



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Efeitos do ácido pantotênico na interação entre *Cryptococcus neoformans* e macrófagos

Lara Laís Montalvão Tomaz

Brasília
2020

LARA LAÍS MONTALVÃO TOMAZ

Efeitos do ácido pantotênico na interação entre *Cryptococcus neoformans* e macrófagos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola

Brasília-DF

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Montalvão Tomaz, Lara Laís
Efeitos do ácido pantotênico na interação entre
Ma *Cryptococcus neoformans* e macrófagos / Lara Laís Montalvão
Tomaz; orientador Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola. --
Brasília, 2020.
57 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2020.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. macrófagos. 3. ácido
pantotênico. 4. meio condicionado. 5. interação patógeno
hospedeiro. I. Albuquerque de Andrade Nicola, Patrícia,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A meus familiares e amigos, em especial minha mãe e avó, que sempre me apoiaram e incentivaram meus estudos, estando presentes nos bons e maus momentos. Sei que esse período que tive que estar mais afastada de vocês não foi fácil, mas sou muito grata pela paciência e compreensão.

A minha orientadora, que mesmo sem me conhecer recebeu-me tão bem, e que apesar de estar longe em boa parte desse período, nunca me deixou na mão, sempre tirando minhas dúvidas e tentando estar próxima o máximo possível.

Aos professores Hugo e Ildinete, que sempre estiveram me dando apoio e suporte necessário.

A TODOS os meus colegas do lab 3, foi ótima a experiência de trabalhar e dividir esse ambiente e período com vocês. Obrigado por serem pessoas tão prestativas e amigáveis, vocês fizeram meus dias mais leves.

Em especial ao Phil, que foi quem teve a paciência para me treinar, e que esteve comigo na maior parte dos experimentos, dividindo os dias de luta e de glórias sempre com sua animação a mil. E ao Jhones, que apesar das tiradas, tem um coração gigante, sempre presente ouvindo meus dramas diários e me incentivando a ser uma pessoa mais forte. Obrigada a vocês por tudo!

Ao apoio financeiro da CAPES e FAP-DF, sem os quais eu não conseguiria terminar esse trabalho.

RESUMO

O fungo *Cryptococcus neoformans* é um dos agentes etiológicos da criptococose, uma doença sistêmica que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, e que pode se desenvolver em meningoencefalites graves quando o fungo consegue chegar ao sistema nervoso central (SNC). Nas últimas décadas foi demonstrado que esse fungo, assim como outros, utiliza quorum sensing (QS) para regular diversos fenótipos. QS é um tipo de comunicação microbiana mediada por pequenas moléculas autoindutoras ou moléculas de QS (QSM), que são secretadas por esses organismos e que quando atingem concentrações estimulatórias podem induzir mudanças na expressão de determinados fenótipos em toda população de maneira sincronizada. Nosso grupo demonstrou que o meio condicionado (CM) de *C. neoformans* produzia efeitos no crescimento planctônico e de biofilmes desse fungo, na secreção do polissacarídeo da cápsula e na produção de melanina. O processo de caracterização da molécula responsável por essas atividades de QS revelou a presença de ácido pantotênico no CM, indicando que essa molécula, ou algum derivado dela, são responsáveis pelas atividades observadas. Visto que as QSM também podem atuar sobre células do hospedeiro, nosso trabalho buscou identificar possíveis atividades do AP na interação de *C. neoformans* com macrófagos, importantes células efetoras na resposta imune a esse fungo. Para isso, testamos a interação entre a cepa H99 de *C. neoformans* e macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6, avaliando a fagocitose, viabilidade fúngica e produção de citocinas na presença do AP e/ou CM. Em experimentos de fagocitose em que os fungos foram incubados com macrófagos na presença de CM ou AP observamos um aumento no percentual de fagocitose em ambas as situações, no entanto esse aumento não foi acompanhado de efeitos no índice fagocítico. Não observamos diferenças na produção de TNF- α , IL-6, IL-10 ou de MCP1 por macrófagos incubados com CM ou AP sem a presença do fungo. A única diferença observada foi uma diminuição na produção de IL-6 por macrófagos incubados com fungos na presença de CM. Em relação à sobrevivência fúngica, o AP produziu uma diminuição no número de unidades formadoras de colônia de leveduras intracelulares quando esteve presente durante o período de fagocitose do fungo, sugerindo uma possível atividade dessa molécula estimulando as atividades microbicidas de macrófagos, uma vez que não observamos efeitos dessa molécula na fagocitose do fungo. Contrariamente, na presença de CM observamos um aumento no número de unidades formadoras de colônia, provavelmente derivado da ação do CM no crescimento de leveduras extracelulares, embora seja necessário investigarmos possíveis efeitos do CM no processo de exocitose não-lítica.

Palavras chaves: *C. neoformans*; macrófagos; ácido pantotênico; meio condicionado; interação patógeno-hospedeiro;

ABSTRACT

The fungus *Cryptococcus neoformans* is one of the etiologic agents of cryptococcosis, a systemic disease that mainly affects immunocompromised individuals, and can develop in severe meningoencephalitis when the fungus reaches the central nervous system (CNS). In recent decades, it has been shown that this fungus, like others, uses quorum sensing (QS) for several regular activities. QS is a type of microbial communication mediated by small autoinducer molecules or QS molecules (QSM), which are secreted by these organisms and when they reach stimulatory concentrations they can induce changes in the expression of genes in the entire population resulting in population synchronized phenotypes. Our group demonstrated that the conditioned medium (CM) of *C. neoformans* produces effects on planktonic and biofilm growth of this fungus, on the secretion of capsule's polysaccharide and on fungal melanization. The biochemical characterization of the molecule responsible for these QS activities revealed the presence of pantothenic acid (PA) in the CM, suggesting that this molecule or some derivative is responsible for the activities observed. Since QSMs can also affect host cells during host-pathogen interactions, our work aimed to identify a possible role for PA in the interaction of *C. neoformans* with macrophages, an important effector cells in the immune response to this fungus. For this, we tested an interaction between *C. neoformans* strain H99 and bone marrow derived macrophages from C57BL/6 mice, evaluating phagocytosis, fungal viability and cytokine production in the presence of PA and/or CM. In phagocytic experiments in which fungi were incubated with macrophages in the presence of CM or AP, we observed an increase in the percentage of phagocytosis, but this increase was not followed by changes on the phagocytic index. We observed a decrease in the production of IL-6 by macrophages incubated with *C. neoformans* in the presence of CM, but no other significant differences in the production of other tested citocinas. In the presence of AP during phagocytosis, we observed a decrease in the number of intracellular fungal CFUs (colony forming units). As we did not observe any differences in fungal phagocytosis, in the presence of PA, this result might indicate a possible stimulation of macrophage microbicidal activities. On the other hand, CM produced an increase in fungal CFUs probably derived from its effects on the growth of extracellular yeasts. However, its is necessary to further investigate possible CM effects on non-lytic exocytosis.

Key words: *C. neoformans*; macrophages; pantothenic acid; conditioned medium; pathogen-host interaction;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Variação de tamanhos de cápsula de *C. neoformans* mostrada através de coloração com tinta nanquim

Figura 2: Estimativa da incidência anual de infecções criptocócica por país em 2014

Figura 3: Distribuição das taxas de mortalidade por criptococose (causas associadas) nos estados brasileiros

Figura 4: Esquema representativo dos possíveis destinos de *C. neoformans* após infecção pulmonar.

Figura 5: Esquema representativo da metodologia utilizada para o ensaio de fagocitose.

Figura 6: Esquema representativo das etapas da metodologia utilizada para avaliar a viabilidade do fungo após 24 horas de interação com macrófagos

Figura 7: Esquema representativo das etapas da metodologia utilizada para avaliar a viabilidade do fungo após 2 horas de interação macrófagos e tratamentos, seguidas de mais 22 horas interagindo somente com macrófagos.

Figura 8: Esquema representativo das etapas da metodologia utilizada para avaliar se existia diferença na viabilidade dos fungos que se encontravam extracelulares dos intracelulares após 24 horas de interação com macrófagos.

Figura 9: Macrófagos infectados com *C. neoformans* e corados com kit Panótico

Figura 10: Avaliação da capacidade de fagocítica de macrófagos após interação com *C. neoformans*.

Figura 11: Avaliação da produção de citocinas por macrófagos após a interação com *C. neoformans* na presença ou não de CM, AP ou de LPS.

Figura 12: Contagem de unidades formadoras de colônia de *C. neoformans* após a interação com macrófagos (metodologia 2+22).

Figura 13: Número de UFCs de *C. neoformans* após interação com macrófagos murinos derivados de medula óssea por 24 horas.

Figura 14: Número de UFCs de *C. neoformans* após 24 horas de interação com macrófagos murinos derivados de medula óssea (metodologia INTRA/EXTRA)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	10
1.2	Criptococose	13
1.2.1	Patogênese e imunologia	15
1.2.2	Interação <i>Cryptococcus</i> -macrófago	18
1.3	Fatores de virulência	19
1.4	Diagnóstico e tratamentos	21
1.5	Quorum sensing	22
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Geral	27
3.2	Específicos	27
4	METODOLOGIA	28
4.1	Culturas de células	28
4.1.1	Células fúngicas	28
4.1.2	Produção de Macrófagos murinos derivados de medula	28
4.2	Produção de CM	29
4.3	Interação fungo-macrófago	30
4.3.1	Fagocitose	31
4.3.2	Dosagem de citocinas.....	32
4.3.3	Ensaio de viabilidade fúngica.....	32
4.4	Estatística	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Fagocitose	38
5.2	Dosagens de Citocinas	40

5.3 Sobrevivência/crescimento de <i>C. neoformans</i> após interação com macrófagos	41
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÕES.....	49
8 PERSPECTIVAS.....	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucariontes que possuem uma vasta diversidade de nichos ecológicos, podendo ser desde decompositores de matéria orgânica morta até mesmo parasitas de plantas e animais, incluindo o ser humano.

Estima-se cerca de 1,5 milhão de espécie fúngicas, no entanto apenas cerca de 300 são capazes de causar doenças em seres humanos. Sendo que a maioria dos fungos potencialmente patogênicos causam doenças superficiais ou cutâneas (GARCIA-SOLACHE e CASADEVALL, 2010).

Nas últimas décadas tem-se notado 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 de tempo (LOW e ROTSTEIN, 2011).

Entre as micoses sistêmicas com maior número de casos e com maior letalidade estão a candidíase, aspergilose, e a criptococose. A criptococose por *C. neoformans* atinge principalmente pacientes imunocomprometidos sendo uma das infecções definidoras da AIDS, causando meningoencefalites, a apresentação clínica mais grave da doença, e que é responsável por altas taxas de letalidade mesmo quando os pacientes são submetidos à tratamento (GARBER, 2001). Já as infecções causadas pela espécie irmã *Cryptococcus gattii* são menos frequentes e normalmente evoluem para criptococose pulmonar, uma doença que é mais comum em pacientes aparentemente saudáveis(LA HOZ e PAPPAS, 2013).

1.1 *Cryptococcus neoformans*

As primeiras descrições desse fungo aconteceram no século XIX, onde em 1894 ele foi associado a uma infecção na tíbia de uma paciente e em 1895 foi isolado a partir de uma amostra de suco de pêssego, já demonstrando assim sua diversidade e potencial patológico (MITCHELL e PERFECT, 1995).

Devido a sua morfologia normalmente leveduriforme, sua nomenclatura inicial foi associada aos fungos do gênero *Saccharomyces*. Em 1905 recebeu sua nomenclatura atual, sendo então enquadrado ao grupo dos basidiomicetos. (SRIKANTA et al., 2014)

Em sua classificação filogenética pode ser dividido em 2 variedades, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, as quais eram identificadas imunologicamente como sorotipo A e D respectivamente. Também podem ser encontrados híbridos que possuem a variedade AD. Atualmente, baseado nas sequências polimórficas do DNA, o sorotipo A foi dividido molecularmente em VNI, VNII e VNB; já o sorotipo D é molecularmente dividido no tipo VNIV; o híbrido AD é VNIII (ZHAO et al., 2019).

As células desse fungo têm como característica marcante a presença de uma cápsula polissacarídica cujo tamanho pode ser modulado de acordo com determinadas condições ambientais (Figura 1). As células de *C. neoformans* podem variar muito em tamanho, entre 2 e até 100 micrometros, e essa variação pode ser relacionada tanto à modulação do tamanho da cápsula, quanto a aumentos no tamanho do corpo celular. Sob determinadas condições esse fungo produz células que são chamadas de titãs, que tem sido estudadas como um mecanismo de sobrevivência desse fungo nos tecidos do hospedeiro (MA e MAY, 2009).

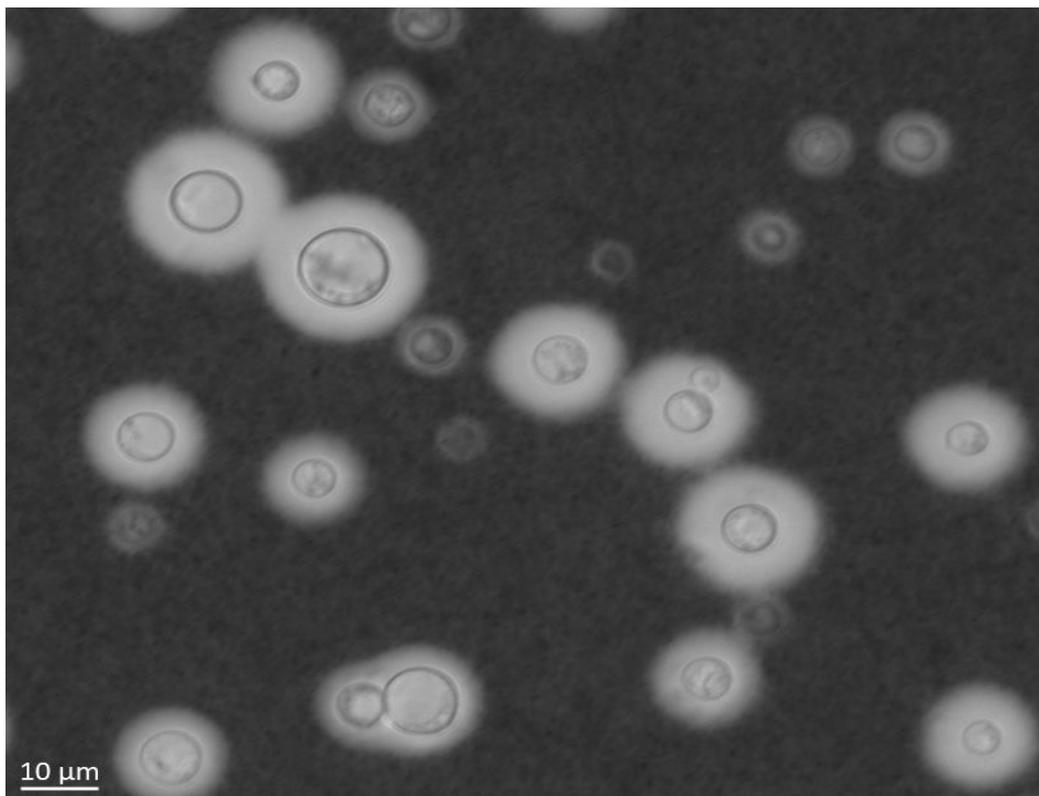


Figura 1: Morfologia de células de *C. neoformans* observadas por microscopia de luz na presença de tinta nanquim. Nessa figura é possível observar a cápsula fúngica como um halo de exclusão ao redor do corpo celular em decorrência da tinta nanquim. Fonte: Patrícia Albuquerque

No seu ambiente natural *C. neoformans* é um fungo saprófita, sendo encontrado em diversos locais como o solo, onde pode interagir com outros organismos como nematóides e protozoários (TEMFACK et al., 2019).

Esse fungo também apresenta uma forte associação com aves, sendo encontrado nas fezes de pombos, levando-se a associar esse animal a maior dispersão do fungo. Além disso, esse fungo pode infectar diferentes espécies de mamíferos como gatos, cachorro, coelho, ratos e eventualmente sendo também capaz de infectar seres humanos, onde pode causar a criptococose (LIN e HEITMAN, 2006).

1.2 Criptococose

A criptococose é uma doença sistêmica causada por alguns fungos do gênero *Cryptococcus*, incluindo os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. É uma doença amplamente distribuída pelo mundo e pode ter diversas apresentações clínicas (MAZIARZ e PERFECT, 2016).

As estimativas é que ocorram cerca de 223.100 casos de meningite por *Cryptococcus* no mundo, sendo 73% desses casos na África sub-saariana. Também foi estimada a morte anual por essa doença, sendo 181.100 casos no mundo e com 135.000 ocorrendo na África sub-saariana. Estima-se que 15% das mortes de portadores da AIDS são causadas por meningite criptocócica (RAJASINGHAM et al., 2017). A Figura 2 mostra estimativa da incidência anual da infecção por país.

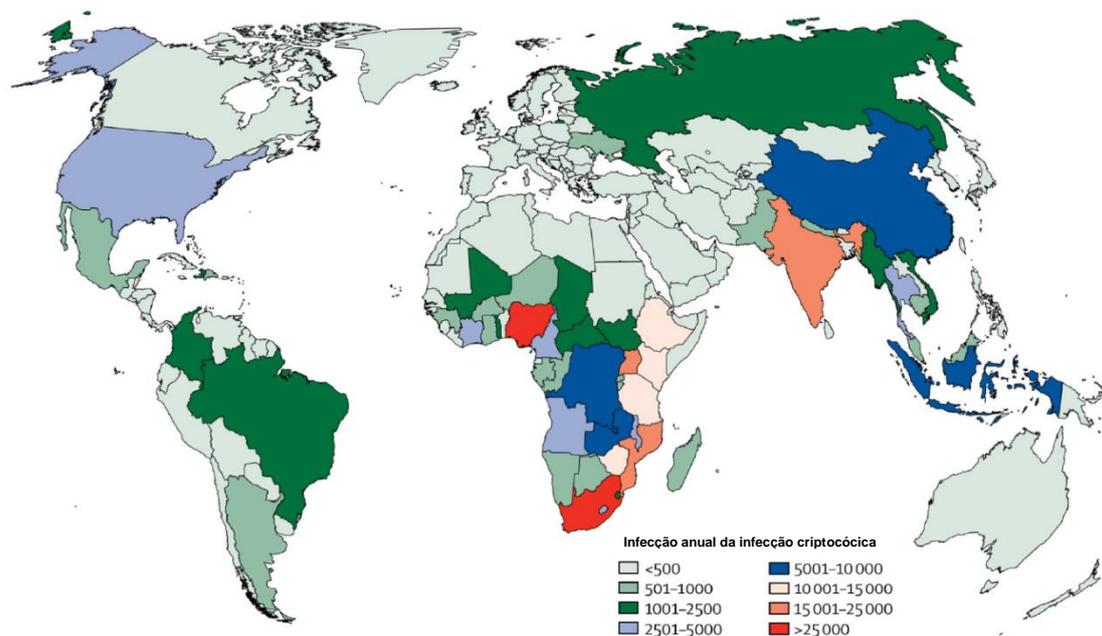


Figura 2: Estimativa da incidência anual de infecções criptocócicas por país em 2014 (editada de *Rajasingham et al. 2017*)

Na América latina ocorrem mais de 5 mil casos de meningite criptocócica por ano, causando a morte de aproximadamente 2.400 pessoas (FIRACATIVE et al., 2018). A espécie que mais prevalece nessa região, tanto sob a forma de isolados clínicos quanto de isolados ambientais é a *C. neoformans* (COGLIATI, 2013).

No Brasil não há notificação compulsória das micoses sistêmicas, dessa maneira, o número de casos dessas doenças pode ser bem maior. Trabalhos utilizando dados de mortalidade foram usados para traçar um perfil dessa doença. Foi observado que a criptococose foi a micose sistêmica que teve maior número em mortes subjacentes a AIDS no Brasil (PRADO et al., 2009). Já o trabalho de Alves e colaboradores (ALVES SOARES et al., 2019) mostrou o perfil da mortalidade por criptococose no Brasil nos anos de 2000 a 2012, onde se observou que a forma clínica mais predominante foi meningite (80%). Eles também observaram que o estado do Mato Grosso apresentou a maior taxa de mortalidade tendo a criptococose como causa básica no Brasil durante o período avaliado (Figura 3).

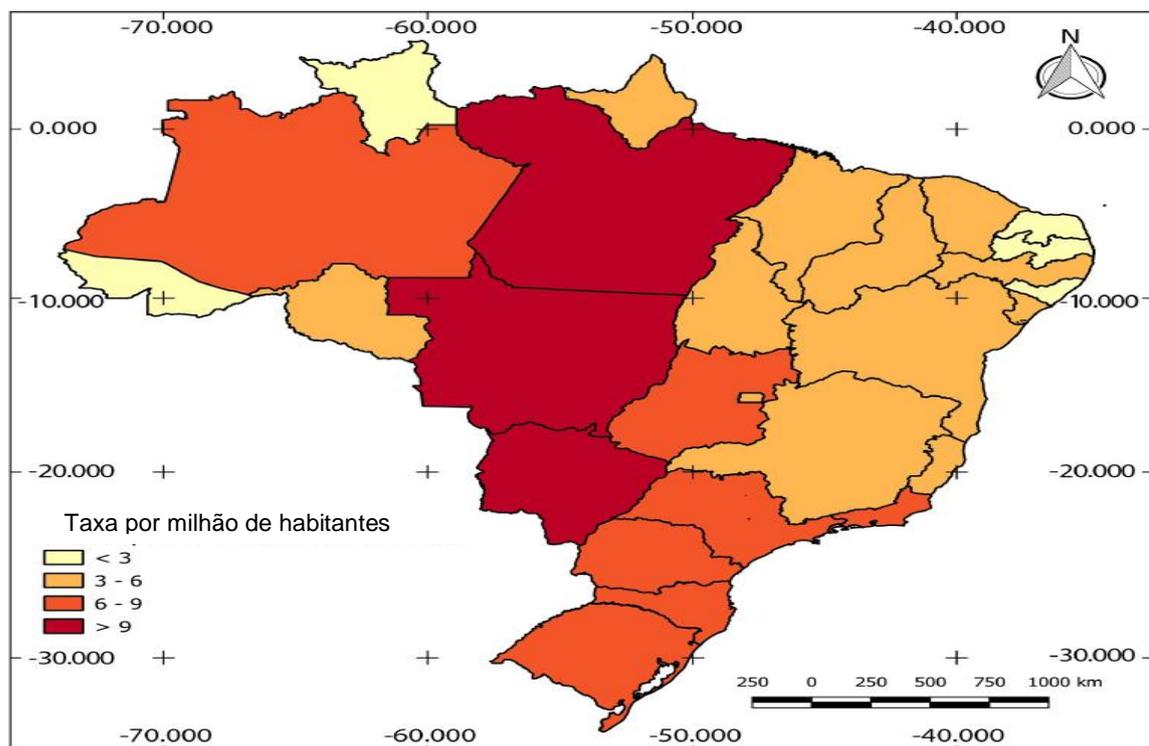


Figura 3: Distribuição das taxas de mortalidade por criptococose (causas associadas) nos estados brasileiros. (editada de Alves Soares et al. 2019)

1.2.1 Patogênese e imunologia

Estudos demonstram que a infecção com *C. neoformans* é algo prevalente na população em geral, acontecendo provavelmente na infância, a partir da entrada de esporos ou leveduras desidratadas nas vias aéreas (GOLDMAN et al., 2001). Porém o desenvolvimento da doença em pessoas imunocompetentes é raro, sendo a infecção normalmente assintomática ou podendo se desenvolver para um quadro pulmonar leve nas infecções por *C. neoformans*.

O grande impacto dessa doença se dá principalmente nas pessoas com imunossupressão, particularmente do tipo celular, pois o mecanismo imune para o controle e eliminação desse fungo envolve os fagócitos, como macrófagos, e células T auxiliaadoras (MILLER e MITCHELL, 1991). Por esse motivo, pacientes com AIDS são um dos principais grupos de risco para o desenvolvimento da doença, uma vez que estes tem uma redução progressiva de suas células T devido a infecção pelo HIV (DEEKS et al., 2015). Entre outros grupos de risco encontram-se transplantados, pacientes sob uso prolongado de corticoides ou doença crônica de rins (BRIZENDINE et al., 2013).

Durante a infecção células fúngicas ou esporos entram nas vias aéreas, essa entrada pode ou não ser bloqueada por mecanismos/barreiras físicas de imunidade inata. Os que entram em geral de alguma maneira são contidos por uma resposta imune eficiente, não produzindo doença (SETIANINGRUM et al., 2019). No entanto, esses fungos podem não ser totalmente destruídos, permanecendo provavelmente no interior de granulomas. Quando existe uma diminuição significativa na resposta imune celular, como no caso da AIDS, o fungo se dissemina pelo organismo, apresentando uma preferência para o sistema nervoso central. Figura 4

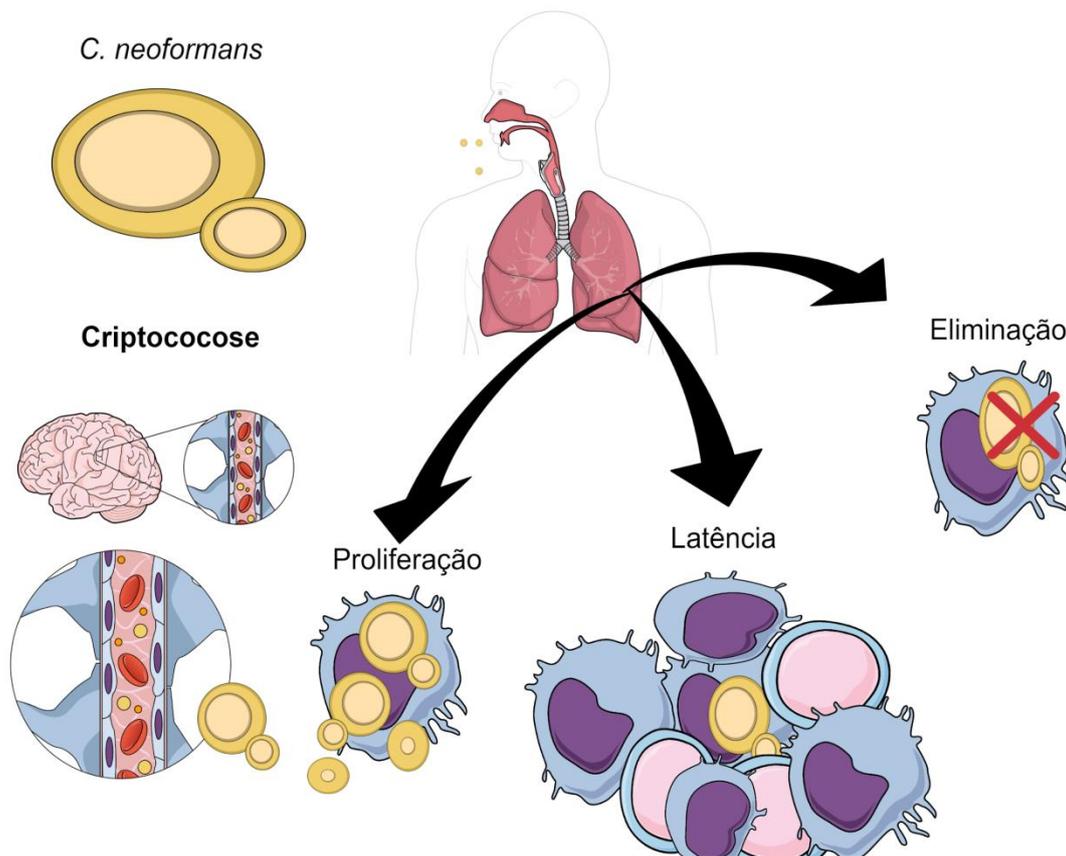


Figura 4: Esquema representativo dos possíveis destinos do *C. neoformans* após infecção pulmonar. Figura elaborada pela autora

A resposta imune do hospedeiro envolve tanto a parte inata quanto a adaptativa. Assim que o fungo chega ao trato respiratório inferior encontra com macrófagos alveolares, que já residem no tecido. *C. neoformans*, devido a sua cápsula, gera um grande desafio para que essas células façam seu reconhecimento e, apesar desse mecanismo não ser completamente entendido, sabe-se que as células imunes podem se utilizarem 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), receptores Scavengers, entre outros (HEUNG, 2017).

Realizada a fagocitose, dentro do fagolisossomo ocorre a ativação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio para que, idealmente, ocorra a eliminação do invasor (CAMPUZANO e WORMLEY, 2018). Além disso, estes macrófagos podem produzir MCP-1, 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 são capazes de fazer o processamento de antígenos do fungo, para assim apresentá-los para as células T auxiliaadoras nos órgãos linfoides. Estas últimas 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* é normalmente 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, 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 são um sinal de controle da doença e são formados por aglomerados de células como macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas. É geralmente devido a esse mecanismo que se pode gerar os sintomas pulmonares, que são parecidos com os de pneumonia, onde as radiografias podem mostrar nódulos não calcificados e infiltrados (MAZIARZ e PERFECT, 2016). Mas em geral esses granulomas se resolvem sozinhos sem necessidade de tratamento.

Há uma série de evidências que o *C. neoformans* pode continuar viável dentro desses granulomas, mas em latência, tendo sua replicação contida. Somente quando há a quebra nesse equilíbrio, principalmente por uma deficiência na resposta

imune celular, é que as células fúngicas são reativadas, saindo dessa condição, podendo se multiplicar e disseminar pelo corpo (GIBSON e JOHNSTON, 2015).

Além dos sintomas clínicos pulmonares, o fungo pode chegar 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).

Ainda não se sabe ao certo o porquê, mas *C. neoformans* tem um tropismo pelo sistema nervoso central. Para penetrar no SNC, o fungo necessita cruzar a barreira hematoencefálica. Atualmente existem 2 hipóteses principais de como *C. neoformans* é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica. A primeira é de forma livre, onde as células do fungo interagiriam diretamente com as células endoteliais, podendo por meio de suas proteínas enfraquecer a ligação célula-célula e passar por entre elas, ou mesmo passando por dentro delas, através de sua internalização. A segunda hipótese é conhecida como cavalo de tróia, e nesse caso o fungo conseguiria fazer essa travessia dentro de macrófagos (MAY et al., 2016).

Os sintomas da meningoencefalite são diversos como febre, dores de cabeça, letargia, entre outros, e eles ocorrem devido ao processo de inflamação e também pelo aumento da pressão intracraniana, podendo levar ao coma e morte na ausência de tratamento (BOWEN et al., 2016). A secreção do polissacarídeo capsular pode desempenhar um papel importante no aumento da pressão intracraniana, principalmente em pacientes com altas cargas fúngicas (ROBERTSON et al., 2014).

1.2.2 Interação *Cryptococcus*-macrófago

A imunidade protetora contra *C. neoformans* depende principalmente de células fagocíticas, e os macrófagos são um dos primeiros e principais efetores na resposta inicial contra a criptococose, e essa interação inicial é que pode determinar o desenvolvimento da doença.

Osterholzer e colaboradores mostraram que a depleção de células dendríticas e macrófagos pré-infecção alterara drasticamente a sobrevivência de modelos murinos infectados por *C. neoformans* (OSTERHOLZER et al., 2009).

O perfil de citocinas que atuam localmente pode influenciar na ativação das células efetoras e conseqüentemente em como o organismo lidará com o patógeno. Em *C. neoformans* foi demonstrado que as citocinas dos perfis Th1 e Th17 são as que geram uma resposta protetora contra o fungo (VOELZ et al., 2009). Elas ativam cascatas de sinalização que geram a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, e outros fatores que auxiliam a eliminação de patógenos intracelulares (MANTOVANI et al., 2004).

Porém, evolutivamente, o *C. neoformans* desenvolveu mecanismos de virulência que o ajudam a escapar dessa ação, sendo a principal hipótese de que estes foram selecionados a partir de sua interação seus predadores naturais, as amebas e outros protozoários (CASADEVALL et al., 2019).

Esses mecanismos de escape do fungo acabam subvertendo o papel de célula efetora da resposta imune desempenhado por macrófagos, tornando essas células sítios de proteção e de dispersão do fungo para o SNC (RUDMAN et al., 2019).

O trabalho de Charlier e colaboradores mostrou que a depleção de macrófagos reduziu a disseminação do fungo, e que camundongos que foram inoculados com monócitos infectados *in vitro* com o *C. neoformans* tiveram maior carga fúngica no SNC do que os inoculados somente com o fungo (CHARLIER et al., 2009).

Para realizar tais ações como sobrepujar o ataque dos macrófagos, atravessar barreiras epiteliais e endoteliais, e sobreviver em um ambiente com poucos nutrientes como o líquido, *C. neoformans* conta com uma série de mecanismos, os chamados fatores de virulência.

1.3 Fatores de virulência

A virulência pode ser definida como a capacidade relativa de um microrganismo causar dano a um hospedeiro suscetível. Por sua vez fatores de virulência são características presentes em um microrganismo capazes de gerar dano ao hospedeiro e podem incluir mecanismos e estruturas que possam auxiliar a

sobrevivência desses microrganismos nos tecidos do hospedeiro. (PIROFSKI e CASADEVALL, 2015)

Acredita-se que o *Cryptococcus* seja um patógeno acidental, já que ele não necessita de hospedeiro para completar seu ciclo de vida, e que foram as mesmas adaptações, que o auxiliaram a sobreviver no ambiente, que o tornou apto a sobreviver dentro de mamíferos (WATKINS et al., 2017).

Dentre essas adaptações, as de maior destaque para sua virulência são: termotolerância, sua cápsula polissacarídica, a produção de melanina, e a produção de diferentes enzimas.

Diferente da grande maioria dos fungos, o *C. neoformans* consegue sobreviver e se reproduzir a 37°C, sendo assim, este é apto a se desenvolver no interior do corpo humano (KRONSTAD et al., 2011).

A cápsula é o fator considerado mais fundamental na virulência, já que as cepas que não a possuem são consideradas avirulentas (CHANG e KWON-CHUNG, 1994). Esta apresenta diversos papéis, sendo que no ambiente ela pode prevenir a desidratação e ajudar o fungo a não ser ingerido por um de seus predadores naturais. Já dentro do hospedeiro ela pode ter diversas funções: impede a fagocitose, pois pode esconder epítomos importantes da parede do fungo; protege da digestão dentro do fagolisossomo, pois resiste ao estresse oxidativo; também pode ser que por sua viscosidade, ou por tamanha sua espessura, que o macrófago não consiga englobar o fungo (ZARAGOZA, 2019).

Além do que, ela tem papel imunomodulatório, podendo desregular a produção de citocinas, reduzir a função da apresentação de antígenos por fagócitos, gerar apoptose de macrófagos e células dendríticas, entre outros (VECCHIARELLI et al., 2013).

Outro fator de virulência importante é a melanina, um pigmento de cor marrom/negra. No *C. neoformans* ela se encontra ancorada na quitina da parede celular. Para sua síntese é necessário que a enzima lacase oxide um precursor de catecolamina, como o L-DOPA. Cepas que possuem alguma deficiência na produção de lacases, e conseqüentemente de melanina, tem virulência reduzida. (CAMACHO et al., 2019)

No ambiente a melanina auxilia na proteção contra os raios UV, calor e congelamento, além de ajudar na sobrevivência contra os predadores naturais.

(AGUSTINHO et al., 2018). Já foi demonstrado que cepas melanizadas conseguem sobreviver melhor ao estresse oxidativo, dificultando assim a ação dos fagócitos (BLASI et al., 1995). Além disso, cepas melanizadas são mais resistentes a drogas antifúngicas como a Anfotericina B e caspofungina (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006).

C. neoformans é capaz de produzir uma série de enzimas, e dentre estas as consideradas de maior importância para a virulência são as fosfolipases, proteases e a urease.

As proteases são enzimas que realizam a degradação de proteínas. Sabe-se que ele libera proteases que podem fazer a quebra de imunoglobulinas e proteínas do complemento. Além disso, ele possui uma serino protease que facilita a permeabilidade da barreira hematoencefálica (CASADEVALL et al., 2018).

As fosfolipases são enzimas que fazem a quebra de fosfolipídios. *C. neoformans* produz fosfolipases, entre elas a fosfolipase B, que permite ao fungo degradar as membranas dos fagócitos, podendo ajudar o acesso de nutrientes dentro do fagolisossomo, ou até mesmo no processo de exocitose não-lítica (COELHO et al., 2014). Além disso, já foi demonstrado que ela auxilia na adesão do fungo nas células epiteliais do pulmão, podendo então ser um dos facilitadores da dispersão do fungo para fora do pulmão (GANENDREN et al., 2006).

Para acessar suas fontes de nitrogênio o *C. neoformans* utiliza a urease. Além disso, essa enzima ajuda a neutralizar o pH dentro do fagolisossomo e é usada para a invasão do SNC (MAY et al., 2016).

1.4 Diagnóstico e tratamentos

O diagnóstico da doença pode ser feito através da visualização direta por microscopia, cultura, métodos de procura de antígenos e por métodos de detecção de ácidos nucleicos, sendo esses últimos não tão utilizados na prática clínica devido ao custo (MAZIARZ e PERFECT, 2016).

A visualização direta pode ser feita pela utilização de tinta nanquim em amostras do líquido. A visualização do fungo é feita por contrastação utilizando tinta nanquim, uma vez que a cápsula não é permeável a esse corante a levedura fica

aparente e pode-se visualizar um halo ao redor da célula fúngica (figura 1). Outra forma é através de técnicas histopatológicas (TEMFAK et al.; 2019).

A cultura em meios sólidos de diferentes amostras também pode ser feita para diagnóstico, porém esse método é mais efetivo em pacientes que possuem grande carga fúngica, podendo não identificar corretamente um paciente que tenha a infecção, mas em baixa quantidade (MAZIARZ e PERFECT, 2016).

Atualmente o método de diagnóstico mais utilizado é um teste rápido imunocromatográfico para a detecção qualitativa ou semi-quantitativa dos antígenos de polissacarídeos, mais conhecido como CrAg LFA (Ensaio de Fluxo Lateral para antígeno criptocócico, do inglês “Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay”). Outros testes que podem ser usados, mas que apresentam menor sensibilidade são os testes de aglutinação em látex, e ensaios enzimáticos (KOZEL e BAUMAN, 2012; SKIPPER et al., 2019)

O início do tratamento envolve uma série de questões, como qual a apresentação clínica da doença, local da infecção, o estado imunológico do paciente, se possui ou não HIV, se é ou não transplantado, etc. Mas em resumo ele é feito com a administração de Anfotericina B e flucitosina na etapa de indução, e Fluconazol nas etapas de consolidação e manutenção (MOURAD e PERFECT, 2018).

Apesar de ser um tratamento razoavelmente efetivo os medicamentos, em especial a anfotericina B, podem apresentar alta toxicidade e altos custos. Além disso, existe a preocupação com o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos, e por esse motivo torna-se necessário entender melhor a biologia desse microrganismo e a interação do fungo com o hospedeiro para buscar novos alvos para o seu controle.

1.5 Quorum sensing

O quorum sensing (QS) é um mecanismo que alguns microrganismos utilizam para comunicação, o qual é dependente da densidade populacional. Nesse processo moléculas são liberadas no meio e, ao atingirem concentrações estimulatórias, elas desencadeiam mudanças na expressão gênica da população microbiana de maneira

sincronizada para a produção de determinados fenótipos. Em organismos patogênicos, muito frequentemente o QS controla a expressão de genes associados a fatores de virulência dos microrganismos (BARRIUSO et al., 2018).

O mecanismo de QS foi primeiramente descrito em bactérias nas décadas de 60 e 70, nos trabalhos de competência de *Streptococcus pneumoniae* e de luminescência em espécies de bactérias marinhas respectivamente, onde e observou-se a necessidade de secreção e recepção de moléculas sinalizadoras por parte dos microrganismos para a expressão de determinados fenótipos, os quais eram expressos de maneira sincronizada na população após a ultrapassagem de determinados limites de concentração das moléculas de sensoriamento de quórum (WHITELEY et al., 2017).

A primeira observação do QS em organismos eucariotos foi em *Candida albicans*, um fungo que é encontrado naturalmente na microbiota humana. Esse fungo possui a capacidade de alterar sua morfologia de levedura para micélio, e essa mudança funciona como um fator crítico para virulência. A transição acontece em resposta a determinados estímulos como: pH, temperatura, concentração de CO₂ (POULAIN, 2015). Foi observado que em concentrações de células maiores que 10⁶ havia uma inibição da filamentação, um efeito chamado dependente do tamanho do inóculo. Hornby e colaboradores descobriram que uma molécula de quorum sensing (QSM), o farnesol, é uma das moléculas responsáveis pela regulação da filamentação (HORNBY et al., 2001).

Além de *C. albicans*, o mecanismo de QS também foi observado em outros fungos como: *Saccharomyces cerevisiae*, no qual as QSMs são álcoois aromáticos que controlam a mudança morfológica em resposta a falta de nitrogênio. Em outros fungos fenômenos provavelmente mediados por QS foram descritos, mas as QSMs ainda não foram isoladas *Histoplasma capsulatum*, *Ceratocystis ulmi*, *Neurospora crassa* entre outros (ALBUQUERQUE e CASADEVALL, 2012; PADDER et al., 2018).

Um efeito parecido com QS foi observado em cepas mutantes de *C. neoformans* que tinham deleção no gene TUP1. Eles observaram que quando o inóculo dessas cepas era menor que 10³, não havia a formação de colônias em placas, mas quando o inóculo era mais que 10⁵ sim. Ao filtrar a cultura com alta densidade, e colocar o meio condicionado (CM) na de menor densidade, eles

conseguiram recuperar a habilidade de crescer. Descobriram que esse fenótipo é controlado por um peptídeo que foi denominado QSP1 (LEE et al., 2007). Mais tarde outros mecanismos regulatórios de QSP1 foram desvendados, foi demonstrado que esse peptídeo participa, por exemplo, na reprodução sexuada (TIAN et al., 2018), e que ele é necessário para a virulência fúngica (HOMER et al., 2016).

No trabalho de Albuquerque e colegas foi observado um sistema QS em *C. neoformans*. Eles observaram que a adição de meio condicionado (CM) proveniente do sobrenadante de culturas desse fungo em fase estacionária produzia em culturas novas do fungo a expressão de diversos fenótipos compatíveis com uma resposta por QS. Entre esses fenótipos foi observado: aumento do crescimento fúngico e saída da fase lag de crescimento, liberação de componentes derivados da cápsula e síntese de melanina, sendo esses importantes fatores de virulência do microrganismo. Ao tentarem caracterizar a QSM responsável, descobriram que provavelmente é uma molécula derivada do ácido pantotênico, mas que outros metabólitos presentes no CM também possam estar associados a essas atividades (ALBUQUERQUE et al., 2013).

As QSM regulam diversos fenótipos dos microrganismos e, além de atuar sobre a espécie que a produziu, podem interferir em outras espécies que dividem o mesmo habitat como, por exemplo, na microbiota, onde já foi demonstrado como as QSM podem influenciar a composição dos microrganismos ali presentes (MUKHERJEE e BASSLER, 2019). Outro exemplo é a ação do Farnesol, QSM de *Candida albicans*, que quando adicionado a outras espécies de fungos pode causar morte celular, inibição do crescimento e da filamentação, inibição da formação de biofilmes, entre outras respostas (LANGFORD et al., 2009).

Também é real a interferência das QSM na relação parasita-hospedeiro. Já se sabe que moléculas produzidas por bactérias e fungos podem influenciar a resposta imune. Elas podem induzir ou reprimir a produção de citocinas; favorecer a sobrevivência do microrganismo, por exemplo, fazendo-o resistir à produção de ROS; induzir as células do hospedeiro a apoptose; inibir diferenciação celular, entre outros fatores (DIXON e HALL, 2015), o que torna essencial o entendimento dessa relação.

Visto moléculas de QS podem também atuar sobre as células do hospedeiro decidimos avaliar a capacidade imunomodulatória do meio condicionado, bem como

do ácido pantotênico, uma das QSM desse fungo, na interação de *C. neoformans* com macrófagos. Acreditamos que poderemos gerar informações importantes para entender melhor a interação existente entre patógeno-hospedeiro, e assim buscar melhores alvos para o tratamento da criptococose.

2 JUSTIFICATIVA

O sistema imune e sua resposta adequada são essenciais para o controle de doenças infecciosas, e na criptococose causada por *C. neoformans*, a relação entre o sistema imunitário e o fungo é determinante para o desenvolvimento ou não da doença.

Visto que a criptococose em pacientes imunossuprimidos é causa de grande mortalidade, torna-se necessário estudar mais ativamente a relação imunológica existente entre o fungo e hospedeiro, a fim de encontrar meios de melhorar o tratamento.

Os macrófagos são uma das principais células efetoras da resposta imune na criptococose. Essas células atuam, de maneira geral, ingerindo os patógenos, processando antígenos e liberando mediadores do processo de inflamação.

Já foi demonstrado que várias moléculas de quorum sensing produzidas por microrganismos além de apresentarem atividade sobre eles próprios, também podem atuar na sua interação com o hospedeiro. Nossa hipótese é que as moléculas de quorum sensing, ou outras moléculas de baixo peso molecular secretadas por *C. neoformans* também podem atuar na interação desse fungo com macrófagos.

Por esse motivo, testamos se o meio condicionado não purificado ou o ácido pantotênico, uma das QSMs de *C. neoformans* produzem efeitos na interação do fungo com os macrófagos, a fim melhor entender a interação desse fungo como sistema imune do hospedeiro.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar os possíveis efeitos imunomodulatórios do ácido pantotênico em macrófagos murinos durante a interação com *C. neoformans*.

3.2 Específicos

- Analisar a capacidade dos macrófagos fagocitarem *C. neoformans* na presença ou ausência do ácido pantotênico.
- Quantificar a produção de citocinas produzidas pelos macrófagos após a interação dessas células com *C. neoformans* na presença ou ausência do ácido pantotênico.
- Avaliar os efeitos do ácido pantotênico na sobrevivência das células do fungo após a interação.

4 METODOLOGIA

4.1 Culturas de células

4.1.1 Células fúngicas

Para todos os experimentos foi utilizada a cepa H99 do fungo *C. neoformans* que se encontrava armazenada em estoque glicerol em freezer -80°C. Sua cultura deu-se por semeadura em placa de Petri contendo meio Sabouraud sólido (1% peptona, 4% dextrose, 1.8% ágar), permanecendo em estufa a 30°C de 2 a 3 dias.

Para a utilização nos experimentos, no dia anterior a interação, uma colônia era coletada da placa, inoculada em 10 ml de meio Sabouraud líquido e crescida a 30°C durante a noite sob agitação de 200rpm a 30°C.

4.1.2 Produção de Macrófagos murinos derivados de medula

Para a obtenção de macrófagos derivados de medula óssea, que foram usados nos experimentos de interação com *C. neoformans*, foram utilizados camundongos C57Bl/6, de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos em condições sanitárias apropriadas com fornecimento de água e ração *ad libitum* no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Todos os procedimentos experimentais obedeceram às diretrizes do Comitê de Ética, em projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnBDOC n.º 52657/2011.

A diferenciação dos macrófagos foi feita seguindo-se o protocolo descrito por Lutz e colaboradores com algumas modificações como descrito a seguir (LUTZ et al., 1999). As células foram retiradas da medula do fêmur e tíbia de camundongos tipo C57Bl/6. De forma resumida foram retirados os fêmures e tíbias do camundongo onde suas epífises foram cortadas para realização de um lavado de seu interior com meio RPMI-1640 (Gibco).

As células foram coletadas e tratadas com um tampão de lise para hemácias, e posteriormente foram contadas em câmara de Neubauer com o corante Azul de

tripano, onde 2×10^6 foram alocadas em placa de Petri com 10 ml de meio para diferenciação [RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 20 ng/ml do fator estimulador de colônias de macrófago (GM-CFS), 50 μ l de betamercaptoetanol], sendo mantida em estufa com 5% de CO_2 a 37°C.

No terceiro dia de cultivo era adicionado o mesmo volume inicial de meio de diferenciação novo. No sexto dia 10 ml do volume eram retirados da placa e colocados em tubo falcon, onde se fazia uma centrifugação a 300g por 5 minutos. Descartado o sobrenadante, ressuspendeu-se as células em 10ml de meio de diferenciação novo, retornando-as para a placa. No oitavo dia elas estavam prontas para serem utilizadas nos experimentos.

As células da medula que não seguiam para o processo de diferenciação eram submetidas ao congelamento em 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), onde posteriormente poderiam ser utilizadas para a diferenciação.

4.2 Produção de CM

Uma cultura de 1L de células de *C. neoformans* (densidade de 10^5 células/mL) em meio mínimo (MM), onde as células foram cultivadas em uma incubadora a 30°C por 5 dias sob agitação constante de 200 rpm. A etapa seguinte foi remover as células para obtenção do sobrenadante, pelo seguinte procedimento: primeiramente, se fez uma centrifugação, a velocidade de 6000 rpm, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e em seguida filtrado por membranas de 0,45 μ m, com auxílio de uma bomba a vácuo. Adicionalmente, o sobrenadante foi submetido sequencialmente à ultrafiltração com membranas de 100 KDa e depois de 1KDa para remoção de GXM e outras moléculas de alto peso molecular secretadas pelo fungo.

O sobrenadante ultrafiltrado foi congelado a -80°C e posteriormente liofilizado para ser concentrado. Para a utilização nos ensaios, o extrato liofilizado foi ressuspendido em água de injeção em volume 10 vezes menor que o original (CM 10X) e nos experimentos o CM foi utilizado para concentração final de 1x (em relação ao volume inicial).

4.3 Interação fungo-macrófago

Após o período de diferenciação os macrófagos foram coletados das placas de cultura celular, lavados e contados em câmara de Neubauer para determinação da sua densidade celular. A seguir as células foram semeadas em uma densidade de 5×10^4 células por poço em placas de 96 para os ensaios de fagocitose ou sobrevivência fúngica, ou em uma densidade de 2×10^5 em placas de 24 poços para os experimentos de dosagem de citocinas e acondicionadas por 24h em estufa a 37°C com atmosfera com 5% de CO_2 .

No dia anterior à interação, uma colônia de *C. neoformans* proveniente de uma placa em meio sólido foi coletada e inoculada em meio Sabouraud. A cultura foi crescida por 24 h, a 37°C 200 rpm. No dia da interação, as células fúngicas foram coletadas por centrifugação a 1200g, e depois foram lavadas 3 vezes com PBS (tampão salino fosfato) e contadas em câmara de Neubauer. A partir disso foi feita uma suspensão fúngica de densidade adequada para os ensaios utilizando-se uma multiplicidade de infecção (MOI) de 2 para os ensaios de fagocitose e sobrevivência fúngica, e uma MOI de 10 para os ensaios para coleta de sobrenadante e dosagem de citocinas.

Foi utilizado como opsonina o anticorpo monoclonal anticápsula 18B7 (doação do Prof. Dr. Arturo Casadevall, Johns Hopkins University, EUA). Nos ensaios de fagocitose as placas foram incubadas na estufa de CO_2 por 2h, já nos ensaios de sobrevivência fúngica e coleta de sobrenadante para dosagem de citocinas produzidas pelos macrófagos utilizou-se o tempo de interação de 24 horas.

Durante essa interação foram utilizados o CM e ácido pantotênico (AP), com o intuito de testar a atividade desses compostos. Para o CM cada poço foi tratado com a concentração final de 1X desse composto. O AP foi utilizado na concentração de 2mM por poço, esse valor foi escolhido com base nos resultados descritos no trabalho de Albuquerque e colaboradores (ALBUQUERQUE et al., 2013).

4.3.1 Fagocitose

Os seguintes grupos foram testados em triplicata técnica e biológica para a fagocitose: Macrófago+H99; Macrófago+H99+CM; Macrófago+H99+AP. Após as 2 horas de interação, os poços foram lavados gentilmente 3 vezes com PBS, com o intuito de retirar os fungos não fagocitados. Por fim, fez-se a coloração das células com o kit panótico onde se utiliza de 3 reagentes para a coloração dos macrófagos.

Para avaliar a fagocitose foram fotografados 4 campos de cada poço, e selecionados aleatoriamente 50 macrófagos por foto, totalizando a contagem de 200 macrófagos por poço. As fotos foram tiradas em microscópio invertido (Zeiss primovert). Foi utilizado o *software* ImageJ para auxiliar na contagem.

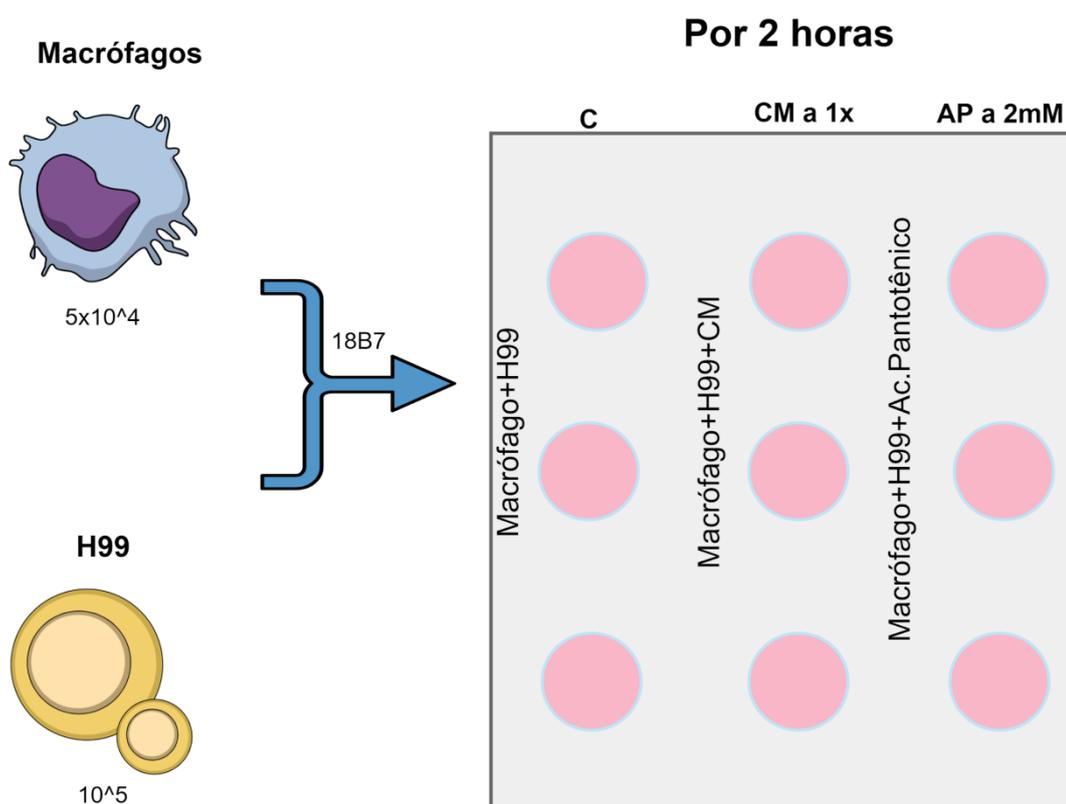


Figura 5: Esquema representativo da metodologia utilizada para o ensaio de fagocitose. Figura elaborada pela autora

4.3.2 Dosagem de citocinas

Para a dosagem de citocinas foram coletados os sobrenadantes dos poços após 24 horas de interação. Os grupos testados foram: somente o macrófago como controle negativo; macrófago infectado com H99; macrófago infectado com H99 na presença de 2mM de AP; macrófago com 2mM de AP; macrófago infectado com H99 na presença de CM; macrófago com CM; macrófago com LPS a 100 ng/ml como controle positivo.

As amostras foram armazenadas em freezer -20°C para posteriormente serem dosadas através da técnica de ELISA pelo kit DuoSet(R&D systems). As citocinas avaliadas foram: TNF-alfa, IL-6, IL-10 e MCP-1.

4.3.3 Ensaio de viabilidade fúngica

Para testar a viabilidade fúngica após a interação com os macrófagos foram realizadas 3 condições diferentes:

- 1) Interação macrófago-fungo por 24 horas sem remoção de leveduras extracelulares.

Nessa metodologia macrófagos foram infectados com células de *C. neoformans* na presença ou não dos compostos e as células foram incubadas por um período total de 24h, sem remoção de leveduras extracelulares. Nesse experimento excluímos possíveis efeitos do CM ou do AP na fagocitose e avaliamos a sobrevivência/multiplicação total do fungo durante a interação. Passadas às 24 horas, os macrófagos foram lisados com água estéril gelada (200 microlitros) e células fúngicas foram coletadas para contagem de unidades formadoras de colônia. Em linhas gerais, em microtubos já previamente rotulados para cada poço, coletava-se os 200 microlitros do sobrenadante da co-cultura, adicionou-se 200 microlitros de água estéril gelada nos poços para lisar os macrófagos, seguindo-se incubação por 20 minutos. Coletava-se novamente o volume de cada poço que era transferido para o mesmo microtubo da primeira etapa. Após essa etapa foram realizadas 3 lavagens

de cada poço com 200 microlitros de PBS, sendo o líquido das lavagens também coletado e transferido para o seu respectivo microtubo, totalizando um volume de 1ml coletado de cada poço. A seguir foram feitas 3 diluições de cada amostra (1:10, 1:100, 1:1000), e cada diluição foi inoculada em placas de meio sabouraud sólido que foram armazenadas em estufa 37° por 2 dias. Após esse período foi realizada a contagem das colônias.

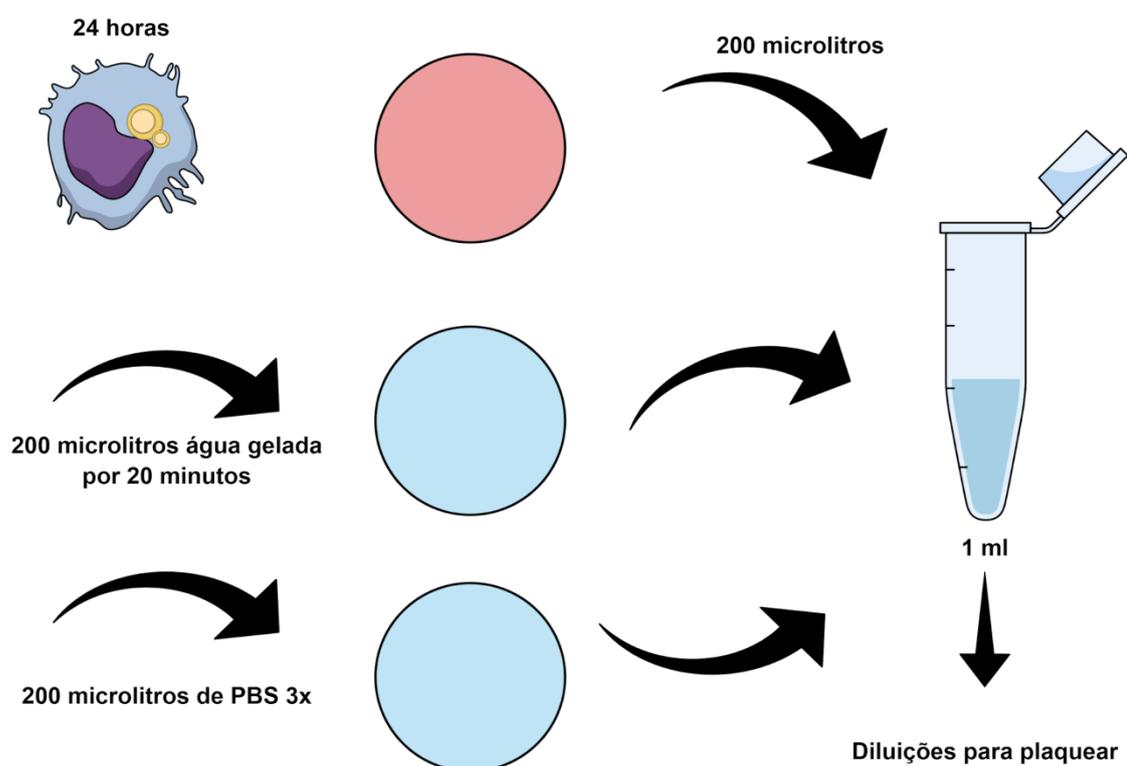


Figura 6: Esquema representativo das etapas da metodologia utilizada para avaliar a viabilidade do fungo após 24 horas de interação com macrófagos. Figura elaborada pela autora

- 2) Interação macrófago-fungo por 24 horas com um período de 2h horas de fagocitose na presença ou ausência dos tratamentos e remoção de leveduras extracelulares (metodologia 2+22 horas)

Nessa metodologia, após 2 horas de interação fungo-macrófago, realizou-se o descarte do volume do poço e gentilmente fez-se a lavagem dos poços com o intuito de retirar os fungos que não foram fagocitados. Depois, foi retornado o volume dos poços com meio RPMI suplementado com SFB, sem nenhum tratamento, voltando a placa para a estufa CO₂, onde permaneceu até completar 24 horas de ensaio. Coletou-se os 200 microlitros do sobrenadante da co-cultura, adicionou-se 200 microlitros de água estéril gelada nos poços para lisar os macrófagos, seguindo-se incubação por 20 minutos. Coletava-se novamente o volume de cada poço que era transferido para o mesmo microtubo da primeira etapa. Após essa etapa foram realizadas 3 lavagens de cada poço com 200 microlitros de PBS, sendo o líquido das lavagens também coletado e transferido para o seu respectivo microtubo, totalizando um volume de 1ml coletado de cada poço. A seguir foram feitas as diluições de cada amostra, e cada diluição foi inoculada em placas de meio Sabouraud sólido que foram armazenadas em estufa 37° por 2 dias. Após esse período foi realizada a contagem das colônias.

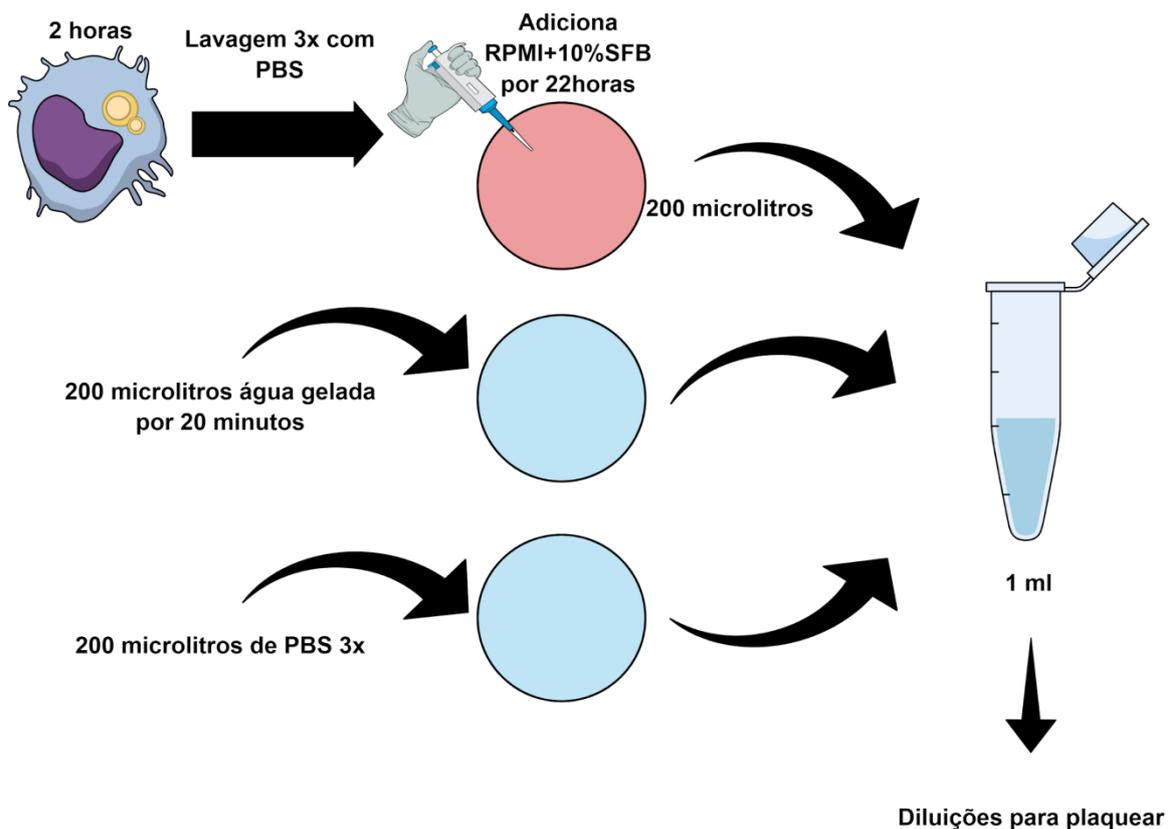


Figura 7: Esquema representativo das etapas da metodologia utilizada para avaliar a viabilidade do fungo após 2 horas de fagocitose na presença dos diferentes tratamentos, e posterior interação de macrófagos com leveduras intracelulares por mais 22 horas. Figura elaborada pela autora

3) Interação macrófago-fungo por 24 horas com separação das leveduras intracelulares e extracelulares antes da semeadura (metodologia INTRA/EXTRA)

Para esse ensaio, seguiu-se as 24 horas total de interação entre macrófagos e células fúngicas, sem o período inicial de fagocitose e remoção de leveduras extracelulares. Após a interação, foi realizada a separação de leveduras extracelulares das leveduras intracelulares antes da semeadura das células em meio sólido para a análise de viabilidade celular. Para isso, após as 24 horas de interação, o sobrenadante de cada poço, contendo as leveduras extracelulares foi coletado,

seguindo-se a isso, 4 lavagens delicadas com 200 microlitros de PBS para remoção do máximo possível de fungos extracelulares, totalizando 1 ml de volume em um tubo de microcentrifuga. Para coleta de leveduras intracelulares, adicionou-se 200 microlitros de água gelada estéril nos poços para a lise dos macrófagos que foram incubados por 20 minutos a 37°C. Após os 20 minutos foi feita a coleta do volume presente em cada poço, contendo as leveduras intracelulares, essa suspensão de células foi transferida para outro tubo de microcentrifuga. Cada poço foi então lavado 4 vezes com 200 microlitros de PBS para recuperação máxima de leveduras intracelulares.

Foi realizada as diluições de cada amostra e a inoculação em placas de meio Sabouraud sólido, que foram armazenadas em estufa 37° por 2 dias. Após esse período foi realizada a contagem das colônias.

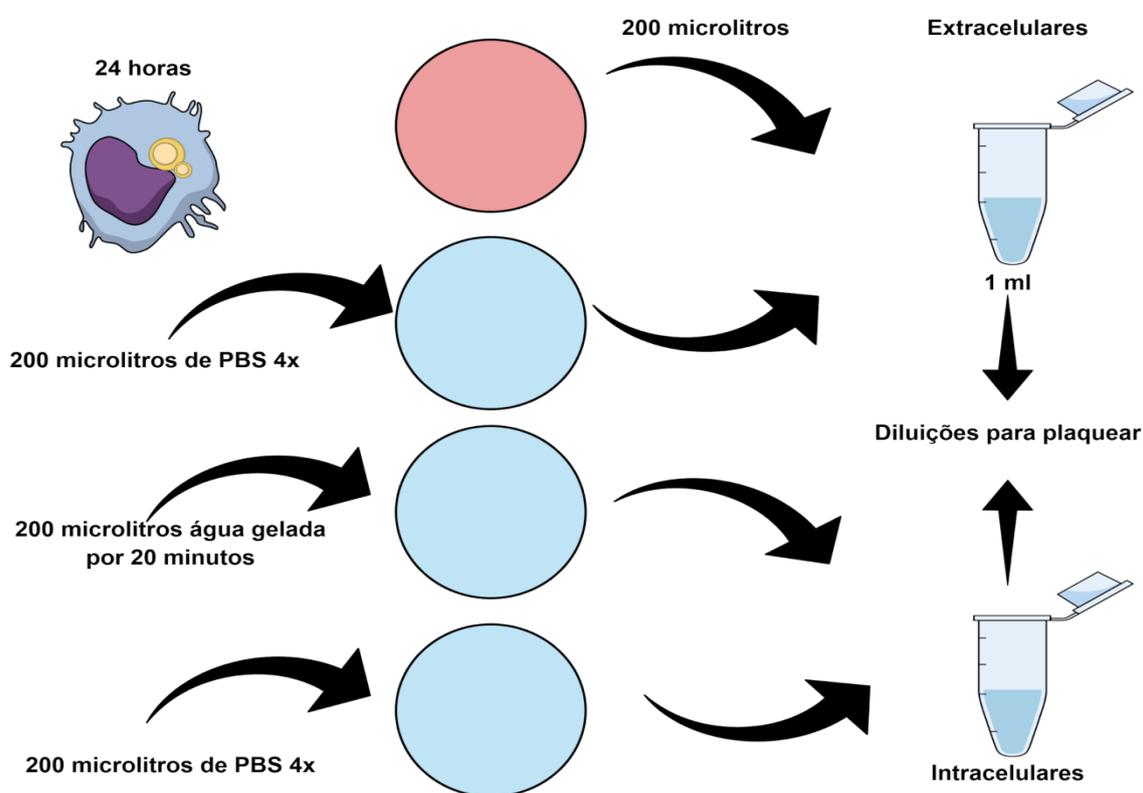


Figura 8: Esquema representativo das etapas da metodologia utilizada para avaliar se existia diferença na viabilidade dos fungos que se encontravam extracelulares dos intracelulares após 24 horas de interação com macrófagos. Figura elaborada pela autora

4.4 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 6. Para avaliar a porcentagem de fagocitose utilizou-se o teste qui-quadrado. Nos ensaios de viabilidade fúngica, dosagem de citocinas e índice fagocítico foi utilizado o teste ANOVA.

5 RESULTADOS

5.1 Fagocitose

Para observar se o ácido pantotênico causava alguma alteração no processo da fagocitose, realizou-se experimento de interação fungo-macrófago na presença ou ausência de CM ou de AP. Após o período de 2 horas, foi feita a lavagem para retirar os fungos não internalizados e a coloração panótica para observação da fagocitose por microscopia de luz. Através das fotos, foi realizada a contagem das leveduras internalizadas em 200 macrófagos por poço.

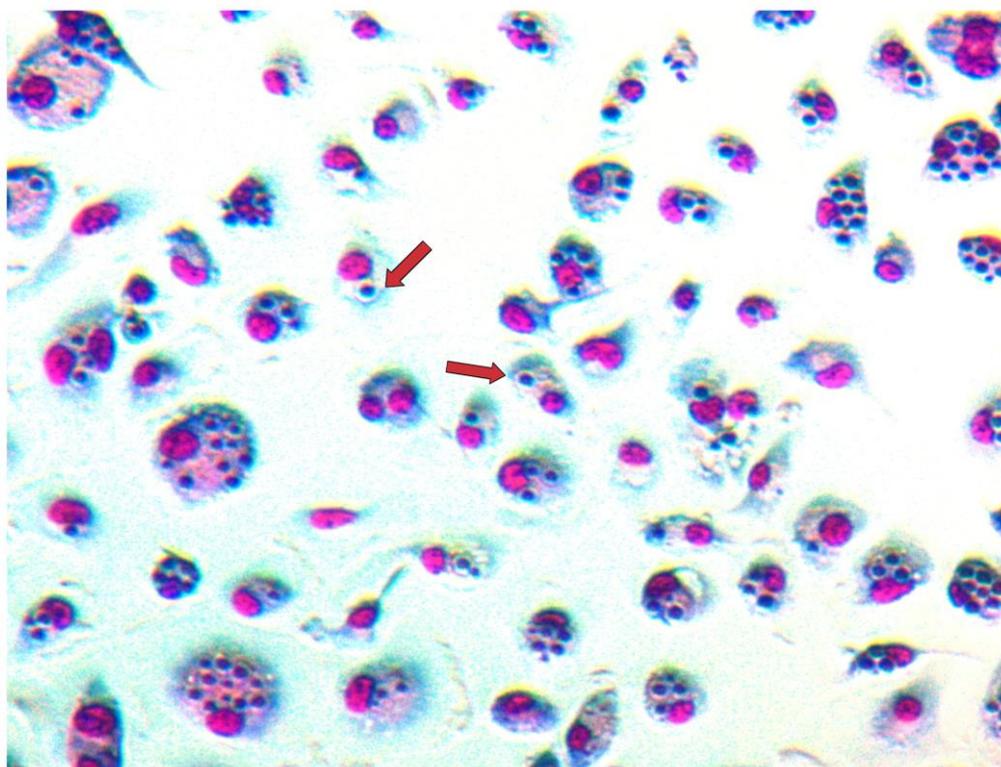


Figura 9: Imagem representativa da fagocitose de *C. neoformans* por macrófagos. Macrófagos foram infectados com *C. neoformans* (MOI=2) e após 2h de interação foram corados com Panótico para a observação da fagocitose de leveduras. As setas mostram a levedura internalizada. Imagem da autora

O experimento foi executado em triplicata técnica e biológica. Foram avaliados o índice fagocítico (Total de leveduras internalizadas/ macrófagos que fagocitaram) e a porcentagem de fagocitose (Total de macrófagos que fagocitaram/ pelo total de macrófagos).

Com relação à porcentagem de fagocitose, tanto o grupo AP quanto o grupo CM apresentaram um aumento no percentual de fagocitose em relação ao controle, ($p=0.002$ e $p=0,0349$ respectivamente) (Figura 10A). No entanto, não foram observadas diferenças em relação ao índice fagocítico entre os diferentes grupos conforme pode ser observado na figura 10B.

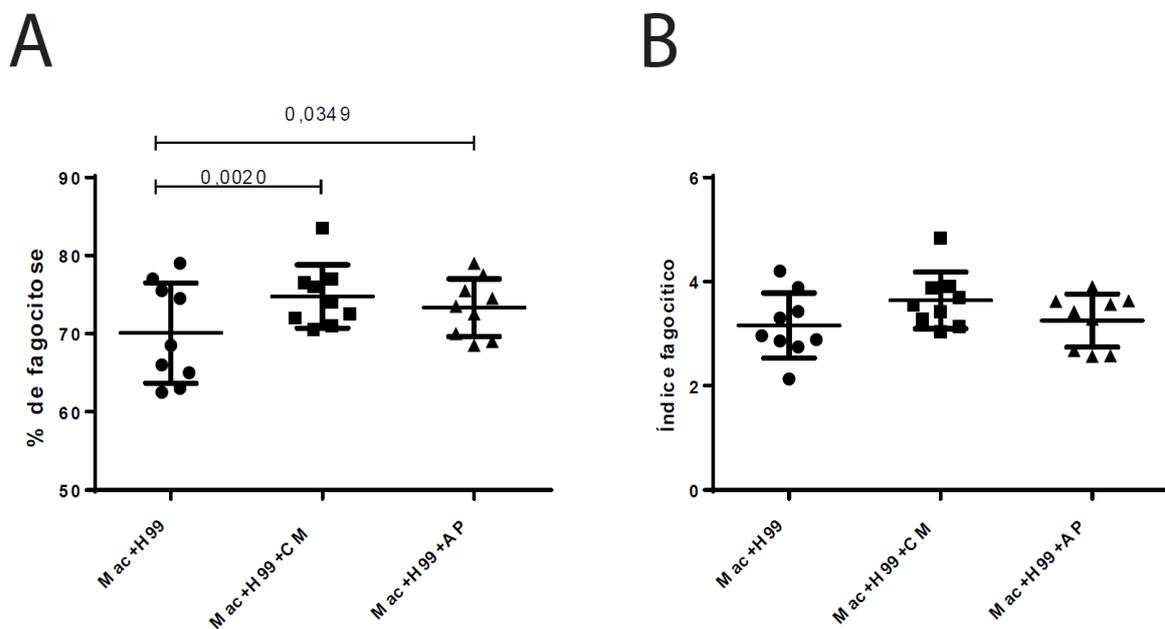


Figura 10: Avaliação da capacidade de fagocítica de macrófagos após interação com *C. neoformans*. Os macrófagos foram infectados com *C. neoformans* (MOI=2), tendo como opsonina o anticorpo anticápsula 18B7, após 2 horas de interação, as amostras foram coradas com corante panótico para observação da fagocitose por microscopia de luz. (A) Porcentagem de fagocitose e (B) índice fagocítico dos macrófagos, tratados ou não com CM (1X) e AP (2 mM). Foi realizada a contagem do número de leveduras internalizadas em 200 macrófagos por poço. A figura representa os resultados de três replicatas biológicas realizadas com três replicatas técnicas. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste qui-quadrado na porcentagem de fagocitose e o teste ANOVA para o índice fagocítico. As barras de erro representam o desvio padrão da média.

5.2 Dosagens de Citocinas

Para avaliar se a produção de citocinas era alterada com a presença do AP ou CM macrófagos foram co-incubados com *C. neoformans* por 24 horas na presença ou não de CM ou AP. Após esse período o sobrenadante das co-culturas foi coletado para a dosagem de citocinas através da técnica de ELISA. As citocinas escolhidas foram: TNF-alfa, MCP1, IL-10, IL-6.

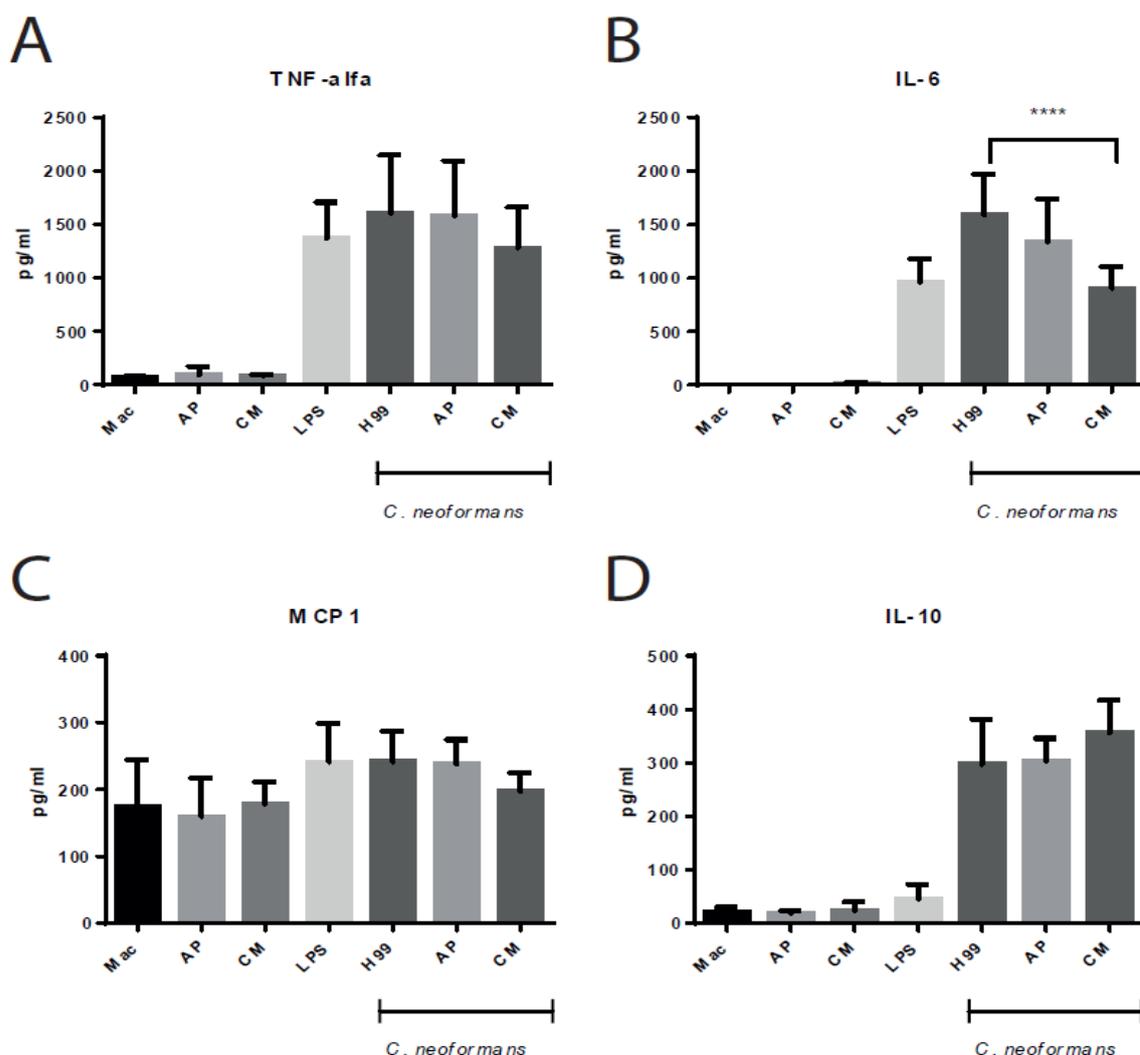


Figura 11: Avaliação por ELISA da produção de citocinas de macrófagos após a interação com *C. neoformans* (MOI 10) por 24 horas na presença ou não de CM (1x), AP (2mM) ou de LPS (100ng/ml). A) níveis de TNF-alfa. B) Níveis de IL-6. C) Níveis de MCP1. D) Níveis de IL-10. A figura representa resultados de três replicatas biológicas realizadas com três replicatas técnicas. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA. As barras representam o desvio padrão.

Como pode ser observado na figura 11 somente o tratamento com CM ou AP não foi capaz de estimular a produção das citocinas avaliadas. Existe uma produção basal da citocina MCP1, por isso seus níveis são detectados em todos os grupos, inclusive no controle sem nenhum tipo de estímulo, apesar disso não houve diferença estatística. Além disso, houve a redução da concentração de IL-6 no grupo dos macrófagos infectados com o fungo na presença do CM.

5.3 Sobrevivência/crescimento de *C. neoformans* após interação com macrófagos

A viabilidade fúngica após 24 horas de interação com os macrófagos foi avaliada em três condições diferentes.

Na primeira condição, após 2 horas de interação, realizou-se a remoção do sobrenadante da co-cultura e lavagem dos poços para remoção das células fúngicas não internalizadas. As culturas receberam novas alíquotas de meio RPMI suplementado com SFB, e foram incubadas em uma estufa CO₂ por mais 22 horas antes da lise dos macrófagos e semeadura dos fungos em meio Sabouraud sólido para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

Nessas condições podem-se observar os possíveis efeitos do CM ou do AP na interação de macrófagos apenas com leveduras que haviam sido inicialmente internalizadas.

O que se pode observar na figura 12 é que houve redução das unidades formadoras de colônias apenas no grupo em que os macrófagos e fungos interagiram na presença do AP.

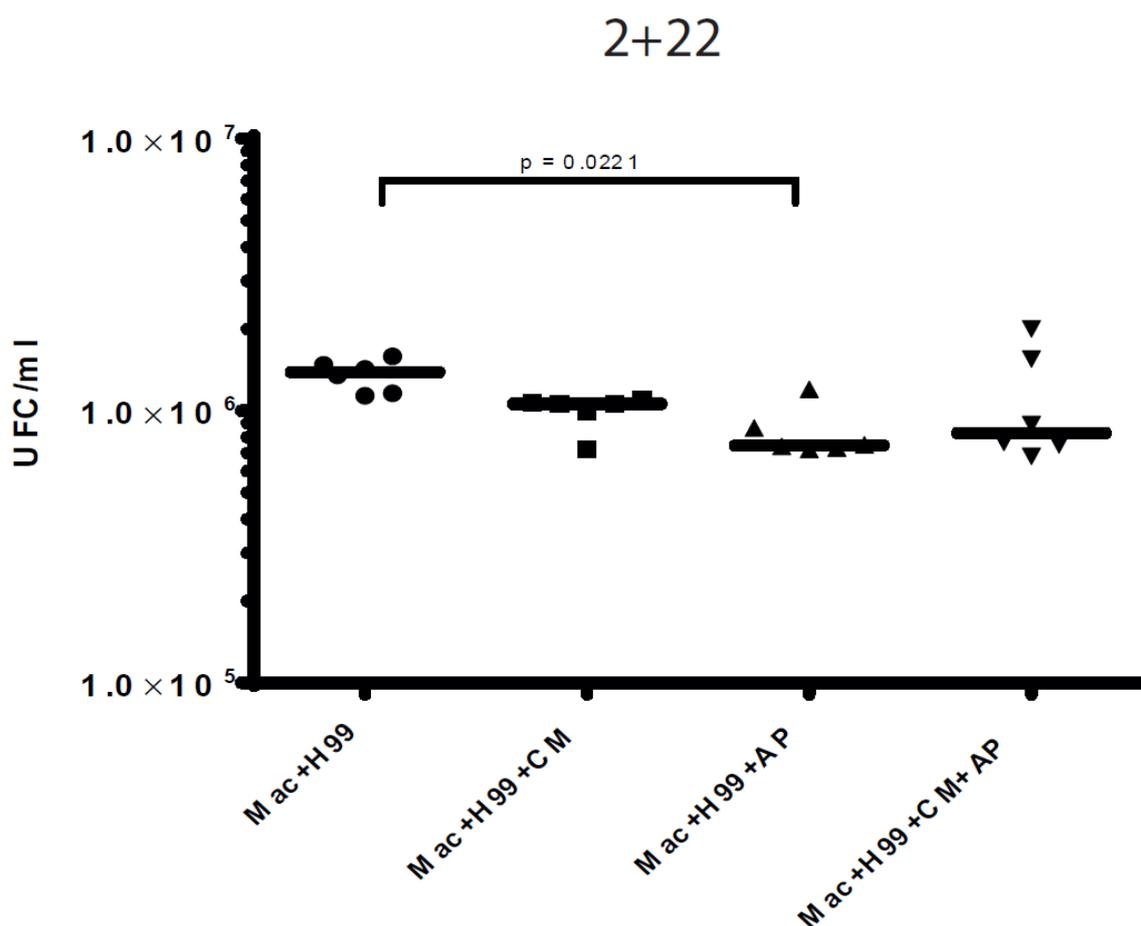


Figura 12: Contagem de unidades formadoras de colônia de leveduras intracelulares de *C. neoformans* após a interação com macrófagos por 24h (metodologia 2+22). Macrófagos e fungos foram co-cultivados para fagocitose por 2h, na presença ou não de CM, PA, ou das duas moléculas ao mesmo tempo, após esse período células fúngicas não internalizadas foram removidas, e a co-cultura recebeu uma nova alíquota de meio RPMI e foi incubada por outras 22h a 37°C em estufa CO₂. Após esse período as leveduras de cada poço (extracelulares + intracelulares juntas) foram coletadas para semeadura e contagem de UFCs. Foram realizadas 3 triplicatas biológicas com duplicatas técnicas. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste ANOVA.

Para excluir os possíveis efeitos dos tratamentos na fagocitose, foi feita a interação de macrófagos e fungos por 24 horas, na presença ou não dos compostos, mas sem a remoção de leveduras não internalizadas. Foram observadas alterações significativas na sobrevivência do fungo apenas quando eles eram expostos ao CM sozinho ou na presença de CM e AP (figura 13).

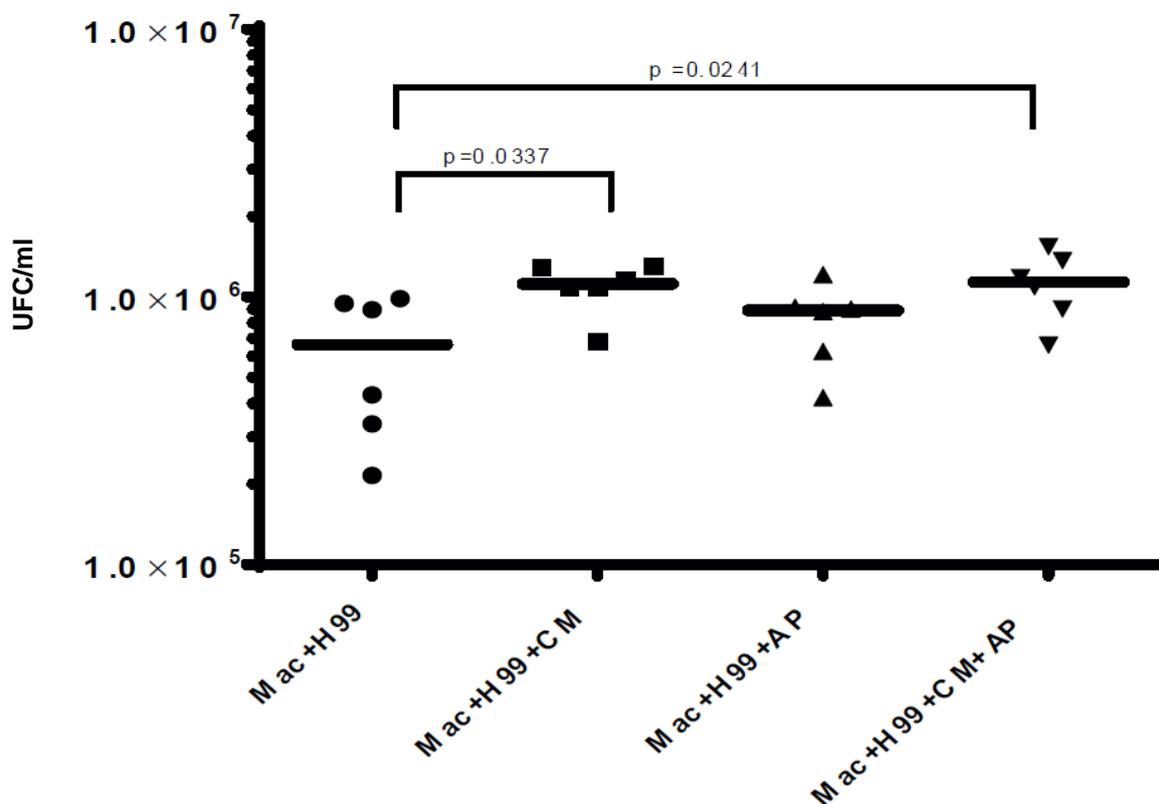


Figura 13: Número de UFC de *C. neoformans* após interação com macrófagos murinos derivados de medula óssea por 24 horas. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste ANOVA. As barras representam o desvio padrão.

Como nessa segunda abordagem não se pode excluir os efeitos dos diferentes tratamentos no crescimento de leveduras extracelulares, ou efeitos derivados de excitose-não lítica das leveduras, repetimos o experimento fazendo a separação de leveduras intracelulares e extracelulares após as 24 horas de interação e antes da semeadura para contagem de UFCs.

Não foi observada nenhuma diferença no número de células fúngicas viáveis intracelulares em nenhum dos grupos experimentais (Figura 14A). No entanto observamos um maior número de UFC nas amostras de leveduras extracelulares nos grupos tratados tanto com CM quanto no grupo onde houve o tratamento simultâneo com CM e AP (Figura14B).

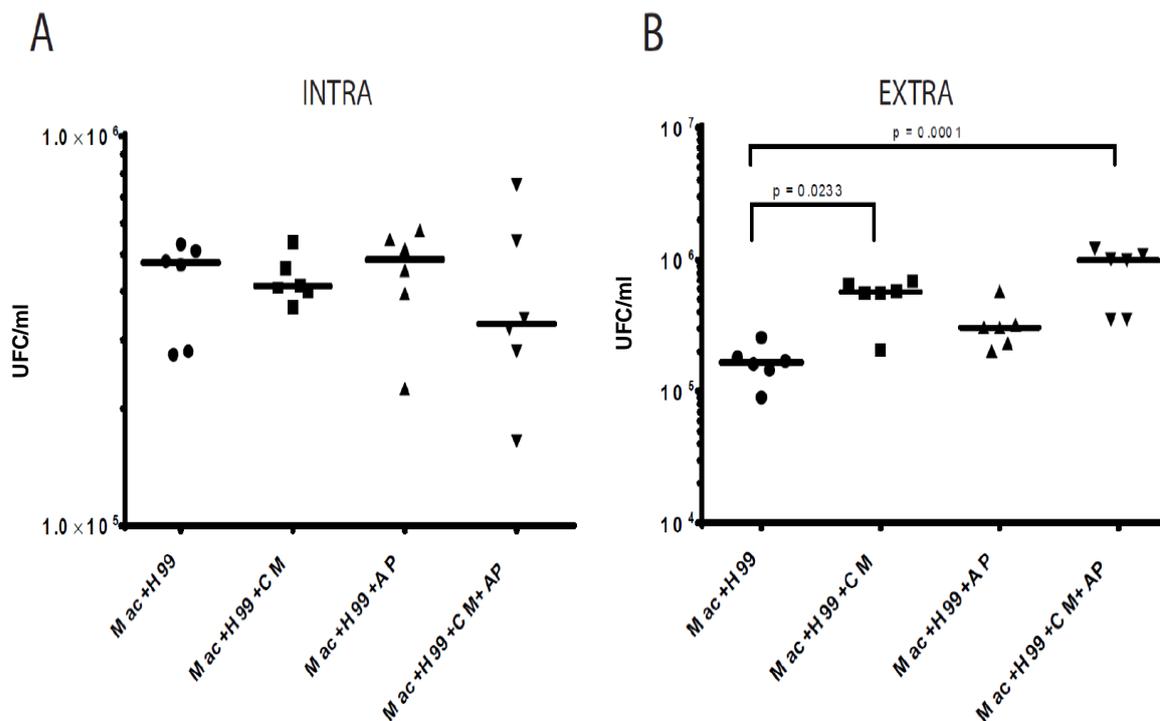


Figura 14: Número de UFC de *C. neoformans* após 24 horas de interação com macrófagos murinos derivados de medula óssea com separação de leveduras intracelulares e extracelulares após a interação (metodologia INTRA/EXTRA). A) CFU dos fungos intracelulares. B) CFU dos fungos extracelulares. Após as 24h de interação as células extracelulares do fungo foram separadas das células intracelulares antes da semeadura em meio ágar Sabouraud para contagem de unidades formadoras de colônia. Somente os fungos extracelulares tratados com CM mostraram diferença estatística em relação ao controle. Para a avaliação estatística foi utilizado o teste ANOVA.

6 DISCUSSÃO

O QS é um importante meio de comunicação para microrganismos, principalmente para os patogênicos, já que através da indução das QSM estes podem exibir fenótipos de virulência. A maioria dos trabalhos estudam QSM de bactérias, pois foi mais tardio o entendimento de que microrganismos eucariotos, como os fungos, também se comunicavam assim. Mas atualmente já se conhece QSMs em diversos fungos, e até já se sabe de algumas que possuem potencial para antifúngicos (MEHMOOD et al., 2019).

No trabalho de Albuquerque e colaboradores observou-se que o meio condicionado (CM) de *C. neoformans* possuía QSMs, que induziram a estimulação do crescimento do fungo, produção do polissacarídeo da cápsula e de melanina. Análises bioquímicas, incluindo espectrometria de massa, revelaram a presença de ácido pantotênico (AP) nas amostras, e testes com amostras comerciais dessa vitamina revelaram que ela era capaz de reproduzir os fenótipos observados, sugerindo que essa molécula, ou algum derivativo dela, era a molécula responsável por essas atividades (ALBUQUERQUE et al., 2013). No entanto, as concentrações de ácido pantotênico (AP) que reproduziam a atividade do meio condicionado eram muito maiores que as encontradas na cultura, sugerindo que as atividades observadas seriam derivadas de mais de uma QSM ou da presença de alguma modificação na molécula de AP, que aumentasse sua atividade. Como ainda não foram isoladas outras moléculas do CM que reproduzem as atividades, nem conseguimos ainda identificar um possível derivado do ácido pantotênico que possuísse maior atividade, utilizamos nos experimentos descritos neste trabalho o CM (menor que 1 KDa) e o ácido pantotênico comercial.

As QSM, além de regularem fenótipos dos próprios microrganismos que as produzem, podem também atuar em outras espécies e até mesmo entre diferentes reinos. Um exemplo interessante disso foi observado no trabalho de Vesty e colaboradores em que eles mostraram a influência das N-acil homoserinas lactonas (AHLs), uma QSM de bactérias, na germinação dos esporos de um musgo da espécie *Physcomitrella patens* (VESTY et al., 2020).

O corpo humano a todo o momento está em contato com microrganismos, sejam os já existentes em sua microbiota ou os ambientais. E as moléculas de comunicação, utilizadas pelos microrganismos, além de afetar as populações que dividem o mesmo habitat, também pode agir sobre as células do hospedeiro (DIXON e HALL, 2015), como mostrado no trabalho de Wu e colaboradores, em que a molécula autoindutora-2 (AI-2) de *Fusobacterium nucleatum*, uma bactéria do trato intestinal, pode induzir respostas inflamatórias e ativar diversas vias de sinalização em macrófagos (WU et al., 2020). Zawrotniak e colaboradores mostraram que o Farnesol desencadeia a indução das armadilhas extracelulares de neutrófilos (ZAWROTNIAK et al., 2019).

Sendo macrófagos células muito importantes na resposta imune contra *C. neoformans*, trabalhos anteriores do grupo já haviam testado e observado alguns efeitos imunomoduladores do CM de H99 em macrófagos murinos, e por esse motivo decidimos verificar se essa atividade provinha do AP.

No trabalho de Abe e colaboradores observaram que a adição de farnesol, uma QSM de *C. albicans*, além suprimir a atividade fagocítica, gerava uma toxicidade nos macrófagos de uma maneira dose dependente, reduzindo a viabilidade destas células (ABE et al., 2009). Em nosso trabalho mostramos uma elevação na porcentagem de fagocitose nos grupos tratados com CM e AP, porém essa elevação não foi acompanhada do aumento índice fagocítico, mostrando que os tratamentos não afetaram na quantidade de leveduras internalizadas pelos macrófagos nas condições testadas.

Outro dado avaliado neste trabalho foi a produção de algumas citocinas chaves na resposta imune a *C. neoformans* como MCP-1, Il-6, TNF-alfa e IL-10. A produção de citocinas é um fator importante nas respostas imunes, pois essas podem ditar o perfil de ativação das células, alterando assim o tipo ações exercidas durante os processos de interações patógeno-hospedeiro, sendo as do perfil pró-inflamatório consideradas mais protetivas na infecção por *C. neoformans* (GARELNABI E MAY, 2018). Assim decidimos avaliar se o AP poderia interferir na produção de citocinas dos macrófagos.

Dentre as citocinas dosadas em nossos experimentos estava a MCP-1, esta é uma quimiocina com potente fator de quimiotático de monócitos. Em modelo murino com infecção de *C. neoformans* no SNC ela se apresentou como uma citocina que media uma resposta imune celular protetora (UICKER et al., 2005). A MCP-1 pode ser produzida por macrófagos e outras células de maneira constitutiva ou após ser induzida, por exemplo, com fatores de crescimento (DESHMANE et al., 2009). Acreditamos ser esse motivo de detectar sua produção mesmo nas células sem nenhum tipo de estímulo. Apesar disso, em nossos experimentos não houve diferença estatística entre os grupos, mostrando que nem o CM nem o AP apresentaram atividade modulando essa citocina.

IL-6 e TNF-alfa são citocinas pró-inflamatórias, e em pacientes com AIDS estas foram associadas com um melhor prognóstico de meningite criptocócica (MORA et al., 2015; MUKAREMERA e NIELSEN, 2017). Trabalhos com a QSM farnesol, mostraram que os macrófagos e monócitos expostos a essa molécula aumentavam a produção dessas citocinas (GHOSH et al., 2010; LEONHARDT et al., 2015). Neste trabalho não foi observada diferença estatística na estimulação da produção dessas citocinas entre os grupos com os tratamentos, sem a presença do fungo. Porém, houve um decréscimo na produção de IL-6 nos macrófagos infectados com *C. neoformans* e tratados com CM em relação aos somente com o fungo, mostrando que outra molécula do CM, que não o AP, pode estar agindo na inibição dessa citocina.

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, ela faz a regulação negativa na inflamação, prevenindo o dano tecidual do hospedeiro na resposta a patógenos (SARAIVA e O'GARRA, 2010). Na resposta imune contra *C. neoformans* ela tem papéis diferenciados, existindo trabalhos demonstrando que sua produção é importante para proteção, já outros mostram que ela sinaliza pior prognóstico da doença, e até há os que dizem que ela não tem efeito, sendo essa variação devido aos sítios de infecção avaliados (MUKAREMERA e NIELSEN, 2017). Nos nossos experimentos só observamos a produção dessa citocina por macrófagos na presença do fungo.

Avaliamos a sobrevivência/crescimento do fungo de algumas maneiras diferentes. Quando a fagocitose das leveduras aconteceu por um período de 2h, na presença de CM ou AP, e após esse período as leveduras não internalizadas foram removidas, observamos uma diminuição no número de unidades formadoras de colônia apenas no grupo tratado com AP, sugerindo um possível aumento na capacidade microbicida de macrófagos ou uma diminuição na multiplicação intracelular do fungo nessa condição experimental, já que não observamos efeitos de AP na fagocitose de *C. neoformans*.

Quando macrófagos e fungos foram co-incubados durante um período total de 24 horas na presença de CM e/ou AP, sem que houvesse remoção de leveduras extracelulares, observamos um maior número de unidades formadoras de colônia apenas na presença de CM. Como nessa situação não podemos excluir os efeitos de CM sob as leveduras extracelulares, repetimos esse experimento de interação separando leveduras extracelulares das leveduras intracelulares antes da semeadura das mesmas. Nessa situação não observamos efeitos significativos no número de UFC de leveduras intracelulares, mas observamos um aumento no número de UFC nas amostras de leveduras extracelulares quando as células foram co-incubadas na presença de CM. Esse aumento observado pode ser explicado pela atividade já comprovada do CM no crescimento do fungo (ALBUQUERQUE et al., 2013), visto que não existe diferença entre os grupos intracelulares, sugerindo que muito provavelmente não houve a entrada dessas moléculas dentro do macrófago, ou não atingiram concentrações intracelulares estimulatórias. Apesar disso ainda é necessário investigarmos possíveis efeitos do CM no processo de exocitose não-lítica de macrófagos.

7 CONCLUSÕES

Nesse trabalho mostramos a interação entre a cepa H99 de *Cryptococcus neoformans* e macrófagos murinos derivados de medula, na presença de meio condicionado (1x) ou ácido pantotênico (2mM).

A interação por 2 horas na presença dos tratamentos levou a um aumento na porcentagem de fagocitose em relação ao controle, porém não houve diferença no índice de fagocitose.

A adição somente dos tratamentos por 24 horas não foi capaz de estimular a produção das citocinas IL-6, IL-10, TNF e MCP1 nos macrófagos. Porém ocorreu redução de IL-6 quando houve a interação do fungo com o CM, em relação ao grupo somente com o fungo.

Foi observada a redução das unidades formadoras de colônias (UFC) dos fungos intracelulares quando tratado com AP apenas nas duas primeiras horas da interação. Não houve diferença nas UFC dos fungos intracelulares quando expostos aos tratamentos por 24 horas. Já os fungos extracelulares que foram expostos ao CM demonstraram um aumento nas UFC.

8 PERSPECTIVAS

Assim, fica como perspectiva para os próximos estudos:

- i. Testar a modulação de outras citocinas pró-inflamatórias, já que na presença do fungo o CM inibiu a produção de IL-6.
- ii. Investigar se essas moléculas tem papel no processo da exocitose não-lítica na interação fungo-macrófago.
- iii. Realizar a sensibilização prévia dos macrófagos aos tratamentos, já que nos experimentos os tratamentos ocorreram simultâneos ao tempo de interação com o fungo.
- iv. Produzir e/ou purificar derivados do ácido pantotênico, para tentar confirmar se outras moléculas atuam no processo de quórum sensing de *C. neoformans*.

REFERÊNCIAS

- Abe, S., Tsunashima, R., Iijima, R., et al. 2009. Suppression of anti-Candida activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. *Microbiology and Immunology* 53(6), pp. 323–330.
- Agustinho, D.P., Miller, L.C., Li, L.X. and Doering, T.L. 2018. Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 113(7), p. e180040.
- Albuquerque, P. and Casadevall, A. 2012. Quorum sensing in fungi--a review. *Medical Mycology* 50(4), pp. 337–345.
- Albuquerque, P., Nicola, A.M., Nieves, E., et al. 2013. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* 5(1), pp. e00986-13.
- Alves Soares, E., Lazera, M.D.S., Wanke, B., et al. 2019. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(7), p. e0007569.
- Barriuso, J., Hogan, D.A., Keshavarz, T. and Martínez, M.J. 2018. Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* 42(5), pp. 627–638.
- Blasi, E., Barluzzi, R., Mazzolla, R., et al. 1995. Role of nitric oxide and melanogenesis in the accomplishment of anticryptococcal activity by the BV-2 microglial cell line. *Journal of Neuroimmunology* 58(1), pp. 111–116.
- Bowen, L.N., Smith, B., Reich, D., Quezado, M. and Nath, A. 2016. HIV-associated opportunistic CNS infections: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews. Neurology* 12(11), pp. 662–674.
- Brizendine, K.D., Baddley, J.W. and Pappas, P.G. 2013. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with Cryptococcosis according to immune status. *Plos One* 8(3), p. e60431.
- Camacho, E., Vij, R., Chrissian, C., et al. 2019. The structural unit of melanin in the cell wall of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Biological Chemistry* 294(27), pp. 10471–10489.
- Campuzano, A. and Wormley, F.L. 2018. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. *Journal of fungi (Basel)* 4(1).
- Casadevall, A., Coelho, C. and Alanio, A. 2018. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-Mediated Host Damage. *Frontiers in immunology* 9, p. 855.
- Casadevall, A., Fu, M.S., Guimaraes, A.J. and Albuquerque, P. 2019. The “Amoeboid Predator-Fungal Animal Virulence” Hypothesis. *Journal of fungi (Basel)* 5(1).

- Chang, Y.C. and Kwon-Chung, K.J. 1994. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Molecular and Cellular Biology* 14(7), pp. 4912–4919.
- Charlier, C., Nielsen, K., Daou, S., Brigitte, M., Chretien, F. and Dromer, F. 2009. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 77(1), pp. 120–127.
- Coelho, C., Bocca, A.L. and Casadevall, A. 2014. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology* 87, pp. 1–41.
- Cogliati, M. 2013. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica* 2013, p. 675213.
- Deeks, S.G., Overbaugh, J., Phillips, A. and Buchbinder, S. 2015. HIV infection. *Nature reviews. Disease primers* 1, p. 15035.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S. and Sawaya, B.E. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29(6), pp. 313–326.
- Dixon, E.F. and Hall, R.A. 2015. Noisy neighbourhoods: quorum sensing in fungal-polymicrobial infections. *Cellular Microbiology* 17(10), pp. 1431–1441.
- Elsegeiny, W., Marr, K.A. and Williamson, P.R. 2018. Immunology of cryptococcal infections: developing a rational approach to patient therapy. *Frontiers in immunology* 9, p. 651.
- Firacative, C., Lizarazo, J., Illnait-Zaragozı, M.T., Castaneda, E. and Latin American Cryptococcal Study Group 2018. The status of cryptococcosis in Latin America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 113(7), p. e170554.
- Ganendren, R., Carter, E., Sorrell, T., Widmer, F. and Wright, L. 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and Infection* 8(4), pp. 1006–1015.
- Garber, G. 2001. An overview of fungal infections. *Drugs* 61 Suppl 1, pp. 1–12.
- Garcia-Solache, M.A. and Casadevall, A. 2010. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *mBio* 1(1).
- Garelnabi, M. and May, R.C. 2018. Variability in innate host immune responses to cryptococcosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 113(7), p. e180060.
- Ghosh, S., Howe, N., Volk, K., Tati, S., Nickerson, K.W. and Petro, T.M. 2010. *Candida albicans* cell wall components and farnesol stimulate the expression of both inflammatory and regulatory cytokines in the murine RAW264.7 macrophage cell line. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 60(1), pp. 63–73.

Gibson, J.F. and Johnston, S.A. 2015. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology* 78, pp. 76–86.

Goldman, D.L., Khine, H., Abadi, J., et al. 2001. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics* 107(5), p. E66.

Heung, L.J. 2017. Innate immune responses to cryptococcus. *Journal of fungi (Basel)* 3(3).

Homer, C.M., Summers, D.K., Goranov, A.I., et al. 2016. Intracellular action of a secreted peptide required for fungal virulence. *Cell Host & Microbe* 19(6), pp. 849–864.

Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., et al. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7), pp. 2982–2992.

Kozel, T.R. and Bauman, S.K. 2012. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. *Expert opinion on medical diagnostics* 6(3), pp. 245–251.

Kronstad, J.W., Attarian, R., Cadieux, B., et al. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews. Microbiology* 9(3), pp. 193–203.

La Hoz, R.M. and Pappas, P.G. 2013. Cryptococcal infections: changing epidemiology and implications for therapy. *Drugs* 73(6), pp. 495–504.

Langford, M.L., Atkin, A.L. and Nickerson, K.W. 2009. Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by *Candida albicans*. *Future Microbiology* 4(10), pp. 1353–1362.

Lee, H., Chang, Y.C., Nardone, G. and Kwon-Chung, K.J. 2007. TUP1 disruption in *Cryptococcus neoformans* uncovers a peptide-mediated density-dependent growth phenomenon that mimics quorum sensing. *Molecular Microbiology* 64(3), pp. 591–601.

Leonhardt, I., Spielberg, S., Weber, M., et al. 2015. The fungal quorum-sensing molecule farnesol activates innate immune cells but suppresses cellular adaptive immunity. *mBio* 6(2), p. e00143.

Lin, X. and Heitman, J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 60, pp. 69–105.

Low, C.-Y. and Rotstein, C. 2011. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicine Reports* 3, p. 14.

LUTZ, M. B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*, v. 223, n. 1, p. 77-92,1999.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25(12), pp. 677–686.

Martinez, L.R. and Casadevall, A. 2006. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(3), pp. 1021–1033.

May, R.C., Stone, N.R.H., Wiesner, D.L., Bicanic, T. and Nielsen, K. 2016. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews. Microbiology* 14(2), pp. 106–117.

Maziarz, E.K. and Perfect, J.R. 2016. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America* 30(1), pp. 179–206.

Ma, H. and May, R.C. 2009. Chapter 5 Virulence in *Cryptococcus* Species. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 131–190.

Mehmood, A., Liu, G., Wang, X., Meng, G., Wang, C. and Liu, Y. 2019. Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(10).

Miller, M.F. and Mitchell, T.G. 1991. Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by human neutrophils and monocytes. *Infection and Immunity* 59(1), pp. 24–28.

Mitchell, T.G. and Perfect, J.R. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews* 8(4), pp. 515–548.

Mora, D.J., Fortunato, L.R., Andrade-Silva, L.E., et al. 2015. Cytokine profiles at admission can be related to outcome in AIDS patients with cryptococcal meningitis. *Plos One* 10(3), p. e0120297.

Mourad, A. and Perfect, J.R. 2018. Present and future therapy of cryptococcus infections. *Journal of fungi (Basel)* 4(3).

Mukaremera, L. and Nielsen, K. 2017. Adaptive Immunity to *Cryptococcus neoformans* Infections. *Journal of fungi (Basel)* 3(4).

Mukherjee, S. and Bassler, B.L. 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews. Microbiology* 17(6), pp. 371–382.

Osterholzer, J.J., Milam, J.E., Chen, G.-H., Toews, G.B., Huffnagle, G.B. and Olszewski, M.A. 2009. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 77(9), pp. 3749–3758.

O'Halloran, J.A., Powderly, W.G. and Spec, A. 2017. Cryptococcosis today: It is not all about HIV infection. *Current clinical microbiology reports* 4(2), pp. 88–95.

Padder, S.A., Prasad, R. and Shah, A.H. 2018. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiological Research* 210, pp. 51–58.

Pirofski, L. and Casadevall, A. 2015. What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity? *BMC Immunology* 16, p. 13.

Poulain, D. 2015. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical reviews in microbiology* 41(2), pp. 208–217.

Prado, M., Silva, M.B. da, Laurenti, R., Travassos, L.R. and Taborda, C.P. 2009. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(3), pp. 513–521.

Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., et al. 2017. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 17(8), pp. 873–881.

Robertson, E.J., Najjuka, G., Rolfes, M.A., et al. 2014. *Cryptococcus neoformans* ex vivo capsule size is associated with intracranial pressure and host immune response in HIV-associated cryptococcal meningitis. *The Journal of Infectious Diseases* 209(1), pp. 74–82.

Rudman, J., Evans, R.J. and Johnston, S.A. 2019. Are macrophages the heroes or villains during cryptococcosis? *Fungal Genetics and Biology* 132, p. 103261.

Saraiva, M. and O'Garra, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews. Immunology* 10(3), pp. 170–181.

Setianingrum, F., Rautemaa-Richardson, R. and Denning, D.W. 2019. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. *Medical Mycology* 57(2), pp. 133–150.

Skipper, C., Abassi, M. and Boulware, D.R. 2019. Diagnosis and Management of Central Nervous System Cryptococcal Infections in HIV-Infected Adults. *Journal of fungi (Basel)* 5(3).

Srikanta, D., Santiago-Tirado, F.H. and Doering, T.L. 2014. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast* 31(2), pp. 47–60.

Temfack, E., Boyer-Chammard, T., Lawrence, D., et al. 2019. New insights into *Cryptococcus* spp. biology and cryptococcal meningitis. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 19(10), p. 81.

Tian, X., He, G.-J., Hu, P., et al. 2018. *Cryptococcus neoformans* sexual reproduction is controlled by a quorum sensing peptide. *Nature Microbiology* 3(6), pp. 698–707.

- Uicker, W.C., Doyle, H.A., McCracken, J.P., Langlois, M. and Buchanan, K.L. 2005. Cytokine and chemokine expression in the central nervous system associated with protective cell-mediated immunity against *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 43(1), pp. 27–38.
- Vecchiarelli, A., Pericolini, E., Gabrielli, E., et al. 2013. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Future Microbiology* 8(9), pp. 1107–1116.
- Vesty, E.F., Whitbread, A.L., Needs, S., et al. 2020. Cross-kingdom signalling regulates spore germination in the moss *Physcomitrella patens*. *Scientific Reports* 10(1), p. 2614.
- Voelz, K., Lammas, D.A. and May, R.C. 2009. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 77(8), pp. 3450–3457.
- Watkins, R.A., King, J.S. and Johnston, S.A. 2017. Nutritional requirements and their importance for virulence of pathogenic cryptococcus species. *Microorganisms* 5(4).
- Whiteley, M., Diggle, S.P. and Greenberg, E.P. 2017. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551(7680), pp. 313–320.
- Wu, J., Wang, Y. and Jiang, Z. 2020. Immune induction identified by TMT proteomics analysis in *Fusobacterium nucleatum* Autoinducer-2 treated macrophages. *Expert Review of Proteomics*.
- Zaragoza, O. 2019. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence* 10(1), pp. 490–501.
- Zawrotniak, M., Wojtalik, K. and Rapala-Kozik, M. 2019. Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule of *Candida Albicans* Triggers the Release of Neutrophil Extracellular Traps. *Cells* 8(12).
- Zhao, Y., Lin, J., Fan, Y. and Lin, X. 2019. Life Cycle of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology* 73, pp. 17–42.

ANEXO



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

Brasília, 10 de setembro de 2012.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"CARACTERIZAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA SUSCETIBILIDADE IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO SISTÊMICA."**, UnBDOC n.º 52657/2011, sob responsabilidade da Profa. Ildinete Silva Pereira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. José Raimundo Corrêa
Coordenador da CEUA