubadas a 37°C por 72 horas, sem agitação, com ou sem filme. Os painéis superiores representam as medidas do diâmetro e volume do corpo celular, enquanto os painéis inferiores representam as

medidas do diâmetro e volume da cápsula. O experimento foi realizado em triplicata biológica e para cada replicata foram medidas 100 células. São apresentados os dados das médias com desvio padrão.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar do nosso crescente conhecimento em relação a biologia de *Cryptococcus spp*, e desse fungo já ter vários fatores de virulência bem caracterizados, ainda há muito o que se estudar, principalmente sobre o fator de virulência mais amplamente estudado, que é sua cápsula polissacarídica. Além da sua função antifagocítica, essa estrutura apresenta uma série de outros efeitos prejudiciais às funções do sistema imunológico do hospedeiro, sendo também um poderoso reservatório de radicais livres que protege a célula fúngica de oxidantes (WHO, 2018).

O nosso grupo tem se dedicado a estudar diversos fatores de virulência de isolados clínicos da criptococose para que possamos auxiliar a descrever melhor os mecanismos da doença. Em 2011, Chrisman e colaboradores realizaram um trabalho onde foi realizada incubação de *C. neoformans* com *Acanthamoeba castellanii* e obtiveram como resultado o aumento capsular de *C. neoformans*. A análise de extratos de amebas mostrou que os prováveis estímulos para o aumento da cápsula foram lipídios polares tanto de protozoários quanto de macrófagos. Também demonstraram que fosfatidilcolina e moléculas derivadas desse fosfolípido (glicerofosforilcolina e glicerofosforiletanolamina) desencadearam o aumento capsular com a subsequente formação de células gigantes. Lipídios polares derivados de protozoários ou mamíferos podem representar um sinal de perigo para *C. neoformans* que desencadeia o aumento capsular como um mecanismo de defesa não específico contra células que apresentem perigo em potencial. Esses resultados demonstraram que fosfolípidos são um gatilho para o aumento da cápsula de *C. neoformans in vivo* e também envolvidos na formação de células titãs *in vitro*. Esse trabalho foi o primeiro a demonstrar a produção *in vitro* de células titãs em *C. neoformans*. Uma das limitações para estudar células titãs é a dificuldade de reproduzir esse fenômeno *in vitro*. Atualmente existem publicações de outros grupos de pesquisa com protocolos para a produção de células titãs *in vitro* por meio de outras metodologias (SAIDYKHAN et al., 2022).

Estudos anteriores demonstraram a possibilidade de induzir a formação de células titã através do estímulo ou depende de diferentes sinais externos, como CO<sub>2</sub>, hipóxia, incubação

na presença de soro bovino fetal (SFB) e densidade celular suficientemente baixa (TREVIANO-CONTADOR et al., 2018; HOMMEL et al., 2018; DAMBUZA et al., 2018). O protocolo para obtenção de células titãs desenvolvido por Trevijano-Contador e colaboradores compartilha vários aspectos com o método introduzido por Dambuza e colaboradores. Ambos os protocolos requerem o uso de FBS e a incubação é realizada a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Em contraste com os dois protocolos, o método descrito por Hommel e colaboradores não envolve FBS, ou 5% de CO<sub>2</sub>, e as células são incubadas a 30°C. Em 2022, Dylag e colaboradores trouxeram outro protocolo demonstrando que quando as células foram expostas ao PBS com pH ajustado para 7,3 e suplementado com 0,05% de glicose, 0,025% de sulfato de amônio, 0,004% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0035 % de MgSO<sub>4</sub>, na presença de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C desencadearam a formação de células semelhantes a titã.

No entanto, a metodologia de produção de células titãs a partir da incubação com fosfolipídeos nunca foi explorada com mais detalhes, principalmente por apresentar resultados nem sempre reprodutíveis, talvez por conta da facilidade com que essas moléculas são oxidadas e possivelmente possam perder sua atividade. Por isso, após descrito que as células de *C. neoformans* se desenvolvem na presença de fosfolipídios, nesse projeto nossa proposta foi estabelecer condições experimentais otimizadas e consistentes para estimular o aumento do corpo celular ou do tamanho da cápsula de *C. neoformans* em resposta a incubação com fosfatidilcolina. Nossos resultados demonstraram que a formação de células tipo titã é induzida pela presença de lipídios polares contribuindo para o aumento celular de *C. neoformans*.

Na patogênese de *C. neoformans*, o aumento da cápsula em hospedeiros mamíferos é bastante estudado e esse fenômeno é relacionado à alta concentração de CO<sub>2</sub> e também à privação de ferro, mas a magnitude do aumento capsular observada in vivo apresentava grandes dificuldade para replicata in vitro. Este trabalho relata que *C. neoformans* responde a adição de fosfatidilcolina purificada ao seu meio de cultura com aumento maciço da cápsula, e também com aumento no tamanho do corpo celular, embora nesse caso em menor escala do que previamente relatado no trabalho de Chrisman et al. 2011.

No nosso trabalho, a maioria das condições experimentais resultaram em células que apresentaram corpo celular em torno de 10 micrometros, que é o mínimo para ser considerada célula titã (ZARAGOZA et al, 2010b; LI et al, 2017; OKAGAKI et al, 2010). No entanto, no trabalho anterior, tínhamos muitas células com 20, 30 e até 50 micrometros de corpo celular.

Isso sugere que ainda falta descobrir algum fator adicional que está relacionado a indução de células titãs em resposta a fosfatidilcolina.

Em protocolos anteriores, as células foram submetidas a um procedimento de separação onde as células titãs são separadas das células de tamanho menor. Como no de Dylag e colaboradores, que após 7 dias as células foram passadas por uma peneira celular (Cell Strainer) e células de titãs de tamanho  $>20\mu\text{m}$  foram recultivadas. Diante disso, considera-se uma possibilidade interessante para ser adicionado ao nosso protocolo a utilização de filtros/peneiras celulares.

Embora nesse trabalho não tenhamos testado de maneira sistemática o papel da densidade inicial das células, estudos anteriores demonstraram que formação de células de titã é inversamente correlacionada à densidade celular, onde células titãs foram produzidas preferencialmente em baixa densidade celular de  $10^3$  células/mL (SAIDYKHAN et al, 2022; ZARAGOZA et al, 2010a; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2022). Também seria importante observar o crescimento das células com fosfolipídios a  $37^\circ$  e a  $30^\circ$ , sem a presença do  $\text{CO}_2$  e sem agitação.

Nosso trabalho demonstrou que nessas condições, podemos obter células de tamanho em torno de até  $25\ \mu\text{m}$  (cápsula incluída). Esse diâmetro é menor do que o tamanho médio medido em células titãs isoladas de pulmões de camundongos (FELDMESSER et al. 2001; TREVIJANO-CONTADOR et al., 2022), onde o tamanho médio é em torno de  $40\text{--}50\ \mu\text{m}$ , o que pode ser observado devido a estar nas etapas iniciais dessa transição morfológica. Pode ser que *in vitro* as células não atinjam o mesmo tamanho que as células obtidas de infecções *in vivo* devido ao consumo dos nutrientes do meio ou os fatores que favorecem essa mudança morfológica. Enquanto *in vivo* são mantidas por mais tempo, com uma concentração estável de nutrientes permitindo que as células atinjam tamanhos significativamente maiores. Apesar de não ter obtido células de tamanhos semelhantes às obtidas em estudos com mamíferos, o fato de determinar condições que imitam a formação das células titãs é uma contribuição fundamental para entender a biologia dessas células.

Um estudo anterior demonstrou que os fosfolipídios de protozoários desencadearam o aumento capsular em células de *Cryptococcus neoformans* iniciando questionamentos de que os lipídios de mamíferos tinham o mesmo efeito (CHRISMAN et al., 2011). Então através dos

nossos dados também conseguimos demonstrar que os fosfolipídios induziram o aumento da cápsula de *Cryptococcus neoformans in vitro*. Porém, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual os fosfolipídios desencadeiam o aumento da cápsula, porém existem hipóteses, que não foram exploradas nesse estudo, como a de que certos fosfolipídios podem desencadear cascatas de sinalização em *C. neoformans* que, contribuiriam assim, com a síntese da cápsula. Um trabalho anterior trouxe que os membros da família da proteína de ligação ao oxisterol humano (OSBP) podem ligar-se aos fosfolipídios, observando que em *C. neoformans* a família OSBP ou outro conjunto de proteínas de sinalização, seriam responsáveis pela ligação com os fosfolipídios (XU et al., 2001).

## 6. CONCLUSÃO

Nesse estudo demonstramos condições em que foi possível observar a indução do aumento da cápsula e do corpo celular de *C. neoformans*, propondo que possa ser utilizado como auxílio para obter células titãs.

A adição do fosfolipídio P1 em meio mínimo para crescimento de *C. neoformans* nas condições de 37°C ou a 30°C, na presença do filme sobre a placa simulando hipóxia/induzindo maiores concentrações de CO<sub>2</sub> ou na sua ausência, ou quando a placa foi incubada sem agitação a 37°C.

É importante ressaltar que apesar de já existirem protocolos descritos para obtenção de células titãs *in vitro*, o presente trabalho se torna relevante para ajudar na caracterização do mecanismo, tal qual para acrescentar informações pertinentes à solidificação de técnicas precisas para produção de células titãs.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASLANYAN, L. et al. The crucial role of biofilms in *Cryptococcus neoformans* survival within macrophages and colonization of the central nervous system. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 1, p. 10, 2017.

ALVES SOARES, E. et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. *PLoS Negl Trop Dis* 2019, 13, e0007569, doi:10.1371/journal.pntd.0007569.

BOSE, I. et al. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, v. 2, n. 4, p. 655-663, 2003.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Emerging infectious diseases*, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM press, 1998.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *Journal of water and health*, v. 7, n. S1, p. S2-S18, 2009.

CAMPUZANO A., WORMLEY F. L. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. *J Fungi (Basel)*. 2018 Mar 7;4(1):33. doi: 10.3390/jof4010033

CHARLIER, C. et al. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 2009;77(1):120-127. doi:10.1128/IAI.01065-08.

CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog*. 2011 May;7(5):e1002047. doi: 10.1371/journal.ppat.1002047.

CRABTREE, J. N.; et al. Titan Cell Production Enhances the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Deepe GS, ed. Infection and Immunity. 2012;80(11):3776-3785. doi:10.1128/IAI.00507-12.

CRUICKSHANK, J. G.; Cavill, R.; Jelbert, M. *Cryptococcus neoformans* of Unusual Morphology. Applied Microbiology. 1973;25(2):309-312.

DAMBUZA, I. M., et al. The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. PLoS pathogens, 14(5), e1006978, 2018.

DESHMANE, Satish L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. Journal of interferon & cytokine research, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DE FERNANDES, O. et al. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 33, n. 1, p. 75-78, 2000.

DE OLIVEIRA, L.; MELHEM, M. S. C. *Cryptococcus neoformans*: importância no diagnóstico clínico das formas polimórficas. Boletim do Instituto Adolfo Lutz, v. 24, n. 1, p. 49-50, 2014.

DYLAĞ, M. et al Establishing Minimal Conditions Sufficient for the Development of Titan-like Cells in *Cryptococcus neoformans/gattii* Species Complex. Pathogens. 2022 Jul 5;11(7):768. doi: 10.3390/pathogens11070768. PMID: 35890013; PMCID: PMC9322185.

DYLAĞ, M. et al. Titan cell formation is unique to *Cryptococcus* species complex. Virulence. 2020 Jan 1;11(1):719-729. doi: 10.1080/21505594.2020.1772657. PMID: 32498590; PMCID: PMC7549989.

DUTRA, F. et al. Warfare and defense: The host response to *Cryptococcus* infection. Fungal Biology Reviews, v. 32, p. 35-51, 2017.

DROMER, F. et al. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. Jour of Clin Microbiology. 1994;32(10):2364-2371.

E SILVA, B. F. et al. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* como causadores de criptococose em pacientes imunossuprimidos: uma revisão integrativa. Research, Society and Development, v. 12, n. 8, p. e7012842901-e7012842901, 2023.



EISENMAN, D. P. et al. Disaster planning and risk communication with vulnerable communities: lessons from Hurricane Katrina. *American journal of public health*, v. 97, n. Supplement\_1, p. S109-S115, 2007.

ELSEGEINY, W. et al. Immunology of cryptococcal infections: developing a rational approach to patient therapy. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 651, 2018.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology*, v. 147, n. 8, p. 2355-2365, 2001.

FIRACATIVE C, et al. Latin American Cryptococcal Study Group. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113 (7): e170554.doi: 10.1590/0074-02760170554. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29641639; PMCID: PMC5888000.

FRIES, B. C. et al. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infection and immunity*, v. 67, n. 11, p. 6076-6083, 1999.

FORZZA, R. Campostrini et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 2. JBRJ, 2010.

GARCÍA-RODAS, R.; et al. *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during *Galleria mellonella* Infection. Cramer RA, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e24485. doi:10.1371/journal.pone.0024485.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 76-86, 2015.

HENRY, R. P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annual review of physiology*, v. 58, p. 523-538, 1996.

HEUNG L. J. Innate Immune Responses to *Cryptococcus*. *J Fungi (Basel)*. 2017 Sep;3(3):35. doi: 10.3390/jof3030035. Epub 2017 Jul 2. PMID: 28936464; PMCID: PMC5604851.

HOMMEL, B. et al. A formação de células dos titãs em *Cryptococcus neoformans* é afinada pelas condições ambientais e modulada por reguladores genéticos positivos e negativos. *PLoS Pathog* 14 (5): e1006982. 2018.

- IDNURM, A.; HEITMAN, J.. Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS biology*, v. 3, n. 4, p. e95, 2005.
- KOZEL T. R.; BAUMAN S. K. CrAg Lateral Flow Assay for Cryptococcosis. *Expert Opin Med Diagn.* 2012;6:245–251, 2008.
- KOZEL, T. R.; MASTROIANNI, R. P. Inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis. *Infection and immunity*, v. 14, n. 1, p. 62-67, 1976.
- KOZEL, T. R.; GOTSCHLICH, E. C. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 129, n. 4, p. 1675-1680, 1982.
- LACAZ, C. S. et al. Tratado de micologia médica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, n. 5, p. 297-298, 2002.
- LIN, X., HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 60. p. 69–105, 2006.
- LINDELL, D. M. et al. Distinct compartmentalization of CD4+ T-cell effector function versus proliferative capacity during pulmonary cryptococcosis. *The American journal of pathology*, v. 168, n. 3, p. 847-855, 2006.
- LOW, C. Y.; ROTSTEIN, C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 medicine reports*, v. 3, 2011.
- MADA, P. K. et al. *Cryptococcus*. *StatPearls: StatPearls Publishing; 2022.*
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics*, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.
- MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O. & CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol*, 14: 497-505, 2006.
- MCCLELLAND, E. E. et al. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infection and immunity*, v. 74, n. 3, p. 1500-1504, 2006.

MEYA D. B., et al. The immunopathogenesis of cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome: understanding a conundrum. *Curr Opin Infect Dis.* 2016 Feb;29(1):10-22. Doi: 10.1097/QCO.0000000000000224. PMID: 26658650; PMCID: PMC4689618.

MILLER M. F., MITCHELL T. G. Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by human neutrophils and monocytes. *Infect Immun.* 1991 Jan;59(1):24-8. doi: 10.1128/iai.59.1.24-28.1991. PMID: 1987038; PMCID: PMC257700.

MOGENSEN E. G., et al. *Cryptococcus neoformans* senses CO<sub>2</sub> through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryot Cell.* 2006 Jan;5(1):103-11. doi: 10.1128/EC.5.1.103-111.2006. PMID: 16400172; PMCID: PMC1360268.

MORETTI, M. L. et al. Consenso em criptococose-2008. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, n. 5, p. 524-44, 2008.

NELSON, B. N.; HAWKINS, A. N.; WOZNIAK, K. L. Pulmonary macrophage and dendritic cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 10, p. 37, 2020.

NIELSEN, K. Morphology changes in human fungal pathogens upon interaction with the host. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 4, p. 66, 2017.

O'HALLORAN, J. A. et al. A. Cryptococcosis today: It is not all about HIV infection. *Current Clinical Microbiology Reports*, v. 4, p. 88-95, 2017.

OKAGAKI, L. H.; Nielsen, K. Titan Cells Confer Protection from Phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* Infections. *Eukaryotic Cell.* 2012;11(6):820-826. doi:10.1128/EC.00121-12.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000953. pmid:20585559

QUEIROZ, E. O. et al. Atividade antifúngica in vitro dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum* L.(coentro) e *Foeniculum vulgare* Mill.(funcho) sobre cepas de *Cryptococcus neoformans*. 2012.

PARK, B. J et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. 2009; 23:525–530.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. FEMS Yeast Res, 6: 463–468, 2006.

PRADO M, et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 May;104(3):513-21. doi: 10.1590/s0074- 02762009000300019. PMID: 19547881.

RAJASINGHAM, R. et al. Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis. The Lancet. Infectious Diseases 17 (8). Elsevier:873–81. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8).

RAJASINGHAM, R., et. al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. The Lancet Infectious Diseases, 2017.

RAJASINGHAM, R. et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. The Lancet Infectious Diseases, v. 22, n. 12, p. 1748–1755, 1 dez. 2022.

SAIDYKHAN L, et al. An in vitro method for inducing titan cells reveals novel features of yeast-to-titan switching in the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. PLoS Pathog. 2022

SETIANINGRUM F. et al. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. Med Mycol. 2019 Feb 1;57(2):133-150. doi: 10.1093/mmy/myy086. PMID: 30329097.

SRIKANTA, D. et al. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. Yeast, v. 31, n. 2, p. 47-60, 2014.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Microbes and infection, v. 5, n. 7, p. 667-675, 2003.

TRIPP, B. C.; SMITH, K.; FERRY, J. G. Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme\* 210. *Journal of biological chemistry*, v. 276, n. 52, p. 48615-48618, 2001.

TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. *PLoS Pathog.* 2018 May 18;14(5):e1007007. doi: 10.1371/journal.ppat.1007007. PMID: 29775477; PMCID: PMC5959073.

TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. Role of IL-17 in Morphogenesis and Dissemination of *Cryptococcus neoformans* during Murine Infection. *Microorganisms.* 2022 Feb 5;10(2):373. doi: 10.3390/microorganisms10020373. PMID: 35208830; PMCID: PMC8876707.

VIDAL, J. E. et al. HIV-Associated Cryptococcal Meningitis Patients Treated with Amphotericin B Deoxycholate Plus Flucytosine under Routine Care Conditions in a Referral Center in Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 2021, 186, 93-102, doi:10.1007/s11046-020-00512-2.

WILDER, J. A. et al. Complementation of a capsule deficient *Cryptococcus neoformans* with CAP64 restores virulence in a murine lung infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 26, n. 3, p. 306-314, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: December 2011. 2018.

XU, Y. et al. Novos membros da família de proteínas de ligação ao oxisterol humano ligam-se a fosfolipídios e regulam o transporte de vesículas. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 21, p. 18407-18414, 2001.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology*, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLoS Pathogens.* 2010;6(6):1–18. (a)

ZARAGOZA, O.; GARCÍA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J. D. et al. Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. Mitchell AP, ed. *PLoS Pathogens.* 2010. doi:10.1371/journal.ppat.1000945. (b)

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: Cells with a giant impact. *Current opinion in microbiology*. 2013. doi:10.1016/j.mib.2013.03.006.

ZARAGOZA, O. et al. Servicio De Micología, Centro Nacional, De Microbiología Instituto, De Salud Carlos, and I I I Crta. 2009. “The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans*.” *Adv Appl Microbiol* 68 (9):133–216.