

Tese de doutorado

Estudo de fatores associados à virulência e
imunidade na interação entre macrófagos e

Cryptococcus neoformans

Aluno: André Moraes Nicola

Orientador: Arturo Casadevall

Co-orientadora: Maria Sueli Soares Felipe

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Universidade de Brasília

Brasília-DF, primeiro de outubro de 2011

Agradecimentos

Esta tese jamais teria sido concluída sem a ajuda e o suporte de um número enorme de pessoas, às quais eu devo muito do que sou e consegui na vida. Em primeiro lugar, eu gostaria agradecer ao meu orientador Arturo Casadevall, uma fonte de conhecimento e inspiração e um mentor fiel e dedicado. Sou também muito grato à profa. Sueli Felipe, peça essencial na minha formação científica e que muito me ajudou durante a graduação e na reta final desta tese. Ao longo de todo o doutorado, eu tive grande suporte acadêmico da profa. Anamélia Bocca e do prof. Bergmann Ribeiro.

Uma parte importante desta tese também é fruto de colaborações com colegas, com os quais eu aprendi bastante. Em especial, eu gostaria de agradecer as colaborações de longa data com Patrícia Albuquerque, Magdia de Jesus, Emma Robertson, Carolyn Saylor, Helene Eisenman e Erin McClelland, essenciais para que os trabalhos desta tese pudessem ser feitos.

Minha formação como pesquisador também deve muito às duas instituições que me acolheram e às pessoas que as fazem o que são. Na UnB eu adquiri não só o conhecimento que me tornou um médico e um biólogo molecular, mas também aprendi como a ciência é feita. Em especial, eu gostaria de agradecer às professoras Ildinete e Andréa, sempre dispostas a me ajudar desde aprender a pipetar até defender a tese. No Einstein, eu fui muito bem recebido e ampliei bastante meu horizonte de conhecimentos. Eu sou grato pelo suporte oferecido durante minha estadia no Einstein (M&I e ID, IAS, AIF, Flow Cytometry core facility) e pelo pessoal de apoio técnico da BioMol (Fátima e Ivanilde) e da Patologia Molecular.

Talvez ainda mais importante do que os conhecimentos que eu adquiri, nos dez anos desde que eu entrei em um laboratório eu fiz excelentes amigos e vivi experiências que não têm preço. Na BioMol, eu conheci a Patty Girl, Viviane, Hugo, Túlio, Alessandra, João Ricardo, Larissa, Marcus, Antônio Américo e Paula, com quem eu dividi muitas reuniões da Confraria do Boteco, festas e viagens. Nos EUA eu conheci o Gustavo, Lurdinha e João, Magdia, Emma, Cara, Carolyn, Helene,

Erin, Carolina, Beza, Mauricio, Oscar, Luis, Allan, Márcio, Leonardo, Sabriya, Jacky, Julie, e muitos outros amigos que me mostraram como o mundo é maior do que eu imaginava.

As pessoas mais importantes para que tudo isso tenha acontecido são a minha família, e qualquer coisa que eu escrever não vai refletir quão grato eu sou por todo o apoio, carinho e amor de vocês. Durante cinco anos nos EUA, meus tios Regina e Roberto e Alice e Ira foram como segundos pais, cuidando de mim e da minha família e nos apresentando a um novo país. Eu vou sentir saudades dos almoços, conversas e passeios com vocês em Nova York. Eu queria também agradecer profundamente ao Pedro, meu grande companheiro de brincadeiras, e ao João, que sempre me serviu de exemplo e guia. Ao meu pai e minha mãe cabem os maiores créditos por esta tese. Além de terem me criado com muito amor e dedicação, vocês me mostraram desde cedo a importância da educação, me apoiaram em todas as minhas escolhas de vida e aguentaram minha ausência por causa da Medicina e da pesquisa. Espero poder ser para os meus filhos tão bom pai quanto vocês são. Aos mais novos membros da minha família, Dudu, Pedrinho (e futuros irmãozinhos e/ou irmãzinhas): quando vocês lerem esta tese daqui a muitos anos saibam que vocês são o projeto mais importante, gostoso e divertido da minha vida.

Por fim, eu dedico esta tese à Patty, que esteve comigo em todos os passos que levaram a esta tese. Você foi minha professora assim que eu entrei na BioMol, se tornou uma grande amiga e importante colaboradora científica, virou minha namorada, esposa e mãe dos meus filhos. Sem seus conselhos e puxões de orelha, mas também sem seu amor, carinho, companhia e tapiocas eu não seria quem eu sou hoje.

Índice

Resumo.....	1
Abstract	4
I – Introdução	6
<i>Cryptococcus neoformans</i> e criptococose.....	6
Imunologia da criptococose	10
Autofagia e seu papel na imunidade	12
III – Objetivos	18
IV, V e VI – Materiais e Métodos, Resultados e Discussão	19
Capítulo 1 – Uso de sondas fluorescentes para estudar vesículas extracelulares e a cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i>	29
Capítulo 2 – Mecanismos de ação dos anticorpos contra a cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i> ...	47
Capítulo 3 – Estudo da relação entre <i>Cryptococcus neoformans</i> e macrófagos por citometria de fluxo	94
Capítulo 4 – Papel da autofagia do macrófago na resposta imune à infecção por <i>Cryptococcus neoformans</i>	121
VII – Considerações finais.....	150
IX – Referências.....	153
X – Anexos.....	161

Índice de figuras

Figura 1 – A cápsula de <i>C. neoformans</i>	14
Figura 2 – A melanina de <i>C. neoformans</i>	15
Figura 3 – Ciclo da criptococose.....	16
Figura 4 – Estrutura de algumas das sondas utilizadas neste trabalho.....	39
Figura 5 – Coloração de vesículas extracelulares purificadas com dialquilcarbocianinas	40
Figura 6 – Vesículas intracelulares contêm RNA.....	41
Figura 7 – Coloração de células de <i>C. neoformans</i> com sondas lipofílicas.....	42
Figura 8 – Controles da coloração de células com dialquilcarbocianinas	43
Figura 9 – Coloração de <i>C. neoformans</i> com BODIPY-PC e DiI	44
Figura 10 – Coloração de fantasmas de melanina com DiI	45
Figura 11 – Coloração de vesículas extracelulares de <i>B. anthracis</i> com DiO	46
Figura 12 – Resultados do microarranjo	68
Figura 13 – Ligação de 18B7, 12A1 e 13F1 à cápsula	69
Figura 14 – Redução de XTT em células tratadas com 12A1.....	70
Figura 15 – Quantificação de ácidos graxos por cromatografia de camada delgada.....	71
Figura 16 – Ligação de 18B7 aumenta a susceptibilidade à anfotericina B	72
Figura 17 – Aumento da ligação de DiI à cápsula de células tratadas com 18B7	73
Figura 18 – Experimento de fagocitose com <i>C. neoformans</i> corado com DiI e DiIC ₁ (5).....	74
Figura 19 – Análise citométrica usada para separar as células transduzidas	76
Figura 20– Estratégia de varredura da biblioteca.....	77
Figura 21 – Efeito da interferência em Itgb1 na fagocitose mediada por IgG3.....	78
Figura 22 – Efeito de cátions divalentes na ligação de IgG3 a células J774	79
Figura 23 – Ligação de IgG1 e IgG3 na presença de diferentes concentrações de cátions divalentes ..	80
Figura 24 – Ligação de IgG1 e IgG3 na presença combinações de cátions divalentes	81
Figura 25 – Interferência com Itgb1 diminui a ligação de IgG3.....	82
Figura 26 – Efeito do nocaute condicional de Itgb1 em macrófagos primários na ligação e fagocitose por IgG3	83
Figura 27– Testes de fagocitose mediada por IgG3 em células normalmente não-fagocíticas	84
Figura 28 – Ganho de função com células CHO transfectadas com Itgb1 de camundongo.....	85

Figura 29 – Fagocitose de <i>C. neoformans</i> opsonizado com anticorpos quiméricos por células CHO-Itgb1	86
Figura 30 – Controles e compensação	103
Figura 31 – Estratégia de separação por citometria de fluxo para o ensaio de exocitose não-lítica....	104
Figura 32 – Análise de células J774 e de <i>C. neoformans</i> corados com várias sondas.....	105
Figura 33 – Estabilidade da coloração com CMFDA e DDAO-SE.....	106
Figura 34 – Validação do método citométrico	107
Figura 35 – Teste de fagocitose com <i>C. neoformans</i> encapsulado e acapsular	108
Figura 36 – Marcação de macrófagos e <i>C. neoformans</i> mortos por 7-AAD	109
Figura 37 – Teste de fagocitose por citometria de fluxo.....	110
Figura 38 – Medição de exocitose não-lítica por citometria de fluxo.....	111
Figura 39 – Validação do teste citométrico de exocitose não-lítica.....	112
Figura 40 – Exocitose não-lítica de <i>C. neoformans</i> mortos	113
Figura 41 – Replicação de macrófagos e exocitose não-lítica	115
Figura 42 – Esquema do experimento de exocitose não-lítica <i>in vivo</i>	117
Figura 43 – Exocitose não-lítica <i>in vivo</i>	118
Figura 44 – RNAi contra ATG5	135
Figura 45 – Ensaio de viabilidade de <i>C. neoformans</i> em células J774 com shRNA contra ATG5 ...	136
Figura 46 – Detecção de LC3 por imunofluorescência.....	137
Figura 47 – Formação do autofagossomo	138
Figura 48 – Microscopia eletrônica de transmissão.....	139
Figura 49 – Autofagia na exocitose não-lítica	140
Figura 50 – Curvas de sobrevivência de camundongos ATG5 ^{flox}	141
Figura 51 – Carga fúngica pulmonar e cerebral.....	142
Figura 52 – Histopatologia dos pulmões de camundongos ATG5 ^{flox} infectados.....	144
Figura 53 – Imunohistoquímica para Ym-1	145

Índice de tabelas

Tabela 1 – Linhagens de <i>C. neoformans</i>	22
Tabela 2 – Sondas fluorescentes	23
Tabela 3 – Anticorpos monoclonais.....	25
Tabela 4 – Células de mamífero em cultura.....	27
Tabela 5 – Linhagens de camundongos	28
Tabela 6 - Genes cuja expressão foi alterada por 18B7	87
Tabela 7 - Validação do microarranjo de 18B7 por RT-PCR em tempo real.....	88
Tabela 8 - Genes cuja expressão foi alterada por 12A1	89
Tabela 9 - Validação do microarranjo de 12A1 por RT-PCR em tempo real.....	91
Tabela 10 - Genes cuja expressão foi alterada por 13F1	92
Tabela 11 - Validação do microarranjo de 13F1 por RT-PCR em tempo real	93
Tabela 12 – Efeito dos compostos neutralizadores na taxa de exocitose não-lítica.....	119
Tabela 13 – Comparação das taxas de exocitose não-lítica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	120
Tabela 14 – Exocitose não-lítica em células com shRNA contra ATG5	146
Tabela 15 – Dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas J774 infectadas	147
Tabela 16 – Dosagem de citocinas nos pulmões de camundongos infectados	149

Abreviações

ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AF488	Alexa Fluor 488
APC	Alofocianina
BHI	Infusão de cérebro e coração
BSA	Bovine Serum Albumin
CHO	Chinese Hamster Ovary cell
CR3	Complement Receptor 3
CR4	Complement Receptor 4
DAB	3,3-diaminobenzidina
DME	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimetilssulfóxido
DTAF	5 - (4,6 - Diclorotriazinil)aminofluoresceína
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter
GO	Gene Ontology
HRP	Horseradish peroxidase
L-DOPA	L-3,4-dihidroxi-fenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo
MDMO	Macrófago derivado da medula óssea
NIH	National Institutes of Health
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RNAi	Interferência de RNA
RT-PCR	Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction
shRNA	Short hairpin RNA
SSC-A	Side scatter
TLC	Thin layer chromatography
TRITC	Isotiocianato de tetrametil-rodamina
UFC	Unidade formadora de colônia

Resumo

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada patogênica, causadora de meningoencefalite severa. Estima-se uma incidência anual de um milhão de casos de criptococose no mundo, com mais de 600.000 mortes. O desenvolvimento da criptococose se correlaciona fortemente com o estado imunitário do paciente, sendo os macrófagos as principais células efetoras na resposta imune contra esse fungo. O objetivo desta tese é estudar fatores do hospedeiro e do patógeno que sejam importantes durante a interação entre *C. neoformans* e macrófagos.

Os trabalhos desta tese foram divididos em quatro capítulos baseados em quatro objetivos específicos. O primeiro objetivo foi estudar vesículas extracelulares de *C. neoformans*, utilizadas pelo fungo para secretar polissacarídeos capsulares e outros fatores de virulência. Sondas lipofílicas mostraram vesículas na superfície da cápsula e sugeriram que estas estruturas possuem RNA. Outros dois projetos também mostraram a importância das vesículas na melanização de *C. neoformans* e na secreção de toxinas por *Bacillus anthracis*.

Outro tema abordado foi o mecanismo de ação de anticorpos monoclonais contra a cápsula de *C. neoformans*. Experimentos de expressão gênica feitos com fungos expostos a anticorpos monoclonais sugeriram indução da biossíntese de ácidos graxos. Esta alteração metabólica foi confirmada por métodos bioquímicos e se correlacionou com um aumento na susceptibilidade ao antifúngico anfotericina B, sugerindo que anticorpos ajam também alterando o metabolismo do patógeno. Em outro trabalho, foi feita uma varredura com biblioteca de RNAs de interferência para identificar o receptor de superfície do isotipo IgG3 murino. A interferência com um dos genes identificados na varredura, a integrina beta 1 (Itgb1), levou a diminuição da ligação deste isotipo à superfície de macrófagos e da fagocitose mediada por IgG3, sem nenhum efeito na função do isotipo IgG1. Estes resultados

sugerem que Itgb1 possa ser o receptor específico deste isotipo de IgG murino, que vem sendo procurado há três décadas.

Foram também estudadas por citometria de fluxo a cinética da fagocitose e a exocitose não-lítica de *C. neoformans*, um fenômeno descrito recentemente pelo qual o fungo é expelido pelo macrófago sem que nenhuma das duas células morra. Drogas que neutralizam a acidez do fagolisossomo alteraram a taxa de exocitose não-lítica, indicando que o pH deste compartimento é importante para a liberação do fungo. Adicionalmente, a metodologia citométrica foi utilizada para medir exocitose não-lítica em pulmões de camundongo, com aproximadamente 45% em comparação com taxa de pouco menos de 10% *in vitro*. Estes resultados sugerem que a exocitose não-lítica ocorra durante a criptococose, com importantes implicações no entendimento desta doença.

Por fim foi testada a hipótese de que a autofagia do macrófago seja importante na resposta imune contra *C. neoformans*. A autofagia é um mecanismo conservado em eucariotos para a reciclagem de material intracelular que tem sido implicado na imunidade contra um número cada vez maior de patógenos intracelulares. Experimentos de imunofluorescência mostraram fagossomos contendo *C. neoformans* positivos para o marcador de autofagossomos LC3. RNA de interferência contra ATG5, um gene essencial para autofagia, diminuiu a atividade antifúngica de macrófagos e as taxas de exocitose não-lítica e aumentou a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α , IL-12 e IFN- γ . Camundongos com nocaute condicional de ATG5 não apresentaram nenhuma diferença de sobrevivência em relação aos controles após infecção por *C. neoformans*. Entretanto, estes animais tiveram uma resposta imune com melhor balanço Th1/Th2 que resultaram em menor carga fúngica e diferenças no padrão histopatológico pulmonar. Estes resultados sugerem que a autofagia tem múltiplos papéis na imunidade contra *C. neoformans*.

Em conjunto, estes trabalhos esclarecem alguns pontos na importante relação entre *C. neoformans* e macrófagos do hospedeiro e podem servir como base para trabalhos translacionais que melhorem a profilaxia ou terapêutica da criptococose.

Abstract

Cryptococcus neoformans is an encapsulated pathogenic yeast that causes severe meningoencephalitis. It is estimated that over one million cases of cryptococcosis occur each year, with about 600,000 deaths. Macrophages are the main effector cells in immunity against this fungus. The objective of this thesis is to study host and pathogen factors that are important during the interaction between *C. neoformans* and macrophages.

The work described in this thesis has been divided in four chapters based in four specific objectives. The first objective was to study *C. neoformans* extracellular vesicles, used by the fungus to secrete capsular polysaccharide and several other virulence factors. Lipophilic probes revealed vesicles on the capsule surface and suggested that they may carry RNA. Two other projects also showed the importance of extracellular vesicles in *C. neoformans* melanization and *Bacillus anthracis* toxin secretion.

Another subject was the mechanism of action of monoclonal antibodies to the *C. neoformans* capsule. Gene expression studies made with *C. neoformans* that had been exposed to monoclonal antibodies suggested an induction of fatty acid biosynthesis. This metabolic alteration was confirmed using biochemical methods and correlated with increased susceptibility to the antifungal amphotericin B, suggesting that antibodies also act by altering the metabolism of the pathogen. Another project involved screening an RNAi library to search for the cell surface receptor of murine IgG3. Interference with one of the genes identified in the screening, integrin beta 1 (Itgb1), resulted in decreased binding of this antibody to macrophage surface and impaired IgG3-mediated phagocytosis, with no effect in the function of IgG1. These results suggest that Itgb1 may be the specific murine IgG3 receptor, which has been pursued for over three decades.

The kinetics of phagocytosis and non-lytic exocytosis, a recently described phenomenon in which *C. neoformans* is expelled from macrophages without harm to either cell type, were also studied using flow cytometry. Drugs that neutralize the phagolysosomal acidity altered the non-lytic exocytosis rates, indicating that the pH inside this compartment influences fungal release. Additionally, the cytometric methodology was used to measure non-lytic exocytosis in mouse lungs, with a rate of approximately 45% in comparison with 10% *in vitro*. The suggestion that non-lytic exocytosis happens during cryptococcosis could have important implications in understanding this disease.

Lastly, the hypothesis that macrophage autophagy is involved in the immune response against *C. neoformans* was tested. Autophagy is a mechanism conserved in all eukaryotes to recycle intracellular material and has been implicated in immunity against an ever-growing list of intracellular pathogens. Immunofluorescence showed *C. neoformans*-containing phagosomes positive for the autophagosome marker LC3. RNA interference against ATG5, a gene that is essential for autophagy, decreased macrophage antifungal activity and non-lytic exocytosis and increased secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , IL-12 and IFN- γ . ATG5 conditional knockout mice had no survival difference compared to controls after infection with *C. neoformans*. However, these animals had an immune response with better Th1/Th2 balance that resulted in lower fungal burden and different histopathological pattern in the infected lungs. These results suggest that autophagy has multiple roles in immunity against *C. neoformans*.

As a whole, the work described in this thesis clarify some points in the important interaction between *C. neoformans* and host macrophages and could be the basis for future translational studies that could improve cryptococcosis prophylaxis or therapy.

I – Introdução

***Cryptococcus neoformans* e criptococose**

C. neoformans é uma levedura encapsulada e o agente etiológico da criptococose, uma micose sistêmica severa. O fungo foi isolado inicialmente no final do século XIX por Sanfelice a partir de suco de pêssigo fermentado, mas poucos anos depois foi também encontrado em lesões humanas [1]. Até a década de 1980, a criptococose era bastante rara, assim como os estudos sobre o fungo. Neste período os isolados de *C. neoformans* eram classificados em quatro sorotipos (A-D) de acordo com sua reatividade a soros de coelho [1] e em três variedades, *neoformans*, *grubii* e *gattii*. Em 2002, a partir de uma série de estudos moleculares, foi proposta a separação de uma nova espécie, *C. gattii* [2], restando então à espécie *C. neoformans* as outras duas variedades. De maneira geral, linhagens de sorotipos B e C correspondem a *C. gatti* e são isolados de pacientes imunocompetentes. Linhagens do sorotipo A costumam ser *C. neoformans* var. *grubii* e são as mais frequentemente isoladas a partir de pacientes com meningoencefalite, enquanto o sorotipo D em geral é *C. neoformans* var. *neoformans* [3, 4].

C. neoformans possui um grande número de fatores de virulência. O mais estudado deles é sem dúvida a cápsula, a característica mais marcante da célula de *C. neoformans* observada ao microscópio (Figura 1). A cápsula é composta principalmente de carboidratos e tem três componentes principais:

- Glucuronoxilomanana (GXM): É o principal componente da cápsula, correspondendo a aproximadamente 92% da massa total dela. Estruturalmente, é uma α -(1,3)-manana com cadeias laterais de β -(1,2)-ácido glicurônico, β -(1,2)-xilose ou β -(1,4)-xilose [5].

- Galactoxilomanana (GalXM): Junto com as manoproteínas, responde pelos 8% restantes da massa da cápsula. Sua estrutura consiste de uma α -(1,6)-galactana com cadeias laterais de oligossacarídeos contendo manose, xilose e galactose [6]. Recentemente, foi proposta a nomenclatura de GXMGal após a descoberta de que este polissacarídeo também pode conter ácido glicurônico [7].
- Manoproteínas (MP): Único componente capsular altamente imunogênico, são proteínas ligadas a glicanas ricas em resíduos de manose [8]).

A cápsula torna a ingestão de células de *C. neoformans* por fagócitos do hospedeiro extremamente ineficaz na ausência de opsoninas [9]. Além dessa função protetora, a cápsula também tem funções ofensivas. Os carboidratos capsulares GXM e GalXM também são secretados pelo fungo para o meio [9], alterando atividades de linfócitos T e macrófagos e diminuindo efetividade da resposta imune [10].

Um segundo fator de virulência bastante estudado em *C. neoformans* é a melanina, um pigmento escuro formado pelo fungo a partir de substratos difenólicos em uma reação catalizada pela enzima lacase (Figura 2) [11]. Em condições nas quais esta enzima é induzida, a lacase é sintetizada e transportada para a parede celular [12], onde ela cataliza a formação de uma camada de pequenas esferas de material amorfo em volta da parede celular [13]. Mutantes com deleção da lacase são hipovirulentos em camundongo, confirmando o papel da melanina durante a infecção [14].

A capacidade de crescer a 37°C é o outro dos “três grandes” fatores de virulência de *C. neoformans* [15]. O gênero *Cryptococcus* segue a regra geral do reino Fungi de que a maioria destes microrganismos é incapaz de crescer à temperatura encontrada em hospedeiros mamíferos, com *C. neoformans* sendo uma exceção. Por esse motivo, a endotermia de mamíferos foi proposta como tendo sido selecionada ao longo da evolução por conferir

imunidade à grande maioria dos fungos patogênicos [16]. Vários outros fatores de virulência de *C. neoformans* já foram descritos além dos “três grandes”, como as enzimas secretadas urease [17], fosfolipase B [18] e fosfolipase C [19].

A cápsula, a melanina e as enzimas secretadas têm em comum o fato de serem dependentes de sistemas de secreção [12, 20-22]. Como essas moléculas sintetizadas dentro da célula desempenham suas funções essenciais para patogenicidade fora dela, os mecanismos de secreção em *C. neoformans* se tornaram um grande campo de estudos [23]. Uma importante descoberta neste campo foi feita em 2007, quando foi demonstrado o acúmulo de vesículas extracelulares no sobrenadante de culturas de *C. neoformans* [24]. Estas vesículas, com 60-300 nm de diâmetro, contêm glucosilceramida, GXM, urease e mais uma grande variedade de outras proteínas envolvidas na virulência do fungo [25]. Vesículas extracelulares semelhantes também foram encontradas em diversos outros fungos, patogênicos ou não [26-28], assim como em culturas de *Mycobacterium tuberculosis* [29] e *Bacillus anthracis* [30].

A criptococose causada por *C. neoformans* acomete principalmente pessoas com depressão severa da imunidade celular, enquanto a doença causada por *C. gattii* acomete mais frequentemente pessoas imunocompetentes. Estima-se que por ano ocorram pouco mais de um milhão de novos casos da doença e aproximadamente 600.000 mortes [31].

Infecções por *C. neoformans* podem acometer praticamente qualquer órgão. Entretanto, na grande maioria dos casos de criptococose o fungo é isolado do sistema nervoso central. A meningoencefalite criptocócica cursa com sintomas como confusão mental, dor de cabeça, vômitos e coma. O diagnóstico é feito por observação direta com tinta nanquim e cultura do líquido cefalorraquidiano, assim como por meio de sorologia para detecção de GXM. O tratamento específico da criptococose é feito principalmente com a combinação de

flucitosina com anfotericina B intravenosa [32]. Este esquema terapêutico, no entanto, tem um custo elevado por exigir internação e uma alta taxa de efeitos adversos graves, como insuficiência renal aguda, de 49% a 65% [33]. Apesar do tratamento adequado, 20% dos pacientes com meningoencefalite criptocócica morrem em dois meses [32]. A meningoencefalite criptocócica é uniformemente fatal na ausência de tratamento.

Como sugerido pelo isolamento de *C. neoformans* tanto de frutas quanto de pacientes no final do século XIX, hospedeiros mamíferos não são o único habitat deste fungo. Na natureza, ele pode ser encontrado no solo e em árvores, especialmente em regiões contaminadas com fezes de pombos. A criptococose se inicia pela inalação de partículas do fungo a partir destas fontes ambientais. Após esta infecção, o patógeno é eficientemente contido, mas não completamente erradicado por uma reação imune granulomatosa. Este estado latente continua sem prejuízo ao hospedeiro até que apareçam deficiências na imunidade celular como a AIDS ou imunossupressão pós-transplante [34].

Um estudo sorológico populacional feito nos EUA mostrou que mais da metade das crianças de dois a cinco anos de idade já possuíam anticorpos contra *C. neoformans* [35]. Como a criptococose é extremamente rara em crianças imunocompetentes, este estudo demonstra que esta infecção inicial por *C. neoformans*, que em geral tem pouco ou nenhum sintoma, ocorre durante a infância na maioria das pessoas. Outro estudo epidemiológico americano feito entre 1992 e 1994 mostrou que a incidência anual de criptococose em pessoas sem nenhum tipo de imunocomprometimento detectável varia de 2 a 9 casos por milhão de pessoas; em comparação, esta taxa de incidência variou entre 17.000 e 66.000 casos por milhão de pessoas infectadas com HIV. Isto significa que a deficiência na resposta imune celular aumenta em quase três ordens de magnitude o risco da infecção latente por *C. neoformans* se espalhar e causar doença, o que demonstra a importância de se conhecer melhor os mecanismos responsáveis pela resposta imune a *C. neoformans*.

Imunologia da criptococose

Além de informações epidemiológicas, muitas informações sobre a criptococose vieram de estudos com modelos animais. Após serem inaladas, as células de *C. neoformans* se alojam nos alvéolos pulmonares. Em quatro horas, mais de 80% das leveduras é fagocitada por macrófagos alveolares [36]. Após a fagocitose, macrófagos tentam matar o fungo através da maturação do fagossomo e sua fusão com lisossomos. Este processo, no entanto, não é muito eficiente e o patógeno sobrevive dentro destas células fagocíticas [37]. Esta interação entre macrófagos e *C. neoformans* é tão importante que estudos com roedores e pacientes humanos mostram que o resultado da infecção se correlaciona com o resultado da interação entre o fungo e macrófagos [38-40].

Além da fagocitose e formação do fagolisossomo, os macrófagos desempenham outros dois papéis importantes na imunidade inata contra *C. neoformans*. Eles secretam citocinas e quimiocinas que atraem outras células do sistema imune e modulam sua atividade [41-46] e apresentam antígenos [47, 48]. Quando se inicia a resposta imune adquirida, os macrófagos mais uma vez representam um papel efetor importante. A ativação de células T CD4+ leva a produção de citocinas do tipo Th1 como IFN- γ . A presença destas citocinas gera macrófagos classicamente ativados, que aumentam sua atividade contra *C. neoformans* e mantêm a infecção sob controle [49]. Em algumas ocasiões, entretanto, os macrófagos são expostos principalmente a citocinas do tipo Th2, como IL-4 e IL-13. Nesta situação, são gerados os macrófagos alternativamente ativados, cuja atividade antifúngica é insuficiente para controlar a replicação de *C. neoformans* e que permitem que a infecção se espalhe [50].

Outro aspecto importante da interação entre macrófagos e *C. neoformans* é o fenômeno de exocitose não-lítica, descrito recentemente por dois grupos independentes [51, 52]. A exocitose não-lítica foi observada quando a interação entre macrófagos e *C.*

neoformans foi estudada por meio de filmes com células vivas, e não com imagens estanques de células fixadas e coradas. Surpreendentemente, as células fúngicas são capazes de escapar de dentro do macrófago sem que nenhuma das células morra. O mecanismo pelo qual a exocitose não-lítica ocorre ainda é pouco conhecido, mas parece envolver tanto fatores do patógeno quanto do hospedeiro [51-54]. Além disso, a exocitose não-lítica de também ocorre quando *C. neoformans* infecta a ameba *Acanthamoeba castellanii*, sugerindo que este mecanismo possa ser conservado entre células do sistema imune de mamíferos e predadores fagocíticos ambientais [55].

No final da década de 1980, se descobriu que os anticorpos são outro fator importante na resposta imune contra *C. neoformans*. Nesta época foram produzidos os primeiros anticorpos monoclonais contra a GXM da cápsula [56-59]. Alguns desses anticorpos protegeram camundongos de infecções letais com *C. neoformans*, sendo propostos como alternativa terapêutica contra a doença [60]. O mecanismo de proteção destes anticorpos inclui fixação de complemento na superfície do fungo, opsonização e toxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) [61].

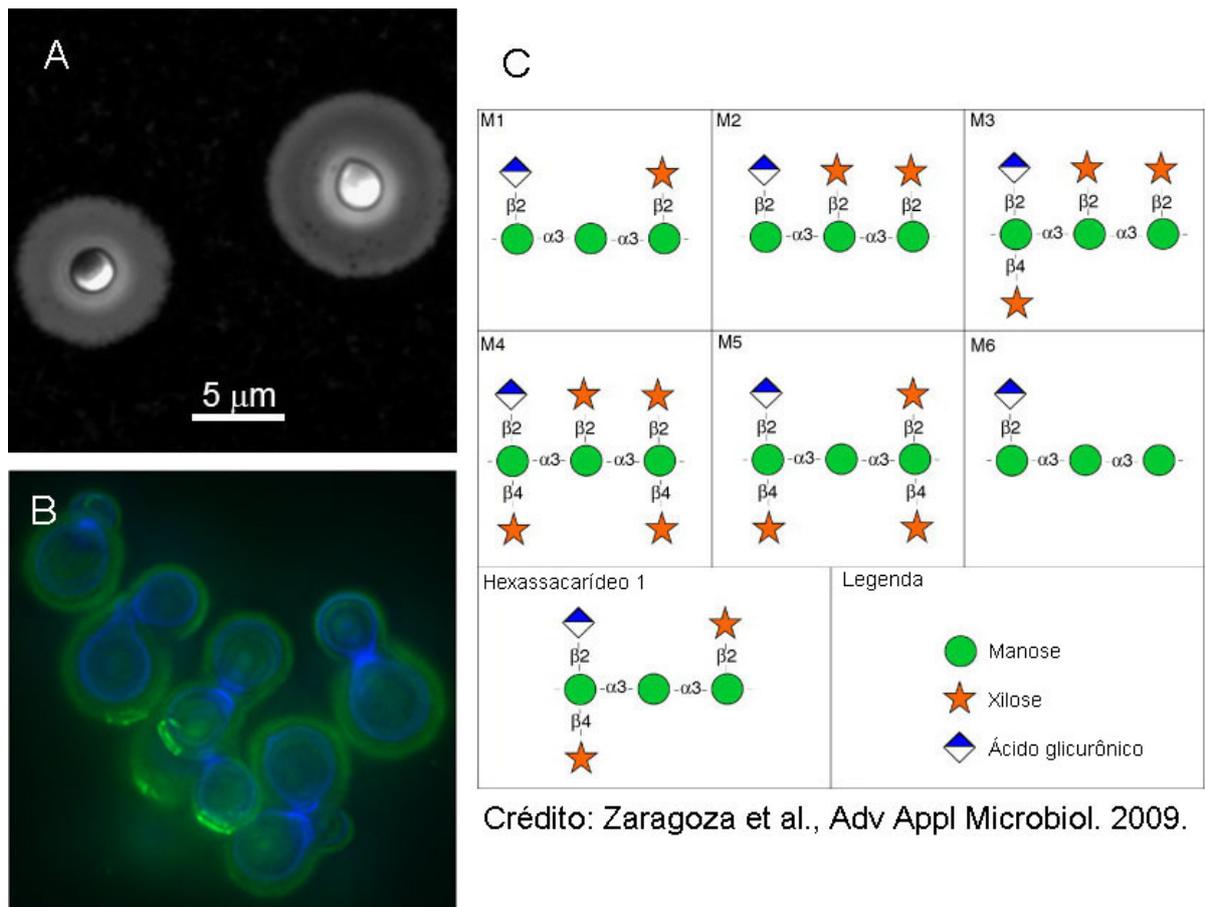
Um resultado intrigante destes estudos sobre o papel dos anticorpos na imunidade contra *C. neoformans* foi que a proteção depende do isotipo do anticorpo. Em experimentos com camundongos, tratamento com anticorpos IgG3 não protegeram os animais ou até mesmo os fizeram morrer mais rápido [62], enquanto os outros isotipos foram protetores [63]. Esta diferença entre IgG3 e os outros isotipos de IgG foi observada também em camundongos nocaute para os receptores de Fc conhecidos [64], o que somado à incapacidade de IgG3 de se ligar aos quatro receptores de Fc conhecidos [65-67] indica que o isotipo IgG3 interaja com algum receptor desconhecido.

Autofagia e seu papel na imunidade

A autofagia é um processo conservado em eucariotos responsável pela reciclagem de material intracelular, com importantes papéis homeostáticos [68]. A autofagia ocorre pela formação de uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo, que engloba o material a ser reciclado (por exemplo, uma fração do citoplasma ou uma organela). Posteriormente, o autofagossomo se funde com lisossomos, levando à digestão e reaproveitamento do material englobado. Muito já se conhece sobre a maquinaria molecular envolvida na autofagia, principalmente sobre as duas proteínas estudadas em mais detalhe nesta tese: ATG5 e LC3. A enzima ATG5 cataliza um passo essencial para que a formação de autofagossomos [69]; já a proteína LC3 é utilizada como marcador específico de fagóforos e autofagossomos [70]

Além do seu papel no balanço nutricional da célula, a autofagia também está envolvida na resposta imune contra múltiplos patógenos intracelulares como vírus, bactérias e protozoários [71]. A formação de autofagossomos permite à célula hospedeira capturar dentro de vacúolos patógenos que se encontram no citoplasma, como o vírus Sindbis [72] ou a bactéria *Listeria monocytogenes* [73], levando a sua eliminação por fusão com lisossomos. Outro mecanismo imunitário da autofagia é ajudar a célula a sobrepujar a inibição da maturação do fagossomo por patógenos como *M. tuberculosis* [74].

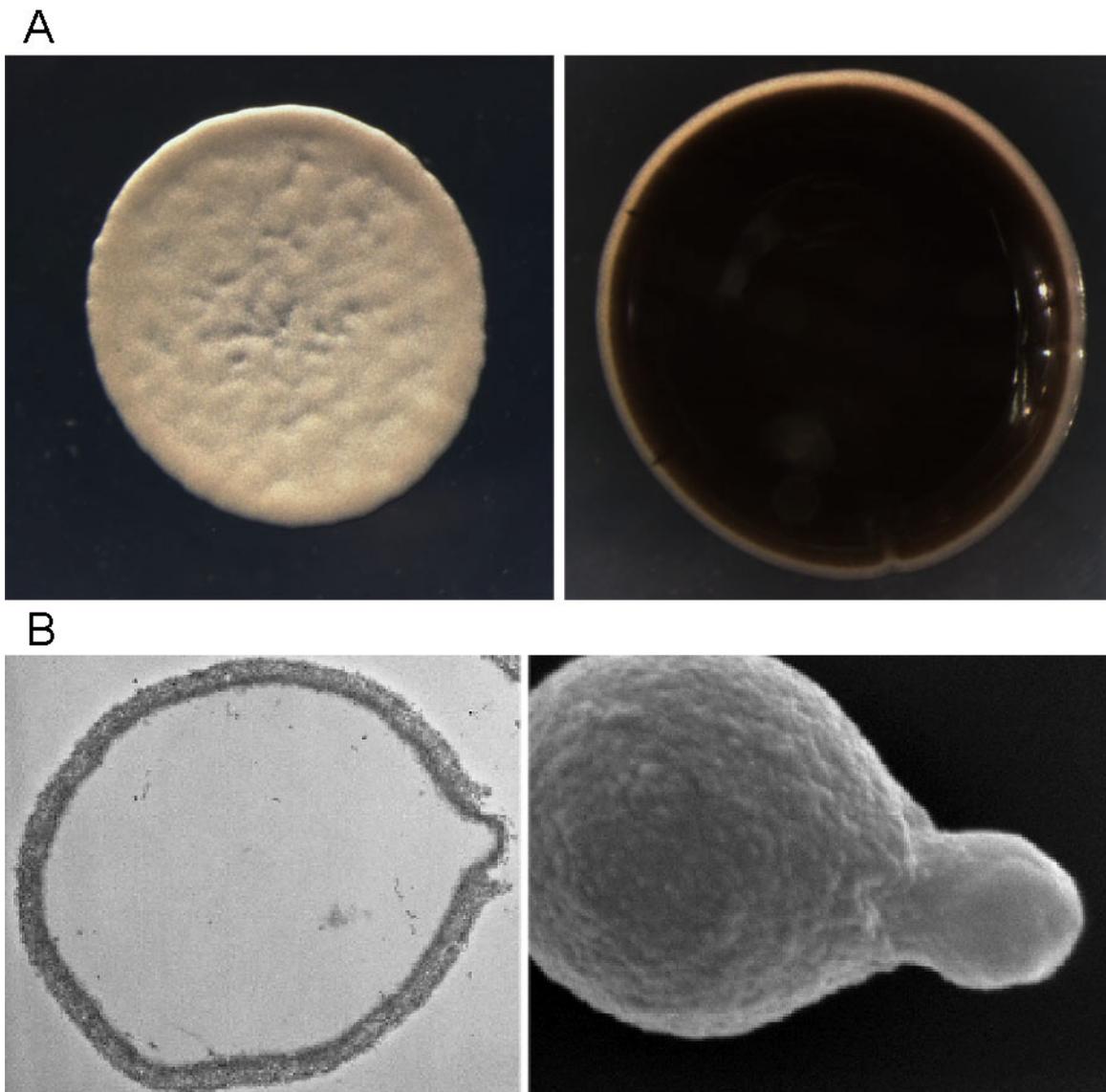
Em um estudo bastante recente, a autofagia também foi ligada à resposta imune contra *C. neoformans* [75]. Por meio da varredura de uma biblioteca de RNAi, os genes Atg2, Atg5 e Atg9 foram identificados como necessários para a replicação e escape de *C. neoformans* em células S2 de *Drosophila*. Os resultados foram confirmados com linhagens de macrófagos murinos, nas quais RNAi contra múltiplos genes envolvidos em autofagia diminuiu a fagocitose, a replicação intracelular e o escape de *C. neoformans*.



Crédito: Zaragoza et al., Adv Appl Microbiol. 2009.

Figura 1– A cápsula de *C. neoformans*

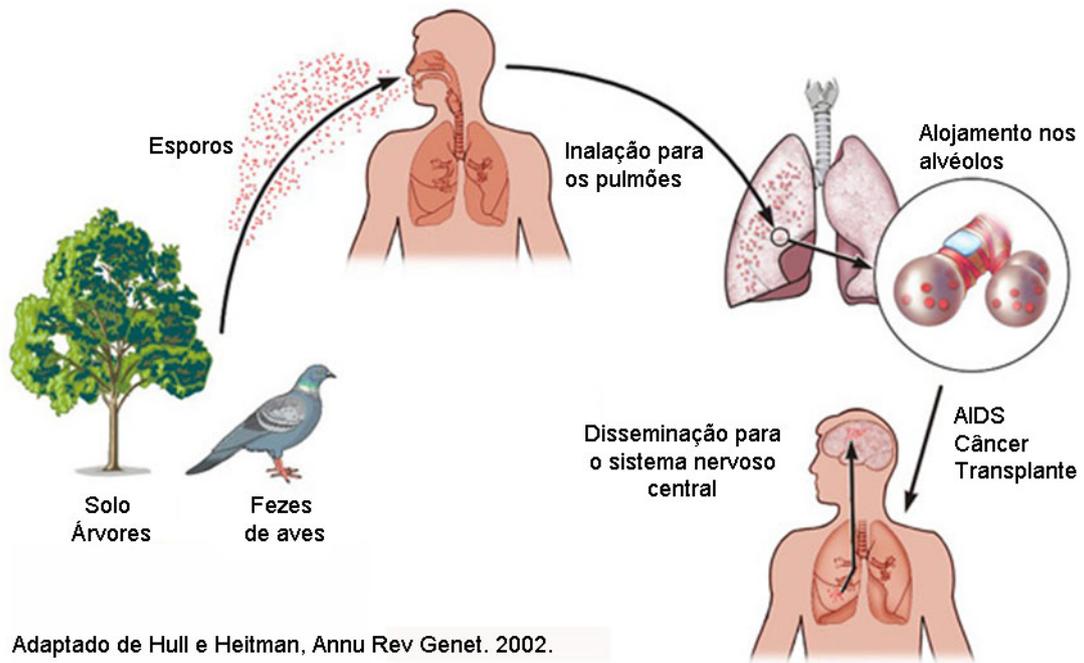
(A) Observação da cápsula pelo método da tinta nanquim (“India Ink”). Coloração mais fácil e comum, a tinta nanquim evidencia a cápsula porque esta estrutura exclui as partículas escuras da tinta. (B) A cápsula foi corada com o anticorpo contra GXM 18B7 marcado com o fluoróforo DTAF, enquanto a parede foi evidenciada com Uvitex 2B. (C) Esquema da estrutura do principal carboidrato capsular, GXM. Painel C adaptado de [76].



Crédito: Eisenman et al.. Biochemistrv. 2005.

Figura 2 – A melanina de *C. neoformans*

(A) Colônia de *C. neoformans* crescida em meio mínimo contendo o precursor de melanina L-DOPA. A colônia foi fotografada em um estereomicroscópio antes e depois da melanização. (B) Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura de fantasmas de melanina de *C. neoformans*. Painel B adaptado de [13].



Adaptado de Hull e Heitman, Annu Rev Genet. 2002.

Figura 3 – Ciclo da criptococose

A criptococose se inicia a partir da inalação de esporos ou leveduras de *C. neoformans* a partir de fontes ambientais como solo, árvores e fezes de pombos. As células fúngicas inaladas se alojam nos pulmões, onde são contidas, mas não completamente eliminadas, por uma resposta granulomatosa. Caso ocorra alguma supressão severa da imunidade celular, o fungo se espalha por todo o corpo por via hematogênica, com grande tropismo pelo sistema nervoso central. Figura adaptada de [77].

II – Justificativa

A criptococose é uma importante causa de morbidade e mortalidade em pessoas imunossuprimidas. Estima-se que pouco mais de um milhão de casos de criptococose ocorram por ano, com aproximadamente 600.000 mortes [31]. Essa grande proporção de mortes ocorre principalmente por fatores sócio-econômicos que impedem o acesso a tratamento adequado na África subsaariana, onde se registram dois terços das mortes. No entanto, mesmo em condições de tratamento ideais em países desenvolvidos, mais de 20% dos pacientes morrem apesar do tratamento adequado. Em conjunto com o fato das drogas antifúngicas mais eficazes serem bastante tóxicas, se percebe que o tratamento da criptococose está bastante aquém do necessário. Para criar novas drogas mais eficazes e menos tóxicas contra *C. neoformans*, é essencial conhecer melhor a sua fisiologia e os papéis dos seus diversos fatores de virulência.

Além dos possíveis benefícios terapêuticos de se estudar o patógeno, novas formas de tratamento ou mesmo de prevenção podem advir do estudo do hospedeiro e da relação entre os dois organismos. Isso se dá por causa da forte correlação entre a criptococose e o status do sistema imune. Estudos populacionais mostram que por volta de 70% das pessoas imunocompetentes são infectadas com *C. neoformans* [35], mas menos de uma em cem mil destas desenvolve a doença [78, 79]. Aprofundar o conhecimento sobre como estas pessoas são capazes de controlar o fungo com tamanha eficiência nos ajuda a entender melhor o que acontece naqueles em que a doença se desenvolve e pode revelar formas eficazes de prevenir a doença ou mesmo tratá-la.

III – Objetivos

O objetivo geral desta tese é entender melhor a interação entre *C. neoformans* e o hospedeiro. Como o resultado desta interação depende tanto de fatores do patógeno quanto do hospedeiro, este objetivo geral foi dividido em quatro objetivos específicos.

- Localizar em células intactas as vesículas extracelulares de *C. neoformans* e estudar seu papel na melanização do fungo.
- Estudar mecanismos de ação de anticorpos protetores contra a cápsula de *C. neoformans*.
- Esclarecer o mecanismo molecular da exocitose não-lítica de *C. neoformans* e testar sua importância durante a criptococose experimental.
- Determinar o papel da autofagia do macrófago na interação com *C. neoformans*.

IV, V e VI – Materiais e Métodos, Resultados e Discussão

Estas seções serão divididas em quatro capítulos, tendo como tema cada um dos objetivos específicos. Abaixo seguem informações gerais sobre materiais e métodos utilizados em todos os capítulos

Cultura de microrganismos

Cryptococcus neoformans. Foram utilizados os isolados H99 (sorotipo A, var. *grubii*), 24067 (sorotipo D, var. *neoformans*), B3501 (sorotipo D, var. *neoformans*) e CAP67 (um mutante acapsular derivado de B3501). As células foram crescidas em meio Sabouraud líquido ou em meio mínimo (glicose 15 mM, KH_2PO_4 29 mM, MgSO_4 10 mM, glicina 13 mM e tiamina 3 μM) com agitação a 150 rpm e temperatura de 30°C ou 37°C.

Bacillus anthracis. Foram utilizadas as linhagens Sterne 34F2 (pXO1^+ , pXO2^-), Sterne 34F2 δT (pXO1^- , pXO2^-) e Sterne 7702 UT231 (com ALO deletada). As bactérias foram crescidas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) com agitação a 150 rpm e temperatura de 37°C.

Camundongos

Todos os experimentos com camundongos foram feitos observando regras estabelecidas pela AAALAC (*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care*, EUA) e pelo NIH (*National Institutes of Health*, EUA). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética do *Albert Einstein College of Medicine (Institute of Animal Care and Use Committee, IACUC)*. Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (100 e 10 mg por kg de massa corporal, respectivamente) antes de procedimentos cirúrgicos.

A eutanásia foi feita por asfixia em atmosfera de CO₂. Todos os procedimentos cabíveis foram tomados para diminuir o sofrimento dos animais.

Macrófagos primários

Dois tipos de macrófagos primários foram utilizados nesta tese. Para obter macrófagos peritoneais, as cavidades peritoneais de camundongos sacrificados por asfixia com CO₂ foram lavadas com 10 mL de PBS utilizando uma seringa de 1 mL conectada a um cateter calibre 18. O material recolhido de um grupo de camundongos foi juntado e centrifugado a 300 g por 10 min a temperatura ambiente. As células foram então re-suspendidas em meio de cultura celular (DME suplementado com: 10% de soro fetal bovino, 10% de meio NCTC-109, 1% de solução de aminoácidos não-essenciais e 1% de solução de penicilina e estreptomicina). Para obter MDMO, a medula óssea dos dois fêmures e duas tíbias de um camundongo foi coletada e plaqueada em 10 mL de meio de cultura celular suplementado com meio condicionado de L929, fonte de CSF. Após três dias, foram acrescentados mais 5 mL de meio suplementado. Após mais três dias, o meio foi removido e as células mantidas em meio de cultura suplementado com L929 com trocas a cada três dias.

Microscopia confocal e de fluorescência

Quatro microscópios diferentes foram utilizados para analisar amostras de acordo com as necessidades do experimento:

- Olympus AX70 equipado com objetiva de 100x NA 1,3, câmera colorida e software Qcapture. Utilizado para experimentos simples de epifluorescência.
- Zeiss Axioskop 200 invertido equipado com objetiva de 63x NA 1,4, câmera monocromática MRm, software AxioVision e sistema de manutenção de temperatura e CO₂. Utilizado para epifluorescência, deconvolução e experimentos de contraste de fase com células vivas.

- Leica SP2 confocal, equipado com uma objetiva de 63x NA 1,4. Utilizado para microscopia confocal de macrófagos e células de *C. neoformans*.
- PerkinElmer UltraVIEW RS-3 spinning disk confocal, equipado com uma objetiva de 100x NA 1,4. Utilizado para microscopia confocal de vesículas purificadas e para experimentos de fluorescência com células vivas.

Citometria de fluxo

Diversas amostras foram analisadas em quatro citômetros de fluxo diferentes:

- BD FACSAria equipado com lasers emitindo a 407, 488, 561 e 635 nm. Usado para separação asséptica de células infecciosas (“sorting”) em condição de biossegurança.
- MoFlo XDP equipado com oito lasers emitindo entre 350 e 676 nm. Usado para separação asséptica de células não-infecciosas.
- BD LSRII equipado com lasers emitindo a 350, 405, 488 e 633 nm.
- BD FACSCalibur equipado com lasers emitindo a 488 e 633 nm.

Após a coleta, os dados foram analisados no programa FlowJo.

Tabela 1 – Linhagens de *C. neoformans*

Nome	Sorotipo	Variedade	Observações
H99	A	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	Cepa mais estudada da variedade <i>grubii</i> , a variedade mais frequentemente isolada de infecções humanas. Teve seu genoma sequenciado e originou um par congênico muito usado em trabalhos de genética, KN99 α e KN99a [80].
24067	D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Muito utilizada em estudos sobre a cápsula e em modelos animais.
B3501	D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Cepa bastante estudada da variedade <i>neoformans</i> . Teve seu genoma sequenciado [81] e originou um par congênico muito usado em trabalhos de genética, JEC20 e JEC21 [82].
CAP67	D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Mutante acapsular derivado de B3501 por meio de mutagênese química e/ou ultravioleta [83].

Tabela 2 – Sondas fluorescentes

Sonda	Nome	Alvo	Concentração (solvente)	Observações
DiI [DiIC ₁₈ (3)]	perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina	Membranas	5 µM (DMSO)	Dialquilcarbocianinas. Possuem uma cauda hidrofóbica e cabeça fluorescente hidrofílica, marcando assim bicamadas lipídicas [84]. A nomenclatura em colchetes indica o tipo de grupamento que modifica a carbocianina (DiI: indo-; DiO: oxa-), o número de carbonos na cauda hidrofóbica em parênteses e o número de carbonos entre os dois grupos de anéis da cabeça fluorescente. O sufixo DS indica a presença de dois grupamentos sulfônicos, que tornam a sonda passível de fixação com aldeídos [85].
DiO [DiOC ₁₈ (3)]	perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina	Membranas		
DiD-DS [DiIC ₁₈ (5)-DS]	ácido 5,5-di-sulfônico de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina	Membranas		
DiIC ₁ (5)	1,,3,3,1',3',3'-hexametilindodicarbocianina	Mitocôndria	5 µM (DMSO)	Carbocianina na qual as caudas hidrofóbicas são substituídas por grupamentos metil. Não marca membranas, mas se acumula em mitocôndrias [85].
CMFDA	Diacetato de 5-clorometil-fluoresceína	Proteínas intracelulares	2 µM (DMSO)	Variante incolor e lipossolúvel da fluoresceína. Atravessa membranas celulares, é clivada por esterases se a célula estiver viva e se liga covalentemente a moléculas contendo grupamentos –SH, principalmente proteínas intracelulares [85].
Uvitex 2B	4,4'-bis(2-sulfoestiril) bifenil di-sódico	Quitina da parede celular	0,01% (água)	Marca a parede de fungos, mas é incapaz de penetrar membranas intactas por ser carregada. Usada para evidenciar a parede e em testes de fagocitose para determinar se o fungo foi ingerido [86]

Sonda	Nome	Alvo	Concentração final	Observações
Calcofluor	4-metil-7-dietilaminocumarina	Quitina da parede celular	50 µg/ml	Frequentemente utilizada como sonda para marcar a parede celular.
7-AAD,	7-aminoactinomicina D	DNA	1 µg/mL (DMSO)	Sondas específicas para DNA incapazes de penetrar membranas intactas por serem carregadas. Usadas como marcadoras de células mortas.
SYTOX green	Não revelado pelo fabricante	DNA	5-25 µM (DMSO)	
PI	Iodeto de propídeo	DNA	1 µg/mL	
DAPI	4',6 - diamidino - 2 - fenilindol	DNA	3 µM	
SYTO RNASelect	Não revelado pelo fabricante	RNA	1 µM	Se liga especificamente a RNA, com pouca afinidade por DNA.
DDAO-SE	9- <i>H</i> -(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona-7- il)-succinimidil éster	Proteínas intra- e extracelulares	1 µM (DMSO)	Tem um grupamento reativo que leva a ligação covalente com grupamentos -NH ₂ de proteínas.

Tabela 3 – Anticorpos monoclonais

Anticorpo	Isotipo	Alvo	Observações
18B7	IgG1 murino	GXM	Anticorpo mais usado para opsonizar <i>C. neoformans</i> e como sonda para a cápsula. Protetor em modelos animais de criptococose [60]. Está em estudos clínicos para uso terapêutico na criptococose [87]
3E5	IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 murinos	GXM	Família de IgGs dos quatro isotipos com região variável idêntica [62, 63]
12A1 e 13F1	IgM murino	GXM	Par de IgMs derivados do mesmo clone de células B, com poucas mutações na região variável diferindo entre eles. 12A1 é protetor e 13F1 é não-protetor em modelos murinos [88]
chIgG1, chIgG2 e chIgG4	IgG1, IgG2 e IgG4 quiméricos humanos	GXM	Três anticorpos quiméricos recombinantes produzidos pela fusão da região variável de 18B7 com as regiões constantes de três dos quatro isotipos de IgG humanos [89].
2.4G2	IgG2b de rato	FcRIIB e CD16-2	Liga-se a e bloqueia a atividade dos receptores de Fc de camundongo [90].
α -CR	Monoclonais de rato e hamster	CD11b, CD11c, CD19	Mistura de três anticorpos monoclonais que inibem a atividade dos receptores de complemento CR3 e CR4 [91].
MOPC 21 e TEPC 183	MOPC IgG1, TEPC IgM de camundongo	-	Controles de isotipo

Anticorpo	Isotipo	Alvo	Observações
HM β 1-1	IgG hamster	Itgb1 [92]	IgGs de hamster que bloqueiam a atividade de diferentes integrinas de camundongo.
HM α 1	IgG hamster	Itga1 [93]	
HM α 2	IgG hamster	Itga2 [93]	
PS/2	IgG hamster	Itga4 [94]	
RMV7	IgG hamster	Itgav [95]	

Tabela 4 – Células de mamífero em cultura

Célula	Fonte	Observações
J774	Linhagem de sarcoma de célula reticular de camundongo [96]	Possui fenótipo parecido com macrófagos peritoneais (“macrophage-like”).
Macrófago peritoneal	Lavado peritoneal de BALB/C ou C57/BL6	Isolado por lavagem peritoneal de camundongo [97].
Macrófago derivado da medula óssea (MDMO)	Medula óssea de BALB/C ou C57/BL6	Diferenciados a partir de células tronco de medula óssea de camundongo em cultura contendo meio condicionado de L929, fonte de GM-CSF [97].
CHO-K1	Linhagem imortal epitelial de ovário de hamster	Utilizada para expressão heteróloga de proteínas.
A549	Linhagem de pneumócito humano	Normalmente não-fagocítica. Utilizada em ensaio de ganho de função fagocítica.
GD25	Linhagem de fibroblasto de camundongo	Derivada de célula tronco embrionária de um camundongo $Itgb1^{-/-}$ [98]. Utilizada para estudo da integrina beta 1.
293T	Linhagem epitelial de rim embrionário humano	Derivada de HEK293 pela adição do antígeno T de SV40. Utilizada para preparação de partículas lentivirais para transfecção.
L929	Linhagem de fibroblasto de camundongo	Secreta GM-CSF para o sobrenadante. Seu meio condicionado é usado como fonte desse fator para diferenciação de macrófagos a partir de células tronco [97].

Tabela 5 – Linhagens de camundongos

Linhagem	Parental	Genótipo	Observações
BALB/C e C57/BL6	-	-	Linhagens congênicas usadas em infecção com <i>C. neoformans</i> e para geração de macrófagos primários.
Atg5flox	C57/BL6 + 129S	Atg5flox ^{+/+} LyzCre ^{+/-}	Criada pelo cruzamento de duas linhagens, uma com o exon 3 do gene Atg5 flanqueado por sítios loxP e outra com a recombinase Cre controlada pelo promotor de lisozima [99]. Fenótipo: nocaute condicional de Atg5 em células mielóides.
Itgb1flox	C57/BL6 + 129S	Itgb1flox ^{+/+} LyzCre ^{+/-}	Criada de maneira similar a Atg5flox. Fenótipo: nocaute condicional de Itgb1 em células mielóides.
Nocaute Fcγ	C57BL6	Fcγ ^{-/-}	Nocaute da cadeia comum gama dos receptores de Fc. Fenótipo: nocaute de FcRI, FcRIIA, FcRIII e FcRIV.
Duplo nocaute Fcγ	C57BL6	Fcγ ^{-/-} FcRIIB ^{-/-}	Fenótipo: nocaute de todos os receptores de Fc conhecidos.

Capítulo 1 – Uso de sondas fluorescentes para estudar vesículas extracelulares e a cápsula de *Cryptococcus neoformans*

Os trabalhos que compõe este capítulo têm como foco a célula de *C. neoformans* e o processo de secreção mediada por vesículas extracelulares. O objetivo do primeiro trabalho [100] foi localizar as vesículas extracelulares em células de *C. neoformans* por meio de microscopia de fluorescência e confocal. As metodologias desenvolvidas neste trabalho foram posteriormente empregadas em dois projetos nos quais eu participei como colaborador, o estudo do papel das vesículas extracelulares na melanização de *C. neoformans* [101] e na secreção de fatores de virulência por *Bacillus anthracis* [30].

Materiais e Métodos

Cultura de microrganismos

Cryptococcus neoformans. Foram utilizados os isolados H99, 24067, B3501 e CAP67. Mais detalhes sobre as linhagens de *C. neoformans* utilizadas neste trabalho podem ser encontradas na Tabela 1. Para induzir o aumento no tamanho da cápsula as células foram incubadas por a 37 °C por 48 h em meio Sabouraud diluído dez vezes em tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) 50 mM pH 7,3 [102].

Bacillus anthracis. Foram utilizadas as linhagens Sterne 34F2 (pXO1⁺, pXO2⁻), Sterne 34F2 δ T (pXO1⁻, pXO2⁻) e Sterne 7702 UT231 (com ALO deletada). As linhagens foram mantidas a -80°C. As bactérias foram crescidas a partir do estoque congelado em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) com agitação a 150 rpm e temperatura de 37°C.

Sondas fluorescentes

As sondas DiI, DiD-DS, DiO, BODIPY-PC, DiIC₁(5) e SYTO RNASelect foram compradas da Invitrogen. Uvitex 2B foi comprada da Polysciences Inc. AF488-18B7 foi preparado marcando o anticorpo contra GXM 18B7 com Alexa Fluor 488 de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). Mais detalhes sobre as sondas na Tabela 2 e na Figura 4.

Purificação e coloração de vesículas extracelulares

O protocolo de isolamento de vesículas extracelulares foi adaptado do utilizado por Rodrigues et al. [24]. Basicamente, culturas líquidas dos microorganismos (3 a 6 dias para *C. neoformans*, 18 h para *B. anthracis*) foram centrifugadas e filtradas para remover as células. Em seguida, os sobrenadantes foram concentrados por ultrafiltração em membranas com poros de 100 kDa e precipitados por ultracentrifugação a 100.000 g por 1 h. As vesículas precipitadas foram então suspensas em PBS e ultracentrifugadas a 100.000 g por 1 h e lavadas duas vezes em PBS nas mesmas condições. As vesículas foram então coradas por 1 h em PBS contendo as sondas apropriadas (5 µM de DiI, DiD-DS, DiO ou DiIC₁(5), ou SYTO RNASelect 1 µM) e lavadas novamente por duas vezes por ultracentrifugação. As vesículas coradas precipitadas foram fotografadas com uma câmera Nikon D90 e re-suspendidas em PBS para citometria de fluxo ou meio de montagem (propilgalato 0,1 M em PBS com 50% glicerol) para microscopia de fluorescência. Lipossomos comerciais feitos com fosfatidilcolina e ergosterol (Encapsula Nano Sciences) foram usados como controle.

Delipidação de *C. neoformans*

Para remoção dos lipídios *C. neoformans*, células da linhagem H99 crescidas em Sabouraud foram submetidas a uma série de extrações com solventes orgânicos. Cada extração durou de 20 min a 2 h e foi feita a 37 °C com rotação para evitar a precipitação das células. Inicialmente, a uma suspensão das células em PBS foram adicionados metanol e clorofórmio para uma proporção final de 0,8:2:1 (v/v/v) de água-metanol-clorofórmio. Em seguida as

células foram submetidas a mais três extrações: metanol-clorofórmio 2:1 (v/v), clorofórmio puro e metanol puro. Após duas lavagens com PBS, as células deslipidadas e as células controle (não extraídas) foram coradas e analisadas no microscópio confocal Leica SP2 ou no citômetro de fluxo LSR II, como descrito abaixo.

Preparação de esferoplastos

Esferoplastos foram gerados por digestão com enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma) durante a noite a 40 mg/mL em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,5 com sorbitol 1 M e corados com DiI 5 μ M.

Citometria de fluxo

Os citômetros Aria II e LSR II foram usados neste trabalho. Para quantificação do número de vesículas, foi acrescentada à preparação de vesículas coradas uma suspensão de esferas fluorescentes de contagem em concentração conhecida (CountBright Absolute Counting Beads, Invitrogen).

Microscopia confocal e de fluorescência

Microscópios. Os quatro microscópios descritos acima foram utilizados neste trabalho.

Preparação das amostras. Para experimentos com células de *C. neoformans* intactas, delipidadas ou esferoplastos, as células foram coradas com as sondas apropriadas por 1 h. Após serem lavadas e re-suspendidas em meio de montagem, as células foram montadas em lâminas para microscopia.

Coleção e manipulação de imagens. Células coradas foram analisadas por microscopia confocal no equipamento Leica SP2 e por epifluorescência no equipamento Zeiss Axioskop 200. Para deconvolução, foi utilizado um algoritmo do tipo “constrained iterative” no software AxioVision. Em ambos os casos, os conjuntos de fatias (“Z-stacks”) foram

compilados e analisados no software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) e reconstruídos tridimensionalmente com o software VOXX (<http://www.nephrology.iupui.edu/imaging/voxx/>). Após a coleção, a manipulação das imagens envolveu somente ajustes lineares de brilho e contraste.

Purificação e coloração de polissacarídeo capsular

GXM do sobrenadante foi purificada a partir de culturas líquidas de H99 precipitadas com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) [5]. Polissacarídeo capsular foi extraído de células H99 por tratamento com dimetilsulfóxido (DMSO) [103]. Para remover lipídeos, 1 mg de polissacarídeo purificado com DMSO foi diluído em PBS e extraído com acetato de etila a temperatura ambiente com agitação vigorosa. Todas as amostras foram diluídas em PBS a 1 mg/mL e centrifugadas por 30 min a 20.000 g para remover partículas em suspensão. Um mililitro de cada solução, assim como um controle somente de PBS, foram corados com DiI por 1 h a 37 °C e centrifugados mais uma vez por 30 min a 20.000 g.

Purificação e coloração de fantasmas de melanina

Fantasmas são estruturas de melanina derivadas de células melanizadas e têm esse nome porque mantêm o formato da célula original. O protocolo de preparação de fantasmas foi descrito previamente [104] e inclui uma série de procedimentos que eliminam outros componentes celulares sem alterar a melanina. Inicialmente as células são digeridas com glicanases e proteases, desnaturadas quimicamente com tiocianato de guanidina, extraídas com clorofórmio, fervidas em ácido clorídrico fumegante e dialisadas em água por 10 dias. Uma alíquota de fantasmas de melanina não foi separada e submetida a todo o protocolo com exceção do passo de extração com clorofórmio. As partículas resultantes de ambas as preparações foram coradas com DiI por 1 h e analisadas no microscópio Olympus descrito acima.

Resultados

Coloração de vesículas extracelulares e da cápsula de *Cryptococcus neoformans* com sondas lipofílicas

Para testar a utilidade das dialquilcarbocianinas na detecção de vesículas extracelulares, nós coramos preparações de vesículas purificadas com DiI e DiD-DS e as observamos por microscopia e citometria de fluxo (Figura 5, painéis A e B). Para confirmar que as estruturas coradas com as sondas eram de fato vesículas extracelulares, dois controles foram feitos. O primeiro consistiu de vesículas incubadas com DiIC₁(5), uma dialquilcarbocianina que não marca membranas por ter as caudas hidrofóbicas substituídas por grupamentos metil, e o segundo controle foi a sonda DiD-DS sozinha. Como esperado, após a ultracentrifugação das amostras somente se observou precipitado corado no tubo de vesículas e DiD-DS, confirmando que a sonda por si só não é precipitada e que as dialquilcarbocianinas se ligam às vesículas por sua cauda hidrofóbica (Figura 5, painel C).

A coloração de vesículas purificadas com dialquilcarbocianinas foi então utilizada para testar se estas estruturas também possuem RNA. Para tanto, vesículas foram coradas simultaneamente com DiI e uma sonda específica para RNA chamada SYTO RNASelect e submetidas a citometria de fluxo. Como mostrado na Figura 6, uma fração dos eventos foi corada pelas duas sondas, confirmando a hipótese inicial.

Após determinar que as sondas marcaram vesículas purificadas, elas foram utilizadas para localizar as vesículas em células inteiras. A coloração com DiI ou DiD-DS resultou em um padrão puntiforme localizado na superfície externa da cápsula em células encapsuladas (Figura 7, painel A) e sobre a parede celular em células acapsulares (Figura 7, painel B). Ocasionalmente outro padrão de coloração foi observado em células encapsuladas, com

ligação das sondas a uma camada anular ao redor da parede celular e a projeções saindo desta região (Figura 7, painel C).

Para confirmar se as estruturas observadas eram de fato vesículas extracelulares, foram feitos vários experimentos controle. O primeiro experimento envolveu a delipidação das células por extração com solventes orgânicos. Surpreendentemente, este procedimento aumentou, ao invés de abolir, a ligação de DiI e DiD-DS às células de *C. neoformans* (Figura 8, painéis A e B). Além disso, a incubação de DiI com amostras de carboidrato capsular levou a formação de agregados mesmo quando os carboidratos foram delipidados, sugerindo que as sondas se ligam diretamente aos polissacarídeos capsulares (Figura 8, painel C). Por fim, células de *C. neoformans* foram incubadas com DiIC₁(5), resultando também em coloração puntiforme na superfície capsular (Figura 8, painel D).

Como as dialquilcarbocianinas não funcionaram para detectar vesículas extracelulares em células vivas, uma nova estratégia foi testada. Ao invés de marcar vesículas existentes, as células foram incubadas com o fosfolípido fluorescente BODIPY-PC, que marcou intensamente as membranas no interior da célula e evidenciou estruturas puntiformes na superfície da cápsula (Figura 9).

Melanização associada a vesículas em *Cryptococcus neoformans*

O trabalho seguinte tinha como objetivo determinar o papel das vesículas extracelulares na melanização de *C. neoformans*. Fantasmas de melanina extraídos ou não com solventes orgânicos foram corados com DiI e depois examinados por microscopia. A melanina que não foi extraída com solventes ligou maior quantidade de DiI, sugerindo que membranas lipídicas possam estar associadas à melanina (Figura 10).

***Bacillus anthracis* produz vesículas derivadas da membrana contendo toxinas biologicamente ativas**

Além dos experimentos com vesículas de *C. neoformans*, estas técnicas foram utilizadas em um estudo que descreveu vesículas extracelulares em culturas do bacilo gram-positivo *B. anthracis*. Experimentos piloto mostraram que DiO corava melhor as vesículas de *B. anthracis* do que DiI. Uma suspensão de esferas de contagem foi então adicionada às vesículas coradas com DiO. Como estas esferas têm uma concentração conhecida e são facilmente diferenciadas das vesículas coradas, elas permitiram calcular o número de vesículas presentes no sobrenadante: $2,1 \times 10^5$ vesículas por mL de cultura.

Discussão

O estudo das vesículas extracelulares detectadas no sobrenadante de culturas de *C. neoformans* é bastante recente, com a primeira descrição em 2007 [24]. Uma grande dificuldade desses estudos é que só era possível visualizar as vesículas extracelulares por microscopia eletrônica de transmissão, uma técnica bastante trabalhosa e demorada. Para solucionar este problema nós usamos sondas fluorescentes que detectam membranas fosfolipídicas para estudar as vesículas extracelulares de *C. neoformans* por microscopia e citometria de fluxo.

As dialquilcarbocianinas são excelentes sondas para membranas lipídicas devido à sua estrutura química, que combina duas caudas hidrofóbicas e uma cabeça fluorescente hidrofílica. Enquanto as caudas se enterram no núcleo hidrofóbico das bicamadas lipídicas, o fluoróforo hidrofílico se localiza próximo às cabeças dos fosfolipídios, paralelo a membrana [84, 105]. Por causa disso, elas foram utilizadas com sucesso para marcar vesículas extracelulares de *C. neoformans* e *B. anthracis*.

Após sua validação, esta técnica foi utilizada em uma série de experimentos que seriam muito difíceis por microscopia eletrônica. O primeiro deles foi a localização das vesículas na cápsula de células intactas. Os experimentos iniciais com dialquilcarbocianinas e células de *C. neoformans* demonstraram os mesmos pontos observados na microscopia confocal de vesículas purificadas na superfície da cápsula. No entanto, uma série de experimentos controle demonstrou que as sondas se ligaram diretamente a polissacarídeos capsulares mesmo na ausência da cauda hidrofóbica, provando que as estruturas observadas não eram necessariamente vesículas. Como as dialquilcarbocianinas não foram úteis na visualização de vesículas na cápsula de células intactas, uma nova sonda foi então testada. Ao contrário das dialquilcarbocianinas, que se ligam a bicamadas lipídicas existentes, esta sonda é composta pelo fosfolipídio mais comumente encontrado nas vesículas marcado diretamente em um dos grupamentos acil com o fluoróforo hidrofóbico BODIPY. Em contraste com as dialquilcarbocianinas, que não foram capazes de penetrar a parede celular e corar membranas no interior da célula, a sonda BODIPY-PC foi incorporada à membrana citoplasmática e a vacúolos intracelulares. A sonda também evidenciou pontos fluorescentes na superfície da cápsula, sugerindo que neste local há vesículas extracelulares.

As dialquilcarbocianinas permitiram também estudar o conteúdo das vesículas extracelulares. Usando DiI para evidenciar as vesículas por citometria de fluxo, nós acrescentamos uma segunda sonda específica para RNA. Alguns dos eventos positivos para DiI também foram positivos para a sonda de RNA, sugerindo que vesículas extracelulares de *C. neoformans* contêm este ácido nucléico. Este experimento foi baseado em achados com células de mamífero em cultura, que secretam exossomos contendo mRNA e microRNA que se fundem a células vizinhas em uma espécie de comunicação intercelular capaz de regular expressão gênica [106]. O resultado obtido com células de *C. neoformans* pode indicar que

uma forma semelhante de regulação gênica intercelular ocorra também em fungos, uma hipótese bastante interessante para estudos futuros.

Dois outros trabalhos em que eu participei em colaboração também fizeram uso destas técnicas. O primeiro demonstrou o papel das vesículas extracelulares na melanização de *C. neoformans* e foi baseado em três evidências de estudos anteriores: a presença de lacase nas vesículas extracelulares [25]; a morfologia da melanina na parede celular, que se acumula em camadas de grânulos cujo diâmetro é semelhante ao das vesículas [13] e a produção de melanina em metazoários, que a sintetizam em estruturas vesiculares chamadas melanossomos [107]. Brevemente, este trabalho mostra que vesículas extracelulares purificadas incorporam um precursor de melanina marcado radioativamente e formam estruturas que assemelham grânulos de melanina quando observadas por microscopia eletrônica. Além disso, fantasmas de melanina que não haviam sido extraídos com clorofórmio ligaram uma maior quantidade de DiI do que os extraídos, o que indica que fosfolípidios se associam à melanina e reforça a tese de que este material tem origem vesicular. Em conjunto, estes resultados foram usados para propor um modelo da formação da camada de melanina na parede celular através da secreção de vesículas contendo lacase que se tornam grânulos de melanina na presença do substrato.

O outro trabalho em que estas técnicas foram utilizadas demonstrou que o bacilo gram-positivo *B. anthracis*, causador do antraz, também secreta vesículas extracelulares. Utilizando ultracentrifugação, microscopia eletrônica e medições de dispersão de luz como as feitas com vesículas de *C. neoformans*, foram detectadas vesículas de 50 a 150 nm em culturas do bacilo. Experimentos mostraram que estas vesículas carregam os componentes necessários para a formação de três toxinas essenciais na patogênese do antraz, a toxina letal, a toxina de edema e a antrolisina. Além disso, estudos com animais mostraram que preparações de vesículas são imunogênicas e conferem aos animais algum grau de proteção

contra infecções futuras por *B. anthracis*. Neste trabalho, DiO foi utilizado para estudar as vesículas por citometria de fluxo. Como no experimento de detecção de RNA, um segundo componente foi adicionado ao experimento: esferas de contagem. Desta forma, se tornou possível quantificar o número absoluto de vesículas presentes na amostra. Este trabalho revelou um novo aspecto da biologia celular de bactérias gram-positivas e pode ter importantes implicações na terapia e profilaxia do antraz.

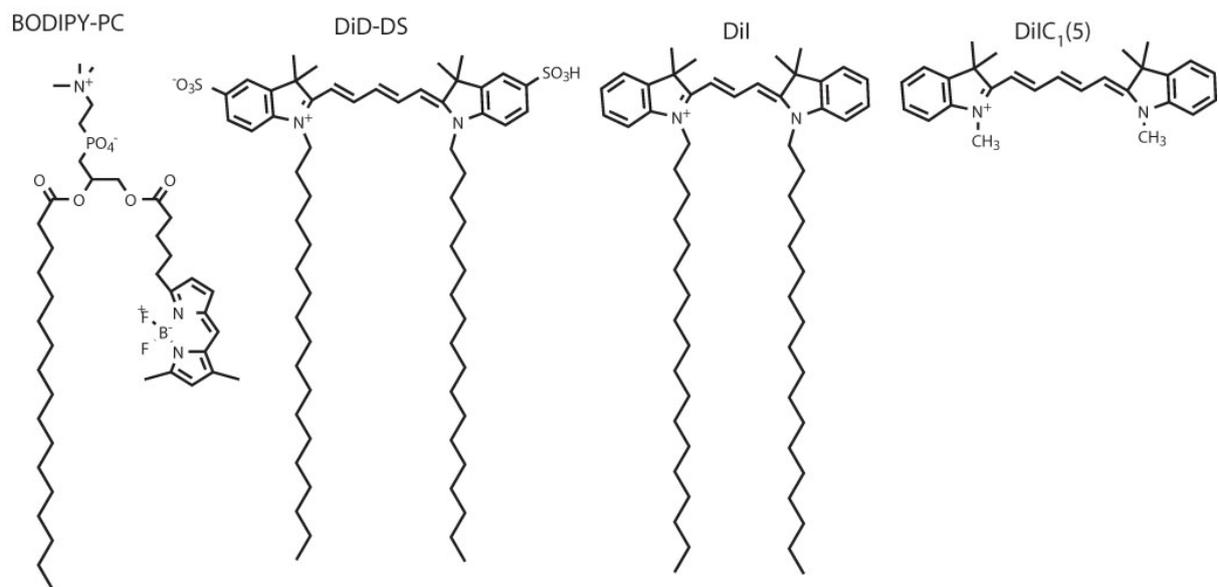


Figura 4 – Estrutura de algumas das sondas utilizadas neste trabalho.

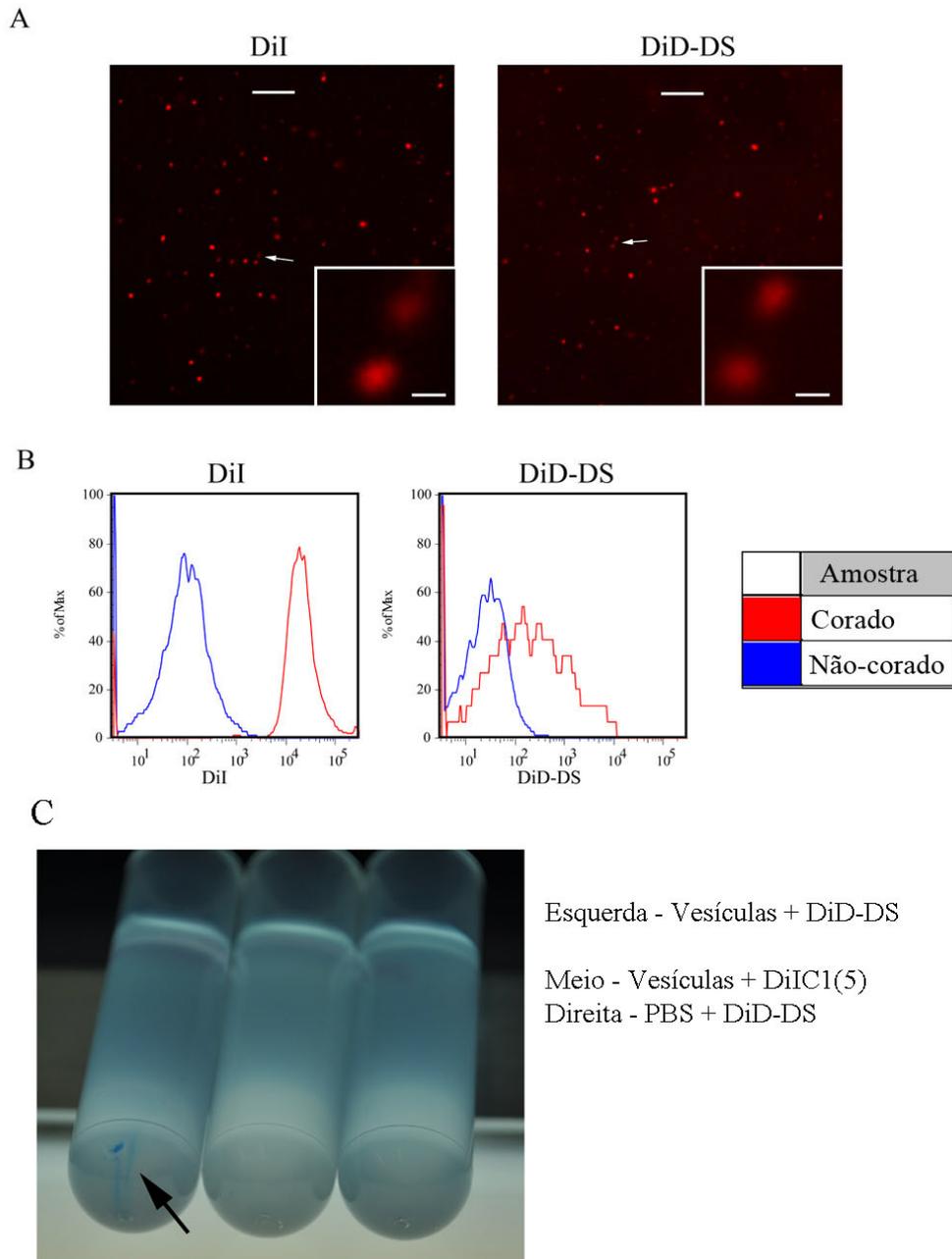


Figura 5 – Coloração de vesículas extracelulares purificadas com dialquilcarbocianinas

Vesículas extracelulares foram purificadas do sobrenadante de culturas de *C. neoformans* e coradas com DiI ou DiD-DS. Em seguida, elas foram observadas por microscopia confocal (A) ou citometria de fluxo (B). A barra em A corresponde a 5 μ m no painel principal e 400 nm no quadro ampliado. (C) Coloração de vesículas com DiD-DS e com DiIC₁(5), demonstrando a especificidade da coloração.

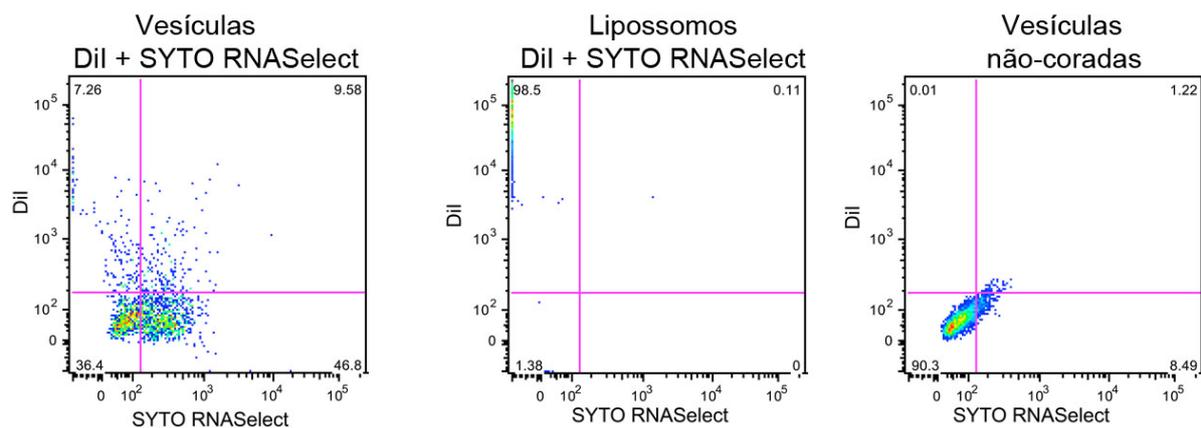


Figura 6 – Vesículas intracelulares contêm RNA

Vesículas extracelulares foram purificadas e analisadas por citometria de fluxo após coloração com DiI e a sonda específica de RNA SYTO RNASelect (esquerda). Como controles, foram analisados lipossomos comerciais feitos com fosfatidilcolina e ergosterol corados com ambas as sondas e vesículas extracelulares de *C. neoformans* não-coradas.

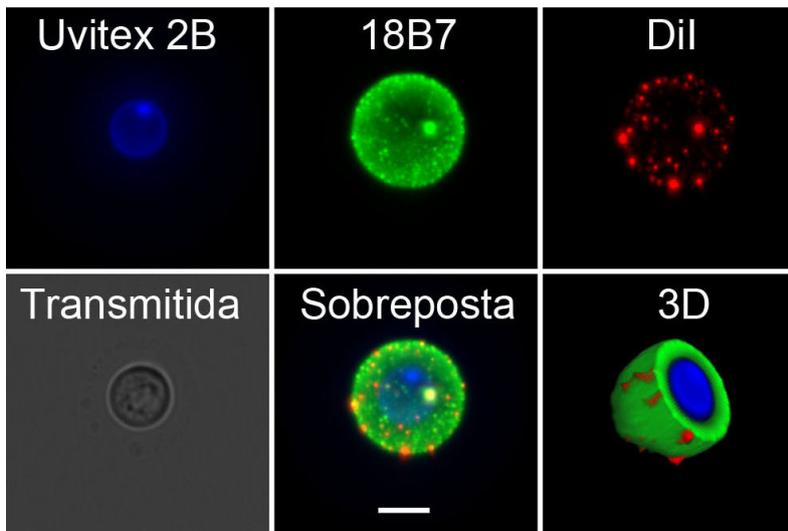
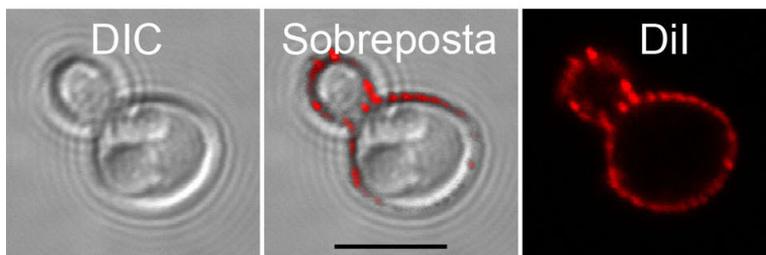
A

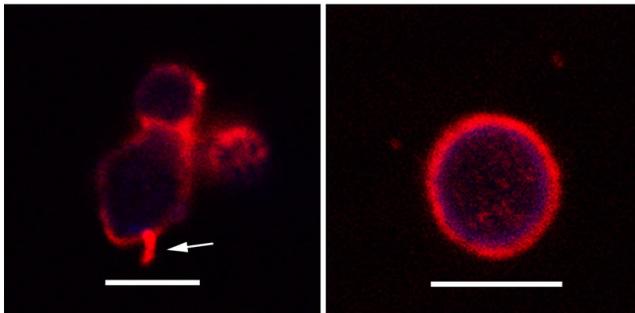
Figura 7 – Coloração de células de *C. neoformans* com sondas lipofílicas

(A) Células encapsuladas de *C. neoformans* foram coradas com Uvitex 2B (parede celular), DiI e Alexa488-18B7 (cápsula) e observadas por epifluorescência com deconvolução.

(B) Células do mutante acapsular CAP67 foram coradas com DiI e observadas por microscopia confocal.

B

(C) Células encapsuladas de *C. neoformans* coradas com Uvitex 2B e DiI, mostrando coloração em faixa corada sobre a superfície da parede celular e em projeção (seta).

C

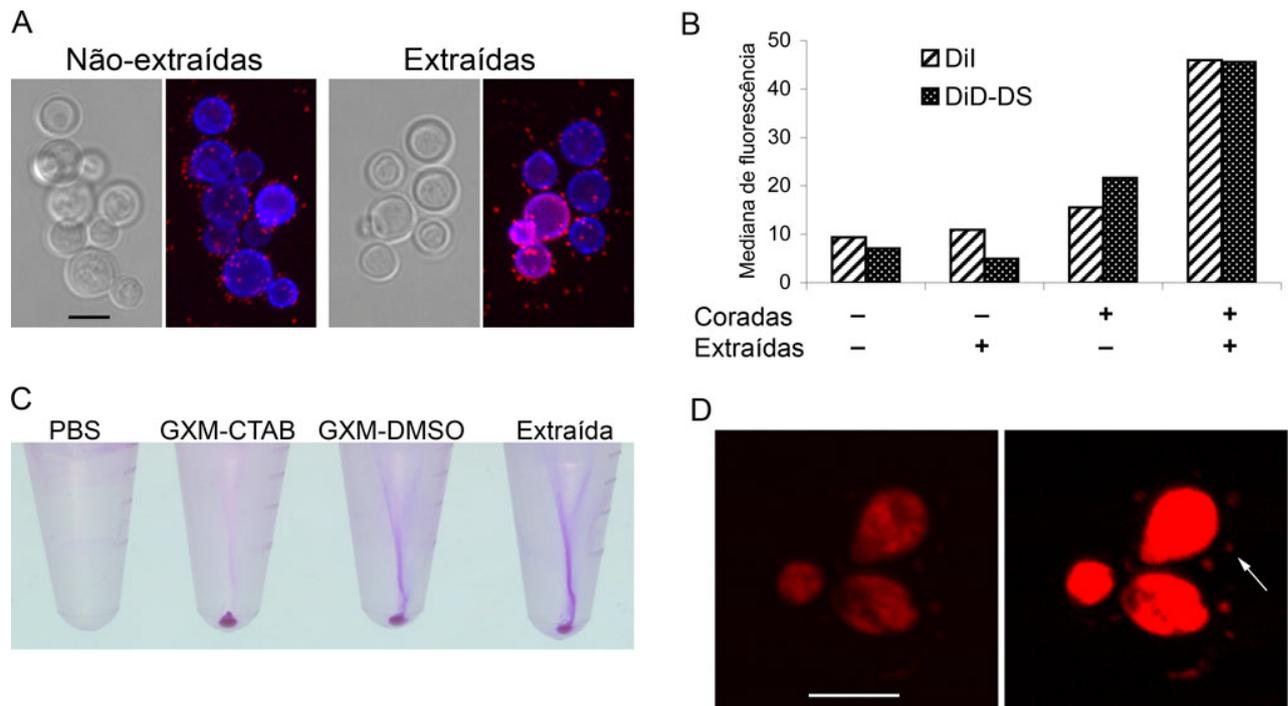


Figura 8 – Controles da coloração de células com dialquilcarbocianinas

Células de *C. neoformans* foram extraídas com solventes orgânicos e então coradas com DiI ou DiD-DS para testar se as estruturas observadas são de fato lipídicas. (A) Microscopia confocal de células extraídas ou não e coradas com DiD-DS. (B) Quantificação da intensidade de coloração com DiI e DiD-DS por citometria de fluxo. (C) Polissacarídeos capsulares diluídos em PBS foram incubados com DiI e depois centrifugados. Da esquerda para a direita, a fotografia mostra que a sonda sozinha não precipita, mas que ela se liga a e forma agregados com polissacarídeo secretado (GXM-CTAB) e capsular (GXM-DMSO), mesmo após a delipidação das amostras com clorofórmio. (D) Células de *C. neoformans* foram coradas com DiI_{C₁(5)}, resultando em coloração intensa de estruturas intracelulares e menos intensa de pontos na superfície da cápsula. A imagem à direita é a mesma da esquerda, após realce de brilho e contraste para evidenciar melhor os pontos na cápsula.

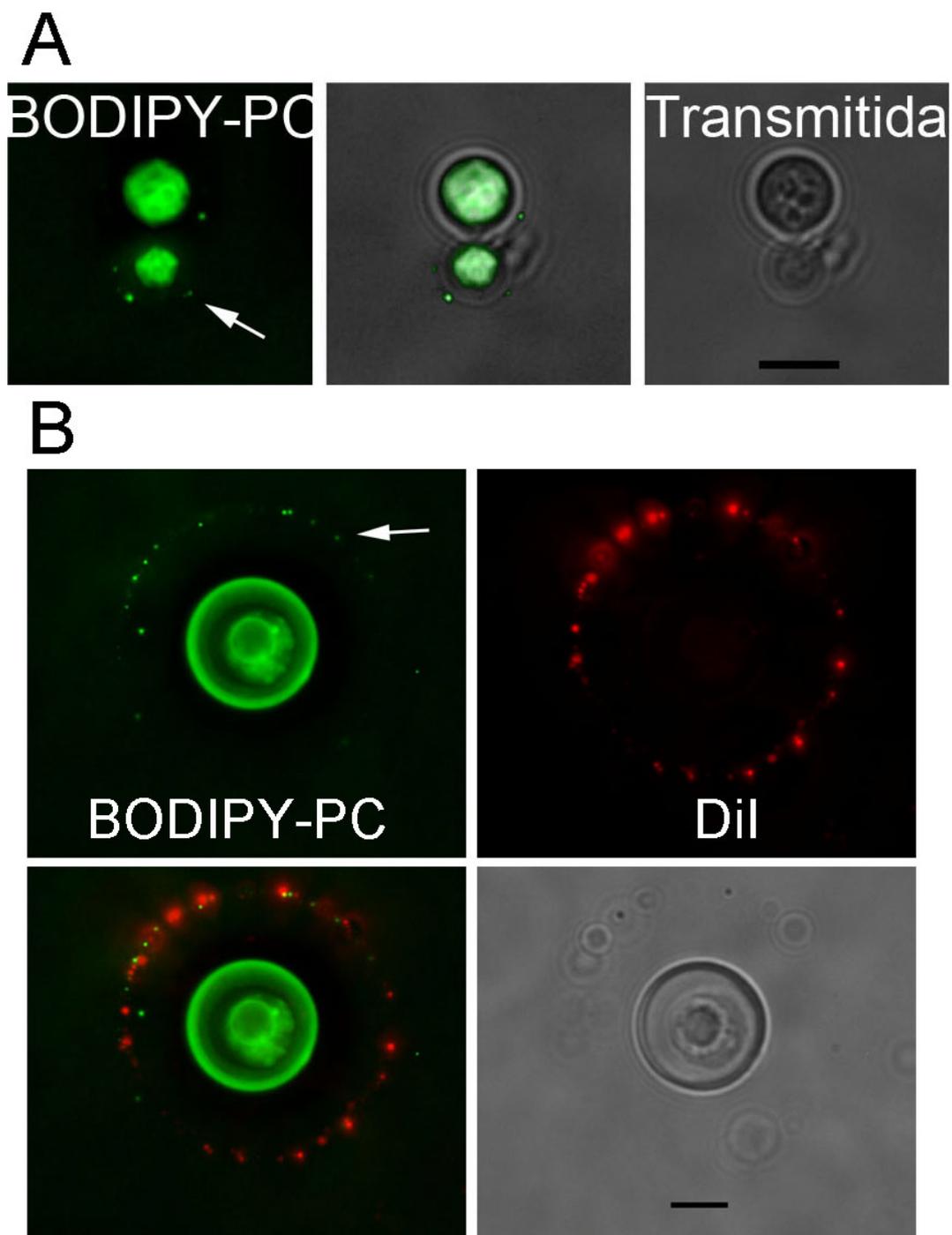


Figura 9 – Coloração de *C. neoformans* com BODIPY-PC e DiI

(A) Epifluorescência de células de *C. neoformans* incubadas com BODIPY-PC. A seta aponta vesículas na superfície da cápsula. (B) *C. neoformans* corado com BODIPY-PC e DiI observado por epifluorescência com deconvolução. As barras correspondem a 5 μm .

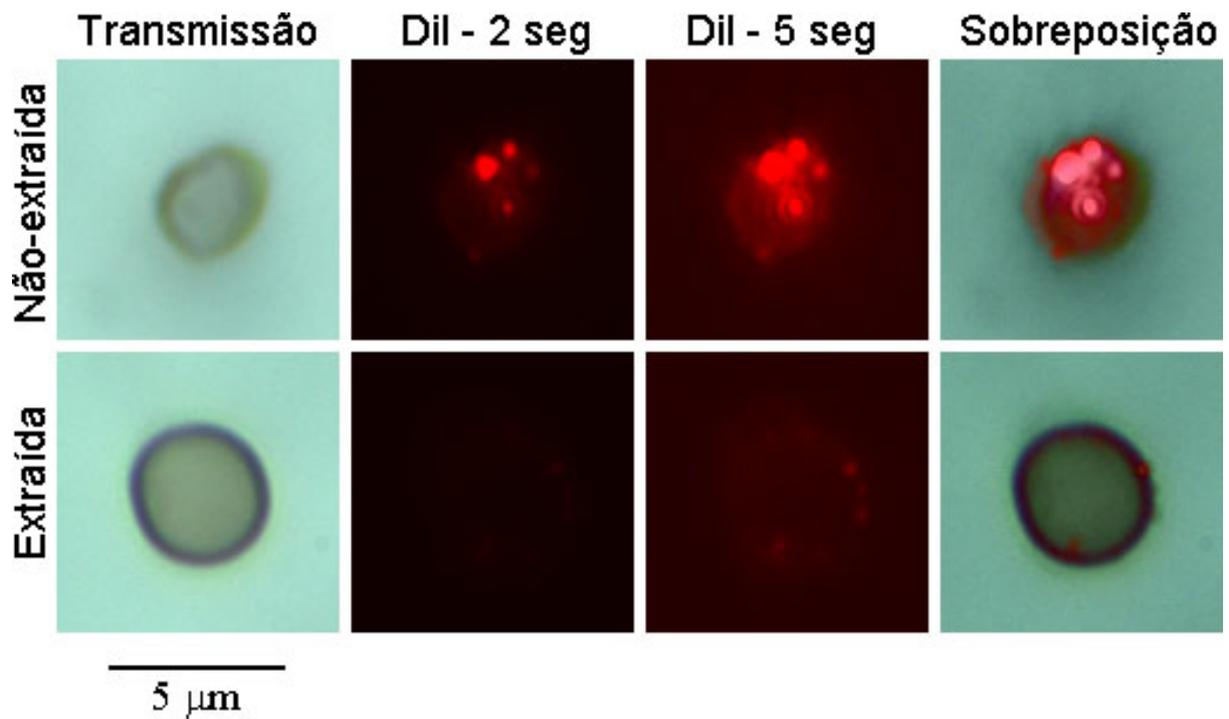


Figura 10 – Coloração de fantasmas de melanina com DiI

Fantasmas de melanina que foram ou não submetidos a extração com solventes orgânicos foram corados com DiI e examinados por microscopia de fluorescência. As duas amostras foram então examinadas sob condições idênticas com dois tempos de exposição diferente para demonstrar que após a extração os fantasmas ligam menos DiI, uma indicação de que há membranas lipídicas associadas à melanina.

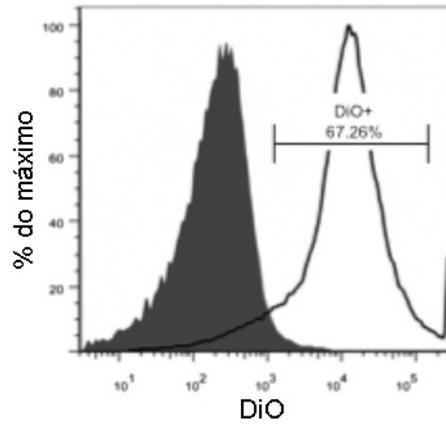


Figura 11 – Coloração de vesículas extracelulares de *B. anthracis* com DiO

Vesículas extracelulares purificadas de *B. anthracis* foram coradas com DiO e analisadas por citometria de fluxo, demonstrando um padrão similar ao observado com vesículas extracelulares de *C. neoformans*.

Capítulo 2 – Mecanismos de ação dos anticorpos contra a cápsula de *Cryptococcus neoformans*

Este capítulo inclui dois trabalhos cujo foco é o papel dos anticorpos na imunidade contra *C. neoformans*. Os dois trabalhos foram feitos em colaboração com colegas e eu sou co-primeiro autor em ambos. Um dos trabalhos, já publicado, estuda o mecanismo de ação de anticorpos contra a cápsula [108]. O segundo trabalho, submetido para publicação, lida com uma pergunta que permanece há 30 anos sem resposta na Imunologia: qual é o receptor do isotipo IgG3 de camundongo?

Materiais e Métodos

Parte 1 – expressão gênica na presença de anticorpos contra a cápsula

Cultura de *C. neoformans*

Em todos os experimentos deste projeto foi utilizado o isolado H99. Mais detalhes sobre as linhagens de *C. neoformans* utilizadas neste trabalho podem ser encontradas na Tabela 1.

Anticorpos

Foram utilizados os anticorpos 18B7, 12A1, 13F1, MOPC 21, TEPC 183. Mais detalhes sobre cada um deles podem ser encontrados na Tabela 3. Os anticorpos foram marcados com Alexa Fluor 488 de acordo com instruções do fabricante.

Expressão gênica por microarranjo

Microarranjos. Lâminas de microarranjo para *C. neoformans* foram preparadas por um consórcio financiado por pesquisadores individuais e pelo *Burroughs Wellcome Fund* (“*Cryptococcus* Community Microarray Consortium”). Os experimentos são feitos no centro de genômica da Universidade Washington em Saint Louis-MO, EUA (The Genome Center at Washington University;

http://genome.wustl.edu/services/microarray/cryptococcus_neoformans). O arranjo inclui 7.775 sondas em duplicata e é baseado na sequência genômica da linhagem de *C. neoformans* var. *neoformans* JEC21.

Preparação das amostras de cDNA. As células de *C. neoformans* (4×10^7 no total) foram incubadas com anticorpos a 37°C por uma hora. A concentração de anticorpos foi normalizada pelo número de células de *C. neoformans* e pelo número de moléculas de GXM presentes em cada célula [109]. Após a incubação, RNA total foi extraído com o kit RNAeasy (Qiagen) e DNA genômico removido com o kit Message Clean (GenHunter).

Hibridação e análise dos dados. Para o microarranjo com 18B7, 6 diferentes amostras de RNA foram usadas para comparar H99 na presença de 18B7 e H99 na presença do controle de isotipo MOPC. Para os experimentos com IgM, 3 grupos de RNA foram usados para comparar H99 na presença de 12A1 e H99 na presença de 13F1 com H99 na presença do controle de isotipo TEPC. Cada comparação foi feita duas vezes com alternância dos corantes Cy3 e Cy5 em cada amostra de cDNA (“dye-swap”). A consistência das duas medidas foi avaliada pela correlação da média nos dois canais ($r^2 = 0,78$) indicando efeito insignificante do corante. Os dados de expressão gênica foram normalizados em todos os microarranjos e analisados com o software GeneSpring 7.2 (Agilent). Foram selecionados genes com alteração da expressão (“fold-change”) maior ou igual a 2 com valor de p menor que 0,05. A correção para testes múltiplos pelo método de taxa de descobertas negativas de Benjamini e Hochberg (“Benjamini and Hochberg false discovery rate”) foi então utilizada em todos os genes com variação na expressão.

RT-PCR em tempo real

RNA foi coletado de células de H99 incubadas com concentrações saturantes de todos os anticorpos como descrito para os microarranjos. Um controle adicional foi feito com *C.*

neoformans incubado com os anticorpos 18B7, 12A1 e 13F1 fervidos. cDNA foi feito a partir de duas amostras de RNA para cada condição utilizando o kit Quantitech Reverse Transcription (Qiagen). As reações de RT-PCR em tempo real foram feitas com SYBR Green (Applied Biosystems) no equipamento ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Cada amostra de cDNA foi analisada em quadruplicata e normalizada contra a expressão do gene da actina [110]. A expressão relativa de cada gene na presença dos anticorpos é dada em relação a sua expressão em células tratadas com os controles de isotipo. Todos os experimentos de RT-PCR em tempo real descritos foram repetidos duas vezes.

Microscopia confocal

Os anticorpos 18B7, 12A1 e 13F1 foram marcados com AlexaFluor 488 de acordo com instruções do fabricante do kit (Invitrogen). Células de *C. neoformans* foram incubadas com os anticorpos marcados e submetidas a microscopia confocal com o equipamento Leica SP2. As fatias foram reconstruídas tridimensionalmente usando o software ImageJ, que também foi usado para medir a distância entre a marcação e a parede celular, corada com calcofluor. A diferença nas distâncias de ligação dos anticorpos foi analisada por ANOVA.

Teste de XTT

Este teste mede a redução de XTT [hidróxido de 2,3- bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamino)carbonil-2H-tetrazólio], uma substância incolor que se torna alaranjada (pico de absorção: 490-500 nm) após ser reduzida por redutases mitocondriais. A redução de XTT é portanto um marcador do metabolismo mitocondrial. Para o teste, células de *C. neoformans* foram crescidas até o meio da fase logarítmica a 37°C, lavadas e diluídas em PBS contendo BSA a 1%. Foram então acrescentados os anticorpos a concentrações de 5,2 a 333 µg/mL (mais um controle sem anticorpos) e 5×10^6 células de *C. neoformans*. Foram feitos seis poços para cada concentração. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 20 h,

quando XTT e menadiona foram adicionados. Após quatro horas a 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm. Cada teste foi repetido duas vezes.

Ensaio de susceptibilidade a antifúngicos

Concentração inibitória mínima (MIC). A uma placa de 96 poços foram acrescentadas 10^4 células de *C. neoformans* por poço diluídas em meio mínimo e duas concentrações diferentes de anticorpos, uma concentração saturante e outra metade desta. As células foram incubadas com anticorpos por uma hora, quando então foram acrescentadas diluições de anfotericina B para se obter concentrações finais da droga variando de 1 a 0,031 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C e observadas durante 7 dias para avaliar a menor concentração de anfotericina B capaz de inibir o crescimento. Este experimento foi repetido três vezes.

Curva de crescimento. Este experimento foi feito de maneira semelhante ao de concentração inibitória mínima. No entanto, foi usado o equipamento Bioscreen C (Growth Curves, EUA), que mantém as células em placas de 100 poços sob agitação e temperatura constantes e faz leituras de absorbância a cada 30 min. Cada poço continha em um volume final de 200 µL: meio mínimo, 10^4 células de *C. neoformans*, anticorpos 18B7 ou MOPC a 166 µg/mL (metade da concentração saturante) e uma concentração de anfotericina B variando de 4 a 0,016 µg/mL. As curvas de crescimento foram coletadas durante 5 dias.

Morte celular medida por citometria de fluxo. Células de *C. neoformans* foram preparadas como descrito acima para o experimento com XTT e incubadas por 1 h a 37°C com 18B7 ou MOPC. Após a incubação com anticorpos, foi acrescentada anfotericina B para concentração final de 2 µg/mL e as células incubadas por mais uma hora. Em seguida foi adicionado às células o corante SYTOX Green e elas foram analisadas no citômetro BD LSRII descrito anteriormente. Um total de 30.000 eventos foi coletado e o experimento foi repetido duas vezes.

Cromatografia de camada delgada (TLC) de lipídios

Células de *C. neoformans* foram suspensas em PBS + BSA 1% a 3×10^7 células por mL e incubadas sob agitação a 37°C com 6 µCi/mL de acetato marcado radioativamente por ^{14}C no carbono 1 na presença ou ausência de concentrações saturantes de 18B7 ou MOPC. Após duas horas, as células foram coletadas para extração de lipídios pelo método de Blight e Dyer [111]. Para tanto, foram acrescentados às células, suspensas em 1 mL de PBS, 3,75 mL de clorofórmio-metanol 2:1 e pérolas de vidro. As células foram agitadas em vortex por 15 min, quando então foi acrescentado mais 1,25 mL de clorofórmio. Para separar as fases, os tubos foram centrifugados a 110 g por 10 min e a fase inferior coletada e seca. Os extratos lipídicos foram diluídos em um pequeno volume de clorofórmio-metanol 2:1 e separados por cromatografia de camada delgada (TLC) em placas de sílica usando como fase móvel éter de petróleo-dietil éter-ácido acético 90:15:1 (v/v/v). A placa de TLC foi então exposta por 5 dias com filme radiográfico BioMax (Kodak) e a identidade da banda de ácidos graxos determinada por comparação com um padrão de ácido palmítico radioativo aplicado na mesma placa. A intensidade das bandas foi quantificada usando o software Multigauge 2.3 (Fujifilm) e normalizada pela intensidade total de cada poço.

Parte 2 – Itgb1 e o receptor de IgG3

Cultura de *C. neoformans*

Em todos os experimentos deste projeto foi utilizado o isolado 24067. Mais detalhes sobre as linhagens de *C. neoformans* utilizadas neste trabalho podem ser encontradas na Tabela 1.

Cultura celular e camundongos

Foram utilizadas neste trabalho as células J774, CHO e A549 e as linhagens de camundongos C57BL/6, nocaute Fcγ, duplo nocaute Fcγ e Itgb1flox. Mais informações sobre as linhagens

celulares e camundongos usados podem ser encontrados nas tabelas Tabela 4 e Tabela 5. Macrófagos primários foram preparados como descrito anteriormente.

Anticorpos

Foram utilizados os anticorpos 3E5-IgG1, 3E5-IgG3, HM β 1-1, HM α 1, HM α 2, PS/2 e RMV7. Mais detalhes sobre cada um deles podem ser encontrados na Tabela 3. HM β 1-1 marcado com ficoeritrina (PE) e IgG1 marcado com aloficocianina (APC) foram comprados marcados. Os anticorpos 3E5 IgG3-DTAF, 3E5 IgG3-AlexaFluor 488 e 3E5 IgG1-AlexaFluor 568 foram marcados de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen).

Teste de fagocitose

As células foram plaqueadas entre 2 h e 24 h em placas de 96 poços. Em experimentos nos quais receptores foram bloqueados, os anticorpos foram acrescentados em concentrações de 10 a 50 μ g/mL por 20-30 min. Em seguida, foram acrescentadas 10^5 a 2×10^5 células de *C. neoformans* opsonizadas com 10 μ g/mL de 3E5 IgG1 ou IgG3 para atingir uma razão de infecção entre 1:1 e 1:2. A placa foi então incubada por 2 h a 37°C e 10% CO₂ e as células fixadas com metanol a -20°C por 30 min. As células foram então lavadas com PBS três vezes, coradas com Giemsa e observadas em um microscópio invertido. Para quantificação da fagocitose, foram contadas pelo menos cem células por campo em três campos diferentes em cada poço. Uma câmera digital Nikon D60 foi utilizada para fotografar as células, quando necessário. Cada condição experimental foi analisada em triplicata.

Varredura da biblioteca de shRNA

Transdução da biblioteca. Um conjunto de partículas lentivirais contendo aproximadamente 80.000 diferentes shRNAs contra 15.000 genes de camundongo foi obtido através da Sigma-Aldrich, distribuidora dos produtos gerados pelo “RNAi Consortium” [112, 113]. Células J774 foram plaqueadas e incubadas por 24 h de forma a gerar 10 placas com 2×10^6 células

por placa. Brometo de hexadimetrina (Sigma) foi adicionado às células em concentração de 8 µg/mL para aumentar a eficiência de transdução e 2×10^5 partículas virais foram acrescentadas a cada placa para atingir uma multiplicidade de infecção de 0,1. Após uma incubação de 24 h, o meio foi trocado e as células incubadas por mais um dia para permitir a integração do vetor e expressão da marca de resistência. Neste momento foi adicionada puromicina a 5 µg/mL e as células incubadas por mais dois dias. Após a seleção, as células mortas foram removidas e as células transduzidas re-plaqueadas com puromicina para se recuperarem durante uma noite.

Separação por citometria de fluxo. No dia seguinte, um total de $4,6 \times 10^7$ células foi corado com dois anticorpos monoclonais marcados, IgG3-DTAF e IgG1-APC. As células foram então lavadas, re-suspendidas em uma solução salina contendo quelantes (Cellstripper, Cellgro Inc.) e DAPI para eliminar células mortas da análise, passadas por um filtro de 40 µm e analisadas no citômetro de fluxo MoFlo XDP. As regiões (“gates”) usadas para separar as células foram determinadas com base em controles corados somente com IgG1 ou IgG3 e a separação foi feita em modo “yield”, no qual ao detectar um evento a ser separado o equipamento coleta não só a gota que mais provavelmente o contém mas também as duas gotas imediatamente antes e depois dela. Um total de $1,5 \times 10^6$ células foi recuperado e crescido em meio contendo puromicina por uma semana. As células foram então submetidas a uma nova etapa de separação, desta vez em modo “purity”, no qual uma célula positiva só é separada se as duas gotas anteriores ou posteriores não contiverem nenhuma outra célula para garantir a pureza. Foram recuperadas 50.000 células que foram crescidas em cultura para extração de DNA.

Extração do DNA, amplificação por PCR, sequenciamento e análise estatística. DNA genômico total foi extraído das amostras a serem analisadas utilizando o kit “DNAeasy blood and tissue” da Qiagen. As amostras de DNA foram então enviadas à empresa “Partners

Healthcare”, que submeteu as amostras a amplificação por PCR com iniciadores que flanqueiam a região codificadora do shRNA. Os produtos das reações com DNA extraído das células J774 transduzidas antes da separação e após a segunda rodada de separação foram sequenciados em uma plataforma Illumina Solexa para gerar um mínimo de 3 milhões de leituras por amostra. Os dados foram então enviados a uma segunda empresa, “Seqwise LLC”, onde foram identificadas as sequências correspondentes ao shRNA em cada leitura. Após a comparação com banco de dados da Sigma, foi gerada uma tabela com informações sobre cada um dos shRNAs (por exemplo gene alvo, anotação GO) e com o número de vezes que cada um deles foi lido nas duas amostras. Esta informação foi analisada pelo método de Audic e Claverie [114] na ferramenta online IDEG6 [115].

Citometria de fluxo

Para analisar a ligação de IgG1 ou IgG3, assim como medir a expressão de Itgb1, foram utilizados os citômetros BD LSR II ou BD FACS Aria. Aproximadamente 10^6 células foram ressuspensas em 1 mL de PBS e coradas com 10 μ L de IgG1-AF568, IgG3-AF488 ou HM β 1-1. Após coloração por 1 h a 4°C, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS e analisadas nos citômetros. Os dados foram então analisados com o software FlowJo (Treestar Inc).

Resultados

Ligação de anticorpos altera a expressão gênica de *Cryptococcus neoformans* e modula o metabolismo fúngico diretamente

Para testar se anticorpos contra a cápsula têm algum efeito diretamente em *C. neoformans*, células do fungo foram incubadas com três anticorpos monoclonais contra GXM (18B7 - IgG1 protetor, 12A1 – IgM protetor e 13F1 – IgM não-protetor) e dois controles de isotipo (MOPC 21 e TEPC) e em seguida usadas para extração de RNA para microarranjo.

Em comparação com os respectivos controles de isotipo, os anticorpos contra GXM alteraram a expressão de um pequeno número de genes, aproximadamente 1% dos genes presentes no genoma de *C. neoformans*. O anticorpo IgG1 protetor 18B7 alterou a expressão de 43 genes, principalmente ligados a metabolismo e síntese da parede celular (Figura 12 e Tabela 6). De 14 genes testados por RT-PCR em tempo real, 79% tiveram o padrão de expressão confirmado (Tabela 7). Em especial, a ligação de 18B7 à cápsula de *C. neoformans* induziu a expressão das três enzimas que sintetizam ácidos graxos, as subunidades α e β da ácido graxo sintase e a acetil-CoA carboxilase [116]. Já o anticorpo 12A1, IgM protetor, alterou a expressão de 62 genes envolvidos principalmente com metabolismo, secreção e tradução (Figura 12 e Tabela 8). RT-PCR em tempo real confirmou o padrão de expressão de 67% dos 21 genes testados (Tabela 9). O que mais chamou a atenção na resposta a este anticorpo foi a diminuição da expressão de 8 genes relacionados a formação de ribossomos e tradução, sugerindo que a ligação de 12A1 à cápsula induza um declínio no processo de tradução. Por fim, o anticorpo IgM não-protetor 13F1 alterou a expressão de 39 genes (Figura 12 e Tabela 10). Em contraste com os outros dois anticorpos, a ligação de 13F1 não gerou um padrão claramente reconhecível; além disso, somente 29% dos 14 genes testados por RT-PCR em tempo real tiveram seu padrão de expressão confirmado (Tabela 11).

A indução de genes relacionados à síntese da parede celular sugere que esta estrutura possa ser afetada pela ligação de anticorpos à cápsula. Nós então formulamos a hipótese de que os diferentes padrões de expressão gênica observados com os três anticorpos se devam a diferenças em quão próximo à parede estes anticorpos se ligam. Para testar esta hipótese, os anticorpos foram marcados diretamente com o fluoróforo Alexa Fluor 488 e usados em experimentos de microscopia confocal. Como descrito anteriormente [88] e mostrado na Figura 13, os anticorpos 18B7 e 12A1 se ligaram à cápsula em toda a sua extensão em um

padrão anular, enquanto o anticorpo 13F1 apresentou um padrão de ligação diferente, mais difuso e puntiforme.

Para confirmar se as alterações na expressão de genes relacionados ao metabolismo tinham realmente algum significado fisiológico, foram feitos experimentos bioquímicos confirmatórios. O primeiro experimento foi feito com o reagente XTT, que ao medir a atividade de redutases mitocondriais reflete o metabolismo celular em geral. Na presença de 12A1 houve maior redução de XTT em comparação com o controle de isotipo (Figura 14). Outro teste foi feito para avaliar se a indução transcricional da biossíntese de ácidos graxos se traduziu em aumento da síntese lipídica. Para tanto, células de *C. neoformans* foram tratadas com 18B7 ou MOPC na presença de um precursor de lipídios radioativo, ^{14}C -acetato. Utilizando cromatografia de camada delgada (TLC) e auto-radiografia para quantificar os lipídios presentes nos extratos, foi possível confirmar que na presença de 18B7 o fungo produz maior quantidade de ácidos graxos (Figura 15).

Como um dos principais sítios onde ácidos graxos são usados na célula é a membrana citoplasmática, é possível que a indução desta via indique que a ligação de 18B7 à cápsula possa resultar em danos à membrana. Sendo esta hipótese verdadeira, as células tratadas com 18B7 se tornariam mais susceptíveis ao tratamento com antifúngicos cujo alvo é a membrana, como os poliênicos. Foram então feitos três diferentes experimentos para analisar a susceptibilidade de *C. neoformans* à anfotericina B na presença de anticorpos. O primeiro foi um experimento de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima do antifúngico na presença ou ausência de anticorpos (Figura 16, painel A). Todos os anticorpos, inclusive os controles de isotipo, aumentaram em uma diluição a susceptibilidade, enquanto o anticorpo 18B7 aumentou ainda mais. Os anticorpos 12A1 e 13F1 não apresentaram diferenças reprodutíveis em relação ao controle TEPC. Durante este experimento pode-se notar que o resultado mudou durante os sete dias de incubação. Para avaliar melhor a inibição

do crescimento ao longo do tempo, o experimento foi repetido em um equipamento que mede o crescimento a cada 30 min. As curvas de crescimento de *C. neoformans* mostram que em concentrações sub-inibitórias de anfotericina B a presença de 18B7 atrasou o crescimento do fungo em pelo menos 48 h (Figura 16, painel B). Este experimento mostrou mais uma vez que mesmo o anticorpo controle MOPC também apresentou algum efeito. Os dois experimentos anteriores refletem os efeitos da anfotericina B na inibição do crescimento. Para avaliar o efeito tóxico direto às células de *C. neoformans*, as células foram coradas com SYTOX Green após o tratamento com anfotericina B em concentração inibitória e analisadas por citometria de fluxo. A ligação de 18B7 à cápsula por si só não aumentou o número de células mortas, mas aumentou o efeito da anfotericina B (Figura 16, painel C).

A ligação de dialquilcarbocianinas à cápsula é induzida por 18B7 e bloqueia a fagocitose pelo domínio de lectina dos receptores de complemento

Durante testes com as dialquilcarbocianinas descritas no capítulo 1, foi verificado que a ligação de anticorpos à cápsula aumenta drasticamente a ligação das dialquilcarbocianinas ao polissacarídeo capsular, possivelmente por expor um motivo de ligação às sondas antes escondido (Figura 17). Este fenômeno lembra a observação de que a ligação de anticorpos à cápsula expõe motivos que são reconhecidos pelo domínio de lectina dos receptores de complemento CR3 e CR4 na ausência de complemento [91]. Para testar se os dois fenômenos têm alguma ligação, células de *C. neoformans* foram incubadas com 18B7 mais DiI ou DiIC₁(5) e utilizadas em testes de fagocitose (Figura 18). Macrófagos nocaute para receptores de Fc γ foram capazes de fagocitar as células não coradas e as células coradas com DiI, mas não as células coradas com DiIC₁(5). Um primeiro controle foi feito com macrófagos selvagens e *C. neoformans* corado com ambas as sondas, mostrando que a fagocitose por meio dos receptores de Fc γ não foi bloqueada. Por fim, um controle em que os macrófagos, e

não as células de *C. neoformans*, foram corados com as sondas mostrou que DiIC₁(5) não apresentava nenhum efeito aparente nos fagócitos.

Integrina beta 1 (CD29) promove a interação de IgG3 murino com células efectoras.

Para descobrir o receptor de superfície de IgG3, foi utilizada uma biblioteca lentiviral contendo 80.000 shRNAs tendo como alvos 15.000 genes de camundongo [112, 113]. Experimentos piloto mostraram que células J774 transduzidas com a biblioteca apresentaram uma população com menor ligação a IgG3 e ligação alta a IgG1 (Figura 19). Uma estratégia de varredura foi então feita utilizando citometria de fluxo com IgG1 e IgG3 fluorescentes e sequenciamento de alto desempenho para identificar genes cuja expressão diminuída por interferência de RNA diminuísse a ligação de IgG3 sem alterar a ligação de IgG1 à superfície de células J774 (

Figura 20). Células J774 foram transduzidas com a biblioteca de vírus a uma razão de 1:10, para diminuir o número de células transduzidas com mais de um shRNA. As células transduzidas foram então selecionadas com puromicina e marcadas para separação citométrica. Após duas rodadas de separação, o DNA genômico das populações pré- e pós-separação foi extraído e usado em uma reação de PCR para amplificar as regiões que codificam o shRNA. Após sequenciamento de alto desempenho e análise bioinformática, foi obtida uma lista de 8.973 shRNAs com pelo menos uma cópia detectada em uma das duas bibliotecas. Baseado no número de vezes que cada shRNA foi detectado nas duas bibliotecas, foi feita uma análise estatística pelo método de Audic e Claverie [114, 115], que mostrou que 8.145 shRNAs estavam presentes em níveis significativamente diferentes em uma das amostras. Destes, 2.794 estavam mais representados na biblioteca pós-separação. Continuando a análise, 266 destes shRNAs têm como alvo proteínas de membrana de acordo com a classificação do “Gene Ontology (GO)”. Dentre estes 266 candidatos, nós escolhemos cinco genes mais prováveis tendo como base critérios como expressão em macrófagos e

possíveis papéis em fagocitose: Lrig2 (“leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 2”), Itgb2l (“Integrin beta 2-like”, ou Pactolus), Itgb1 (Integrina beta 1), Tlr2 (“toll-like receptor 2”), and Fas1 (ligante de Fas).

Clones individuais de shRNA contra estes cinco genes foram transduzidos em células J774, que foram então usadas em teste de fagocitose com *C. neoformans* opsonizado com IgG3 (Figura 21, painel A). Dois dos shRNAs contra Itgb1 levaram a diminuição da fagocitose; estes mesmos dois shRNAs foram os mais efetivos na diminuição da quantidade de Itgb1 na superfície celular (Figura 21, painel B). As células J774 transduzidas com estes dois shRNAs foram então coradas com anticorpo contra Itgb1 e submetidas a separação por citometria de fluxo para purificar as células com maior eficiência de interferência contra o gene. Como forma alternativa de bloquear a função de Itgb1, foi utilizado também o anticorpo HMβ1-1 que bloqueia a função desta integrina [92]. Experimentos feitos com as células transduzidas e HMβ1-1 mostraram um efeito aditivo que bloqueou quase completamente a fagocitose mediada por IgG3 sem afetar a fagocitose mediada por IgG1 (Figura 21, painéis C e D).

Para avaliar diretamente a ligação de IgG3 à superfície de macrófagos, foram utilizados anticorpos marcados com fluorescência e citometria de fluxo. Um primeiro experimento foi feito para avaliar o papel dos cátions divalentes Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} na ligação. Destes três cátions, Mn^{2+} e Mg^{2+} normalmente ativam integrinas, enquanto Ca^{2+} pode ativá-las ou inibi-las [117]. A presença dos três cátions divalentes em concentrações de 1mM aumentou a ligação de IgG3; o efeito de Mg^{2+} , entretanto, foi menos pronunciado que dos outros dois (Figura 22). Em seguida foram testadas diferentes concentrações de cada um dos três cátions divalentes, demonstrando um efeito dose-dependente deles (Figura 23). Além disso, os cátions divalentes foram também testados em combinação. Este experimento mostrou que Mn^{2+} e Ca^{2+} tiveram efeito sinérgico na indução de ligação de IgG3, enquanto

a presença de Mg^{2+} não alterou os efeitos de Ca^{2+} mas aboliu completamente os efeitos de Mn^{2+} (Figura 24). Em nenhum destes experimentos foi observado efeito importante dos cátions divalentes na ligação de IgG1.

Em seguida foram feitos experimentos de ligação de anticorpos por citometria de fluxo usando células J774 transfectadas com shRNA para *Itgb1* e o anticorpo HM β 1-1. Na presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} mais uma vez tanto os shRNAs quanto HM β 1-1 diminuíram a ligação de IgG3 aos macrófagos (Figura 25). Quando ambos foram combinados, a mediana de fluorescência de IgG3 caiu de 2939 no controle para 1517 e 1506 nas células transduzidas com os dois shRNAs para *Itgb1*, uma queda de quase 50%.

Para confirmar os resultados obtidos com células J774, foram usados macrófagos primários derivados de camundongos *Itgb1*flox. Por citometria de fluxo, foi determinado que aproximadamente metade dos MDMO derivados dos camundongos Cre⁺ eram negativos para *Itgb1*, em comparação com 5% em Cre⁻ (Figura 26, painel A). Em concordância com os resultados obtidos com células J774, macrófagos derivados dos camundongos Cre⁺ tiveram uma diminuição na fagocitose mediada por IgG3 quando a via alternativa de fagocitose pelo domínio de lectina dos receptores de complemento foi bloqueada (Figura 26, painel B). Mais uma vez, a fagocitose mediada por IgG1 praticamente não foi afetada pelo nocaute de *Itgb1*.

Testes de citometria mostraram que assim como células J774, os MDMO ligaram IgG3 e que essa ligação foi aumentada na presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} . Entretanto, não foram observadas grandes diferenças na ligação de IgG3 entre as células Cre⁺ e Cre⁻ (Figura 26, painel C). Como MDMO foram usados por Gavin e colaboradores [118] no estudo que sugeriu Fc γ RI como o receptor de IgG3, também foi avaliado o efeito na ligação de IgG3 do bloqueio deste receptor. Na presença de excesso molar de IgG2a monomérico, que se liga a Fc γ RI com alta afinidade [67], houve uma diminuição da ligação de IgG3. No entanto, mais

uma vez não foram observadas diferenças marcantes entre macrófagos derivados de camundongos Cre⁺ e Cre⁻ (Figura 26, painel D).

Além dos testes de perda de função usando RNAi, anticorpos e camundongos nocaute, nós fizemos um teste de ganho de função usando células CHO. Estas células epiteliais não-fagocíticas foram transfectadas com o cDNA de Itgb1 murino (CHO-Itgb1) e usadas em testes de fagocitose e ligação por citometria de fluxo. Surpreendentemente, as células CHO não-transfectadas foram capazes de fagocitar *C. neoformans* opsonizado por IgG3, mas não IgG1 (Figura 27, painel A). Estes resultados foram confirmados com a linhagem A549 de pneumócitos humanos, que também fez fagocitose de *C. neoformans* mediada por IgG3, mas não IgG1 (Figura 27, painel B).

As células CHO também foram utilizadas em testes de ligação por citometria. Na ausência de cátions divalentes, houve uma ligação mínima de IgG3 às células selvagens e um aumento ligeiro na ligação em células CHO-Itgb1, sem nenhuma ligação de IgG1 (Figura 28, painel A). Em contraste, a adição de Ca²⁺ e Mn²⁺ aumentou a proporção de células CHO não-transfectadas que ligaram IgG3 de 7,6% para 75%, enquanto a proporção de células CHO-Itgb1 IgG3-positivas aumentou de 6,6% para 97%. A adição de HMβ1-1, que não se liga a ou inibe a integrina beta 1 de hamster nas células CHO, diminuiu a fração de células CHO-Itgb1 IgG3-positivas para 80%, valor próximo ao observado com células não-transfectadas (Figura 28, painel A).

Para testar se os resultados anteriores se reproduzem com anticorpos humanos, foram usados três anticorpos quiméricos contendo a região variável de 18B7 e regiões constantes de IgG1, IgG2 e IgG4 humanos [119, 120]. Em células CHO-Itgb1, os anticorpos quiméricos IgG1 e IgG2 resultaram em um número baixo mas consistente de fagocitose de *C. neoformans* (Figura 29), um resultado parecido com o observado com IgG3 murino.

Discussão

Uma grande quantidade de anticorpos monoclonais contra a cápsula de *C. neoformans* foi gerada nos últimos 25 anos. Muitos estudos foram feitos neste período para elucidar o papel destes anticorpos durante a criptococose, gerando um grande volume de conhecimento, mas também muitas novas questões. Os dois trabalhos descritos neste capítulo lidam com duas destas questões.

O primeiro trabalho mostra que a ligação de anticorpos à cápsula altera a fisiologia do microrganismo e o torna mais suscetível à anfotericina B, possivelmente contribuindo para a eficácia da terapia com anticorpo anti-*C. neoformans*. O estudo foi realizado com a IgG1 protetora 18B7 [60] e com um par de anticorpos IgM muito parecidos, mas com efeitos terapêuticos diametralmente opostos [88]. Para entender o que acontece na célula de *C. neoformans* quando estes anticorpos se ligam à cápsula, foi utilizada a técnica de microarranjo. O número de genes cuja expressão foi alterada foi baixo (menos de 1% do genoma) e estas alterações tiveram uma baixa amplitude (expressão relativa ao controle variando de 0,36 a 4,00), demonstrando que o microrganismo em geral consegue se adaptar bem a essa condição. Para tentar entender porque a ligação destes três anticorpos gerou padrões diferentes de expressão gênica, eles foram marcados e utilizados em experimentos de imunofluorescência por microscopia confocal. O padrão de coloração e a profundidade que cada um dos anticorpos conseguiu penetrar na cápsula variou, o que poderia em parte explicar estas diferenças. O anticorpo que mais próximo chegou da parede celular foi o IgG1 18B7, provavelmente por ter um tamanho menor que os outros IgM.

Apesar do baixo número de genes cuja expressão foi alterada, alguns padrões puderam ser claramente observados. Todos os anticorpos induziram a expressão de genes relacionados à parede celular, o que sugere que a ligação de anticorpos à cápsula pode provocar estresse na parede. Além disso, uma proporção razoável dos genes induzidos após a

ligação dos anticorpos está envolvida com metabolismo, principalmente no caso do anticorpo 12A1. Para testar se este padrão de indução gênica resulta em alteração metabólica, foi feito o teste de redução de XTT. Este teste mostrou que de fato o tratamento com 12A1 aumentou a taxa metabólica de *C. neoformans*.

O mais marcante destes padrões foi a indução de todas as enzimas da via de síntese de ácidos graxos após o tratamento com 18B7. Uma possível explicação para o aumento da produção de ácidos graxos é uma maior necessidade destes como precursores da membrana lipídica, indicando que a ligação de 18B7 bem próxima da parede celular possa levar a estresse na membrana. Como a membrana é o alvo de várias das drogas antifúngicas mais utilizadas, nós testamos se a ligação de 18B7 à cápsula altera a susceptibilidade a esta droga. Experimentos de concentração inibitória mínima e curvas de crescimento com anfotericina B mostraram que a presença de 18B7 ligado à cápsula atrasa o crescimento das células em concentrações sub-inibitórias de anfotericina B. Além de atrasar o crescimento, o anticorpo aumentou o número de células que morriam imediatamente após o tratamento com anfotericina B em doses inibitórias. Estes efeitos podem explicar resultados obtidos com modelos experimentais de criptococose, nos quais a adição de outros dois anticorpos monoclonais de isotipo IgG1 contra a cápsula aumentou a eficácia do tratamento com anfotericina B [121, 122].

Enquanto este projeto estava em andamento, foi aventada a hipótese de que o tratamento com 18B7 induzia a biossíntese de ácidos graxos porque o tráfico de vesículas extracelulares pela cápsula seria bloqueado pela ligação do anticorpo. Nesta época, já haviam sido feitos os experimentos com dialquilcarbocianinas em células intactas mostrados na Figura 7, mas os controles mostrados na Figura 8 ainda não. Portanto, foi feito um experimento com DiI para testar se 18B7 aumenta o número de vesículas na cápsula. O resultado positivo parecia confirmar a hipótese, até que se esclareceu que DiI parecia corar o

carboidrato capsular e não vesículas. A interpretação do resultado foi então de que a ligação de 18B7 expõe um motivo da cápsula ao qual as dialquilcarbocianinas se ligam. Este resultado assemelha uma observação anterior de que a ligação de anticorpos à cápsula expõe um motivo no polissacarídeo reconhecido pelo domínio de lectina dos receptores de complemento [91]. A semelhança entre os dois fenômenos poderia significar que a ligação de dialquilcarbocianinas a células de *C. neoformans* recobertas por 18B7 bloquearia o reconhecimento delas por meio do receptor de complemento. Para testar esta hipótese, células opsonizadas com 18B7 foram incubadas com macrófagos duplo nocaute $F\gamma C$ uma condição na qual a fagocitose somente ocorre por meio do domínio de lectina dos receptores de complemento. Enquanto DiI não apresentou nenhum efeito, DiIC₁(5) bloqueou a fagocitose específica por esta via, sugerindo que de fato as sondas se ligam ao mesmo motivo reconhecido pelos receptores de complemento. Esta sonda poderá ser usada para estudar o polissacarídeo capsular a fim de melhor entender o mecanismo responsável por esta via de fagocitose.

O segundo trabalho que faz parte deste capítulo também ajuda a entender o mecanismo de ação dos anticorpos monoclonais contra a cápsula de *C. neoformans*, mais especificamente as diferenças observadas com o uso de diferentes isotipos de IgG. Com a varredura da biblioteca de shRNA, a integrina beta 1 foi envolvida especificamente com a função de IgG3, mas não de IgG1. As integrinas são proteínas de membrana formadas heterodímeros alfa e beta que participam de interações intercelulares e entre células e a matriz extracelular [123]. Algumas integrinas também podem mediar fagocitose, sendo o melhor exemplo os receptores de complemento CR3 e CR4, que são respectivamente os heterodímeros Itgb2/Itgam (CR3) e Itgb2/Itgax (CR4). CR3 e CR4 medeiam fagocitose via iC3b ou por reconhecimento direto de componentes de microrganismos, como no caso do reconhecimento do carboidrato capsular de *C. neoformans* após a ligação de anticorpos [91].

Em contraste com as observações deste trabalho, o reconhecimento por CR3 e CR4 é independente do isotipo do anticorpo.

A primeira sugestão de que IgG3 tenha um receptor específico foi feita em 1981 a partir da descrição de um mutante espontâneo de J774 que havia perdido a capacidade de fagocitar partículas opsonizadas com IgG3 mas ainda era capaz de fagocitá-las se estivessem cobertas com IgG dos outros isotipos [124]. Há pouco mais de dez anos, um grupo australiano publicou trabalhos que sugeriram que Fc γ RI também seria capaz de ligar anticorpos IgG3 [118, 125]. Entretanto, estes resultados não foram confirmados por outros grupos, que observaram funções de IgG3 inalteradas em camundongos nocaute para a subunidade CD64 de Fc γ RI [64, 126, 127] e não observaram nenhuma ligação entre Fc γ RI e IgG3 [67].

Os resultados apresentados neste trabalho oferecem múltiplas evidências da participação de Itgb1 na fagocitose de IgG3. O bloqueio da função desta integrina por meio de RNAi, anticorpos ou nocaute gênico diminuiu tanto a ligação de IgG3 quanto a fagocitose de *C. neoformans* opsonizado com este isotipo, com pouco ou nenhum efeito na função de IgG1. Outra evidência do papel das integrinas na função de IgG3 é a importância dos cátions divalentes. As integrinas possuem múltiplos sítios de ligação com afinidade a diferentes cátions divalentes que desempenham papéis diferentes na ligação ao substrato [117]. Na maioria das integrinas, a ligação de Mn²⁺ a um destes sítios, chamado MIDAS, ativa a integrina e aumenta a afinidade pelo ligante. Corroborando o papel de Itgb1 na função de IgG3, a presença de Mn²⁺ aumentou a ligação de IgG3 a macrófagos e células CHO. Mg²⁺, que também se liga ao MIDAS e ativa integrinas, também aumentou a ligação de IgG3 a células J774; entretanto, esta ativação foi bastante diferente da resultante de Mn²⁺, uma vez que Mg²⁺ pareceu competir com Mn²⁺. Além do MIDAS, as integrinas possuem dois outros tipos de sítios de ligação de cátions divalentes. O primeiro tipo liga Ca²⁺ com alta afinidade e tem funções estruturais, na dimerização alfa/beta e na interação com ligantes [117]. Outro

sítio liga Ca^{2+} com baixa afinidade e se localiza ao lado do MIDAS. A ocupação deste sítio impede a ligação de Mg^{2+} ou Mn^{2+} ao MIDAS e, portanto, inibe a função da integrina. Este sítio inibitório não pareceu afetar a ligação a IgG3, porque Ca^{2+} não competiu com Mg^{2+} e teve efeito sinérgico com Mn^{2+} .

Os testes de ganho de função também forneceram importantes evidências sobre a relação entre Itgb1 e IgG3. A idéia original do experimento foi adicionar Itgb1 a uma célula não-fagocítica e testar se ela passaria a fagocitar partículas recobertas por IgG3. Entretanto, mesmo as células CHO não-transfectadas foram capazes de ligar IgG3 e fagocitar *C. neoformans* opsonizado com este isotipo. Este resultado pode ser interpretado pelo fato de que células CHO expressam Itgb1 de hamster, que mediará a fagocitose mediada por IgG3 de camundongo. Apesar de as células CHO não serem um controle negativo perfeito, nós conseguimos um resultado de ganho de função com este sistema. As células CHO-Itgb1 ligaram mais IgG3 do que as células CHO não-transfectadas, e esta expressão adicional foi anulada quando a integrina beta 1 exógena foi bloqueada com HM β 1-1.

Os resultados obtidos com IgG3 de camundongo não podem ser automaticamente extrapolados para imunoglobulinas humanas, uma vez que não existe um isotipo humano idêntico ao IgG3 murino [66]. No entanto, dois resultados experimentais sugerem que a relação entre IgG3 e Itgb1 possa ter aplicações humanas. Em primeiro lugar, a linhagem epitelial humana A549 foi capaz de fagocitar *C. neoformans* opsonizado com IgG3. Além disso, células CHO-Itgb1 foram capazes de fagocitar um pequeno número de células de *C. neoformans* opsonizadas com anticorpos quiméricos contendo regiões constantes de IgG1 e IgG2 humano.

Uma importante pergunta ainda resta sobre a relação entre IgG3 e Itgb1: as duas proteínas interagem diretamente ou há outros intermediários envolvidos? Neste sentido foram

tentados inúmeras vezes experimentos de imunoprecipitação e ligação cruzada para detectar a interação entre as proteínas, com resultados negativos que não permitem chegar a uma conclusão. Apesar disto, as evidências funcionais do papel de Itgb1 na função de IgG3 podem ajudar a entender os resultados obtidos com este isotipo em experimentos de camundongo. De maneira ainda mais ampla, este trabalho abre portas para possíveis alterações funcionais em anticorpos monoclonais de uso terapêutico, um mercado multibilionário que inclui nove das vinte drogas mais vendidas na atualidade e que conta com mais de 400 drogas em desenvolvimento clínico.

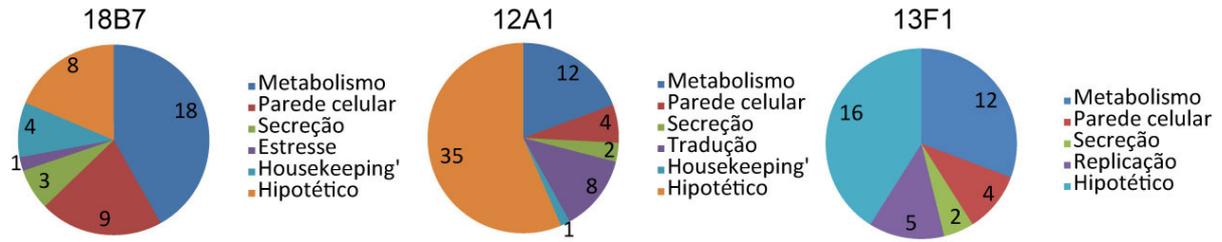


Figura 12 – Resultados do microarranjo

Os genes cuja expressão foi alterada (tanto induzida quanto reprimida) na presença de cada anticorpo nos experimentos de microarranjo foram classificados de acordo com suas funções. Mais detalhes nas tabelas Tabela 6-Tabela 11.

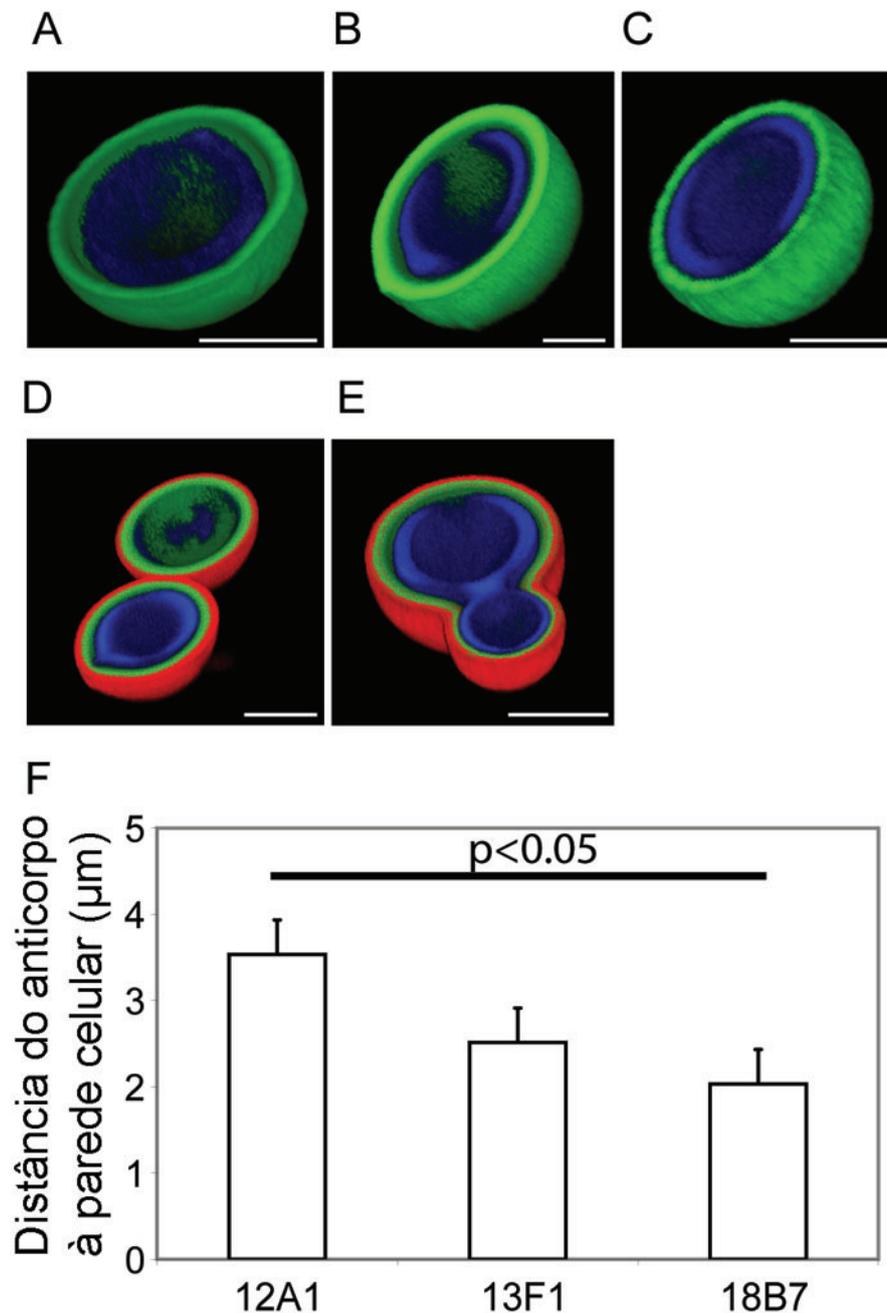


Figura 13 – Ligação de 18B7, 12A1 e 13F1 à cápsula

Os três anticorpos foram marcados diretamente com AlexaFluor 488 (verde) e usados em experimentos de microscopia confocal. A parede celular foi corada com calcofluor (azul), enquanto em alguns experimentos com dois anticorpos contra a cápsula um deles foi evidenciado com um anticorpo secundário marcado com TRITC (vermelho). (A) 18B7-AF488. (B) 12A1-AF488. (C) 13F1-AF488. (D) 18B7-AF488 mais 12A1 detectado por anti-IgM-TRITC. (E) 18B7-AF488 mais 13F1 detectado por anti-IgM-TRITC. (F) Distância entre a os anticorpos ligados à cápsula e a parede celular. Significância estatística foi calculada por ANOVA.

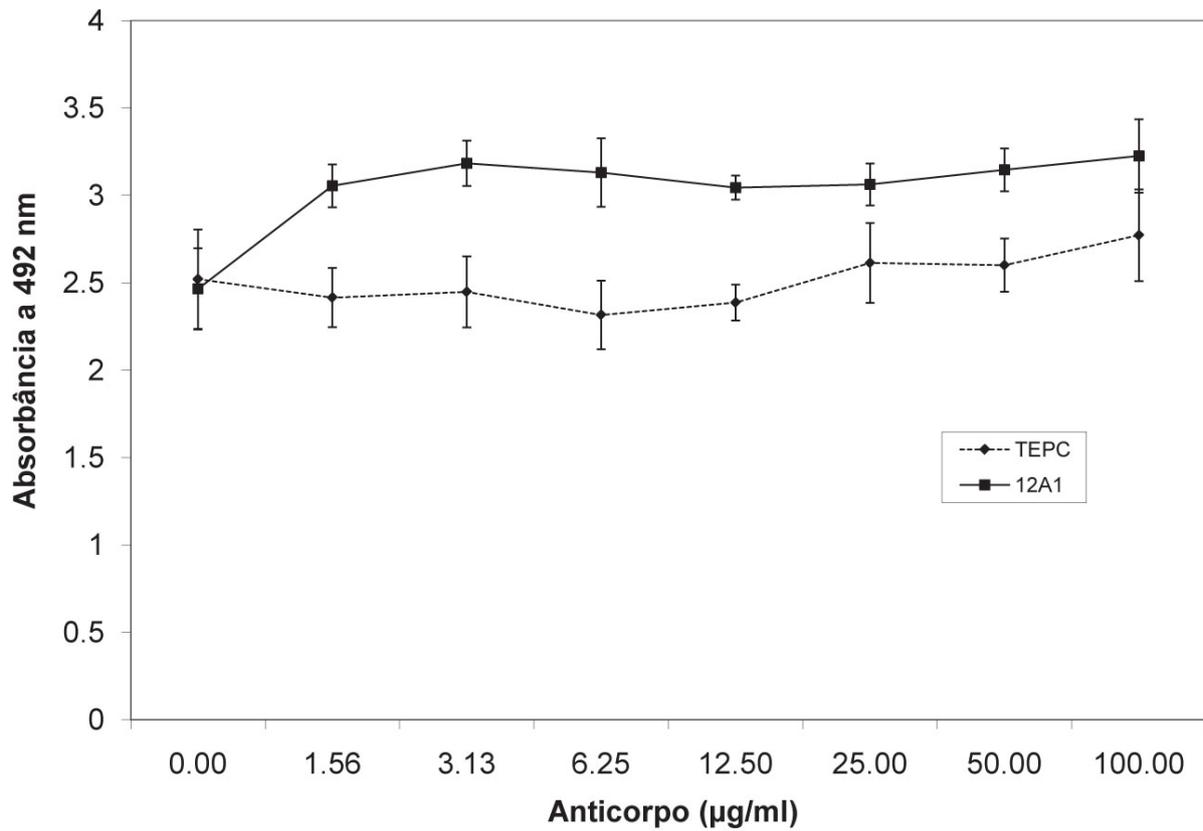


Figura 14 – Redução de XTT em células tratadas com 12A1

Células de *C. neoformans* foram incubadas com diferentes concentrações de 12A1 ou o controle de isotipo TEPC e depois com XTT. A significância estatística foi medida por ANOVA e teve $p < 0,05$ em todos os pontos exceto o primeiro.

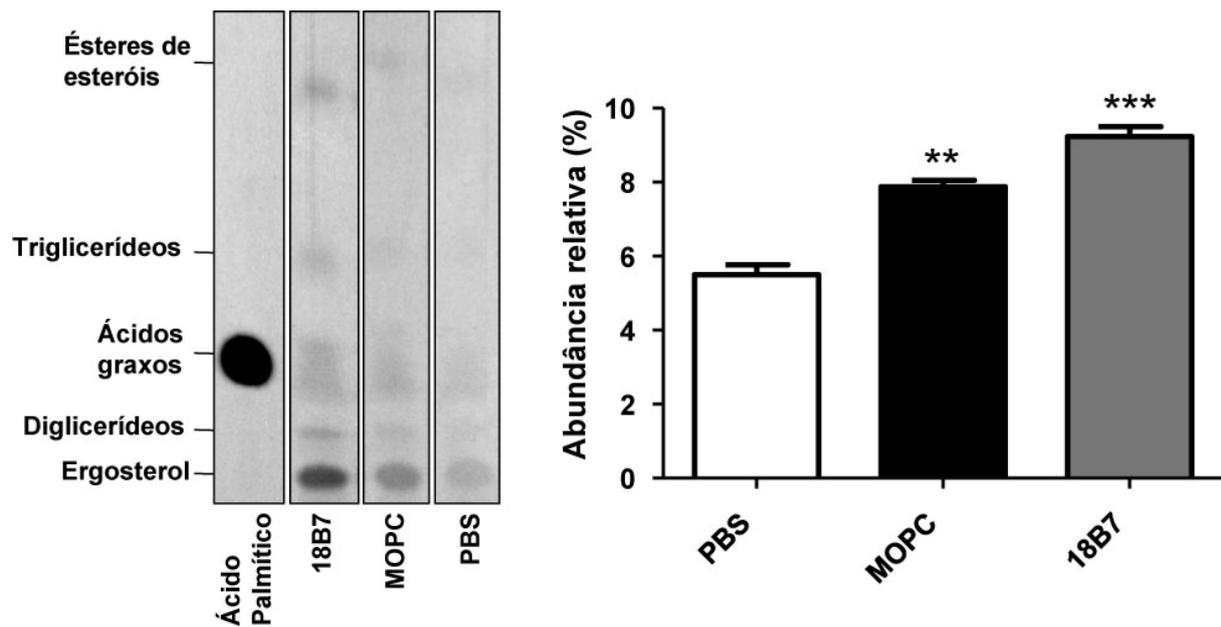


Figura 15 – Quantificação de ácidos graxos por cromatografia de camada delgada

Células de *C. neoformans* foram incubadas com ^{14}C -acetato em PBS na ausência ou presença de 18B7 ou do controle de isotipo MOPC. Extratos lipídicos totais foram então separados por cromatografia de camada delgada (esquerda) junto com um padrão de ácido palmítico. Ácidos graxos foram quantificados por densitometria como a densidade da banda correspondente dividida pela densidade de cada poço (direita). ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

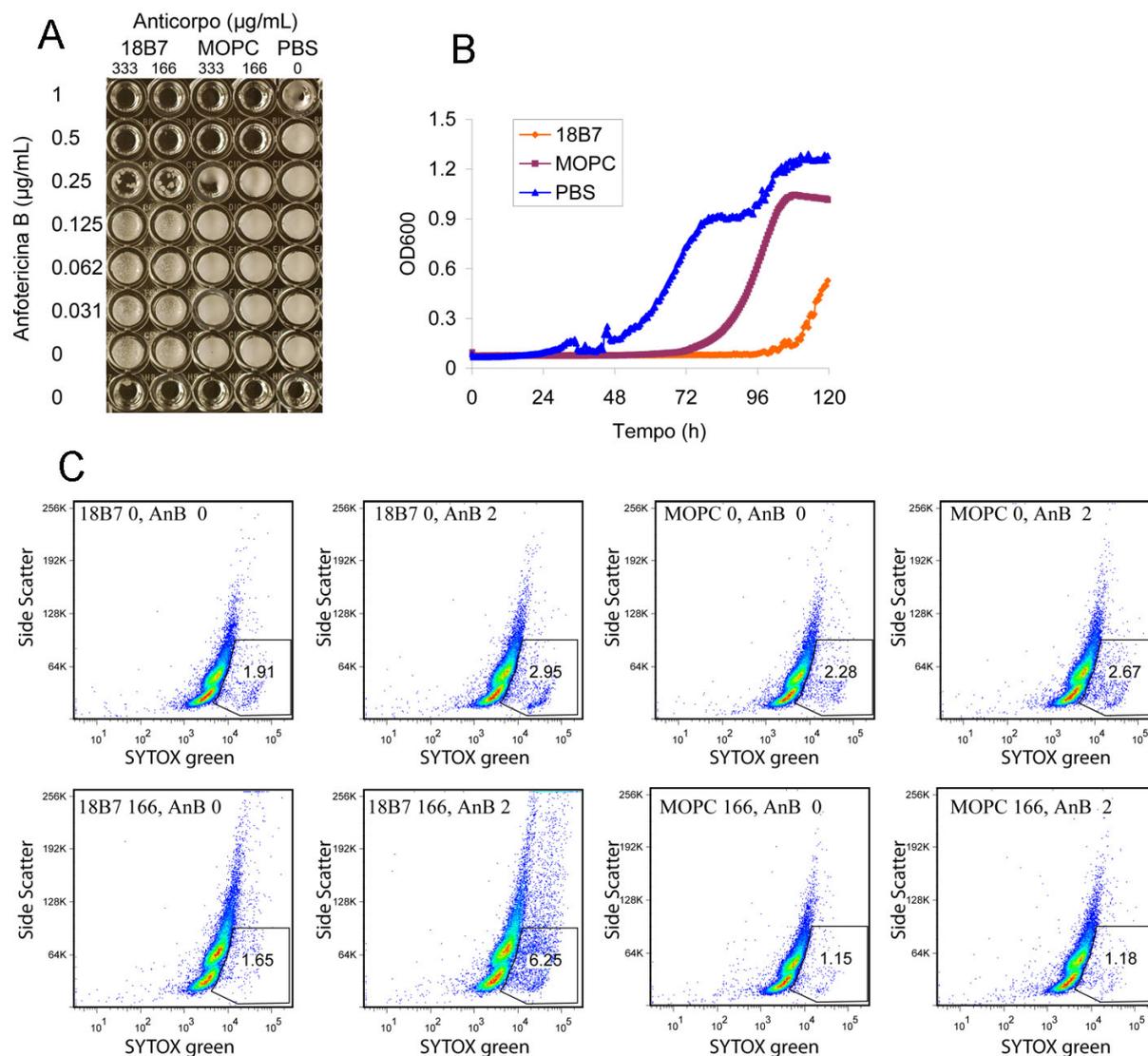


Figura 16 – Ligação de 18B7 aumenta a susceptibilidade à anfotericina B

(A) Experimento de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima. A coluna mais à direita não possui anticorpos, enquanto a fileira mais abaixo não possui células de *C. neoformans* como controle de esterilidade das soluções. (B) Curvas de crescimento de *C. neoformans* com leituras a cada 30 min na presença de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B (concentração sub-inibitória) e anticorpos. (C) Coloração com Sytox Green para determinar a viabilidade de células tratadas com anfotericina B e anticorpos. Os números acima do gráfico indicam a concentração de 18B7 ou MOPC e de anfotericina B.

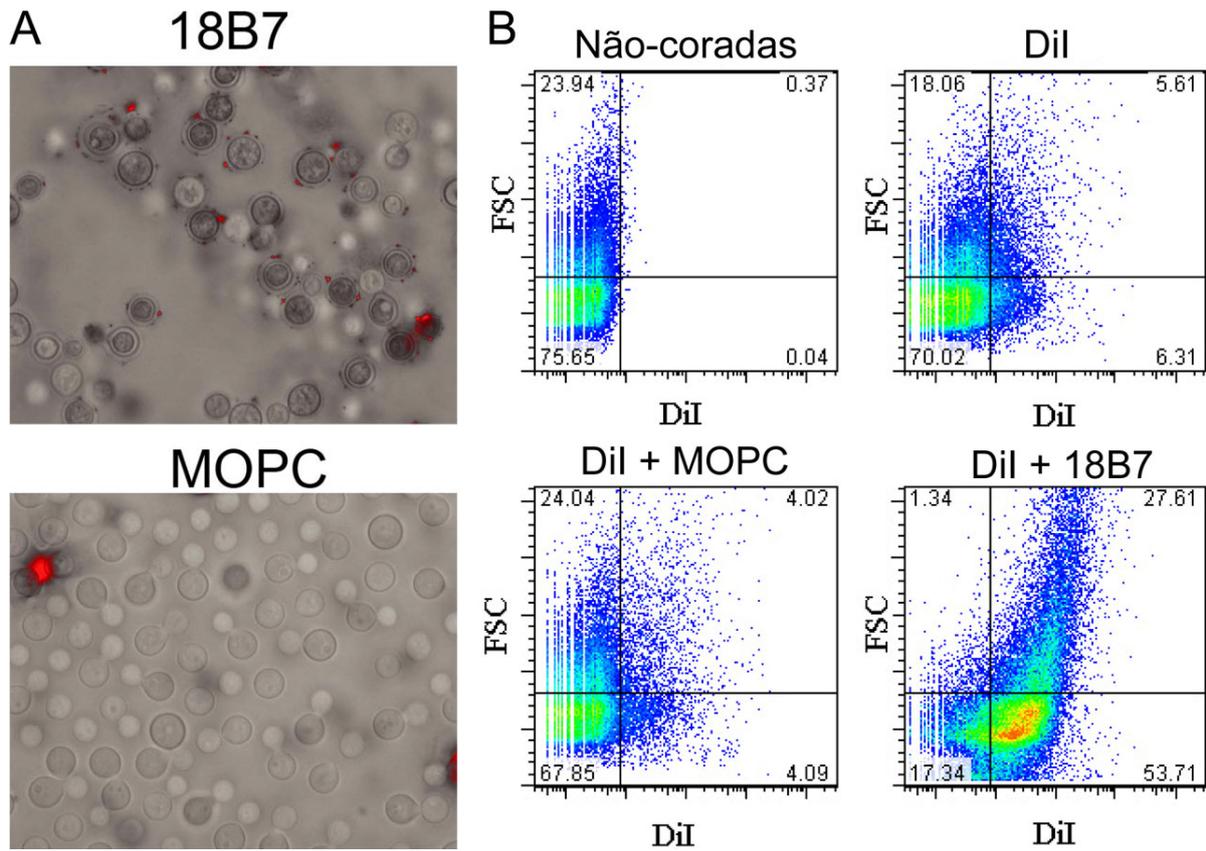


Figura 17 – Aumento da ligação de DiI à cápsula de células tratadas com 18B7

(A) Células de *C. neoformans* foram incubadas com o anticorpo 18B7 ou o controle de isotipo antes da coloração com DiI. As imagens são sobreposições de microscopia de epifluorescência e campo claro. (B) Experimento similar ao painel A, mas com análise por citometria de fluxo.

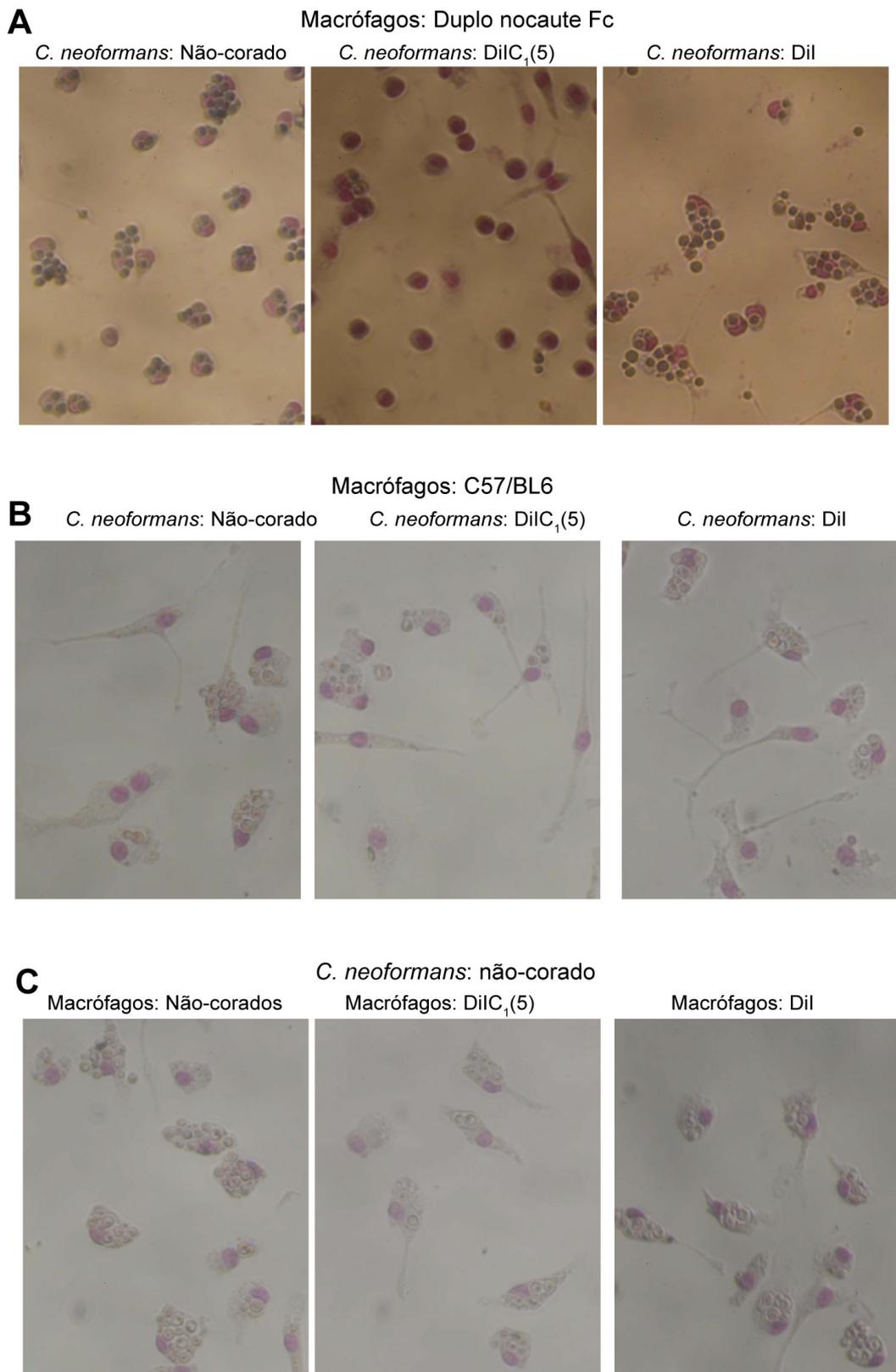


Figura 18 – Experimento de fagocitose com *C. neoformans* corado com DiI e DiIC₁(5)

Experimentos de fagocitose usando diferentes combinações de macrófago (selvagem ou duplo nocaute Fc) e *C. neoformans* (não-corado, corado com DiI e corado com DiIC₁(5)) para

testar a hipótese de que estas sondas se ligam ao mesmo motivo de GXM reconhecido pelos domínios de lectina dos receptores de complemento. Em todos os casos as leveduras foram opsonizadas com 18B7 antes de serem ou não coradas. (A) Fagocitose de macrófagos duplo nocaute Fc. Neste sistema onde a fagocitose somente ocorre pelo domínio de lectina de CR, a presença de DiIC₁(5), mas não DiI, diminui a fagocitose. (B) Controle com macrófagos selvagens demonstrando que a ligação de DiIC₁(5) à cápsula não afeta a fagocitose mediada por receptores de Fc. (C) Controle em que os macrófagos selvagens foram corados com DiI e DiIC₁(5), demonstrando que as sondas não têm efeito direto nos macrófagos.

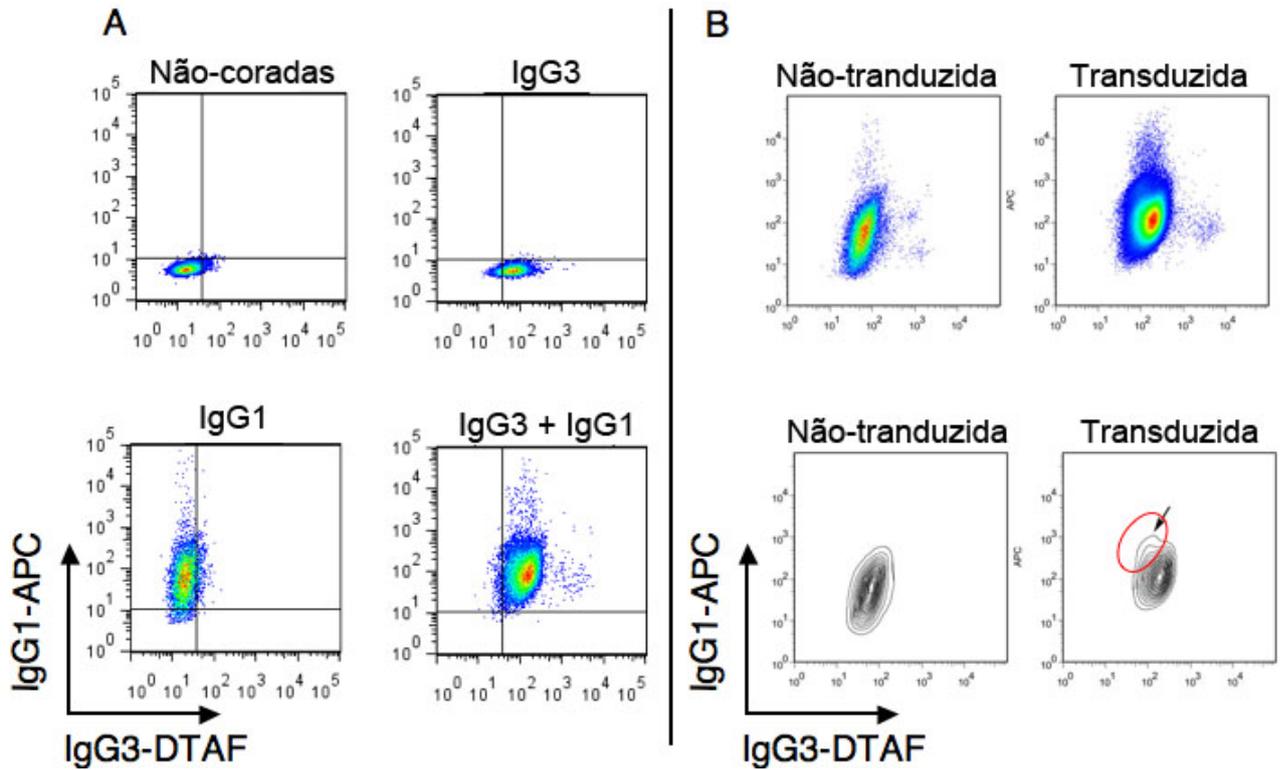


Figura 19 – Análise citométrica usada para separar as células transduzidas

(A) Células J774 não-transduzidas coradas com IgG3-DTAF e/ou IgG1-APC. (B) Comparação com células transduzidas com a biblioteca de shRNA e coradas com os dois anticorpos marcados. Nos gráficos acima se pode observar uma pequena população com ligação aumentada de IgG1 e diminuída de IgG3. Os gráficos abaixo são representações diferentes dos mesmos dados, permitindo uma melhor visualização da população de interesse (seta).

Transdução de células J774 com shRNAs
(80.000 clones contra 15.000 genes murinos)



2 dias: integração do vetor



2 dias: seleção das células transduzidas com puromicina



Separação das células com menor ligação de IgG3 (duas vezes)



Amplificação da região do shRNA por PCR e sequenciamento em larga escala



Análise bioinformática e seleção de candidatos



Figura 20– Estratégia de varredura da biblioteca

A eletroforese mostrada a direita mostra os produtos da amplificação por PCR da região do shRNA. Como controle negativo foi usado DNA de células J774 não-transduzidas, enquanto o controle positivo consiste do plasmídeo pLKO.1-puro. As bandas de PCR das amostras marcadas foram utilizadas no sequenciamento de alto desempenho.

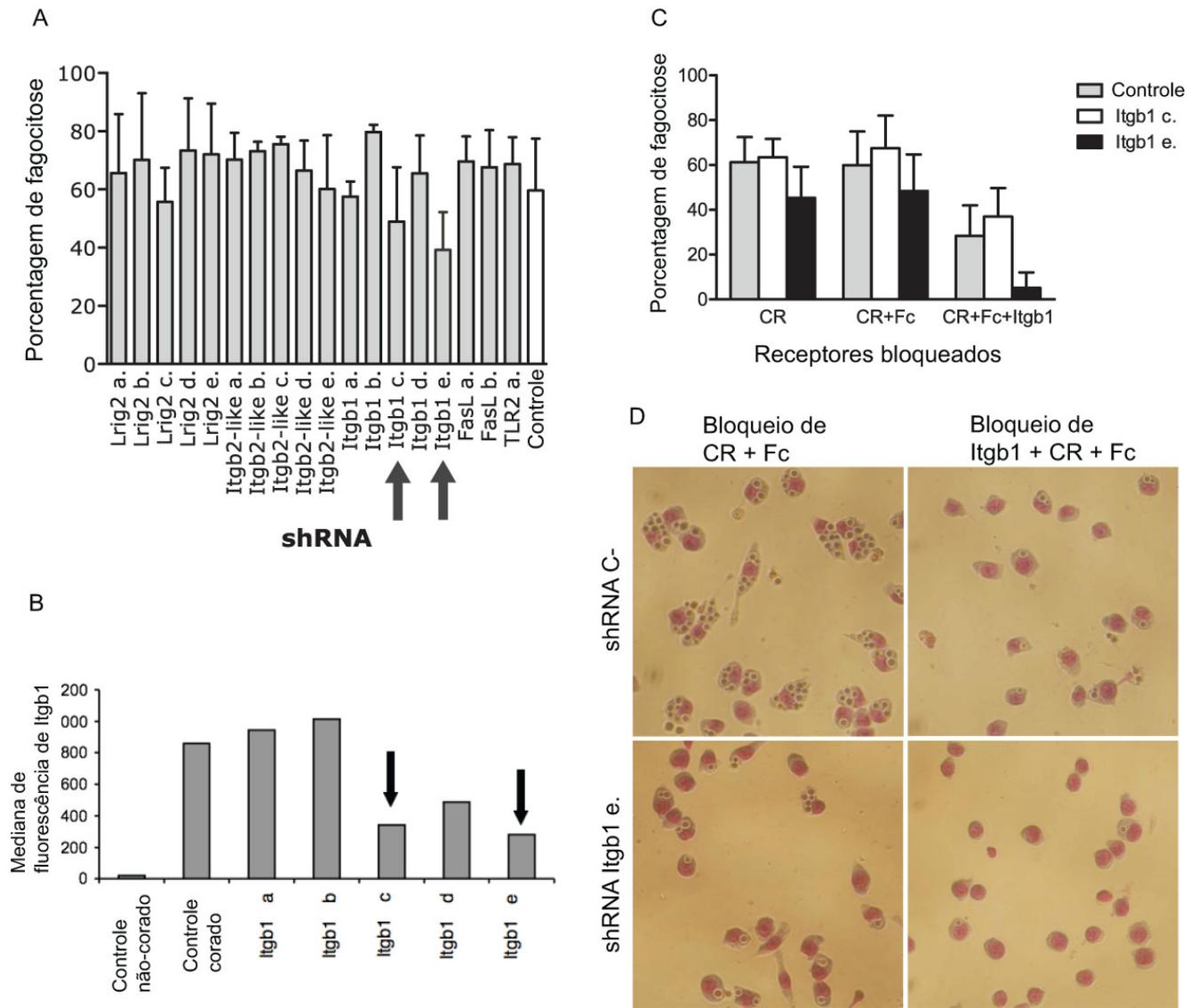


Figura 21 – Efeito da interferência em Itgb1 na fagocitose mediada por IgG3

(A) Células J774 foram transduzidas com 18 shRNAs contra cinco genes apontados como candidatos pela varredura. Cada clone de J774 foi então submetido a teste de fagocitose com *C. neoformans* opsonizado por 3E5 IgG3. As setas apontam os dois clones que tiveram maior diminuição da fagocitose. (B) Eficiência da interferência de cada shRNA contra Itgb1. Cada clone foi corado com HMβ1-1-PE e analisado por citometria de fluxo. As setas apontam os dois clones que tiveram maior eficiência. (C) Testes de fagocitose feitos com os dois clones de maior eficiência de interferência na presença de anticorpos que bloqueiam os receptores de Fc, complemento e Itgb1. As células de *C. neoformans* foram opsonizadas com 3E5 IgG3. (D) Imagens representativas do experimento mostrado em (C).

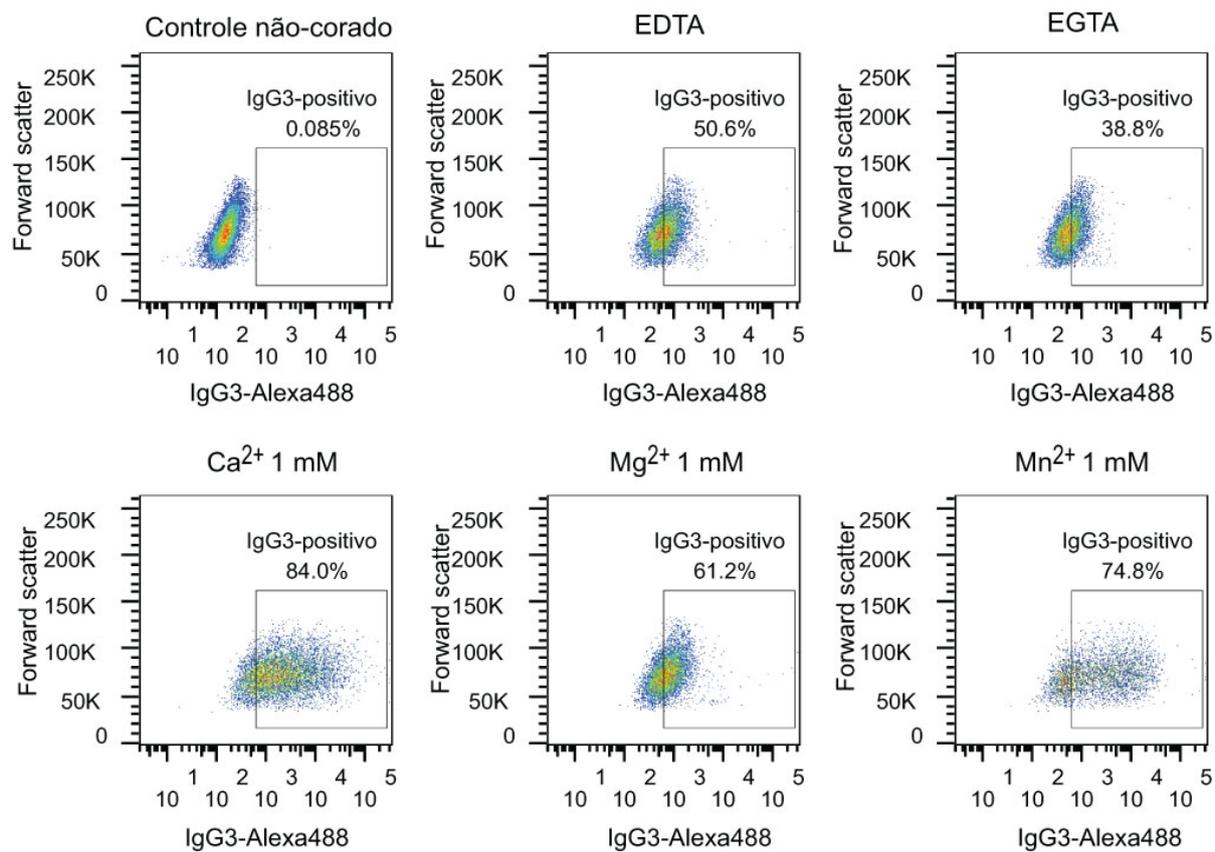


Figura 22 – Efeito de cátions divalentes na ligação de IgG3 a células J774

Células J774 foram marcadas com 3E5 IgG3 fluorescente na presença de cátions divalentes ou quelantes e analisadas por citometria de fluxo. Tanto os cátions quanto os quelantes foram adicionados a concentração de 1 mM.

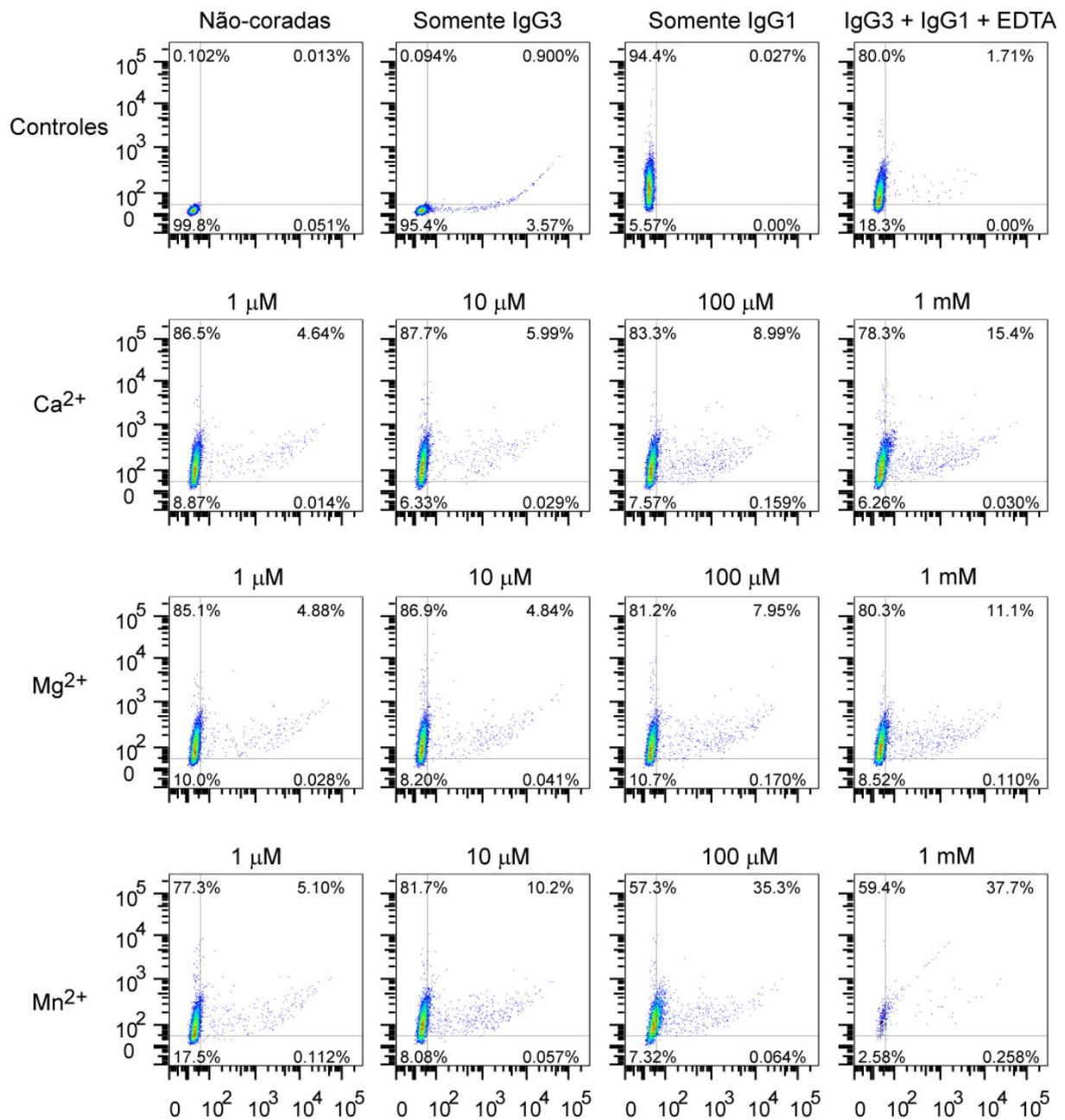


Figura 23 – Ligação de IgG1 e IgG3 na presença de diferentes concentrações de cátions divalentes

Células J774 foram incubadas com IgG3 (eixo X) e IgG1 (eixo Y) marcados na presença de diferentes concentrações de cátions divalentes, mostrando efeito dose-dependente destes na ligação de IgG3, mas com pouco efeito na ligação de IgG1.

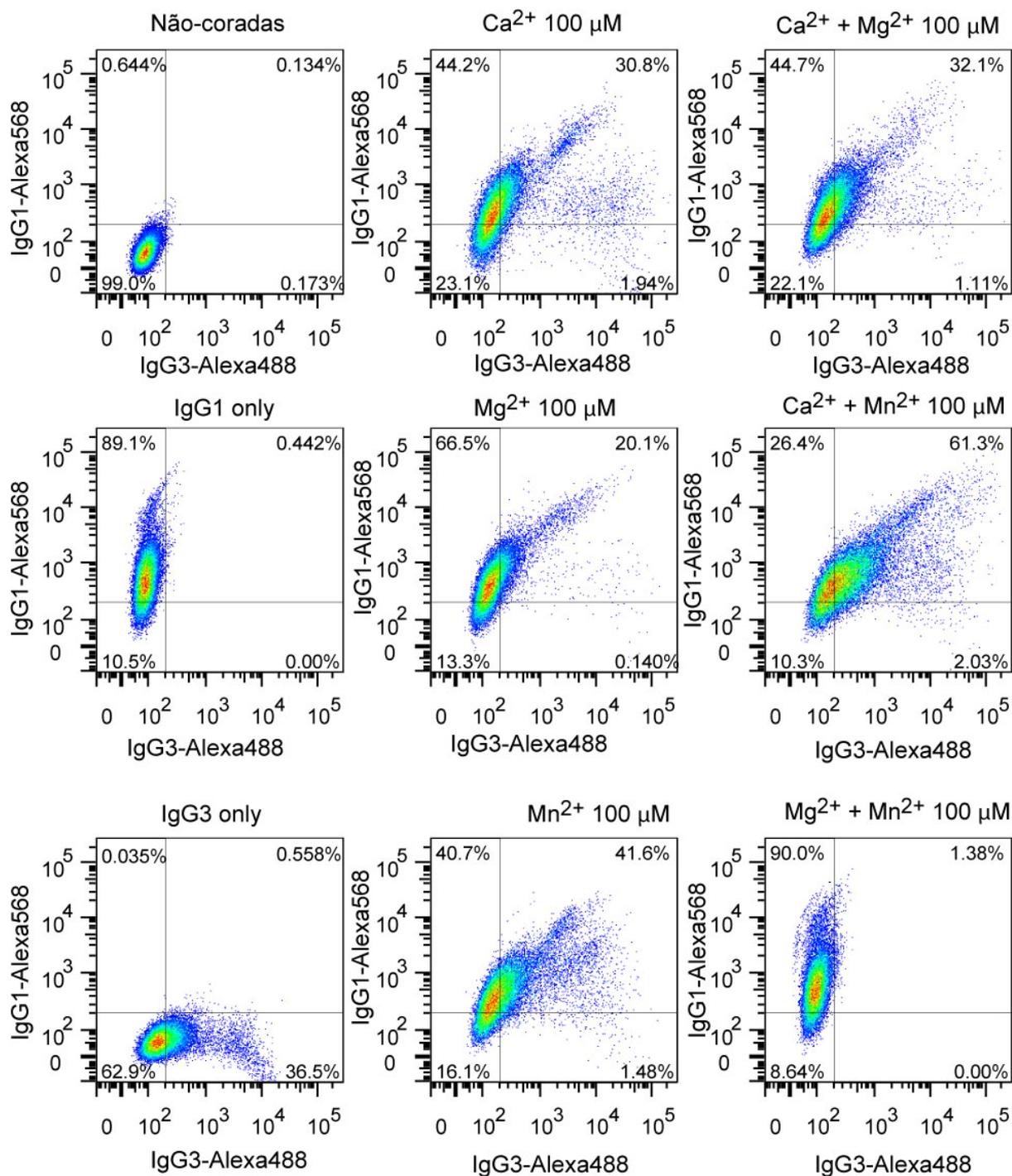


Figura 24 – Ligação de IgG1 e IgG3 na presença combinações de cátions divalentes

Células J774 foram incubadas com IgG3 e IgG1 marcados na presença de diferentes combinações de cátions divalentes, mostrando que Ca²⁺ e Mn²⁺ têm efeitos aditivos enquanto Mg²⁺ tem efeito competitivo com Mn²⁺, mas não com Ca²⁺.

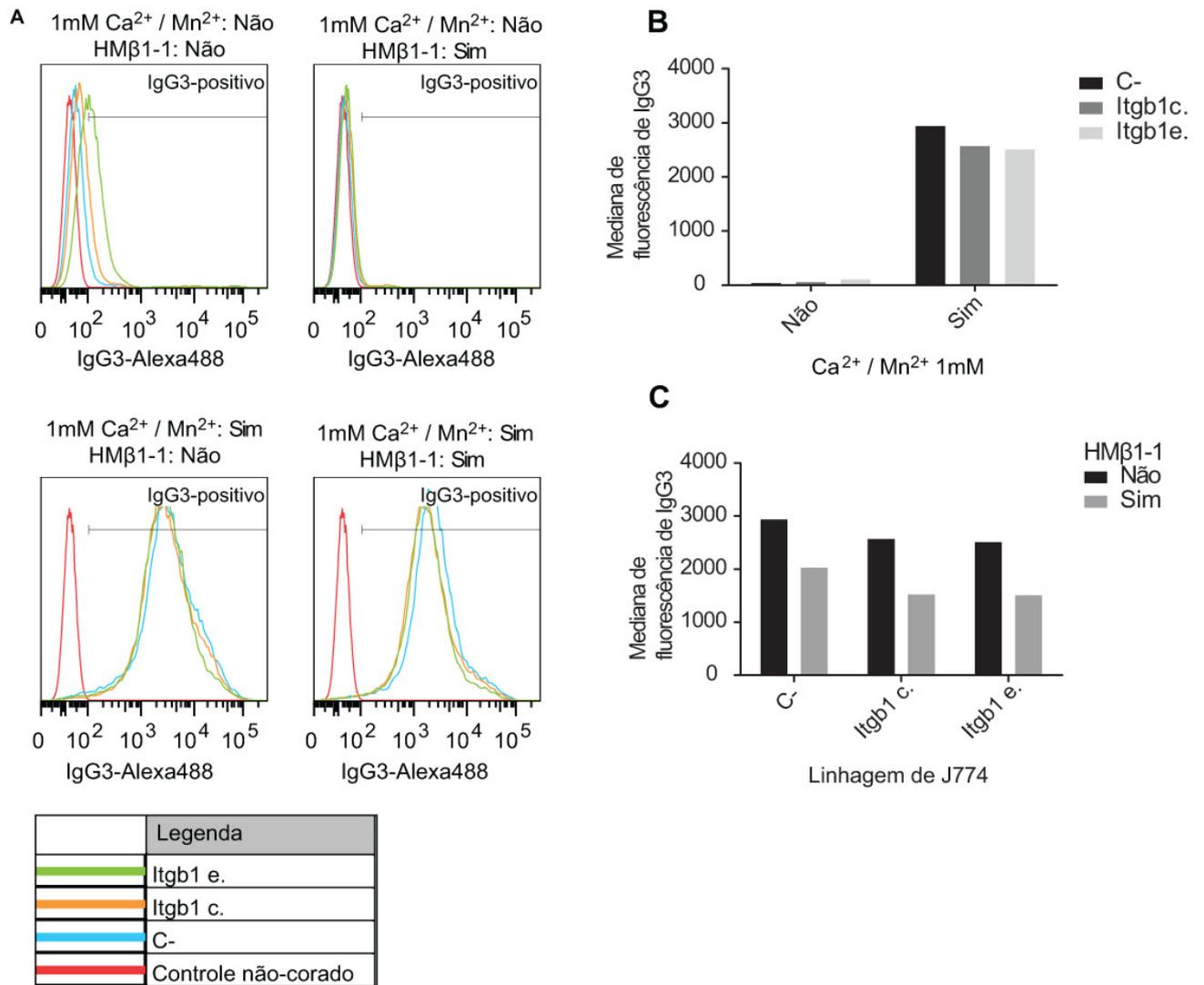


Figura 25 – Interferência com Itgb1 diminui a ligação de IgG3

Células J774 foram incubadas com 3E5 IgG3 fluorescente na presença ou ausência de Ca²⁺ e Mn²⁺ e HMβ1-1 e analisadas por citometria de fluxo. O painel A mostra os histogramas de fluorescência de IgG3, enquanto os painéis B e C mostram dados de mediana de fluorescência das mesmas amostras.

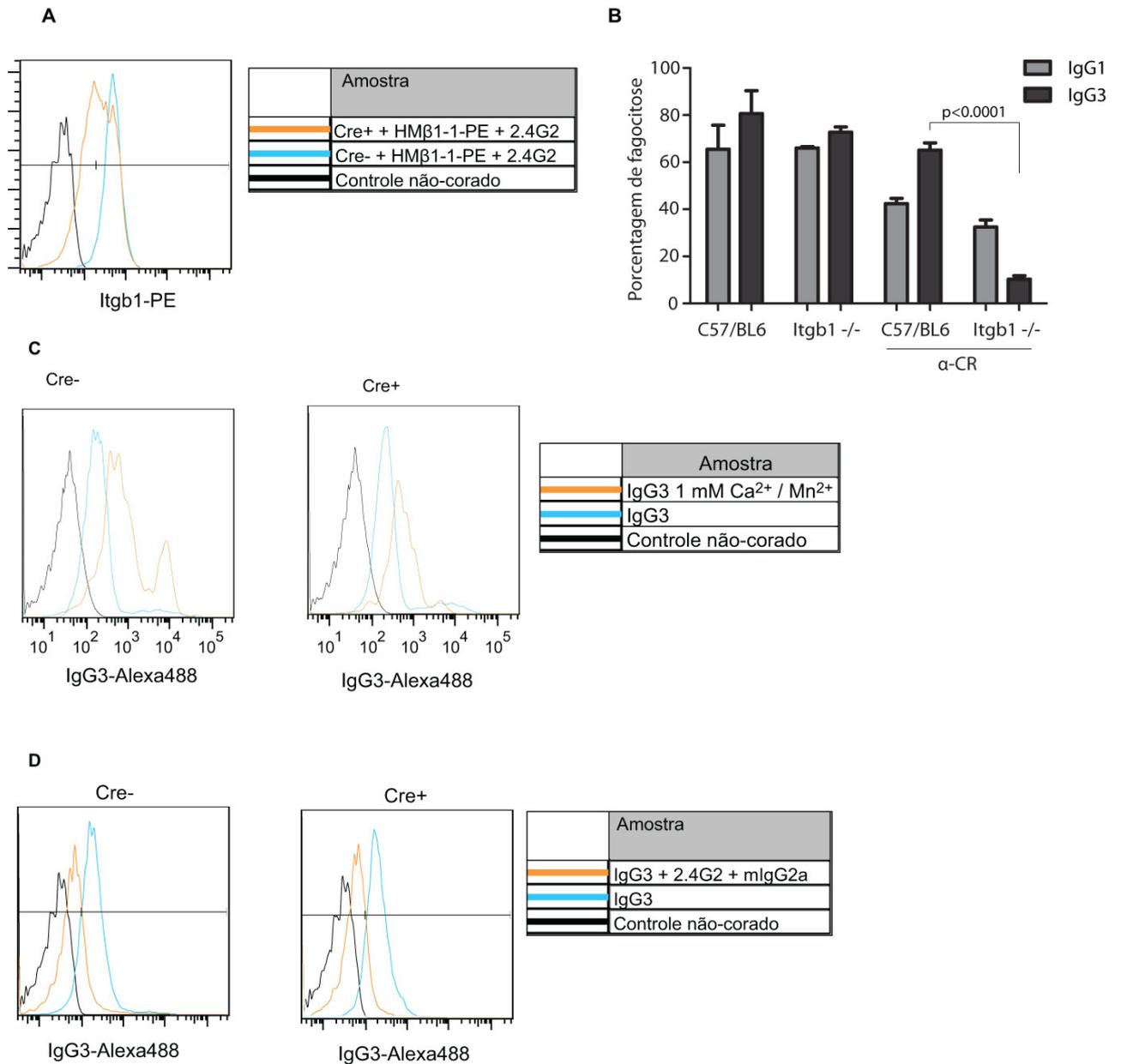


Figura 26 – Efeito do nocaute condicional de *Itgb1* em macrófagos primários na ligação e fagocitose por IgG3

(A) Coloração de macrófagos nocaute (Cre⁺) e controle (Cre⁻) com HMβ1-1 fluorescente, para avaliar a eficácia de nocaute do gene. Aproximadamente 50% dos macrófagos Cre⁺ são nocautes de *Itgb1*. (B) Ensaio de fagocitose com MDMOs derivados de camundongos nocaute e controle e *C. neoformans* opsonizado com 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3. Um mínimo de três campos foi analisado em cada poço, com três poços para cada condição. As barras representam média e desvio padrão. (C) Ligação de IgG3 fluorescente medida por citometria de fluxo na presença ou ausência de Ca²⁺ e Mn²⁺. (D) Efeito da presença de excesso molar de IgG2a monomérico, que se liga a FcRI com alta afinidade e bloqueia este receptor.

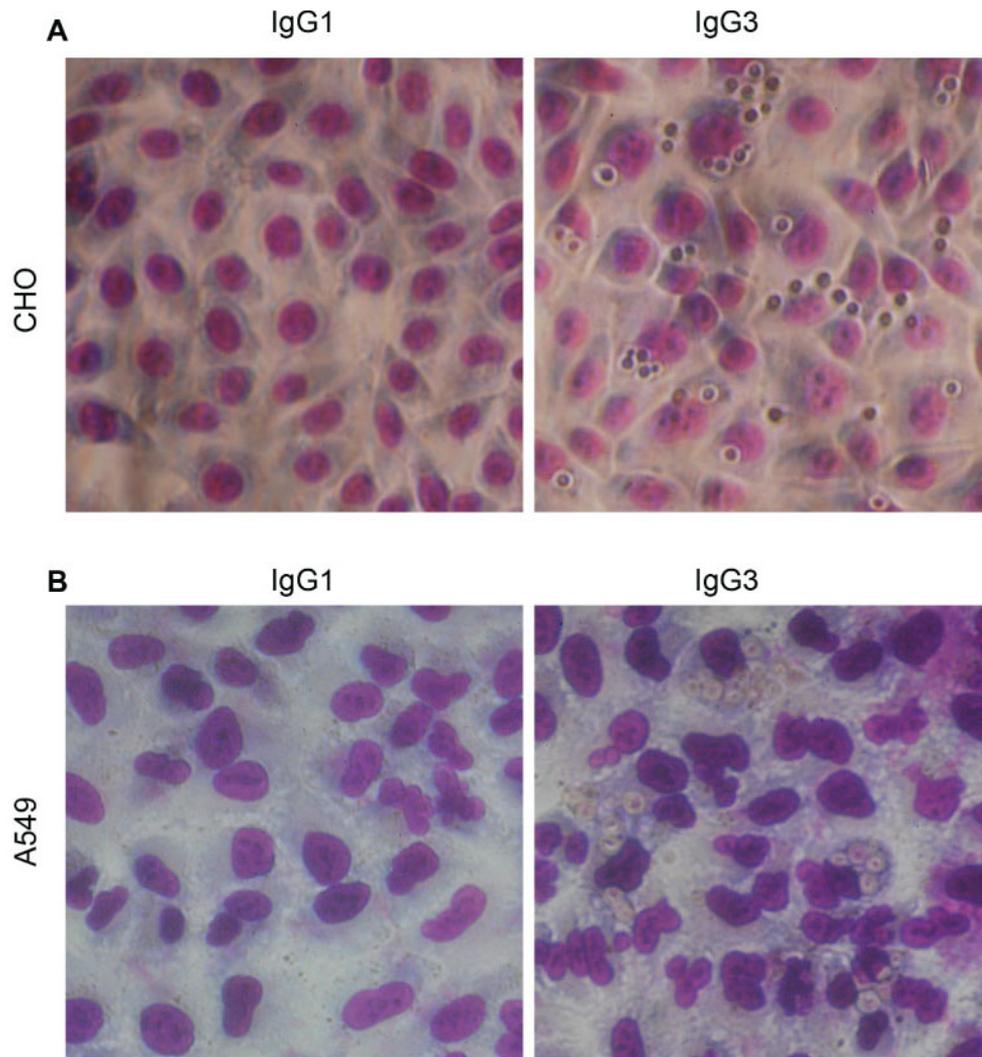


Figura 27– Testes de fagocitose mediada por IgG3 em células normalmente não-fagocíticas

(A) Teste de fagocitose com células CHO e *C. neoformans* opsonizado com 3E5 IgG1 ou IgG3. (B) Teste de fagocitose com células A549 e *C. neoformans* opsonizado com 3E5 IgG1 ou IgG3.

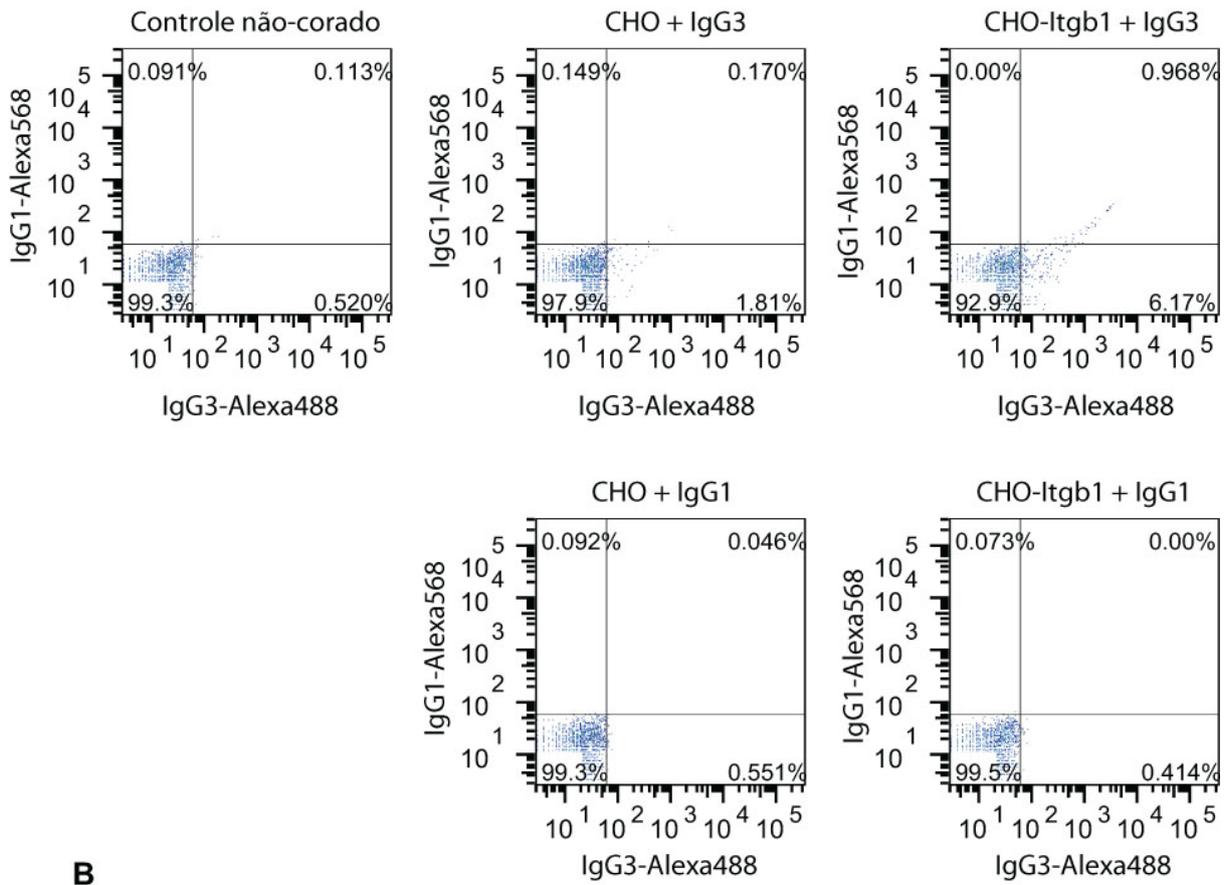
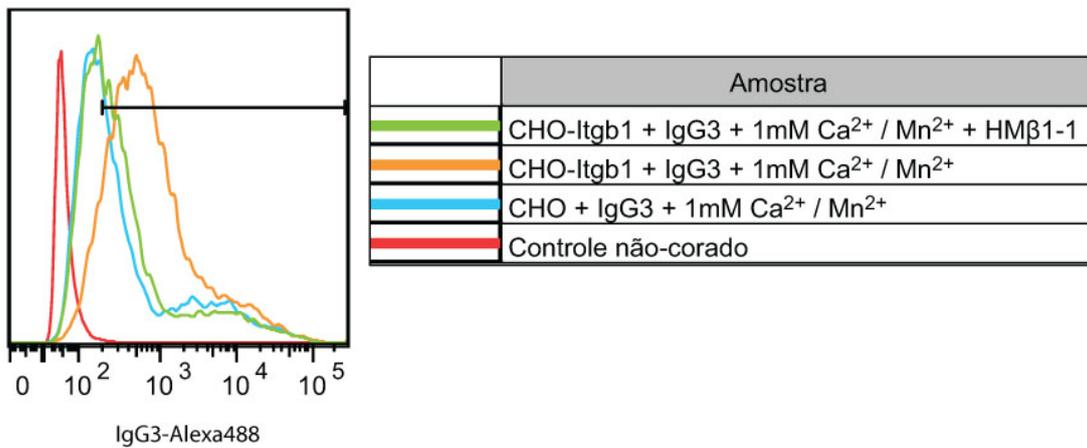
A**B**

Figura 28 – Ganho de função com células CHO transfetadas com Itgb1 de camundongo

(A) IgG1 e IgG3 fluorescentes foram incubados com células transfetadas com Itgb1 de camundongo (CHO-Itgb1) ou células CHO não-transfetadas. (B) Células CHO foram incubadas com 3E5 IgG3 fluorescente na presença de Ca²⁺ e Mn²⁺. A curva amarela mostra o aumento na ligação provocado pela integrina exógena, que é anulado pelo anticorpo HMβ1-1.

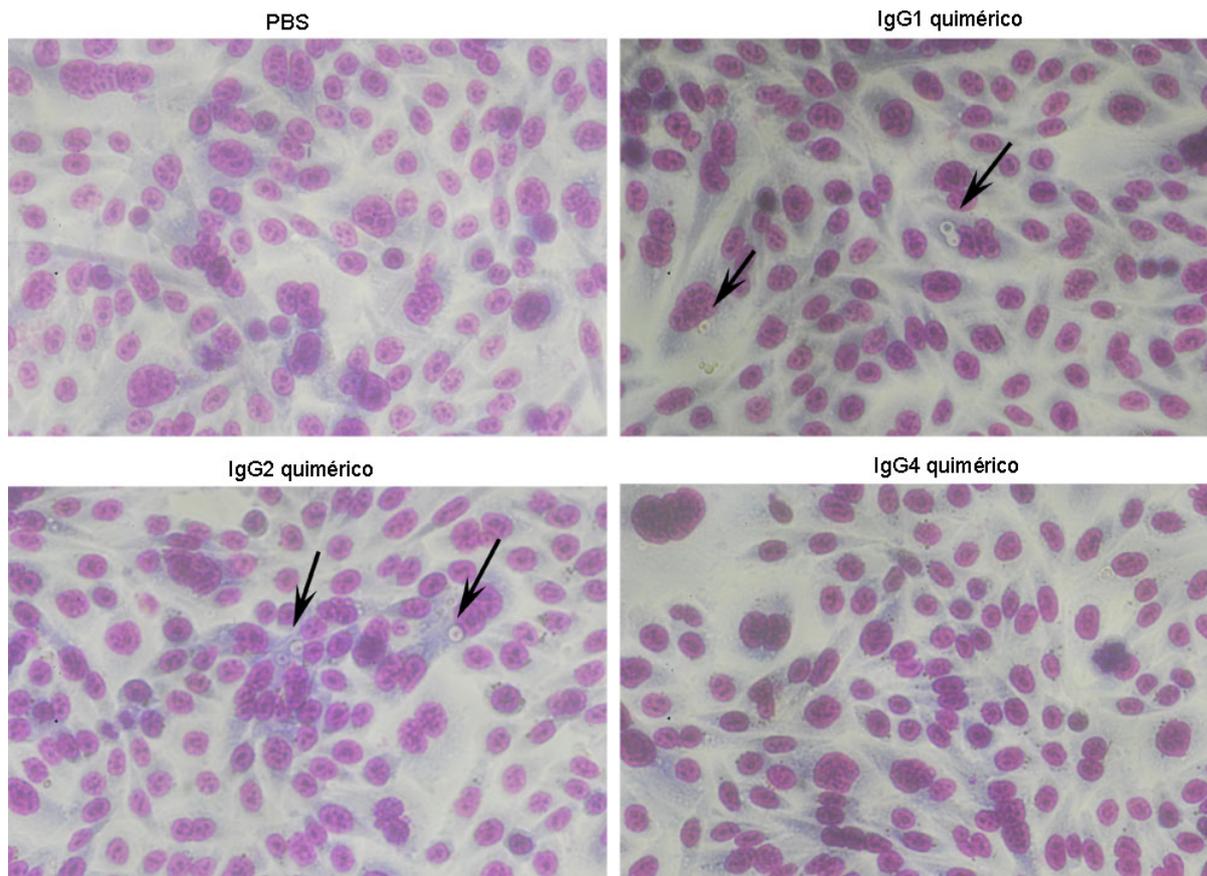


Figura 29 – Fagocitose de *C. neoformans* opsonizado com anticorpos quiméricos por células CHO-Itgb1

Células CHO transfectadas com Itgb1 de camundongo foram incubadas com *C. neoformans* opsonizado com anticorpos quiméricos contra a cápsula. Estes anticorpos recombinantes foram gerados pela fusão dos domínios variáveis de 18B7 com os domínios constantes de IgG1, IgG2 e IgG4 humanos [89].

Tabela 6 - Genes cuja expressão foi alterada por 18B7

<u>Up-regulated Genes</u>	<u>Classification</u>
CNF03470: Formate dehydrogenase	Metabolism
CNC03960: Phosphate transporter, putative	Metabolism
CND00530: Putative urea transporter	Secretion
CNA02250: Ammonium transporter MEP1	Secretion
CNC06440: Inositol 1-phosphate synthase	Metabolism
CND03490: Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98	Cell wall
CNA04560: Hypothetical protein	Hypothetical
CNF02180: Acetyl-CoA carboxylase, putative	Metabolism
CNJ00690: Uracil permease, putative	Secretion
CNF02510: Alcohol dehydrogenase, putative	Metabolism
CNE04360: Fatty acid synthase, alpha subunit-related	Metabolism
CNM00180: Cyclohydrolase, putative	Metabolism
CNL03740: AF540951 catalase isozyme P	Stress
CNE04370: Fatty acid synthase, beta subunit	Metabolism
CNA01790: Expressed protein	Hypothetical
CNA05700: Expressed protein	Hypothetical
CND03840: Vacuole fusion, non-autophagic-related protein, putative	Cell wall
CNM00980: Hypothetical protein	Hypothetical
CNI02420: Uricase (Urate oxidase), putative	Metabolism
CNJ01090: Xylitol dehydrogenase-related	Cell wall
CNC03430: Alpha-1,6-mannosyltransferase, putative	Cell wall
CNF04120: Expressed protein	Hypothetical
CNB01810: Short chain dehydrogenase, putative	Metabolism
CNJ01200: Hypothetical protein	Hypothetical
CNA01160: LSDR putative	Metabolism
CNH03430: Hypothetical protein	Hypothetical
CNM02410: Putative proteine disulfate isomerase	Housekeeping
CNG04200: Alpha-amylase, putative	Cell wall
CNC00920: NADP-dependent glutamate dehydrogenase	Metabolism
166_3.seq.171	Hypothetical
CNC06430: Dehydrogenase	Metabolism
CNG02940: Glycine-rich RNA binding protein	Housekeeping
CNG02940: Glycine-rich RNA binding protein-related	Housekeeping
CNI02000: Glycerophosphodiester phosphodiesterase, putative	Metabolism
CNF04890: Predicted dehydrogenase	Metabolism
CNF01860: Proteasome subunit alpha type 4	Metabolism
CND06130: Beta-glucan synthesis-associated protein	Cell wall
CNE03100: Phosphoketolase	Metabolism
<u>Down-regulated genes</u>	
CNJ02710: Membrane protein	Cell wall
CNK03460: PQQ enzyme repeat, putative	Cell wall
CNI01300: 2,4-dichlorophenoxyacetate alpha-ketoglutarate dioxygenase	Metabolism
CNC02990: DNA-directed RNA polymerase	Housekeeping
CNI01950: Acetyltransferase	Cell wall

Tabela 7 - Validação do microarranjo de 18B7 por RT-PCR em tempo real

Gene	Gene Description	Microarray FC ^a	QRT-PCR FC ^b	QRT-PCR FC-2	Same pattern (up or down)
		H99-18B7	H99-18B7	H99-18B7	Microarray vs QRT-PCR?
CNI01300	2, 4-dichlorophenoxyacetate dioxygenase	0.47	0.61	0.70	Yes
CNI01950	Acetyltransferase	0.38	0.97	0.77	No
CND03490	MP98	3.08	3.54	3.84	Yes
CND00530	Urea transporter	3.57	11.50	12.75	Yes
CNE04360	Fatty acid synthase, alpha subunit-related*	2.66	1.95	1.28	Yes
CNE04370	Fatty acid synthase, beta subunit*	2.50	2.51	2.78	Yes
CNC03960	Inorganic phosphate transporter	3.93	1.93	2.49	Yes
CNC06440	Inositol 1-phosphate synthase	3.12	3.17	2.87	Yes
CNC02990	DNA-directed rna polymerase	0.43	0.61	0.50	Yes
CNF02180	Acetyl-CoA carboxylase*	2.87	2.08	1.90	Yes
CNF02510	Alcohol dehydrogenase	2.67	2.01	2.20	Yes
CNF03470	Formate dehydrogenase	5.04	1.27	1.36	No
CNA02250	Ammonium transporter MEP1	3.29	1.48	3.18	Yes
CNJ00690	Uracil permease, putative	2.81	1.02	nd	No

a=Fold Change, b= Quantitative real-time PCR, nd= no data, * Genes involved in fatty acid synthesis

Tabela 8 - Genes cuja expressão foi alterada por 12A1

<u>Up-regulated Genes</u>	<u>Classification</u>
CNE00710: Mannitol-1-phosphate dehydrogenase, putative	Metabolism
CNI03250: GPI anchor biosynthesis-related protein, putative	Cell Wall
CNC03810: Hypothetical protein	Hypothetical
CNA03300: Hypothetical protein	Hypothetical
CNB02680: Monosaccharide transporter	Secretion
CNC01660: Cytokine inducing-glycoprotein, putative	Cell Wall
CNI02030: Probable aspartokinase	Metabolism
CNBB3710: Hypothetical protein	Hypothetical
CND06090: Expressed protein	Hypothetical
170_3.seq.044	Hypothetical
CND01310: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CNH02940: Hypothetical protein	Hypothetical
CNC06440: Inositol 1-phosphate synthase	Metabolism
CNN02330: Hypothetical protein	Hypothetical
CNK03270: Expressed protein	Hypothetical
CNN01010: Malate dehydrogenase	Metabolism
CND02630: Hypothetical protein	Hypothetical
CNBL2280: Hypothetical protein	Hypothetical
CNA05840: Glycosyl hydrolase, putative	Metabolism
CNK01910: Hypothetical protein	Hypothetical
CNBL0970: Hypothetical protein	Hypothetical
164_1.seq.113	Hypothetical
167_3.seq.014	Hypothetical
CNE00770: Plasma membrane protein, putative	Cell Wall
CND00280: Hypothetical protein	Hypothetical
173_2.seq.080	Hypothetical
CNBA3520: Hypothetical protein	Hypothetical
CNK00030: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CNI01540: Expressed protein	Hypothetical
CNE00430: Expressed protein	Hypothetical
CNH03660: Alpha-amylase AmyA	Metabolism
CNA02640: Expressed protein	Hypothetical
CNA04330: Isovaleryl-CoA dehydrogenase 2, mitochondrial precursor	Metabolism
CND00700: Argininosuccinate synthase, putative	Metabolism
<u>Down-regulated Genes</u>	
CNF03720: C-22 sterol desaturase, putative	Metabolism
CNF00310: High-affinity methionine permease	Secretion
CNE03290: Probable eukaryotic translation initiation factor 3	Translation
CND03490: Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98	Cell Wall
CNL04010: Hypothetical protein	Hypothetical
CNA02480: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CNI03990: Hypothetical protein	Hypothetical
CNC00240: Ribosomal large subunit biogenesis-related protein, putative	Translation
CNL05260: Histone_deacetylase_3-related	Housekeeping

CNM00160: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CND03040: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CNA04950: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CNG03650: ATP dependent RNA helicase, putative	Translation
CNB01060: Probable ATP-dependent RNA helicase has1	Translation
CNC04530: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CNC02410: C-4 methyl sterol oxidase	Metabolism
CNL05530: Hypothetical protein	Hypothetical
CNI03560: Sulfate adenytransferase MET3	Metabolism
CNC04600: BC022918 Pgs1-pending protein, putative	Metabolism
CNC04510: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CNB03020: Hypothetical protein	Hypothetical
CNC04220: Hypothetical protein	Hypothetical
CNA01290: rRNA processing-related protein, putative	Translation
CNN00480: Chromosome organization and biogenesis -related protein	Translation
CNB02220: Nucleolus protein, putative, Yna1p	Translation
CNF02210: Expressed protein	Hypothetical
CNG02750: Cytoplasm protein, related to low-temperature viability protein LTV1	Translation
CNBE1990: Hypothetical protein	Hypothetical

Tabela 9 - Validação do microarranjo de 12A1 por RT-PCR em tempo real

Gene	Gene Description	Microarray	QRT-PCR	QRT-PCR	Same pattern (up or down) Microarray vs QRT- PCR?
		FC ^a	FC ^b	FC-2	
		H99-12A1	H99-12A1	H99-12A1	
CNI02030	Probable aspartokinase	2.96	0.69	0.45	No
CNI03250	GPI anchor biosynthesis-related protein, putative	3.55	0.43	0.39	No
CNI03560	Sulfate adenylyltransferase MET3	0.41	0.20	0.06	Yes
CND03490	Chitin deacetylase-like mannoprotein MP98	0.49	0.79	0.87	Yes
CNM00160	Ribosomal small subunit biogenesis protein*	0.46	0.22	0.18	Yes
CNE00710	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	4.00	3.56	1.97	Yes
CNE03290	Eukaryotic translation initiation factor 3*	0.49	0.31	0.26	Yes
CNE00770	Plasma membrane protein, putative Related to low-temperature viability protein	2.18	0.77	0.27	No
CNG02750	LTV1*	0.27	0.17	0.10	Yes
CNG03650	ATP-dependent RNA helicase*	0.45	0.20	0.13	Yes
CNC00240	Ribosomal large subunit biogenesis protein*	0.48	0.24	0.25	Yes
CNC04510	Major facilitator superfamily transporter	0.39	0.20	0.15	Yes
CNC06440	Inositol 1-phosphate synthase	2.56	0.25	0.38	No
CNA01290	rRNA processing-related*	0.37	0.19	0.14	Yes
CNA05840	Glycosyl hydrolase, putative	2.29	1.46	0.49	No
CNA04330	Isovaleryl-CoA dehydrogenase 2	2.20	2.11	2.06	Yes
CNN00480	Related to microtubule-interacting protein	0.36	0.16	0.24	Yes
CNN01010	Malate dehydrogenase	2.40	0.86	0.43	No
CNB01060	Probable ATP-dependent RNA helicase has1*	0.44	0.22	0.14	Yes
CNB02220	Nucleolus protein, Yna1p*	0.36	0.18	0.08	Yes
CNB02680	Monosaccharide transporter	3.22	0.41	0.38	No

a=Fold Change, b= Quantitative Real-Time PCR, *Genes involved in translation

Tabela 10 - Genes cuja expressão foi alterada por 13F1

<u>Up-regulated Genes</u>	<u>Classification</u>
CNB02680: Monosaccharide transporter	Secretion
CNE00710: Mannitol-1-phosphate dehydrogenase, putative	Cell Wall
CNM01780: Meiotic recombination-related protein, putative	Replication
CNB05670: Hypothetical protein	Hypothetical
CNH02940: Hypothetical protein	Hypothetical
CNC03810: Hypothetical protein	Hypothetical
CNN01010: Malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating), putative	Metabolism
CNE03070: UVSU PI-3 kinase	Replication
CNC01660: Cytokine inducing-glycoprotein, putative	Cell Wall
CNF01380: D-hydantoinase (dihydropyrimidinase)	Metabolism
CNC04420: Probable argininosuccinate lyase	Metabolism
CNI02030: Probable aspartokinase	Metabolism
162_1.seq.132	Hypothetical
170_3.seq.044	Hypothetical
CNF00610: Alpha-glucosidase, putative	Metabolism
CNH00420: SD07712p	Replication
CNC06440: Inositol 3-phosphate synthase	Metabolism
CND01200: Homocitrate synthase, putative	Metabolism
CNBB3710: Hypothetical protein	Hypothetical
CND05980: Nucleoside transporter	Replication
CNA03300: Hypothetical protein	Hypothetical
CNBG0460: Hypothetical protein	Hypothetical
CNM02100: Expressed protein	Hypothetical
CNC03960: Phosphate transporter, putative	Secretion
CNB05660: Oxidoreductase, putative	Metabolism
CNB04710: Aldehyde reductase	Metabolism
CNK03270: Expressed protein	Hypothetical
CNA04330: Isovaleryl-CoA dehydrogenase 2, mitochondrial precursor, putative	Metabolism
CNBL2120: Hypothetical protein	Hypothetical
CNF00200: Expressed protein	Hypothetical
<u>Down-regulated Genes</u>	
CND04840: Bud site selection-related protein, putative	Cell Wall
CNM01410: Hypothetical protein	Hypothetical
CNC04020: Conserved hypothetical protein	Hypothetical
CND04540: Cytoplasm protein, putative	Metabolism
CNA04770: Protein-tyrosine phosphatase cdc14 homolog	Replication
CNC02410: C-4 methyl sterol oxidase	Metabolism
CNI03990: Hypothetical protein	Hypothetical
CNC04600: CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	Cell Wall
CNL05530: Hypothetical protein	Hypothetical

Tabela 11 - Validação do microarranjo de 13F1 por RT-PCR em tempo real

Gene	Gene Description	Microarray	QRT-PCR	QRT-PCR	Same pattern (up or down) Microarray vs QRT- PCR?
		FC ^a	FC ^b	FC-2	
		H99-13F1	H99-13F1	H99-13F1	
CNI02030	Probable aspartokinase	2.53	0.91	1.00	No
CND01200	Homocitrate synthase, putative	2.20	0.51	0.58	No
CND05980	Nucleoside transporter	2.12	0.45	0.44	No
CNM01780	Meiotic recombination-related protein	3.20	2.49	2.71	Yes
CNE00710	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	3.23	2.45	2.73	Yes
CNE03070	UVSB PI-3 kinase	2.82	1.07	1.01	No
CNC02410	C-4 methyl sterol oxidase	0.46	0.85	0.96	No
CNC04420	Probable argininosuccinate lyase	2.63	1.25	0.97	No
CNC04600	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	0.43	0.98	1.11	No
CNC06440	Inositol 1-phosphate synthase	2.24	0.41	0.91	No
CNF00610	Alpha-glucosidase	2.35	1.63	2.11	Yes
CNA04770	Protein-tyrosine phosphatase	0.47	0.76	0.99	Yes
CNN01010	Malate dehydrogenase	2.90	0.31	0.67	No
CNB02680	Monosaccharide transporter	3.25	0.50	0.53	No

a=Fold Change, b= Quantitative real-time PCR

Capítulo 3 – Estudo da relação entre *Cryptococcus neoformans* e macrófagos por citometria de fluxo

Este capítulo inclui trabalhos cujos focos são a fagocitose e a exocitose não-lítica de *C. neoformans* por macrófagos. O primeiro é um capítulo de um livro intitulado “*Leucocytes: Methods and Protocols*” para a série “*Methods in Molecular Biology*”. Este capítulo descreve detalhadamente o protocolo para três ensaios usados para avaliar a interação entre macrófagos e *C. neoformans in vitro* e já foi submetido para publicação. O segundo trabalho descreve uma metodologia alternativa de mensuração da fagocitose de *C. neoformans* que foi adaptada para quantificar a exocitose não-lítica *in vitro* e, pela primeira vez, demonstrar que ela ocorre *in vivo* [128].

Materiais e Métodos

Cultura de *C. neoformans*

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens H99, B3501 e CAP67. Mais detalhes sobre estas linhagens de *C. neoformans* podem ser encontrados na Tabela 1.

Sondas e drogas

As sondas CMFDA, DDAO-SE, 7-AAD e Uvitex 2B foram utilizadas neste trabalho. Mais informações sobre estas sondas podem ser encontradas na Tabela 2. Cloroquina, bafilomicina A1 e cloreto de amônio foram comprados da Sigma.

Cultura de células de mamífero

Células J774 foram mantidas em meio de cultura celular (DME com 10% de soro fetal bovino, 10% de meio NCTC 109, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de solução de penicilina e estreptomicina) a 37°C em 10% de CO₂.

Camundongos

Fêmeas BALB/c obtidas do NCI (*National Cancer Institute*, EUA) foram usadas entre 6 e 8 semanas de idade. MDMO foram preparados como descrito anteriormente. Para o procedimento cirúrgico de infecção intratraqueal os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de ketamina e xilazina. Em seguida, a traquéia foi dissecada e uma micro-seringa com volume total de 250 μL e agulha calibre 26 foi utilizada para puncionar a traquéia e injetar 50 μL de suspensão. Para coleta de lavado broncoalveolar, a traquéia de camundongos sacrificados com CO_2 foi canulada com um cateter calibre 16, por meio do qual dez lavagens de 1 mL cada de PBS com EDTA 1 mM foram feitas. Após a lise de hemácias as células foram lavadas e re-suspensas em PBS para as análises descritas a seguir.

Fagocitose com CMFDA e DDAO-SE

Uma placa contendo células J774 confluentes foi marcada com 5 mL de PBS contendo 1 μM de DDAO-SE durante 10 min. A marcação de *C. neoformans* com CMFDA foi feita em PBS contendo 10^7 células por mL e 2 μM de CMFDA durante 30 min. As células de *C. neoformans* coradas foram então adicionadas à poços de placa de 24 poços contendo células J774 coradas em proporção 1:1 e anticorpo 18B7 a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Poços controle incluíram células J774 e de *C. neoformans* coradas incubadas sozinhas. A placa foi incubada a 37°C por 24 h e amostras coletadas 1 h, 2 h, 3 h e 24 h após a infecção foram analisadas por citometria de fluxo.

Citometria de fluxo

Neste trabalho, foram utilizados os citômetros FACS Calibur, FACS Aria e LSRII. Para determinar os limites entre eventos positivos e negativos para cada corante e para realizar a compensação, foram analisados controles corados com cada uma das sondas (Figura 30).

Quantificação da exocitose não-lítica

Macrófagos corados com DDAO-SE foram incubados com *C. neoformans* corados com CMFDA em proporção de 1:10 em placas de petri contendo 18B7 a 50 µg/mL. Após duas horas, o meio foi removido e as células remanescentes na placa coradas com Uvitex 2B a 0,01% em PBS por um minuto. Após lavagem com PBS, as células foram coletadas com auxílio de 1 mL da solução Cellstripper (Cellgro Inc.), que contém quelantes de cátions e ajuda a descolar as células da placa. À suspensão das células foi então adicionada 1 µg/mL de 7-AAD e a amostra foi passada por filtro de 40 µm antes de ser analisada no citômetro FACS Aria. Para experimentos com as drogas que alteram o pH do fagossomo, as células J774 foram pré-tratadas com cloroquina a 10 µM, bafilomicina A1 a 100 nM ou cloreto de amônio a 20 mM por 30 min antes da fagocitose. As drogas também estavam presentes no meio de cultura durante a fagocitose e na incubação de 24 h após a separação. Para experimentos de exocitose não-lítica *in vitro*, 120.000 macrófagos vivos contendo *C. neoformans* internalizados foram separados de acordo com a estratégia mostrada na Figura 31 e adicionados a um poço de placa de 6 poços contendo meio de cultura. As células foram então incubadas por 24 h, coletadas com auxílio de Cellstripper e analisadas no mesmo citômetro. Para experimentos de exocitose não-lítica *in vivo*, 1.000.000 macrófagos com *C. neoformans* vivos foram separados, centrifugados e re-suspendidos em 50 µL de PBS. Este volume foi então injetado intra-traquealmente como descrito acima. Após 24 h, as células foram recuperadas junto com grande número de células do camundongo recipiente por lavagem broncoalveolar e analisadas no mesmo citômetro.

Microscopia com células vivas

Um total de 6×10^4 células J774 foram aderidas a placas de cultura com fundo de vidro (MatTek) por 2 h. As células foram então infectadas com *C. neoformans* a razão de 1:10 em presença de 10 µg/mL de 18B7. Após 2 h de incubação a 37°C, as placas foram lavadas para

remover células não-aderidas e colocadas no sistema de incubação do microscópio Zeiss Axiovert 200. As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ e imagens foram coletadas a cada 4 min por 24 h com objetiva de 10x e contraste de fase. Quando necessário, as células foram tratadas com 20 mM de cloreto de amônio antes e durante a incubação com *C. neoformans*. As imagens coletadas foram analisadas com o software ImageJ.

Resultados

A exocitose não-lítica de *Cryptococcus neoformans* de macrófagos ocorre *in vivo* e é influenciada pelo pH do fagossomo

O primeiro passo para facilitar o estudo da fagocitose de *C. neoformans* foi o aperfeiçoamento de metodologias já existentes de citometria de fluxo [129]. As células de *C. neoformans* foram marcadas com o corante CMFDA, que forma ligações covalentes com proteínas intracelulares [85]. Já os macrófagos foram corados com DDAO-SE, que se liga covalentemente a proteínas tanto intra quanto extracelulares. O uso destas duas sondas resultou em coloração uniforme e facilmente observável por citometria de fluxo (Figura 32). Além disso, como as duas se ligam covalentemente à célula as colorações foram estáveis por pelo menos 24 h (Figura 33). Experimentos controle mostraram que estes corantes não foram tóxicos para *C. neoformans* ou macrófagos e que testes de fagocitose utilizando estes dois corantes tiveram resultados equivalentes aos obtidos com metodologias tradicionais (Figura 34).

Com essas duas sondas pode-se detectar macrófagos associados a *C. neoformans*, mas não é possível diferenciar se o fungo foi fagocitado ou se ele está somente aderido à superfície do fagócito (Figura 35). Para resolver este problema, foi acrescentado ao protocolo o corante Uvitex 2B, uma sonda específica para quitina da parede celular de fungos que por ser incapaz de penetrar membranas marca apenas os fungos que não estão completamente

internalizados [86]. Também foi adicionado o corante de DNA 7-AAD, que permite diferenciar células vivas e mortas por ser incapaz de penetrar a membrana intacta das células vivas [85]. Como a intensidade da fluorescência de 7-AAD é diretamente proporcional à quantidade de DNA, a marcação de macrófagos (genoma de $2,5 \times 10^9$ pares de base [130]) foi muito mais eficiente do que a de *C. neoformans* (genoma de 2×10^7 bases [81]) e portanto 7-AAD marcou somente macrófagos mortos (Figura 36). Quando usadas em conjunto, estas quatro sondas tornaram possível detectar a associação e internalização de *C. neoformans* por macrófagos e avaliar a viabilidade destes (Figura 37).

Em seguida, o método foi modificado para permitir a quantificação do fenômeno de exocitose não-lítica (Figura 38). O mesmo ensaio de fagocitose é feito, mas as células são submetidas a separação por citometria de fluxo (“sorting”) para purificar uma população de macrófagos vivos contendo *C. neoformans* em seu interior. Depois de 24 h incubadas em cultura, as células são analisadas mais uma vez para quantificação da proporção delas que continua viva, mas que não têm mais fungos internalizados, exatamente o efeito da exocitose não-lítica. A separação por citometria de fluxo aumentou drasticamente a pureza, definida como a porcentagem de macrófagos com *C. neoformans* internalizado, de em média 42,7% para 91,0% (Figura 39, painel A). Este valor de pureza após a separação foi calculado em todos os experimentos para descontar do resultado final células que iniciaram a incubação de 24 h já sem nenhum fungo internalizado.

Os resultados obtidos com esta metodologia foram comparáveis aos resultantes do teste convencional de microscopia óptica (Figura 39, painel B). A média obtida por citometria de fluxo, de 29%, foi mais alta do que a obtida nos nossos experimentos de citometria (12,6%). Porém, este valor foi um pouco mais próximo do obtido em dois trabalhos publicados anteriormente em que a taxa de exocitose não-lítica foi medida em condições semelhantes, de 18,3% [53] e 26,7% [52]. Outra diferença importante entre os dois

métodos foi a taxa de lise de macrófagos. Nos experimentos de citometria, em média 27,3% do macrófagos eram positivos para 7-AAD; em comparação, somente 1 de 477 macrófagos analisados em três experimentos de microscopia havia sofrido lise.

Para validar a metodologia, foram feitos alguns testes adicionais. Para mostrar que os macrófagos que se tornaram CMFDA-negativos não haviam simplesmente matado o fungo e digerido o corante, foi feito um experimento de exocitose não-lítica com fungos que foram mortos logo após a coloração com CMFDA. Mesmo nesta situação extrema em que os fungos passaram 24 h mortos e expostos ao fagolisossomo, a maioria deles continuou CMFDA-positiva (Figura 40). Outro aspecto importante deste experimento é que ele demonstrou uma queda na taxa de exocitose não-lítica com *C. neoformans* mortos, reproduzindo resultados de estudo antecedentes [51, 52]. Outra explicação alternativa para os dados obtidos é de que macrófagos se tornem CMFDA-negativos porque durante a divisão celular o fagossomo contendo todos os fungos internalizados pode ser transferido para uma única célula (replicação tipo I). Como a divisão celular também leva a divisão de DDAO-SE entre as duas células, os macrófagos que tenham passado por divisão têm necessariamente fluorescência menor neste canal. Nós então re-analisamos cinco experimentos com células J774 e quatro com macrófagos primários, que não se replicam com a mesma frequência que células J774, para avaliar este fenômeno. A fluorescência de DDAO-SE diminuiu durante as 24 h de incubação nos dois tipos celulares; entretanto, como esperado a diminuição foi muito maior em células J774 (Figura 41, painel A). Comparando-se a taxa de exocitose não-lítica medida somente nas células que não tinham diminuído a fluorescência de DDAO-SE (e portanto não replicaram) com a taxa medida em todas as células, os valores obtidos foram mais baixos em células J774 mas não em MDMO (Figura 41, painel B). Isto indica que uma parte dos eventos contados como exocitose não-lítica é de fato replicação tipo I. Outro resultado interessante

deste experimento é que a taxa de exocitose não-lítica medida nas células que não replicaram foi muito próxima da observada com MDMO.

Com a validação da técnica, ela foi utilizada para estudar o efeito de drogas que alteram o pH do fagossomo nas taxas de exocitose não-lítica. O inibidor de ATPase vacuolar bafilomicina A1 diminuiu ligeiramente a frequência da exocitose não-lítica de 24,7% para 22,5%, enquanto as bases fracas cloroquina e cloreto de amônio a aumentaram respectivamente para 29,4% e 48,1% (Tabela 12). Estes resultados foram semelhantes aos descritos por Ma e colaboradores, que descreveram um aumento de taxa de exocitose não-lítica por cloroquina e uma diminuição causada por concanamicina A, análoga à bafilomicina [51].

Por fim, a metodologia de exocitose não-lítica foi mais uma vez adaptada, desta vez para medir a ocorrência do fenômeno durante a infecção de camundongos. O desenho experimental, esquematizado na Figura 42, inclui novamente separar macrófagos vivos contendo *C. neoformans* ingeridos. A diferença foi que além de serem incubadas *in vitro*, as células separadas foram também injetadas na traquéia de camundongos. Após 24 h, as células foram coletadas dos camundongos por lavagem broncoalveolar e analisadas junto com as que foram incubadas *in vitro* (Figura 43). Em contraste com o experimento *in vitro*, um controle feito com macrófagos e *C. neoformans* não-corados foi necessário para determinar uma região que incluiu 99,9% dos macrófagos injetados e excluiu 70-85% dos macrófagos do camundongo hospedeiro. A análise dos dados revelou que a exocitose não-lítica ocorreu com maior frequência *in vivo* (44,83%) do que *in vitro* (9,55%) (Tabela 13).

Discussão

O macrófago é uma das células efetoras mais importantes na resposta imune contra *C. neoformans* [131]. Os métodos mais utilizados para estudar a interação entre estas duas

células, entretanto, são trabalhosos, demorados e por vezes muito subjetivos. O uso de citometria de fluxo já havia sido proposto anteriormente [129], mas o método desenvolvido apresentava limitações tais como usar apenas células de *C. neoformans* mortas, só servir para estudos com duração de no máximo 3 h e não avaliar a viabilidade do macrófago.

Tendo isto em mente, foi desenvolvido um novo método utilizando quatro corantes fluorescentes capaz de medir acuradamente diversos parâmetros como a adesão e a internalização do fungo pelo macrófago e a viabilidade do fagócito em um único teste, além de poder ser usado em testes com duração de pelo menos 24 h. O impacto do uso de citometria de fluxo foi ainda maior no estudo da exocitose não-lítica. Normalmente um experimento de microscopia com células vivas leva 24 h para coletar imagens de aproximadamente 200 células em uma única condição experimental. Após a compilação do filme, cada uma dessas células tem que ser observada individualmente para determinar se ocorreu a exocitose não-lítica. Em comparação, experimentos feitos por citometria de fluxo testam quatro diferentes condições experimentais simultaneamente, com dezenas de milhares de células avaliadas num período de 24 h.

Patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes* [132], adenovírus sorotipo 7 [133] e *Francisella tularensis* [134] dependem de acidificação para escapar do fagossomo, o que levou à hipótese de que a exocitose não-lítica também pudesse depender do pH do fagossomo. Para testar isso foram utilizados três agentes neutralizadores do fagossomo: a cloroquina e o cloreto de amônio, duas bases fracas que se acumulam em organelas acídicas e aumentam seu pH, e a bafilomicina A1, um inibidor da ATPase lisossomal responsável pelo transporte de prótons para dentro do fagossomo. Apesar de os três agentes resultarem na neutralização do fagossomo, seus efeitos na exocitose não-lítica foram opostos: as bases fracas aumentaram a ocorrência de exocitose não-lítica, enquanto a bafilomicina A1

diminuiu. Este resultado pode ter sido causado por efeitos das drogas no próprio fungo, uma vez que a cloroquina tem múltiplos efeitos contra *C. neoformans* [37, 135, 136].

A exocitose não-lítica pode ter um papel importante durante a infecção. Como a célula hospedeira não é lisada, não ocorre liberação de conteúdo intracelular com consequente resposta inflamatória, o que pode auxiliar na dispersão do fungo para outros órgãos [51]. Além disso, a exocitose não-lítica pode participar do processo de invasão do sistema nervoso central por um mecanismo de cavalo de tróia, pelo qual o fungo atravessa a barreira hematoencefálica dentro de uma célula do hospedeiro para subsequentemente causar meningoencefalite [137]. Entretanto, estas especulações não podem ser provadas diretamente pela impossibilidade técnica de se filmar a interação entre macrófagos e *C. neoformans in vivo*. Para lidar com esta importante questão, o método citométrico foi adaptado para medir exocitose não-lítica de macrófagos primários dentro do pulmão de camundongos. O experimento demonstrou não só que a exocitose não-lítica realmente ocorre *in vivo*, mas aparentemente em uma frequência muito maior do que a observada *in vitro*. Este resultado reforça a importância da exocitose não-lítica na interação entre *C. neoformans* e o hospedeiro e abre portas para futuros experimentos que possam detalhar sua participação na criptococose.

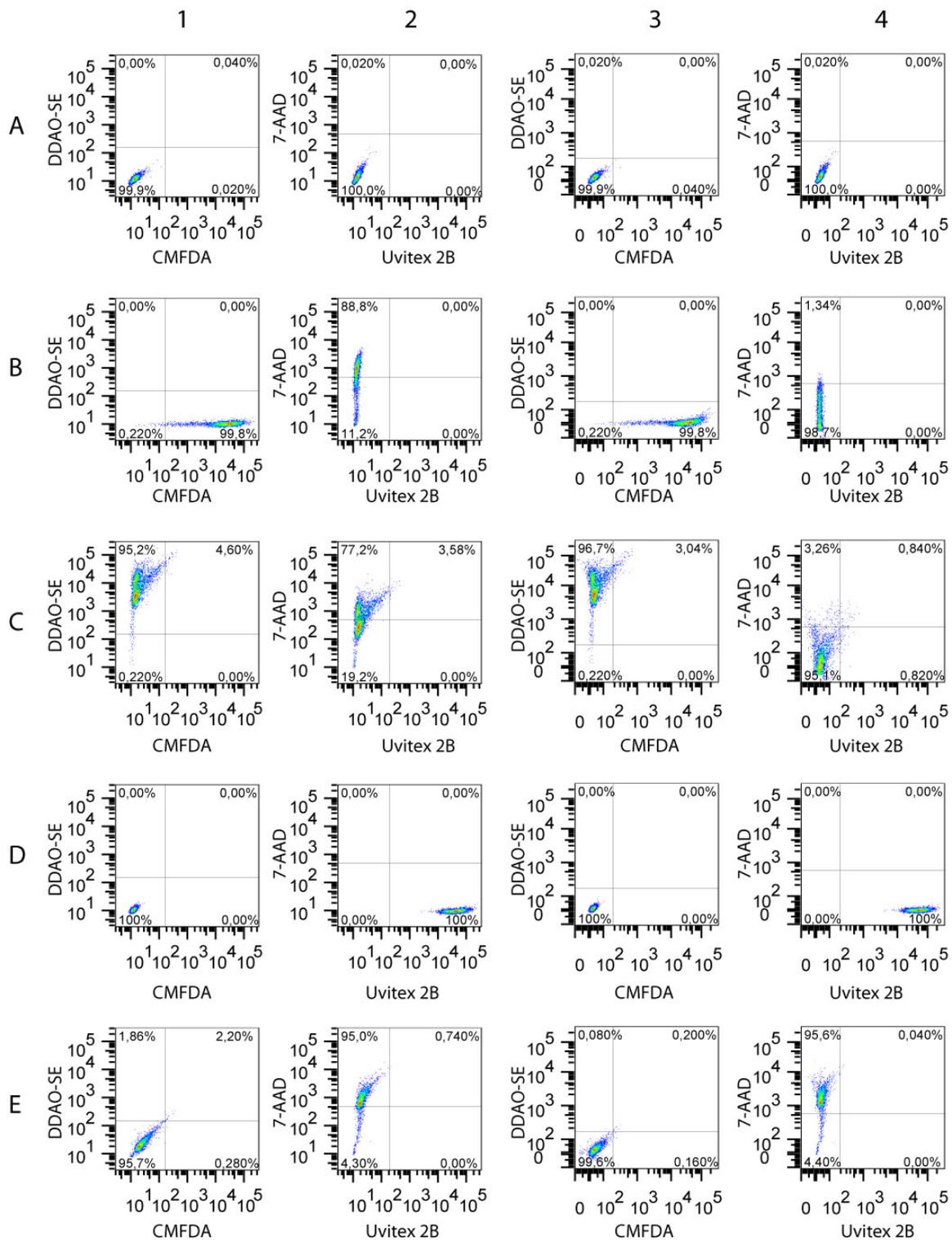


Figura 30 – Controles e compensação

(A) Macrófagos não-corados. (B) *C. neoformans* corado com CMFDA. (C) Macrófagos corados com DDAO-SE. (D) *C. neoformans* corado com Uvitex 2B. (E) Macrófagos corados com 7-AAD. Para este controle as células foram fixadas com formalina a 10% antes da coloração. As colunas 1 e 2 mostram a fluorescência antes da compensação, enquanto as colunas 3 e 4 mostram após a compensação.

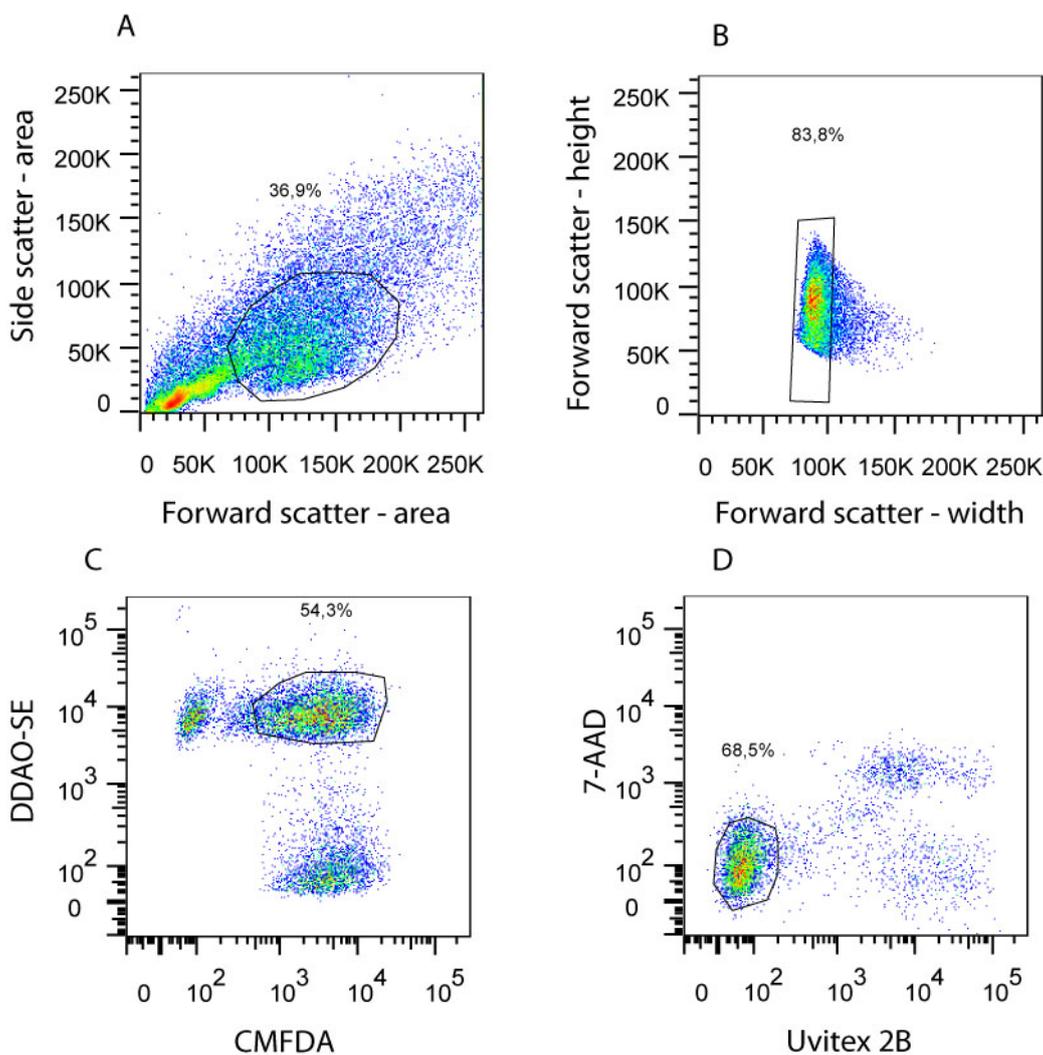


Figura 31 – Estratégia de separação por citometria de fluxo para o ensaio de exocitose não-lítica

Macrófagos corados com DDAO-SE são incubados com *C. neoformans* corado com CMFDA e em seguida corados com 7-AAD e Uvitex 2B para gerar as amostras. (A) A primeira região é desenhada em um gráfico FSC-A x SSC-A para selecionar macrófagos. (B) Um gráfico FSC-W x FSC-H é então utilizado para eliminar ‘doublets’, eventos em que duas células estão próximas o suficiente para parecerem uma só. (C) Em seguida um gráfico CMFDA x DDAO-SE permite selecionar somente os macrófagos associados a *C. neoformans*. (D) Por fim, uma região 7-AAD-negativa e Uvitex 2B-negativa é usada para separar somente macrófagos vivos que tenham internalizado células de *C. neoformans*.

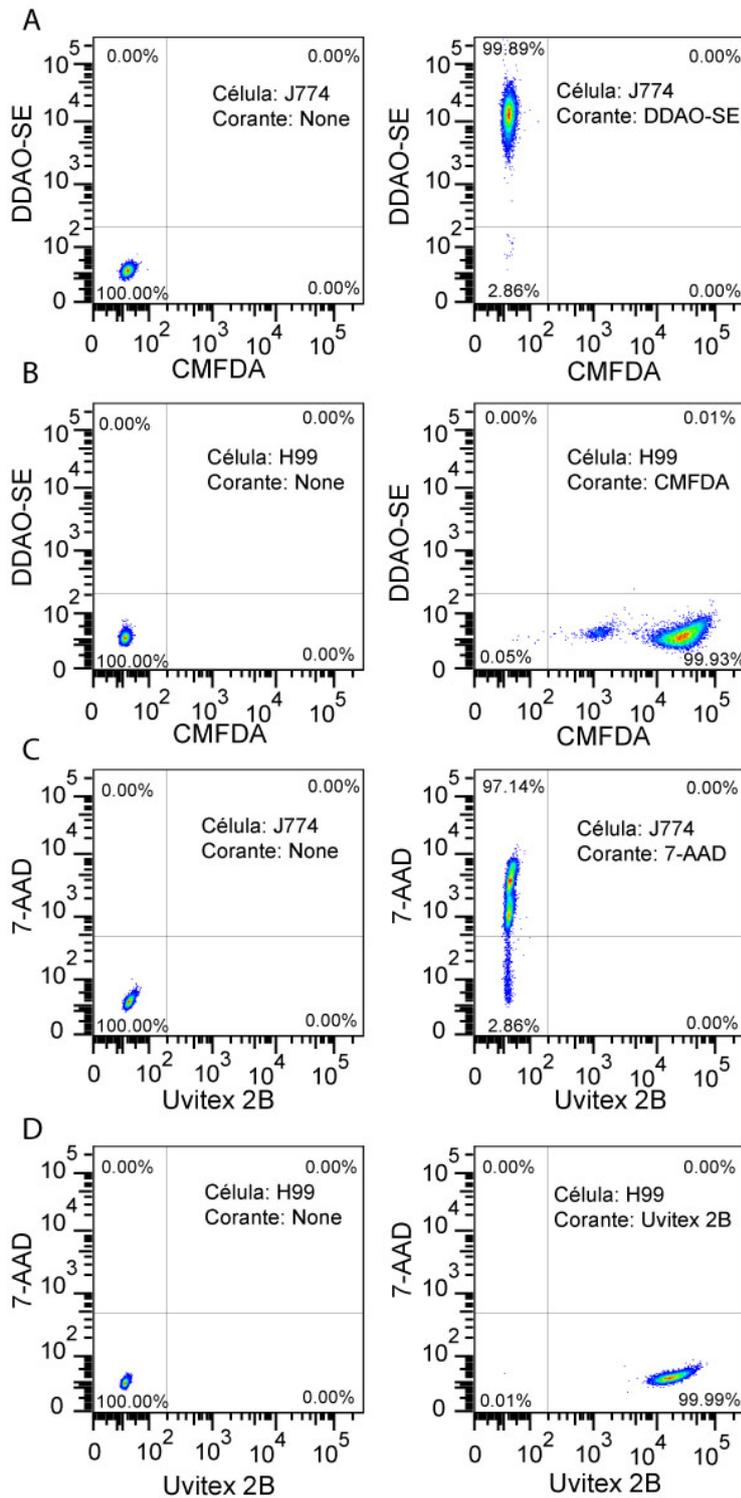


Figura 32 – Análise de células J774 e de *C. neoformans* corados com várias sondas

Esta figura mostra os controles feitos com cada um dos corantes individualmente após compensação. (A) J774 + DDAO-SE. (B) *C. neoformans* + CMFDA. (C) J774 + 7-AAD. (D) *C. neoformans* + Uvitex 2B. Para o controle com 7-AAD as células J774 foram previamente fixadas com paraformaldeído a 1% e permeabilizadas com saponina a 0,1% para simular células mortas.

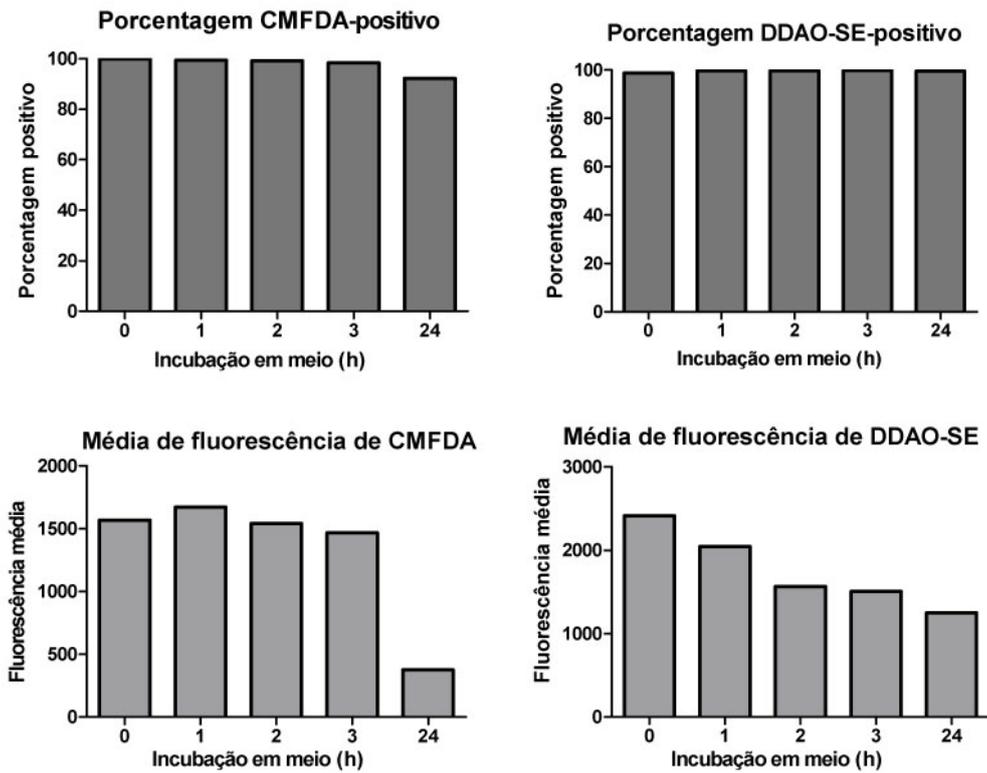


Figura 33 – Estabilidade da coloração com CMFDA e DDAO-SE

Células J774 coradas com DDAO-SE e *C. neoformans* corado com CMFDA foram incubados individualmente em meio de cultura a 37°C e 10% CO₂ e coletados em diferentes tempos para análise por citometria de fluxo. Os gráficos acima mostram a porcentagem de células que continuavam positivas para o corante, enquanto os gráficos abaixo mostram a fluorescência média das células.

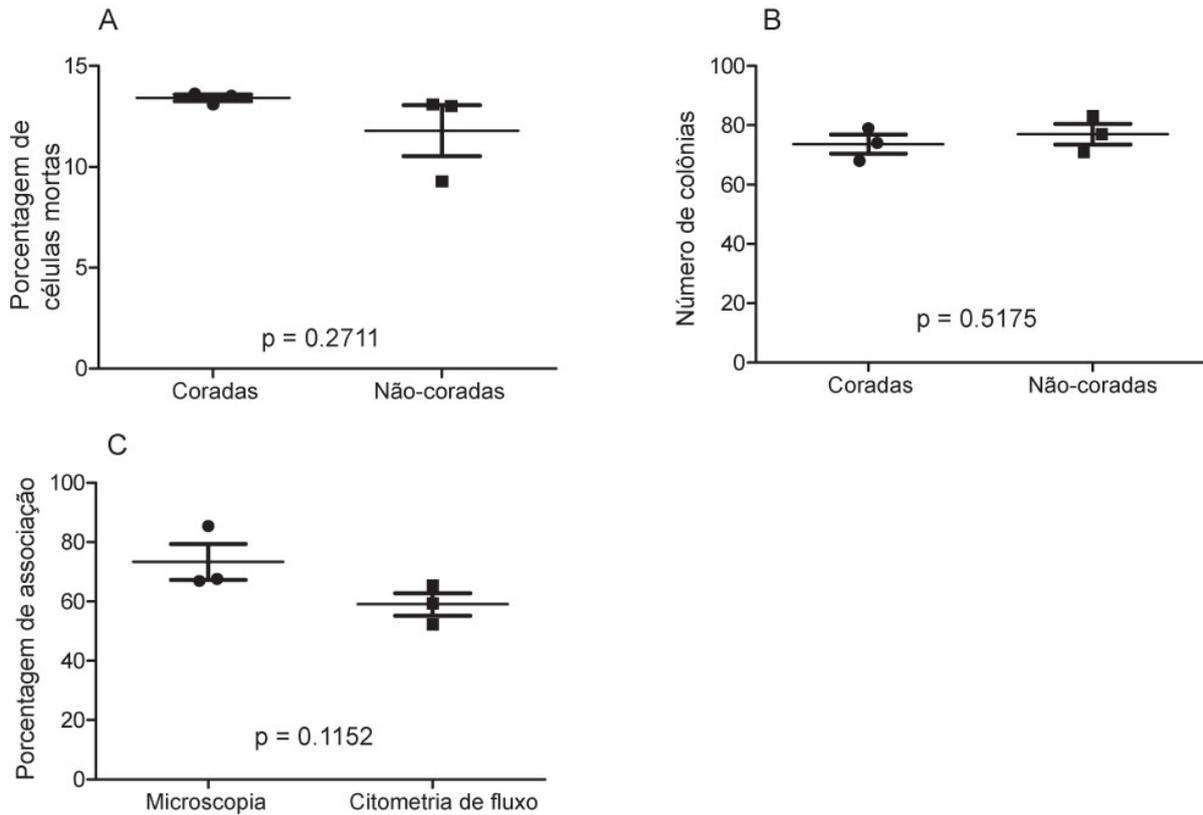


Figura 34 – Validação do método citométrico

(A) Células J774 foram coradas com DDAO-SE em placas de petri, coletadas e plaqueadas em meio de cultura. Após 2 h a viabilidade das células coradas e controles não corados foi determinada por microscopia com o corante vital azul de tripano. (B) Suspensões de *C. neoformans* foram coradas com CMFDA, diluídas e plaqueadas para contagem de unidades formadoras de colônia em paralelo a um controle tratado somente com DMSO. (C) Macrófagos e *C. neoformans* foram incubados na presença de 18B7 e a porcentagem de macrófagos associados a *C. neoformans* quantificada pelo método citométrico e pelo método tradicional de microscopia após coloração com Giemsa. Nos três painéis as barras representam a média e o erro padrão da medida. A significância estatística foi calculada pelo teste *t* de Student.

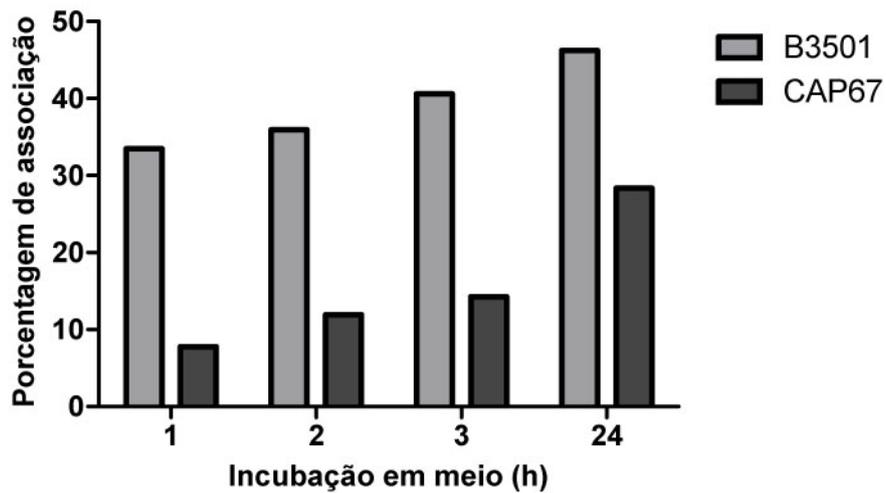


Figura 35 – Teste de fagocitose com *C. neoformans* encapsulado e acapsular

Células J774 coradas com DDAO-SE foram incubadas com *C. neoformans* B3501 (encapsulado) ou CAP67 (acapsular) na presença de 18B7. Como esperado devido ao fato de o anticorpo não se ligar a CAP67, houve menor associação entre macrófagos e este mutante.

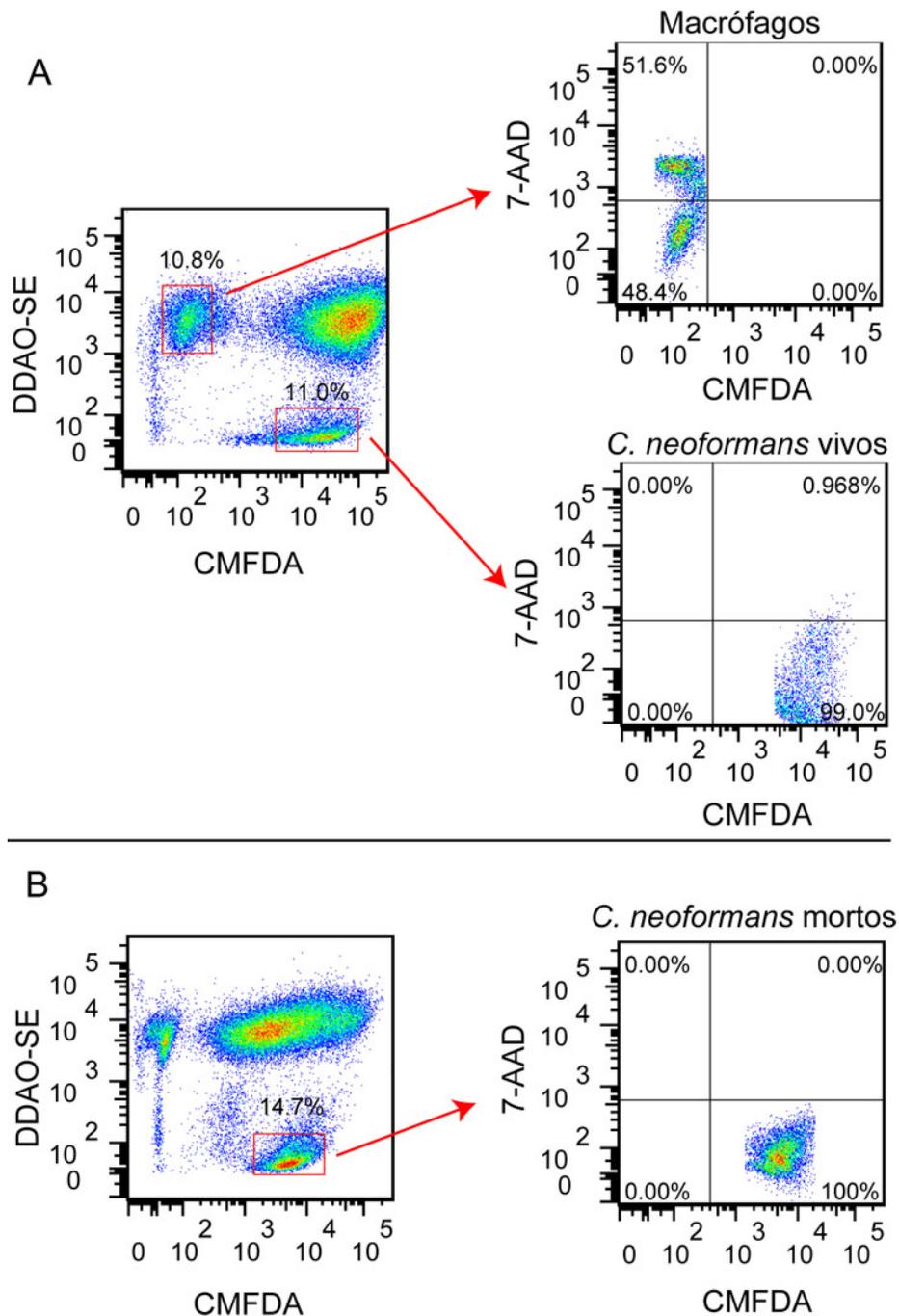


Figura 36 – Marcação de macrófagos e *C. neoformans* mortos por 7-AAD

Macrófagos foram infectados com *C. neoformans* vivos (A) ou mortos (B) de acordo com a Figura 40. Os gráficos CMFDA x DDAO-SE foram usados para desenhar regiões contendo somente macrófagos ou somente *C. neoformans*. Os três gráficos à direita mostram que há uma grande diferença entre macrófagos vivos e mortos e que esta diferença é pequena no caso de *C. neoformans*.

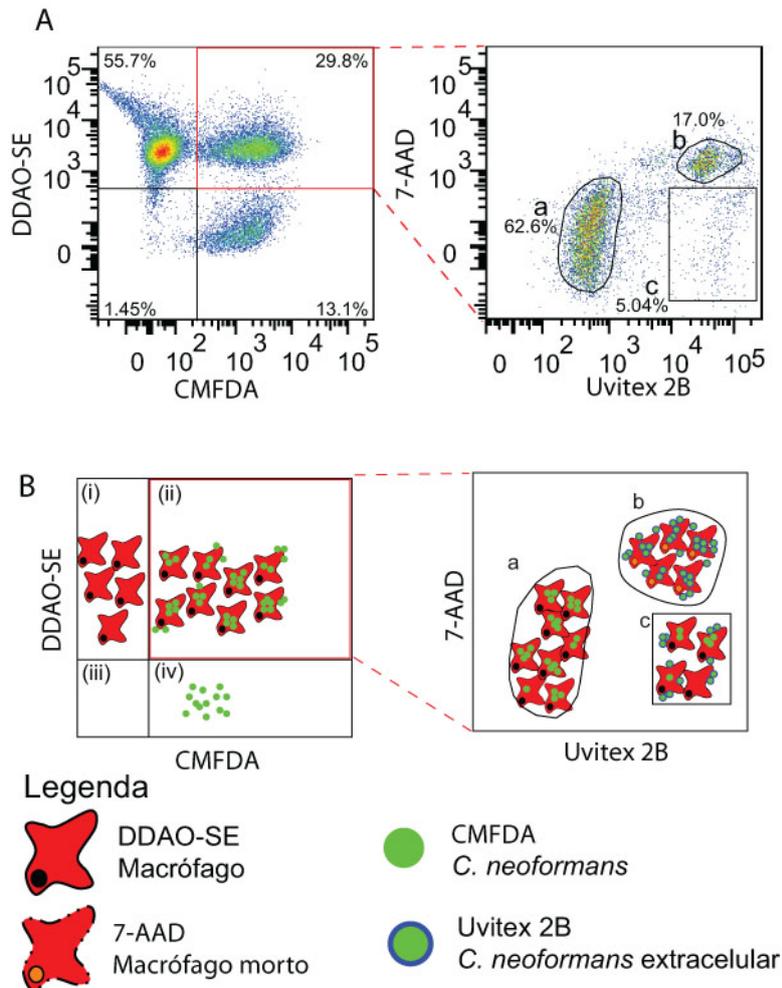


Figura 37 – Teste de fagocitose por citometria de fluxo

(A) Gráficos de citometria tipo “density plot” mostrando o resultado de um ensaio de fagocitose. O gráfico à esquerda mostra em sentido horário partindo do canto superior esquerdo três populações: macrófagos sozinhos, macrófagos associados a *C. neoformans* e células de *C. neoformans* sozinhas. Os eventos do quadrante superior direito são então analisados no gráfico a esquerda, que mostra: (a) macrófagos vivos com *C. neoformans* internalizado; (b) macrófagos mortos associados a *C. neoformans*; (c) macrófagos vivos com *C. neoformans* aderido à superfície. (B) Representação esquemática dos gráficos do painel A.

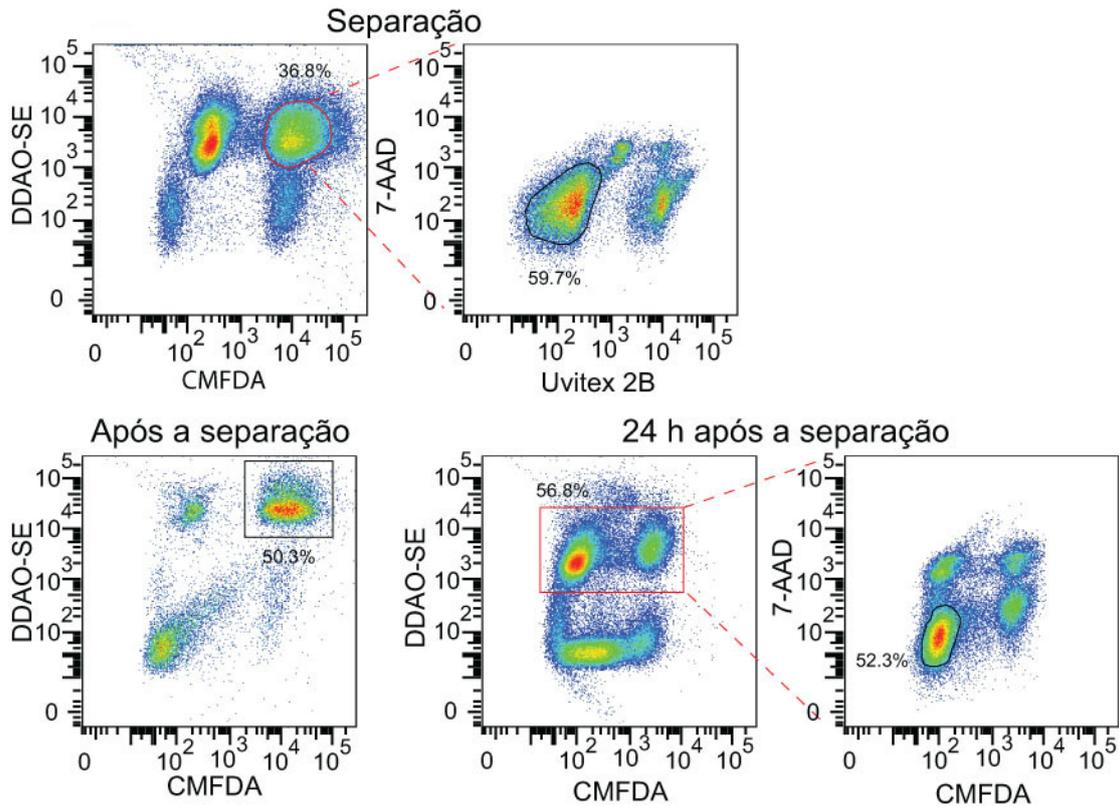


Figura 38 – Medição de excitose não-lítica por citometria de fluxo

Gráficos mostrando os três passos para realização do teste de excitose não-lítica. As células coradas são incubadas e submetidas à separação (“sorting”) para isolar uma população de macrófagos vivos com *C. neoformans* internalizado. Estas células são analisadas imediatamente após a separação para avaliar a eficiência do processo e incubadas por 24 h até nova análise, na qual eventos correspondentes a macrófagos vivos sem *C. neoformans* são contados com excitose não-lítica.

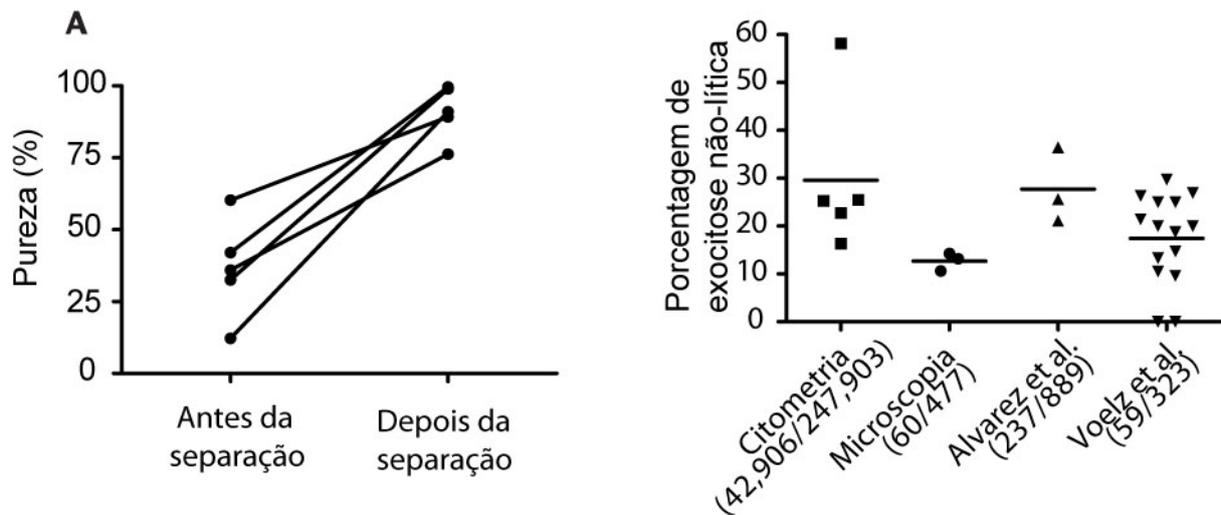


Figura 39 – Validação do teste citométrico de exocitose não-lítica

(A) Porcentagem de macrófagos que possuem células de *C. neoformans* internalizadas (DDAO-SE-positivo, CMFDA-positivo, Uvitex 2B-negativo) antes e logo depois da separação por citometria de fluxo. (B) Comparação dos resultados citométricos com três conjuntos de experimentos semelhantes feitos por microscopia. Os dois a direita são re-análise de dados já publicados [52, 53]. As barras representam a média de 3 a 15 experimentos independentes. Os números abaixo dos rótulos representam o número de eventos de exocitose não-lítica e o número total de macrófagos em todos os experimentos combinados.

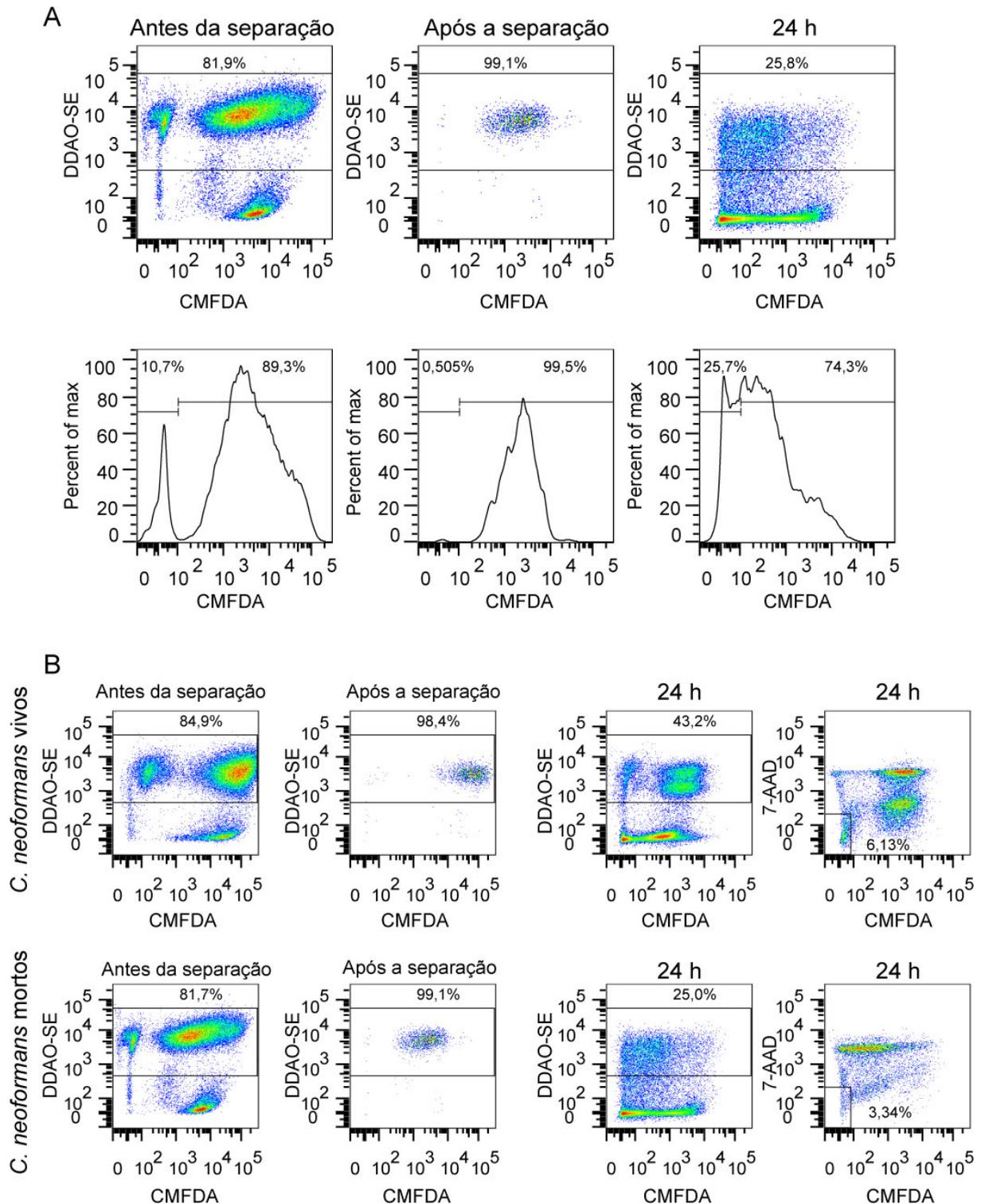


Figura 40 – Exocitose não-lítica de *C. neoformans* mortos

Células de *C. neoformans* foram coradas com CMFDA e separadas em duas frações, em uma das quais as células de *C. neoformans* foram mortas em banho a 65°C por 30 min. As duas amostras foram então usadas em testes de exocitose não-lítica por citometria de fluxo. (A) Análise da fluorescência de CMFDA das células de *C. neoformans* mortas internalizadas. Cada gráfico acima mostra a região desenhada em torno de todos os macrófagos, enquanto

cada gráfico abaixo mostra o histograma de CMFDA desta população. Mesmo após 24 h, 75% das células de *C. neoformans* mortas continuam positivas para CMFDA. (B) Quantificação de exocitose não-lítica com *C. neoformans* vivos ou mortos. A amostra anterior à separação revela uma redução drástica da fluorescência de CMFDA após a fagocitose, que expões o fluoróforo sensível a pH CMFDA aos ambiente ácido do fagolisossomo. A amostra de 24 h demonstra uma diminuição nas taxas de exocitose não-lítica com *C. neoformans* mortos.

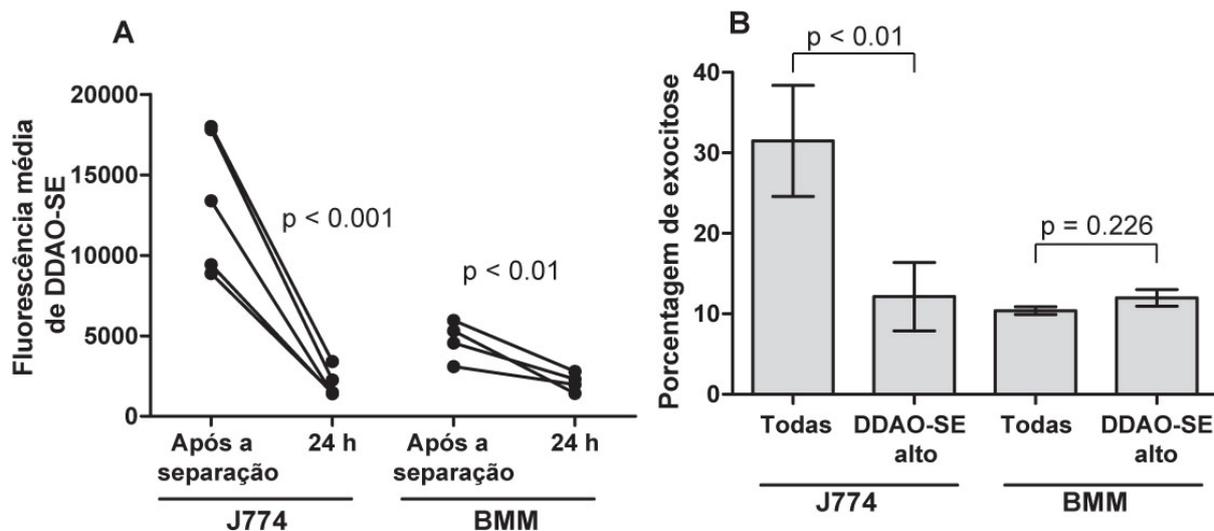


Figura 41 – Replicação de macrófagos e exocitose não-lítica

Os cinco experimentos com células J774 mostrados na Figura 34 foram comparados com quatro experimentos feitos com MDMO. Culturas de J774 duplicam pouco mais de uma vez em 24 h, enquanto MDMO replicam muito pouco. (A) Queda da intensidade de fluorescência de DDAO-SE entre a separação e a análise 24 h depois. (B) A taxa de exocitose não-lítica foi comparada entre todos os macrófagos e só aqueles em que a fluorescência de DDAO-SE continuava tão alta quanto a medida imediatamente após a separação (DDAO-SE alto). As barras representam média e erro padrão. A significância estatística foi calculada por teste *t* pareado.

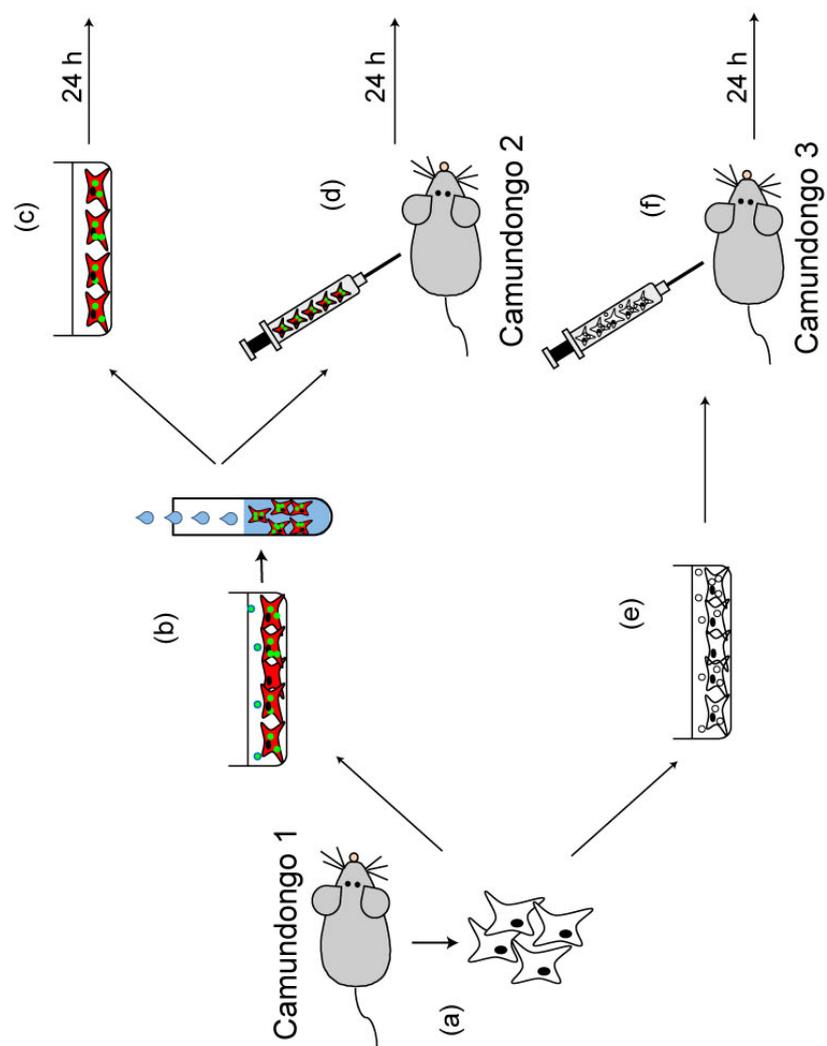
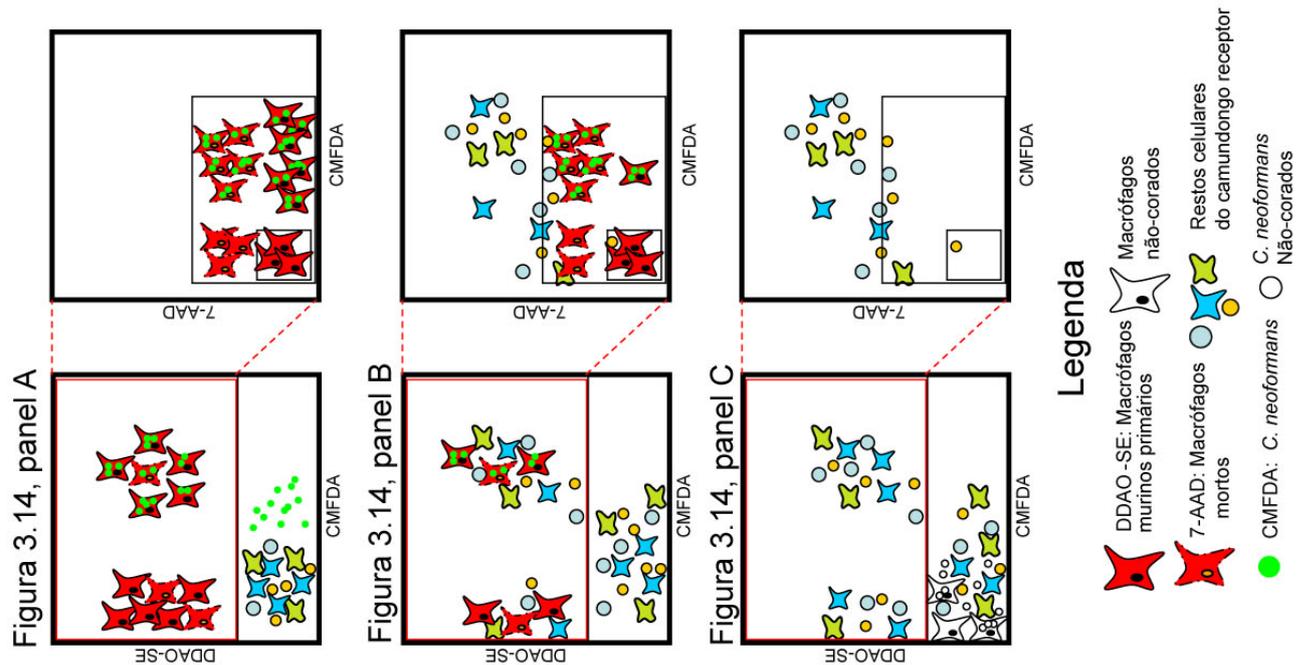


Figura 42 – Esquema do experimento de exocitose não-lítica *in vivo*

O lado esquerdo da figura mostra os passos para obtenção das amostras que geraram os dados de exocitose não-lítica *in vivo*. O lado direito representa esquematicamente os gráficos de citometria de fluxo mostrados na figura 3.14. O experimento começa pela coleção de medula óssea do camundongo 1, usada para diferenciação de macrófagos primários (a). Uma parte destes macrófagos é então marcada com DDAO-SE, incubada com CMFDA-*C. neoformans* opsonizado por 18B7 e em seguida corada com Uvitex 2B e 7-AAD para separação de macrófagos contendo *C. neoformans* internalizados (b). As células separadas são então plaqueadas em meio de cultura (c) ou injetadas intra-traquealmente no camundongo 2 (d). Em paralelo, outra parte dos macrófagos não-corados é usada para fazer um controle negativo. Estas células são incubadas com *C. neoformans* não-corado (e) e injetadas no camundongo 3 (f). Após 24 h, os macrófagos que haviam sido plaqueados são coletados e lavagem broncoalveolar é feita nos camundongos 2 e 3 para gerar as amostras “*in vitro*”, “*in vivo*” e “controle”, respectivamente. A amostra “*in vitro*” gera resultados similares àqueles observados na Figura 38, com uma região menor no gráfico à direita mostrando macrófagos que passaram por exocitose não-lítica. Além disso, por conter somente macrófagos marcados, esta amostra permite desenhar outra região que inclui todos os macrófagos corados. Por outro lado, as amostras “*in vivo*” e “controle” têm milhares de macrófagos injetados misturados a milhões de células e restos celulares do camundongo recipiente. Uma pequena fração destas células do camundongo recipiente é altamente autofluorescente e acaba caindo na região DDAO-SE-positiva no gráfico à esquerda. Entretanto, como estes eventos também são altamente fluorescentes nos outros canais, a maioria deles é excluída da análise pela região maior desenhada na amostra “*in vitro*”.

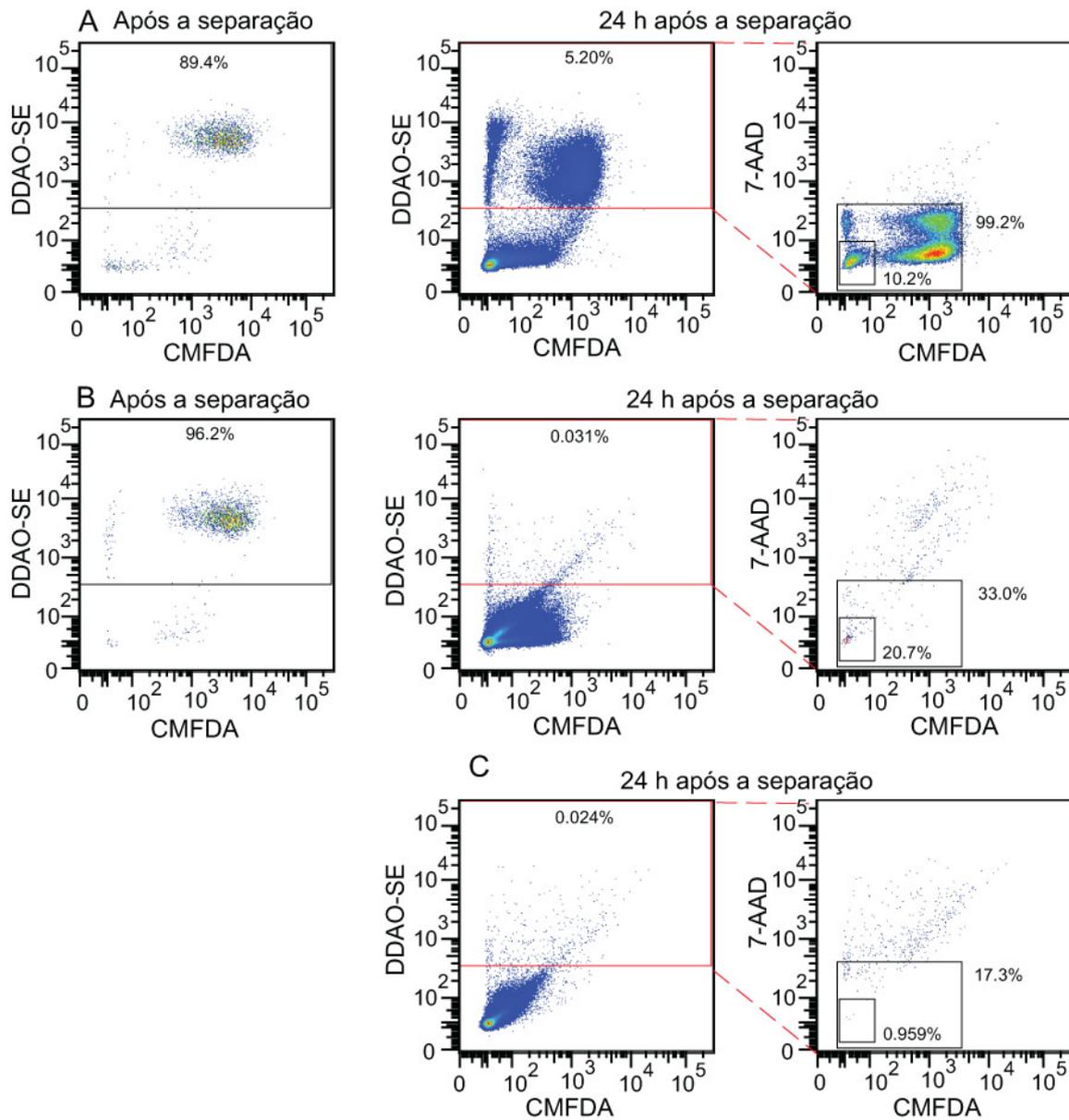


Figura 43 – Exocitose não-lítica *in vivo*

Veja a Figura 42 para um esquema que ajuda a interpretar este experimento. (A) “*In vitro*”. (B) “*In vivo*”. (C) “Controle”. Este teste foi repetido duas vezes e as taxas de exocitose são mostradas na Tabela 13.

Tabela 12 – Efeito dos compostos neutralizadores na taxa de exocitose não-lítica

	Macrófagos*	Exocitose	Porcentagem	p †
<i>Citometria de fluxo</i>				
Não-tratado	84,333	20,819	24.7%	
Bafilomicina A1 100 nM	28,017	6,294	22.5%	<0.0001
Cloroquina 10 µM	126,100	60,688	48.1%	<0.0001
NH ₄ Cl 20 mM	78,794	23,147	29.4%	<0.0001
<i>Microscopia</i>				
Não-tratado	477	60	12.6%	
NH ₄ Cl 20 mM	547	87	15.9%	0.1542

*Citometria de fluxo: n = 2; microscopia: n = 3. Os resultados de todas as réplicas foram combinados.

†Valor de *p* calculado usando o teste do qui-quadrado com correção de Yates.

Tabela 13 – Comparação das taxas de excitose não-lítica *in vitro* e *in vivo*

	Macrófagos*	Exocitose	Porcentagem	p †
<i>In vitro</i>	52,879	5,049	9.55%	-
<i>In vivo</i>	520	233	44.83%	p<0.0001

* n = 2 para cada condição.

† Valor de *p* calculado usando o teste do qui-quadrado com correção de Yates.

Capítulo 4 – Papel da autofagia do macrófago na resposta imune à infecção por *Cryptococcus neoformans*

Os experimentos descritos neste capítulo baseiam-se na hipótese de que a autofagia do macrófago participa da resposta imune a *C. neoformans*.

Materiais e Métodos

Linhagens e reagentes

Neste trabalho foram usadas as linhagens de *C. neoformans* H99, B3501, 24067 e CAP67 e células J774. O plasmídeo de expressão pEGFP-LC3, que contém EGFP fusionada ao marcador de autofagossomos LC3, foi cedido pelo Dr. Noboru Mizushima, Tokyo Medical and Dental University, Japão.

Animais

Camundongos C57/BL6 foram usados entre 6 e 8 semanas de idade para se obter macrófagos peritoneais por meio de lavagem peritoneal. Camundongos ATG5flox, com nocaute condicional de ATG5 em células mielóides [99], foram obtidos com o Dr. Herbert Virgin, Washington University at Saint Louis, EUA. Camundongos nocaute (Cre+) e controles (Cre-) foram obtidos por cruzamento de um animal ATG5flox^{+/+}/LyzCre^{+/+} com outro ATG5flox^{+/+}/LyzCre^{+/-}. Biópsias foram coletadas dos filhotes entre 8 e 21 dias de idade para extração de DNA e genotipagem por PCR, como descrito anteriormente [99, 138]. MDMO foram obtidos incubando células tronco de medula óssea dos camundongos em meio DME suplementado com 20% de meio condicionado de L929 durante 7 dias.

Experimentos de sobrevivência. Para infecção intra-peritoneal, 500 µL de suspensões em PBS de *C. neoformans* H99 contendo entre 10⁵ e 10⁷ células foram injetadas na cavidade peritoneal utilizando uma seringa de 1 mL. Para o procedimento cirúrgico de infecção

intratraqueal os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de ketamina e xilazina. Em seguida, a traquéia foi dissecada e uma micro-seringa com volume total de 250 μL e agulha calibre 26 foi utilizada para puncionar a traquéia e injetar 50 μL de suspensão. As doses de infecção variaram entre $2,5 \times 10^4$ e 10^6 células de *C. neoformans* por animal. A incisão foi fechada com o adesivo veterinário VetBond (3M). Os animais infectados foram observados diariamente e sacrificados por inalação de CO_2 em caso de sofrimento severo.

Carga fúngica e dosagem de citocinas. Camundongos ATG5 Cre⁺ e Cre⁻ foram infectados por via intratraqueal com 10^5 células de *C. neoformans* H99 e sacrificados após 3, 7 e 14 dias. Os pulmões e cérebros foram dissecados e homogenizados em PBS estéril. As suspensões resultantes foram diluídas e quatro diluições plaqueadas em meio Sabouraud para contagem de unidades formadoras de colônias. Para dosagem de citocinas, foi adicionado um coquetel de inibidores de protease (Roche) aos homogenizados de pulmão do dia 14 logo após serem coletadas amostras para contagem de UFC. As amostras foram usadas no experimento para dosagem de citocinas descrito abaixo. O experimento foi feito com cinco camundongos por grupo.

Histopatologia. Camundongos ATG5flox Cre⁺ e Cre⁻ foram sacrificados por inalação de CO_2 e exsanguinação nos dias 3, 7 e 14 após infecção intratraqueal com 10^5 células de *C. neoformans* H99. Os pulmões, fígado, baço e cérebro foram dissecados, fixados em formalina, incluídos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina e eosina. Para estudos de imunohistoquímica, foi utilizado um anticorpo contra a proteína Ym-1 (R&D Systems) seguido por secundário conjugado a peroxidase e detecção com DAB. As lâminas foram avaliadas semi-quantitativamente por uma patologista veterinária. Foram usados cinco camundongos por grupo.

RNAi contra ATG5

Interferência de RNA foi utilizada para diminuir a expressão de ATG5, um gene essencial para autofagia [139]. Células J774 foram transduzidas com cinco clones de shRNA contra ATG5, assim como um shRNA controle sem nenhum alvo no genoma de camundongo. As células transfectadas foram selecionadas e mantidas em meio contendo 5 µg/mL de puromicina. A eficiência de interferência foi quantificada por western blot usando anticorpo policlonal de coelho contra ATG5 de camundongo (Santa Cruz Biotechnology) seguido por detecção com peroxidase (HRP) e quimioluminescência (Thermo Scientific). Como controle constitutivo, foi utilizado um anticorpo monoclonal contra β-actina. Como a eficiência de interferência com ATG5 não foi muito alta, as células transfectadas foram clonadas por diluição limitante e os clones com menor expressão de ATG5 selecionados (Figura 1).

Interação entre macrófagos e *C. neoformans*

Para estudar a interação entre *C. neoformans* e macrófagos foram utilizados três testes diferentes. Para avaliar a viabilidade do fungo, $2,5 \times 10^4$ células J774 foram plaqueadas em cada poço em placas de 96 poços. As células foram mantidas em meio de cultura suplementado ou não com 100 U/mL de IFN-γ recombinante (Roche) e 500 ng/mL de LPS (Sigma). Após 24 h, as células foram infectadas com *C. neoformans* a razão de 1:1 na presença de 10 µg/mL de 18B7 ou 20% de soro de camundongo (Pel-Freez). Após 2 h ou 24h, as células J774 foram lisadas com água destilada e o número de células viáveis determinado por diluição e plaqueamento em meio Sabouraud. Para avaliar a fagocitose e a exocitose não-lítica, foram usados os testes citométricos descritos no capítulo anterior.

Dosagem de citocinas

Células J774 transduzidas com shRNA contra ATG5 foram infectadas em placas de petri com *C. neoformans* a taxa de 1:10 na presença de 10 µg/mL de 18B7. Após 24 h, o sobrenadante das culturas foi coletado, centrifugado e filtrado a 0,2 µm. Além disso, foram também

utilizadas amostras de pulmões homogenizados dos camundongos infectados com *C. neoformans* descritos acima. Para dosagem de citocinas, foi utilizado um sistema de microesferas (Luminex) com reagentes para 22 citocinas e quimiocinas: G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, KC, MCP-1, MIP-1 α , RANTES e TNF- α (Millipore).

Microscopia de fluorescência

Células J774 ou macrófagos primários foram plaqueados em placas de 35 mm com fundo de vidro (MatTek) e aderidas durante 24 h. As células foram então infectadas com *C. neoformans* a razões de 1:1 ou 1:10 e co-incubadas entre 15 min e 24 h. Como opsoninas foram utilizados 18B7 a 10 $\mu\text{g/mL}$ ou soro de camundongo. Após o intervalo de incubação, as células foram fixadas e permeabilizadas com metanol a -20°C por 10 min e coradas com anticorpo policlonal de coelho contra LC3 de camundongo (Santa Cruz Biotechnology), seguido por secundário conjugado a FITC. Em alguns experimentos foi também utilizado Uvitex 2B para marcar a parede fúngica. Depois de coradas, as amostras foram montadas em meio de montagem (0,1 M de propilgalato em 50% glicerol/PBS) e observadas nos microscópios Olympus, Zeiss ou Leica SP2.

Microscopia confocal com células vivas

Células J774 foram submetidas a transfecção transiente com pEGFP-LC3 utilizando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen). As células transfectadas foram transferidas para placas com fundo de vidro 24 h após a transfecção e infectadas com *C. neoformans* marcado com DDAO-SE ou CM-SNARF após mais 24 h. As placas foram acomodadas em estágio a 37°C e com 5% de CO_2 no microscópio Perkin-Elmer descrito anteriormente. A infecção a razão de 1:10 na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de 18B7 foi feita na mesma hora em que a coleta de imagens começou.

Análise de imagens

As imagens de epifluorescência foram analisadas com os programas AxioVision, ImageJ e Photoshop. Deconvolução foi feita com um algoritmo iterativo no programa AxioVision. As imagens coletadas no microscópio confocal Perkin-Elmer foram todas ajustadas em contraste e brilho para melhorar o sinal fraco. As imagens foram reconstruídas tri-dimensionalmente com o software VOXX 2.

Microscopia eletrônica de transmissão

Células J774 crescidas em placas de 6 poços por 24 h foram infectadas com *C. neoformans* a razão de 1:1 na presença de 10 µg/mL de 18B7. Após 12 h, as células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio seguido por 2% de acetato de uranila, desidratadas em etanol e incluídas em resina LX112 (LADD Research Industries). Seções ultrafinas foram feitas em ultramicrotomo Reichert Ultracut UCT, coradas com acetato de uranila seguido por citrato de chumbo e observadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX a 80 kV.

Análise estatística

Os testes de viabilidade de *C. neoformans*, de dosagem de citocinas e de carga fúngica foram analisados por ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os experimentos de exocitose não-lítica foram analisados pelo teste exato de Fisher. Os experimentos de sobrevivência foram analisados individualmente pelo teste Log-rank de Mantel Cox e unidos por regressão de riscos proporcionais de Cox. As análises estatísticas foram feitas com os programas Graphpad Prism e IBM SPSS.

Resultados

Múltiplos papéis para a autofagia do macrófago na resposta imune a *Cryptococcus neoformans*

Para testar se a autofagia tem algum papel na resposta imune de macrófagos contra *C. neoformans*, células J774 foram transduzidas com vetores lentivirais contendo diferentes RNAs de interferência (shRNAs) contra ATG5, um gene essencial para autofagia [140] (Figura 44). Estas células foram então utilizadas em testes de viabilidade de *C. neoformans*, nos quais o número de leveduras viáveis após a infecção dos macrófagos é determinado por contagem de unidades formadoras de colônias. Como mostrado na Figura 45, a inibição da autofagia gera uma diminuição dose-dependente da capacidade do macrófago restringir a replicação intracelular de *C. neoformans*. Este efeito ocorreu independente da opsonina utilizada. Entretanto, o efeito só foi observado após um período de 24 h de infecção, não havendo diferença em experimentos realizados com 2 h de infecção. Quando as células J774 foram ativadas com IFN- γ e LPS antes e durante a infecção, não foi possível avaliar o experimento porque as células perderam completamente sua função antifúngica.

Em seguida, foram feitos experimentos de imunofluorescência para determinar se o marcador de autofagossomos LC3 se localiza na membrana de fagossomos contendo o fungo. Como descrito em vários outros tipos celulares [141], a LC3 está presente tanto a forma inativa LC3-I dispersa por todo o citoplasma do macrófago como a forma ativa LC3-II em pequenos autofagossomos. Além disso, o marcador de autofagossomos foi também detectado envolvendo células de *C. neoformans* fagocitadas (Figura 46, painel A). Fagossomos LC3-positivos foram encontrados em amostras preparadas em todos os tempos de infecção, variando entre 15 min e 24 h. A proporção de macrófagos em que o fungo internalizado se encontrava em vacúolos LC3-positivos variou bastante entre diferentes experimentos. Em geral, estas estruturas eram observadas em menos de 10% dos macrófagos que haviam feito

fagocitose, e a frequência foi maior no tempo de 12 h de infecção. Em contraste com os experimentos de viabilidade de *C. neoformans*, o acúmulo de LC3 no fagossomo contendo *C. neoformans* só foi observado quando o fungo foi opsonizado com anticorpos (Figura 46, painel C). Macrófagos peritoneais foram também usados em experimentos de imunofluorescência para detecção de LC3. Como observado com células J774, o marcador pode ser detectado em fagossomos contendo *C. neoformans* (Figura 46, painel C).

Para entender como se forma o vacúolo LC3-positivo ao redor de *C. neoformans*, foram feitos experimentos de microscopia confocal com células J774 vivas transfectadas com um plasmídeo que leva à expressão de LC3 fusionada à proteína verde fluorescente EGFP [141]. Filmes feitos com estas células infectadas com *C. neoformans* mostram que o vacúolo contendo *C. neoformans* adquire LC3 por fusão sequencial com pequenos autofagossomos (Figura 47). Como em alguns destes experimentos foi incluído o marcador de endossomos 10 kDa Dextran-Texas Red, foi possível observar que o fagossomo contendo *C. neoformans* já era havia se fundido com lisossomos antes da fusão com autofagossomos. Além disso, o marcador endossomal também sugeriu que estes autofagossomos que se fundiram ainda não haviam se maturado e transformado em autofagolisossomos.

Para observar se o vacúolo contendo *C. neoformans* apresentava outras características de autofagossomos, células J774 infectadas com o fungo foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão. Em nenhuma das células observadas foram encontradas membranas duplas ao redor de *C. neoformans*, características de autofagossomos. Entretanto, foram observadas pequenas vesículas com características de autofagia próximas a ou se fundindo com o vacúolo contendo *C. neoformans* (Figura 48).

Durante os experimentos de imunofluorescência contra LC3, foram observadas células de *C. neoformans* que não estavam associadas a nenhum macrófago, mas que ainda

assim estavam recobertas com LC3 (Figura 49, painel A). Para confirmar este resultado, macrófagos foram infectados com *C. neoformans* opsonizado com anticorpo e lavados após duas horas de infecção para remover a maior parte das leveduras não-fagocitadas. Após 24 h, o sobrenadante contendo células de *C. neoformans* exocitadas foi coletado e processado para imunofluorescência contra LC3. Mais uma vez, foram observadas leveduras sem nenhuma associação com macrófagos marcadas com uma camada de LC3 na superfície da cápsula (Figura 49, painel B). Um controle onde o anticorpo contra LC3 foi omitido não mostrou marcação, indicando que o anticorpo secundário não estava ligando inespecificamente nem reconhecendo o 18B7 usado como opsonina. Além disso, experimentos de western blot demonstraram que o anticorpo não reconhece LC3 do fungo (dados não-mostrados).

Este resultado se assemelha a observações feitas com partículas virais de poliovírus, que saem da célula hospedeira envoltas em uma membrana LC3-positiva de forma não-lítica [142]. Devido à semelhança entre esta estratégia de exocitose viral e a exocitose não-lítica de *C. neoformans*, esta observação levou à hipótese de que a autofagia estaria envolvida na exocitose não-lítica. Para testar isso, foi utilizada a metodologia citométrica de quantificação da exocitose não-lítica descrita no capítulo anterior com as células J774 transduzidas com shRNA contra ATG5. Como mostrado na Tabela 14, células transduzidas com dois shRNAs tiveram menores taxas de exocitose não-lítica.

Além de fagocitarem o fungo e restringirem seu crescimento, macrófagos também auxiliam na resposta imune contra *C. neoformans* liberando mediadores inflamatórios solúveis. Para testar se este aspecto da resposta imune também tem a participação da autofagia, vinte e duas citocinas e quimiocinas foram dosadas no sobrenadante das células J774 transfectadas com os shRNAs contra ATG5 (Tabela 15). Em comparação com as células controle (C-), as transfectadas com shRNA contra ATG5 secretaram mais G-CSF, IFN- γ , MCP-1 e RANTES e menos IP-10. As diferenças foram ainda maiores quando as células

foram infectadas com *C. neoformans*. O clone 30, com ~50% dos níveis de ATG5 do controle, secretou menos G-CSF, IFN- γ e IP-10 e mais IL-6, enquanto o clone 31, com a maior eficiência de interferência contra ATG5, secretou menos IP-10 e mais G-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α , MCP1, RANTES e IL-12 (p70).

Todos os experimentos anteriores foram feitos com macrófagos *in vitro*. Para avaliar um modelo mais próximo da criptococose, foram utilizados camundongos transgênicos com nocaute condicional de ATG5 em macrófagos [99]. Vários experimentos de infecção foram feitos usando diferentes rotas (intraperitoneal ou intratraqueal), diferentes inóculos (2.5×10^4 a 10^7 células de *C. neoformans* por camundongo) e camundongos de diferentes idades e sexos. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa de sobrevivência entre os camundongos controle e os com nocaute condicional de ATG5, nem mesmo com todos os experimentos combinados por regressão de riscos proporcionais de Cox (Figura 50).

Para entender por que não houve diferença de sobrevivência, uma série de experimentos foi feito com camundongos infectados por via intratraqueal com 10^5 células de *C. neoformans*, uma condição em que os animais começam a morrer por volta do dia 15 pós-infecção. A carga fúngica nos pulmões e cérebro foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônia nos dias 3, 7 e 14. Nos três períodos, a carga fúngica pulmonar foi menor nos camundongos nocaute, com a diferença sendo estatisticamente significativa somente no dia 14. A carga fúngica cerebral teve um padrão oposto, maior nos camundongos nocaute; entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 51). No dia 14, o lisado de pulmões foi também usado para quantificar citocinas. Em comparação com os controles, os camundongos nocaute tinham menores concentrações de IL-4, IL-13, MIP1- α e IP-10 (Tabela 16).

Finalmente, foi feita análise histopatológica dos camundongos infectados. Várias diferenças foram observadas nos pulmões dos camundongos nocaute em comparação com os controles (Figura 52). No dia 3, havia uma intensa infiltração piogranulomatosa nos controles; nos animais nocaute, a inflamação piogranulomatosa era menos intensa, com uma leve infiltração de macrófagos ao invés de neutrófilos. No dia 7, os controles já apresentavam uma pneumonia piogranulomatosa moderada a intensa, enquanto nos nocautes a pneumonia era menos intensa. No dia 14, a inflamação nos dois grupos mudou para um padrão granulomatoso, com menor infiltração de neutrófilos. Foi observada também uma importante diferença na área dos pulmões afetada pela doença: os controles tinham 15-60% de seu espaço alveolar tomado por células inflamatórias, enquanto no grupo nocaute um camundongo tinha 80% mas todos os outros tinham somente 10-15%. A mediana de área saudável remanescente nos pulmões foi de somente 15% nos controles, enquanto nos nocautes esse número foi de 50%. Houve também diferenças na infiltração linfocítica perivascular, moderada nos controles e mínima nos nocautes.

Juntos, os resultados dos experimentos com animais sugerem que o nocaute da autofagia em macrófagos possa alterar o balanço Th1 x Th2. Para testar esta hipótese, seções de pulmão dos camundongos infectados dos dias 3 e 14 foram usadas em um experimento de imunohistoquímica com anticorpo contra Ym-1, uma proteína da família das quitinases que é produzida por macrófagos ativados por citocinas Th2 [143]. No dia 3, eram visíveis vários focos de células positivas para Ym-1 nos pulmões dos camundongos controle, enquanto no grupo nocaute estes focos eram bastante raros (Figura 53). No dia 14 não havia mais diferença entre os grupos, com intensa marcação pelo anticorpo em todos os pulmões.

Discussão

A interação entre *C. neoformans* e macrófagos levou a classificação do fungo como um parasita intracelular facultativo, juntando-o a um grupo ao qual pertencem outros

microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Histoplasma capsulatum* e *Mycobacterium tuberculosis* [144]. Contudo, há uma diferença importante entre *C. neoformans* e estes outros parasitas facultativos de macrófagos. Todos estes microorganismos possuem estratégias para sobrepujar a ação do fagolisossomo maduro. Após a fagocitose, *L. monocytogenes* escapa do fagossomo para o citoplasma da célula hospedeira [145]. *H. capsulatum*, por sua vez, inibe a acidificação do fagolisossomo [146]. Já as células de *M. tuberculosis* possuem uma gama de efetores que inibem a maturação do fagossomo e sua fusão com lisossomos [147, 148]. Estudos com alguns desses agentes demonstraram que se esses mecanismos de evasão são reprimidos e o patógeno exposto ao ambiente do fagolisossomo maduro, a infecção é controlada [74, 145]. Como exposto acima, *C. neoformans* não inibe nenhum desses passos, mas sobrevive a todas as atividades antimicrobianas normalmente associadas aos macrófagos. Esse contraste se torna paradoxal ao se considerar que algumas das doenças causadas por parasitas intracelulares facultativos, como a tuberculose, acometem frequentemente indivíduos imunocompetentes, enquanto a criptococose depende essencialmente de uma supressão profunda da imunidade celular. Esta observação leva a conclusão de que existem outros mecanismos antifúngicos usados por macrófagos ativados para controlar a infecção por *C. neoformans* que ainda não foram descobertos. Este capítulo sugere que a autofagia seja um desses mecanismos.

Os experimentos iniciais para este trabalho, feitos *in vitro* com células J774 e *C. neoformans* opsonizado com o anticorpo 18B7, mostraram que a falta de autofagia diminuiu a atividade antifúngica do macrófago. Uma série de experimentos foi feita em condições diferentes para definir melhor os fatores envolvidos. Foram feitas curvas com coleta do fungo em diferentes tempos desde 30 min até 24 h após a infecção, que indicaram que a autofagia é importante na atividade fungistática, e não fungicida, dos macrófagos. Outra variação testada foi a opsonização do fungo com complemento ao invés de anticorpo. Neste caso a diferença

na atividade fungistática entre as células sem autofagia e o controle foi ainda maior, o que sugere que a via utilizada para fagocitose altera o papel da autofagia. Também foram feitos testes com a adição de IFN- γ e LPS para ativar as células J774. Estudos anteriores com *M. tuberculosis* mostraram que a ativação de macrófagos infectados induz autofagia e aumenta a atividade contra o patógeno [74]. Entretanto, a presença destas substâncias fez com que as células J774 perdessem completamente a capacidade de restringir o crescimento de *C. neoformans*, impossibilitando a interpretação do experimento.

Experimentos de citolocalização de LC3 também foram feitos em condições diferentes. Variando o tempo de infecção, foram observadas células de *C. neoformans* envoltas por LC3 desde 30 min até 24 h; entretanto, estes eventos eram raros em tempos mais curtos e pareciam atingir um pico de frequência por volta de 12 h após a infecção. Como a fusão com lisossomos e acidificação do fagossomo ocorre rapidamente após a fagocitose [37, 75], pode-se concluir que a fusão com autofagossomos ocorre principalmente após a maturação do fagolisossomo. Em intrigante contraste com os resultados dos experimentos de viabilidade de *C. neoformans*, quando as células fúngicas foram opsonizadas com complemento não foi possível observar nenhuma delas envolta por LC3, o que sugere uma complexa relação entre a via utilizada para fagocitose e o papel da autofagia. Por fim, foram também observados *C. neoformans* em fagossomos LC3-positivos em macrófagos primários, demonstrando que o resultado não é um mero artefato de uma linhagem celular.

Para entender o mecanismo de formação do fagossomo LC3-positivo, foram feitos experimentos de microscopia confocal e eletrônica de transmissão. Estes experimentos demonstraram que LC3 é adquirido pela fusão com pequenos autofagossomos. Um estudo feito com autofagossomos purificados mostrou que eles têm atividade contra *M. tuberculosis* por conterem proteínas ubiquitinadas, que quando digeridas por proteases lisossomais, geram peptídeos antimicrobianos derivados de ubiquitina [149]. Portanto, é possível que os

autofagossomos que se fundem com o fagossomo contendo *C. neoformans* carreguem proteínas que, quando digeridas por proteases gerem peptídeos antifúngicos.

Outra possível função da autofagia revelada pelos experimentos foi na exocitose não-lítica, o que pode ter precedentes em outros tipos de secreção não-convencional. Autofagossomos são seqüestrados por poliovírus para montar sua maquinaria de montagem de vírions, levando a acumulação de partículas virais prontas dentro de autofagossomos com membranas duplas. A membrana externa destas organelas em seguida se funde à membrana citoplasmática, liberando uma vesícula LC3-positiva de membrana simples contendo vírions sem que a célula hospedeira se rompa [142, 150]. Além disso, a autofagia também é necessária para a secreção não-lítica da proteína de ligação a acil-CoA (Acb) em várias células eucarióticas como *Saccharomyces cerevisiae* [151], *Pichia pastoris* [152], *Dictyostelium discoideum* [153] e astrócitos primários de camundongo [154]. Por fim, quando o receptor purinérgico P2X7R é ativado por ATP em células microgliais de camundongo, autofagolisossomos e fagolisossomos LC3-positivos que contém bactérias se fundem com a membrana citoplasmática e liberam seus conteúdos [155]. Estes mecanismos de secreção dependentes de autofagia se assemelham à exocitose não-lítica de *C. neoformans* e podem dar importantes sugestões de como ela ocorre.

Além da importância na atividade fungistática, a autofagia parece também participar da regulação da secreção de citocinas e quimiocinas pelo macrófago. Na presença de shRNA contra ATG5, células J774 não-infectadas secretam maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias; ao serem infectadas com *C. neoformans*, a quantidade de citocinas secretada é ainda maior. Vários destes mediadores são importantes para a imunidade contra *C. neoformans*, como IFN- γ [156], IL-6 [41], TNF- α [43] e MCP1 [44]. Este resultado pode refletir uma reação compensatória do macrófago à falta de uma ferramenta no controle dos fungos fagocitados, uma tentativa de controlar o crescimento de *C. neoformans* mesmo sem

poder contar com a autofagia. Alternativamente, este resultado pode ter ocorrido caso a autofagia seja responsável pela inibição de vias que induzam aumento na secreção de citocinas.

Os efeitos antagônicos observados nos experimentos *in vitro*, com a diminuição da atividade fungistática por um lado e um aumento de citocinas pró-inflamatórias do outro pode explicar os resultados dos experimentos com camundongos, nos quais o nocaute condicional de ATG5 em macrófagos não resultou em diferenças de sobrevivência. De fato, as evidências geradas pelos estudos de carga fúngica, citocinas pulmonares e histopatologia sugerem que os camundongos com e sem autofagia têm criptococose com fisiopatologias diferentes. Enquanto os camundongos controle apresentam pneumonia intensa com grande infiltração de neutrófilos e rápida polarização Th2, os camundongos nocaute apresentam pneumonia menos intensa e com polarização Th2 mais tardia.

Em conjunto, estes resultados mostram um quadro em que a autofagia dos macrófagos desempenha papéis importantes em vários passos da imunidade contra *C. neoformans*. Como a autofagia também está envolvida em muitos outros processos patológicos como câncer e doenças autoimunes [68], há um grande interesse em desenvolver terapias que modulem este processo. Os resultados deste trabalho, portanto, podem ter importantes consequências na terapia da criptococose.

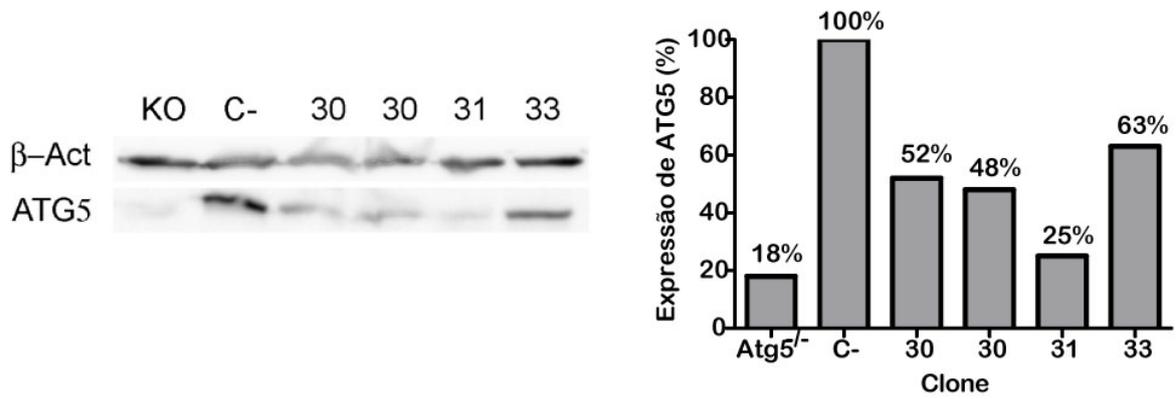


Figura 44 – RNAi contra ATG5

Células J774 foram transfectadas com 5 diferentes sequências de shRNA contra ATG5. A proteína ATG5 é essencial para a formação de autofagossomos e em sua ausência células eucarióticas são deficientes em autofagia [139]. As células transfectadas foram clonadas por diluição limitante e os clones com melhor eficiência de interferência selecionados por western blot com anticorpos contra ATG5 e β -actina. O painel à direita mostra a quantificação densitométrica dos western blots.

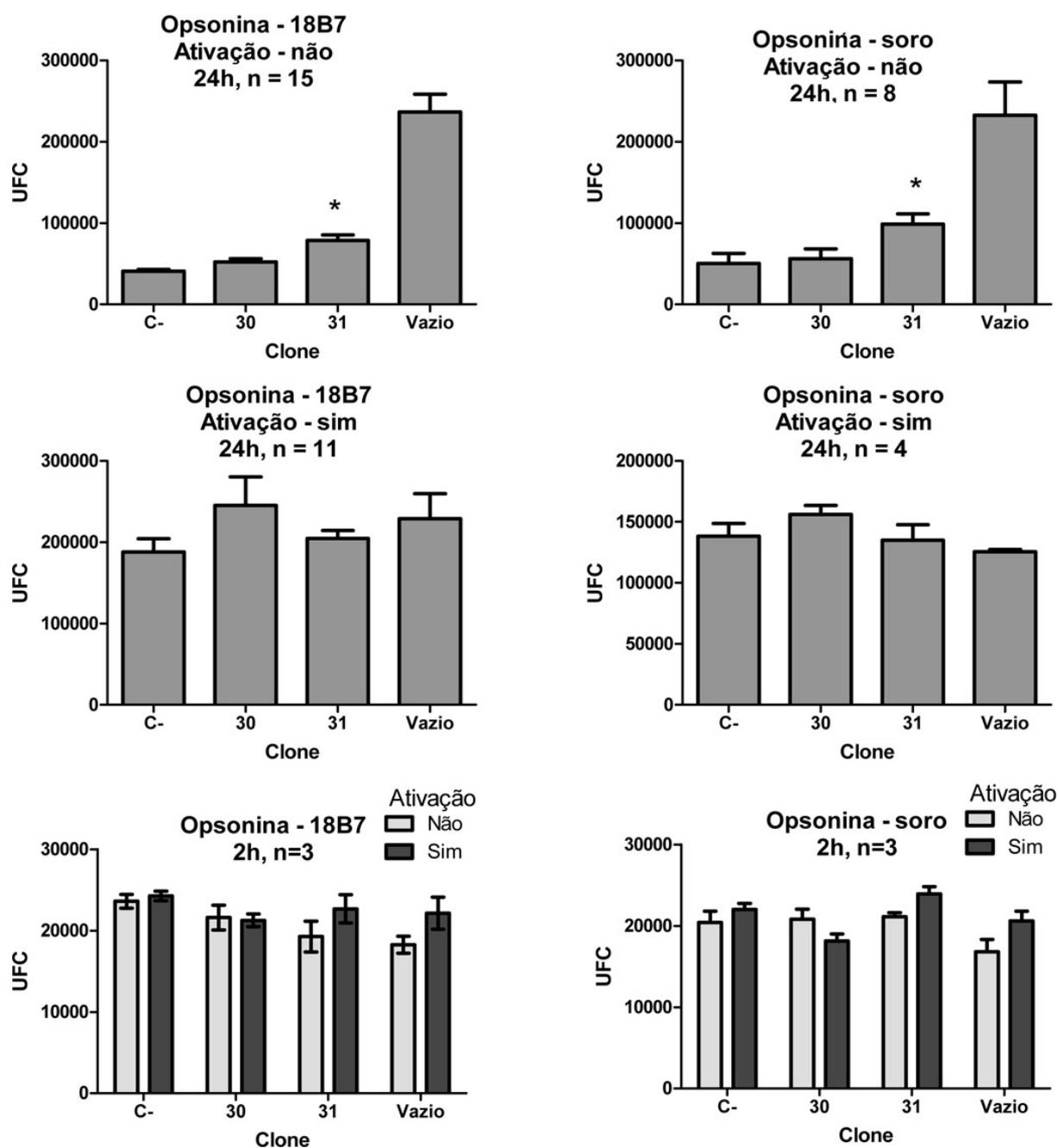


Figura 45 – Ensaio de viabilidade de *C. neoformans* em células J774 com shRNA contra ATG5

Células J774 transduzidas com shRNA contra ATG5 foram infectadas com *C. neoformans* e o número de células viáveis determinado por contagem de unidades formadoras de colônia. Como controles, foram usadas células J774 transduzidas com shRNA sem nenhum alvo (“C-”) e também poços sem nenhum macrófago (“Vazio”). O experimento foi repetido múltiplas vezes em condições diferentes de tempo de incubação, opsonina e ativação, detalhadas acima dos gráficos. As barras representam a média e o erro padrão da medida. Os valores de *p* foram calculados por ANOVA.

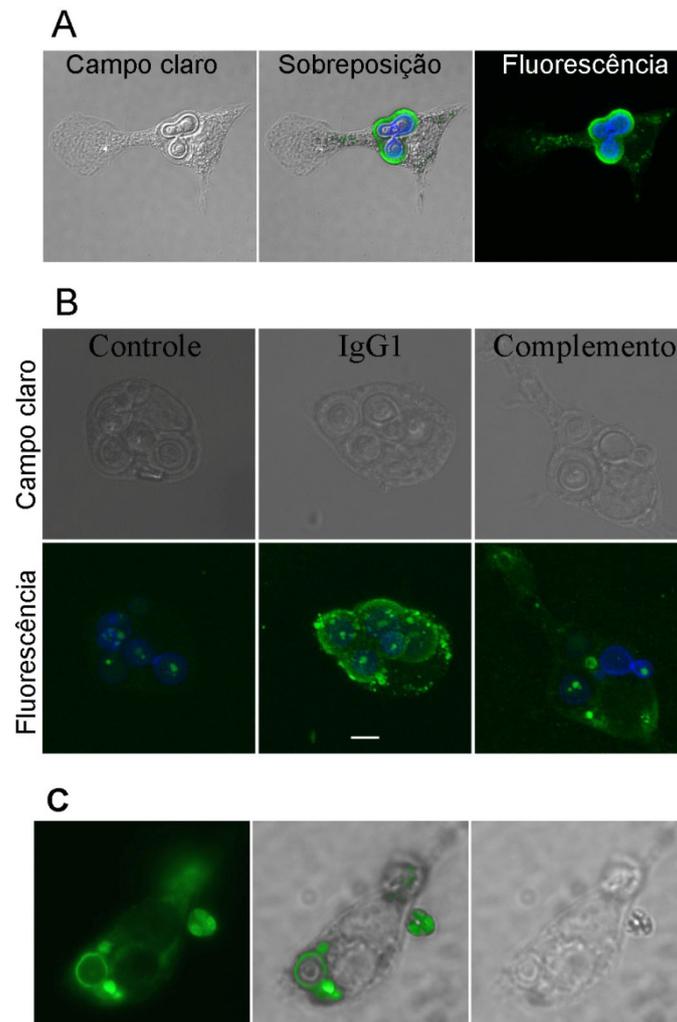


Figura 46 – Detecção de LC3 por imunofluorescência

(A) Células J774 foram incubadas com *C. neoformans* opsonizado com 18B7 por 12 h, fixadas, permeabilizadas e coradas com Uvitex 2B (parede celular, azul) e anticorpo contra LC3 (verde). (B) Comparação entre células opsonizadas com 18B7 e soro de camundongo fresco, fonte de complemento. Os fagócitos são células J774. (C) Imunofluorescência com macrófagos peritoneais. As imagens em A e B são reconstruções tridimensionais de microscopia confocal e em C são de epifluorescência.

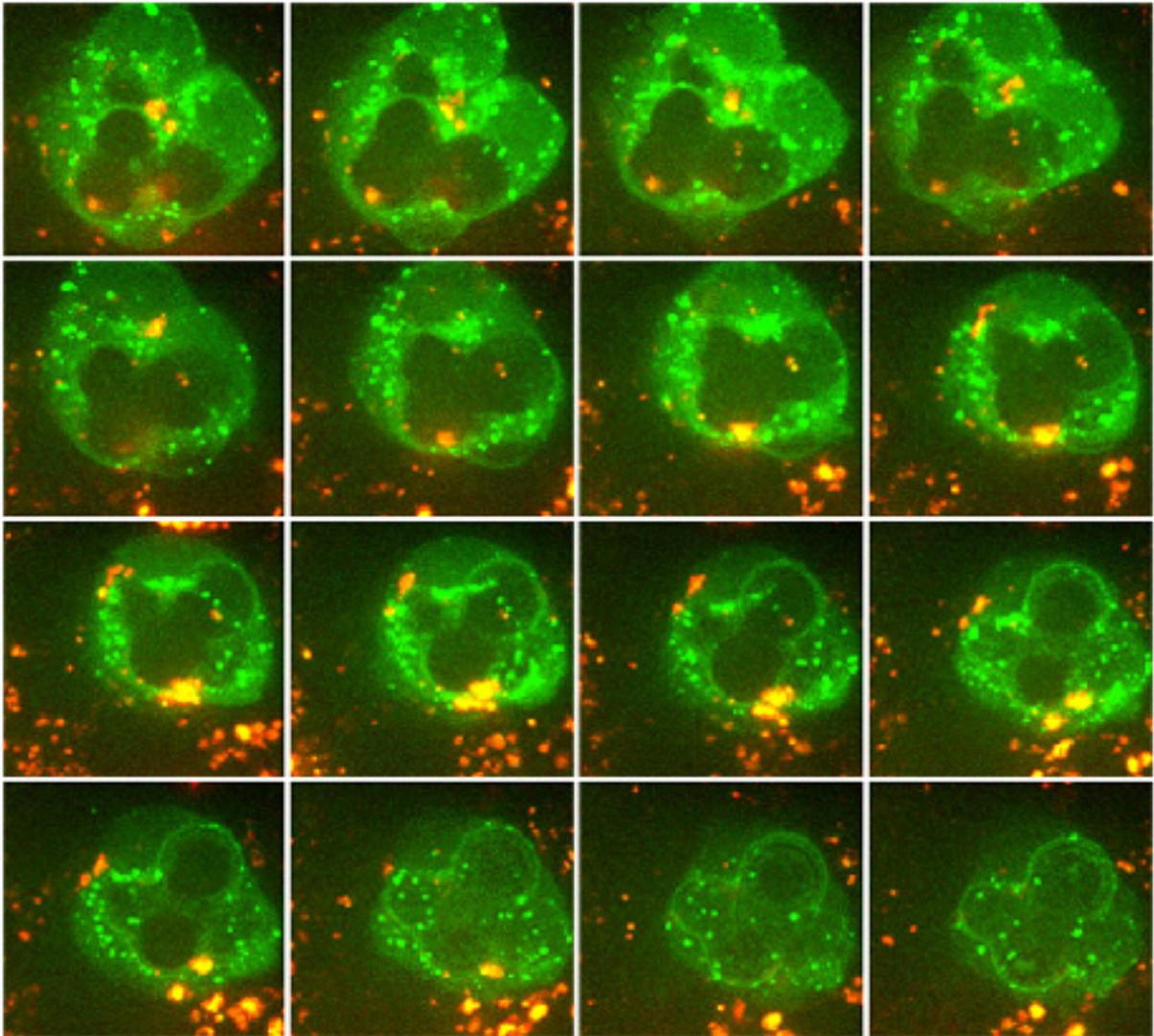


Figura 47 – Formação do autofagossomo

Células J774 transfectadas com pEGFP-LC3 (verde) foram coradas com o marcador endossomal 10 kDa Dextran-Texas Red (vermelho) e infectadas com *C. neoformans* corados com DDAO-SE (azul, apagado). No primeiro quadro, várias células de *C. neoformans* são visíveis em um grande fagossomo no centro do macrófago que já contém 10 kDa Dextran-Texas Red. Os quadros correspondem a imagens da mesma célula ao longo de um período de várias horas.

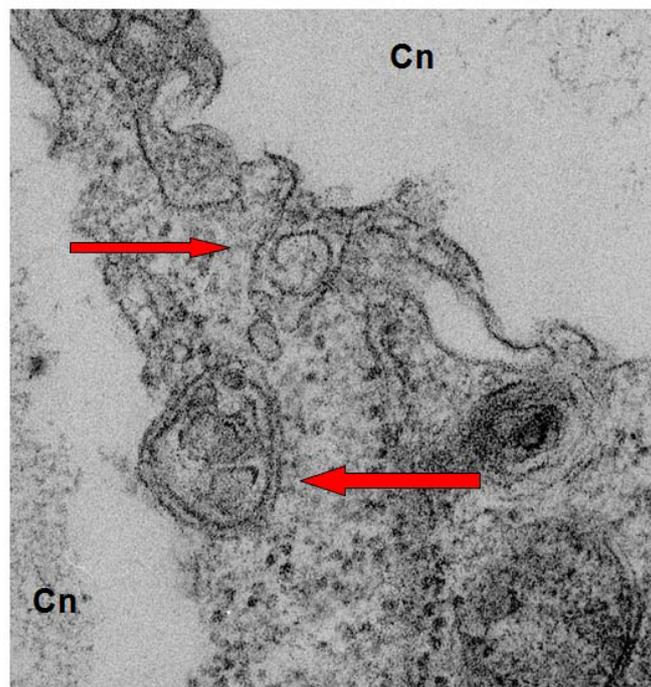
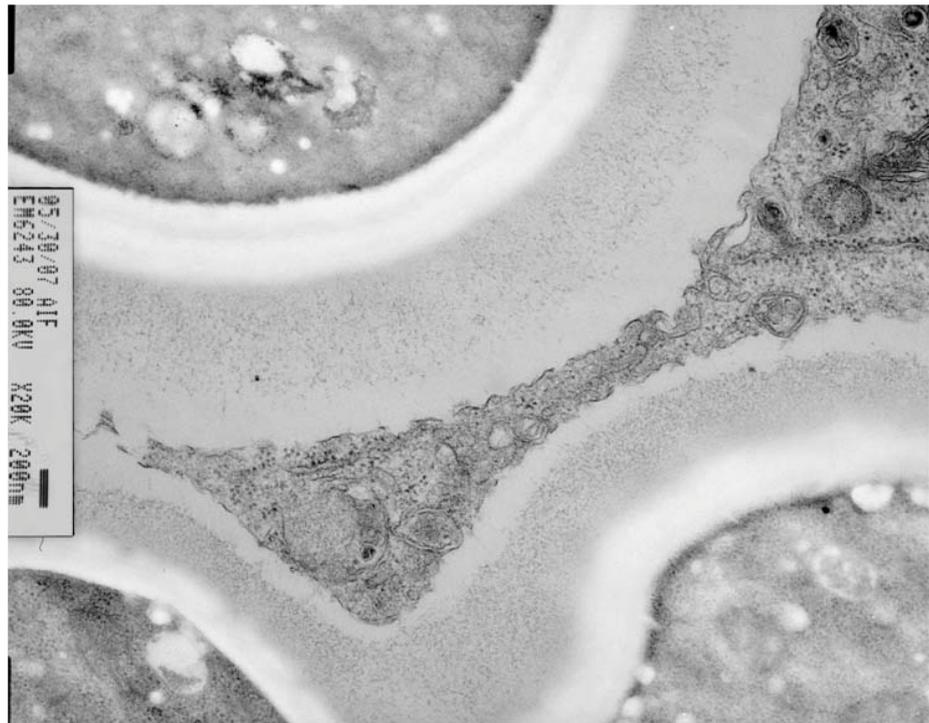


Figura 48 – Microscopia eletrônica de transmissão

Células J774 foram infectadas com *C. neoformans* opsonizado com anticorpo durante 12 h e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. O quadro acima mostra uma visão em aumento médio do citoplasma da célula J774 contendo três células de *C. neoformans*. O quadro abaixo mostra um maior aumento, que permite observar a membrana simples do fagossomo. São também visíveis duas vesículas com membrana dupla (característica de autofagossomos) próximo a ou se fundindo com o fagossomo (setas).

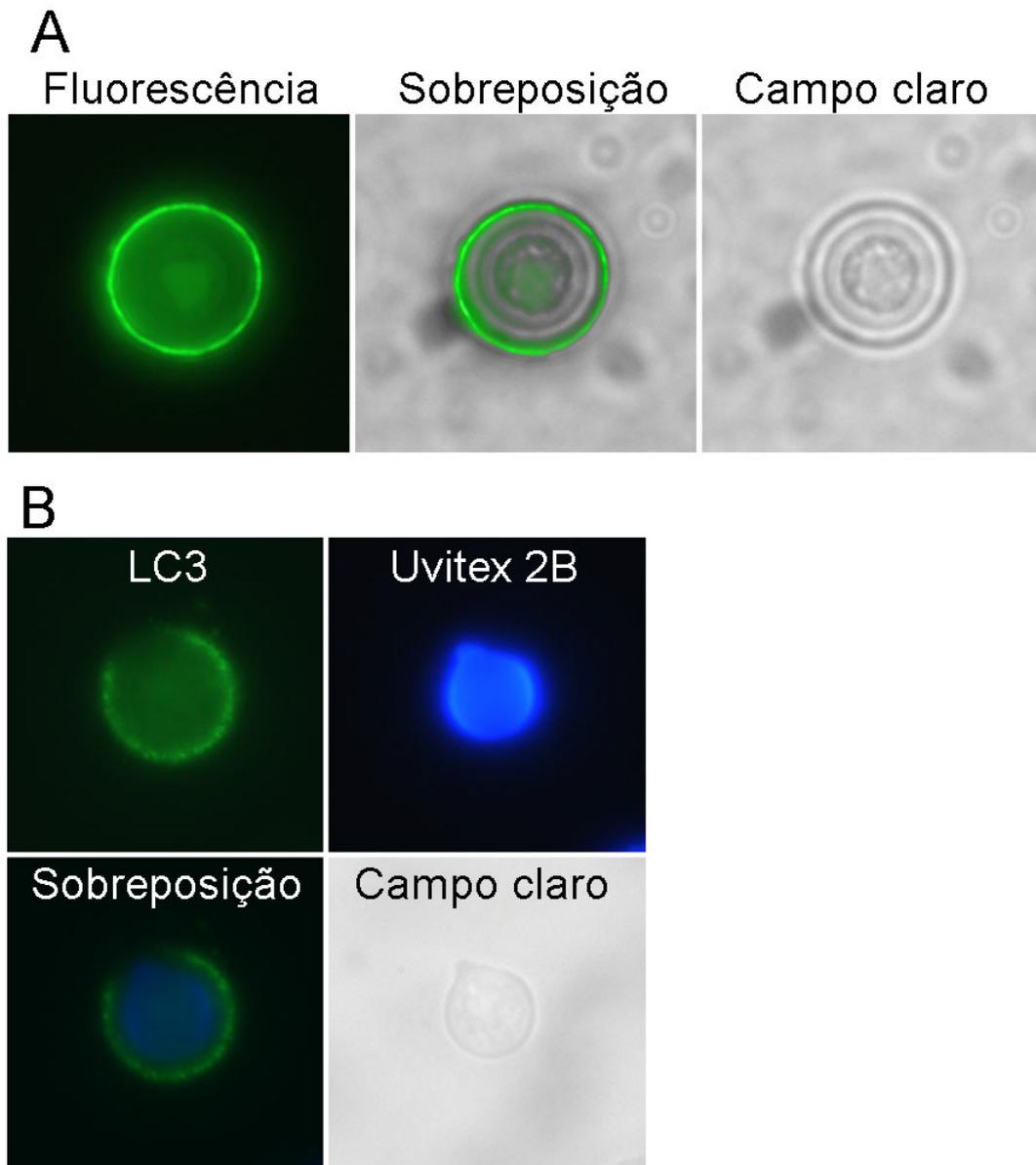


Figura 49 – Autofagia na excitose não-lítica

(A) Célula de *C. neoformans* não associada a macrófago, mas recoberta por LC3, observada ocasionalmente em experimento de imunofluorescência. (B) Células de *C. neoformans* que passaram por excitose não-lítica foram coletadas e coradas com anticorpo contra LC3 (verde) e Uvitex 2B (azul).

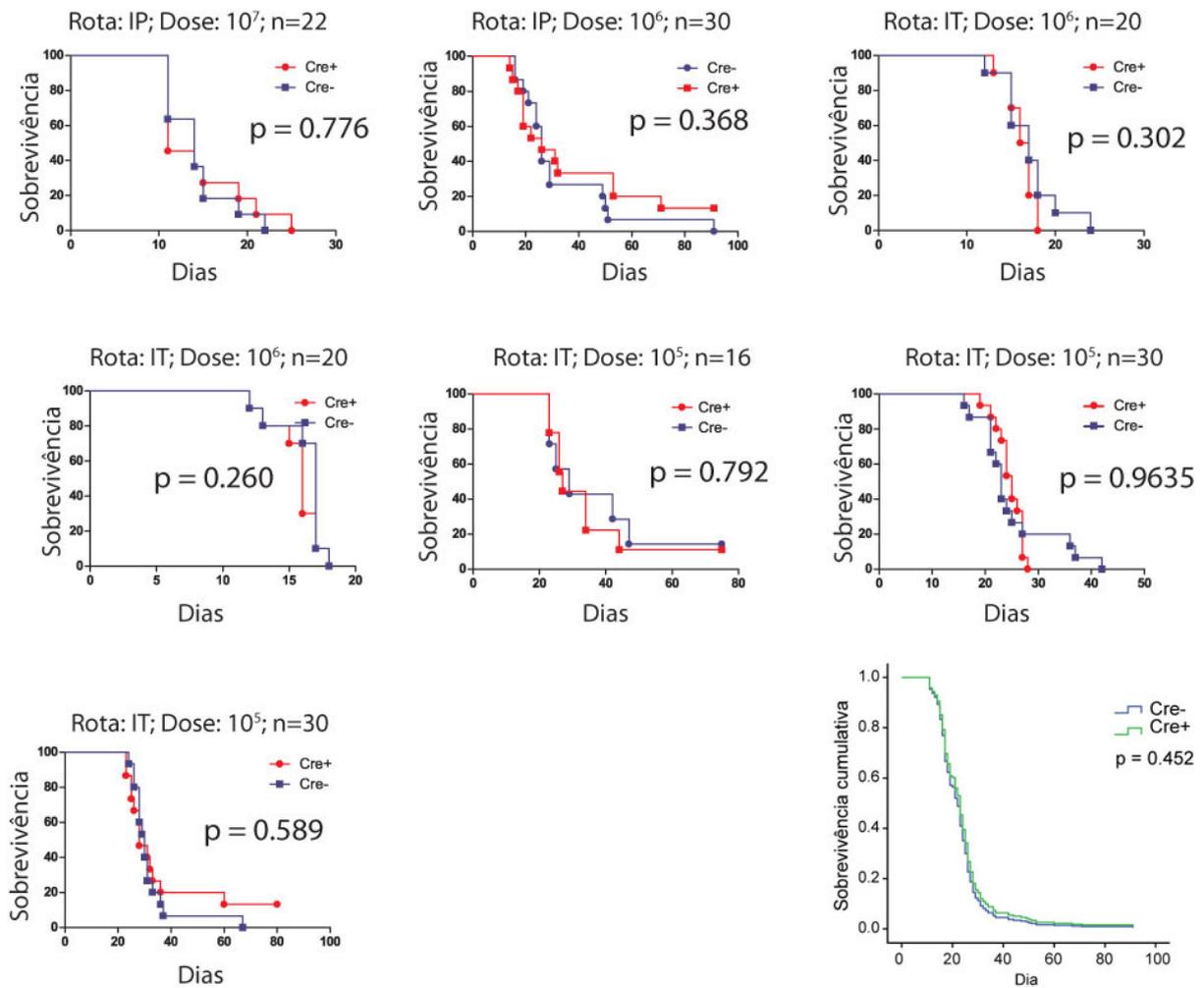


Figura 50 – Curvas de sobrevivência de camundongos ATG5^{fllox}

Camundongos com nocaute condicional de autofagia (Cre+) e controles (Cre-) foram infectados em sete experimentos com *C. neoformans* em diferentes doses e rotas. O gráfico abaixo e à direita mostra uma regressão de riscos proporcionais de Cox, que combina o resultados dos 7 experimentos individuais com um total de 84 camundongos por grupo.

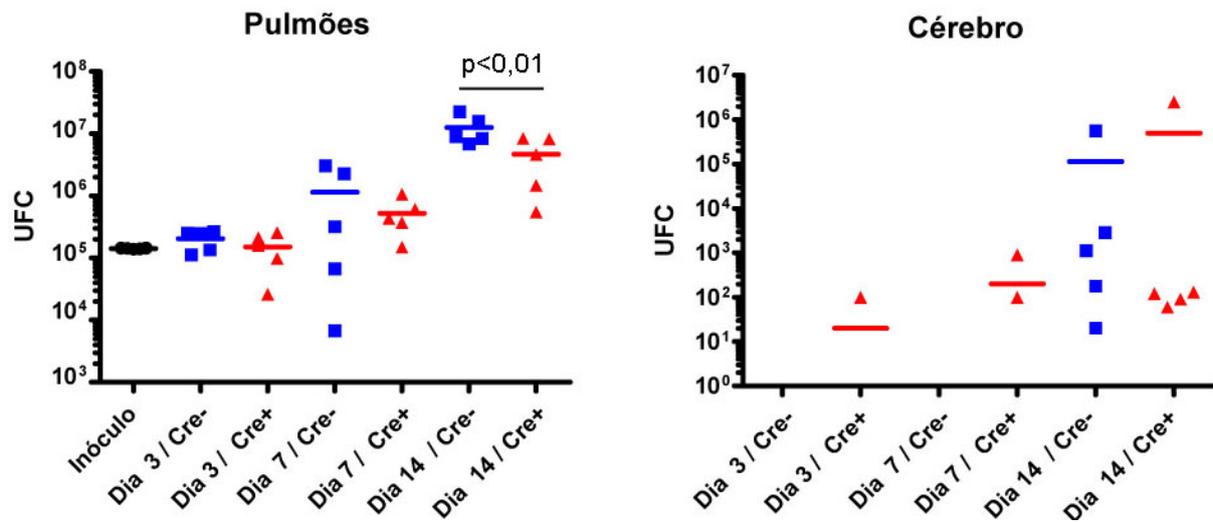


Figura 51 – Carga fúngica pulmonar e cerebral

Camundongos ATG5^{fl} foram infectados por via intratraqueal com 10⁵ células de *C. neoformans*. Em três tempos após a infecção (3, 7 e 14 dias) os pulmões e cérebros foram coletados, homogenizados e plaqueados para contagem de unidades formadoras de colônias. A análise estatística foi feita por ANOVA.

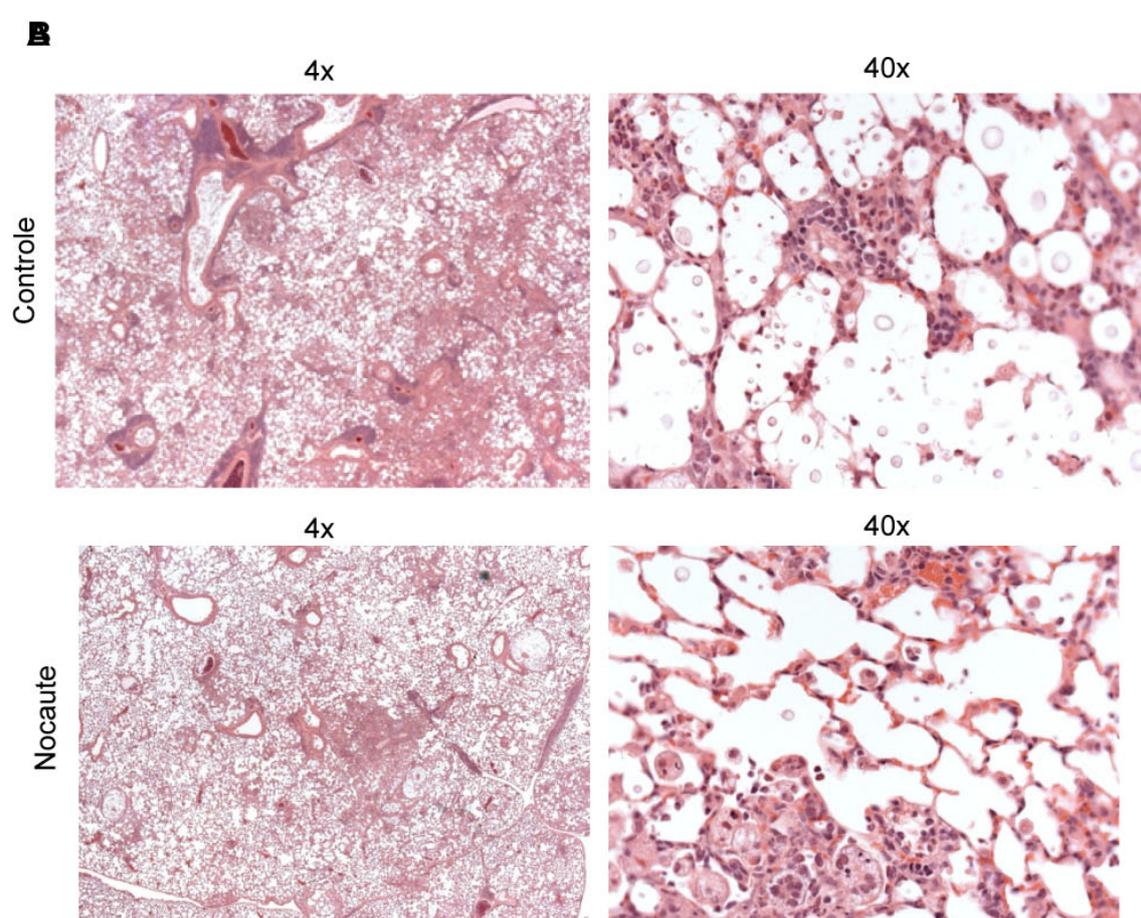
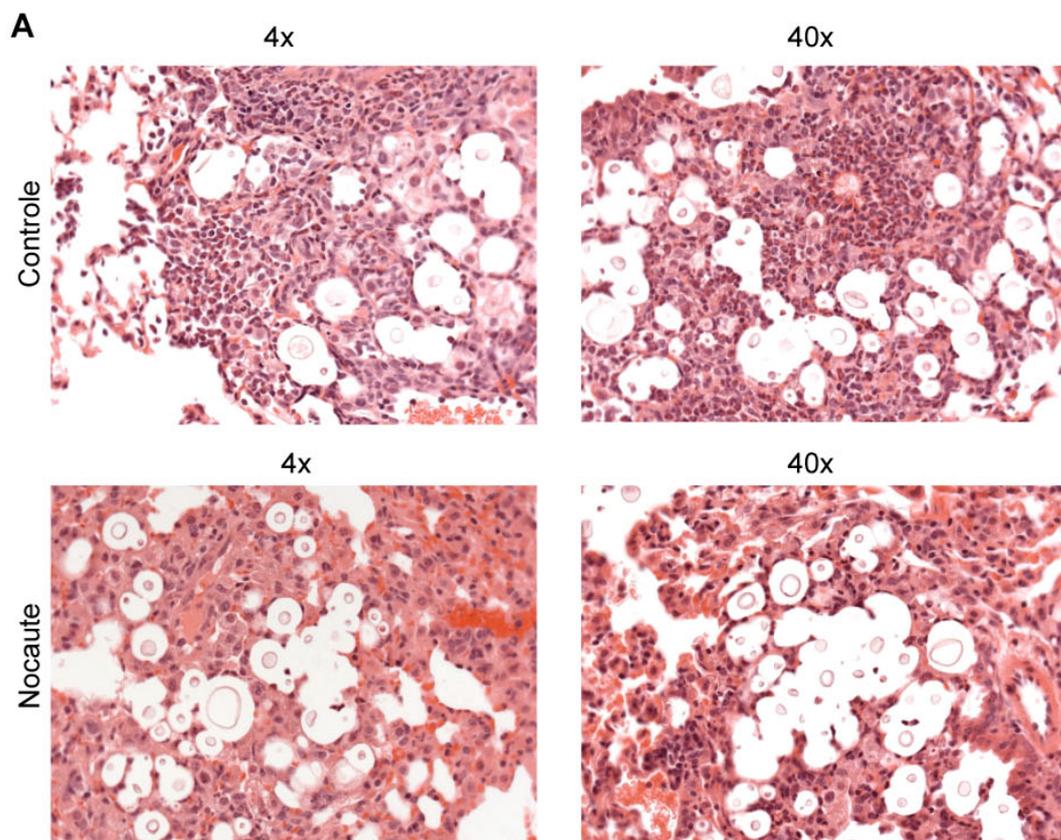


Figura 52 – Histopatologia dos pulmões de camundongos ATG5flox infectados

Coloração de hematoxilina e eosina dos pulmões após a infecção. (A) Dia 7 após a infecção. Nota-se menor infiltrado neutrofilico nos camundongos nocaute. (B) Dia 14 após a infecção. Nota-se que o camundongo nocaute apresenta menor área alveolar ocupada por células inflamatórias e de *C. neoformans* e menor infiltrado linfocítico perivascular.

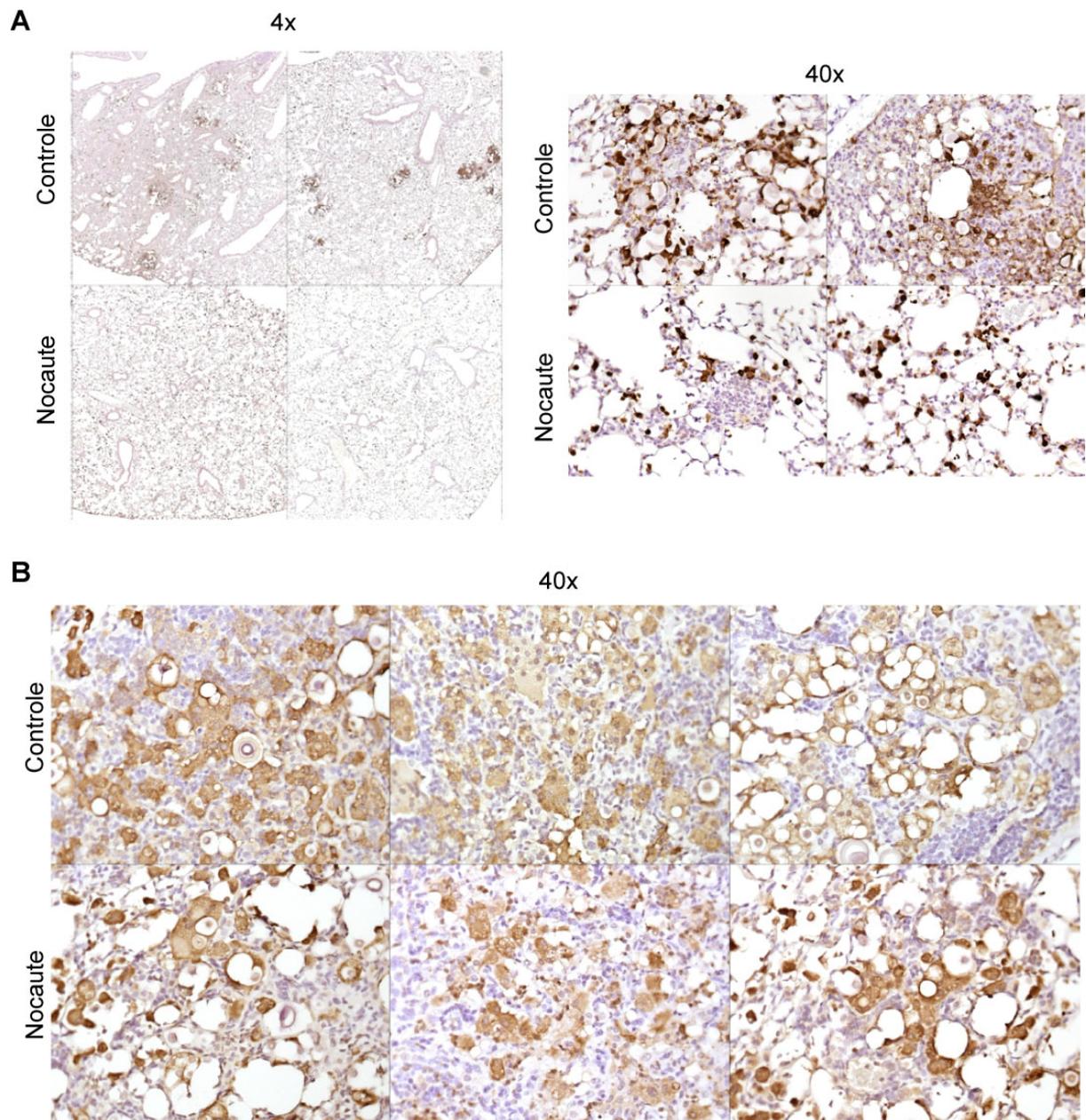


Figura 53 – Imunohistoquímica para Ym-1

Imunohistoquímica com anticorpo contra o marcador de macrófagos alternativamente ativados Ym-1 [143] em pulmões de camundongos ATG5flo^x. (A) 3 dias após a infecção. Nota-se menor número de focos Ym-1-positivos nos camundongos nocaute. (B) 14 dias após a infecção. Camundongos nos dois grupos tem grande quantidade de macrófagos Ym-1-positivos.

Tabela 14 – Exocitose não-lítica em células com shRNA contra ATG5

Clone 31 (n = 3)

	Total	Exocitose	Porcentagem	p *
31	86,116	41,445	48%	<0.0001
C-	102,459	61,123	60%	-

Clone 30 (n = 2)

	Total	Exocitose	Porcentagem	p *
30	80,568	49,671	62%	<0.0001
C-	54,582	37,581	69%	-

*Valor de p calculado pelo teste exato de Fisher com correção de Yates.

Tabela 15 – Dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas J774 infectadas

Citocina	Infecção	C-	30	31	Two-way ANOVA
G-CSF	Não	308.4	116.2	2566.5 *	< 0.0001
	Sim	5598.8	3312.4 *	10000.0 *	
GM-CSF	Não	52.1	31.2	47.2	0.0263
	Sim	75.0	49.9	93.6	
IL-2	Não	ND	ND	3.3	0.2997
	Sim	4.1	4.4	5.6	
IFN- γ	Não	34.2	16.4	127.9 *	< 0.0001
	Sim	210.3	159.5 *	404.5 *	
IL-1 α	Não	5.6	4.5	8.7	0.0047
	Sim	9.5	10.6	20.6 *	
IL-1 β	Não	ND	ND	ND	-
	Sim	ND	ND	ND	
IL-4	Não	ND	ND	ND	-
	Sim	ND	ND	ND	
IL-5	Não	ND	ND	ND	-
	Sim	ND	ND	ND	
IL-6	Não	7.6	12.6	28.1	0.0001
	Sim	31.3	66.4 *	78.8 *	
IL-7	Não	ND	ND	ND	-
	Sim	ND	ND	ND	
IL-10	Não	5.9	4.2	9.7	0.0012
	Sim	9.1	12.4	21.7 *	
IL-13	Não	16.1	8.5	25.3	< 0.0001
	Sim	40.0	30.1	72.4 *	
IL-15	Não	7.9	7.3	6.0	0.7603
	Sim	13.9	12.1	16.1	
IL-17	Não	ND	ND	ND	-
	Sim	ND	ND	ND	
TNF- α	Não	28.6	19.4	148.5	< 0.0001
	Sim	135.3	86.0	881.6 *	
MIP1- α	Não	>10000	>10000	6065.1	-
	Sim	>10000	>10000	>10000	
MCP-1	Não	94.3	24.1	4327.0 *	< 0.0001
	Sim	171.6	60.6	4260.0 *	
KC	Não	ND	ND	ND	0.3124
	Sim	4.4	3.5	5.1	
RANTES	Não	11.0	6.7	32.5 *	< 0.0001
	Sim	20.3	16.1	54.1 *	
IP-10	Não	15.9	9.0 *	5.9 *	< 0.0001
	Sim	20.4	14.8 *	14.2 *	

Cytocina	Infectado	C-	30	31	Two-way ANOVA
IL-9	Não	51.4	ND	57.4	0.2596
	Sim	51.3	60.6	113.2	
IL-12 (p70)	Não	8.1	ND	6.7	0.0088
	Sim	13.0	11.5	19.2 *	

Tabela 16 – Dosagem de citocinas nos pulmões de camundongos infectados

Citocina	Cre-	Cre+
G-CSF	38.48	13.68
GM-CSF	ND	ND
IL-2	20.88	18.08
IFN- γ	152.1	111.24
IL-1 α	97.92	102.68
IL-1 β	7.8	7.9
IL-4	102.02	4.42 *
IL-5	25.62	3.44
IL-6	64.2	50.96
IL-7	ND	ND
IL-10	19.96	9.52
IL-13	175.14	65.52 *
IL-15	ND	ND
IL-17	9.78	6.58
TNF- α	6.02	3.52
MIP1- α	70.16	18.54 *
MCP-1	28.14	8.78
KC	31.2	50
RANTES	19.24	16
IP-10	211.48	110.92 *
IL-9	ND	ND
IL-12(p70)	10.36	7.94

VII – Considerações finais

Os trabalhos descritos neste projeto lidam com diferentes aspectos da interação entre *C. neoformans* e macrófagos do hospedeiro. Os estudos feitos com vesículas extracelulares permitiram pela primeira vez observá-las em associação com a cápsula de *C. neoformans*. Além dessa observação, o uso de sondas fluorescentes criou ferramentas que permitiram obter informações impossíveis pelos métodos usados anteriormente, como a contagem do número absoluto de vesículas. Também lidando principalmente com o patógeno, o estudo sobre os efeitos metabólicos dos anticorpos contra a cápsula revela uma nova forma de ação antimicrobiana dos anticorpos. Como o anticorpo 18B7 está em estudo clínico para uso humano, a elucidação do mecanismo de sua sinergia com anfotericina B pode ter importantes implicações terapêuticas.

O outro estudo com anticorpos contra a cápsula revelou um novo tipo de receptor de superfície para IgG3 de camundongo. Como Itgb1 é estruturalmente diferente de todos os outros receptores de Fc conhecidos, este estudo tem aplicações não só na criptococose, mas também na evolução dos receptores de superfície de anticorpos e na engenharia de anticorpos terapêuticos. Fagocitose, exocitose não-lítica e a atividade antifúngica do macrófago contra *C. neoformans* fagocitado são os temas principais dos outros trabalhos. O achado de que a autofagia é importante na imunidade contra *C. neoformans* pode levar a criação de terapias contra a criptococose que tenham como alvo o sistema imune do hospedeiro ao invés do patógeno, o que pode aumentar a chance de sucesso terapêutico e diminuir a chance de surgimento de resistência.

VIII – Perspectivas

Além de responderem perguntas importantes, os trabalhos mostrados neste projeto criaram novos questionamentos a serem respondidos experimentalmente:

- **Dialquilcarbocianinas, vesículas extracelulares e a cápsula.** Em que motivo do polissacarídeo capsular as dialquilcarbocianinas se ligam? Que tipo de RNA existe nas vesículas e qual sua função biológica?
- **Modulação metabólica por anticorpos contra a cápsula.** Que via de transdução de sinal medeia a resposta à ligação de anticorpos à cápsula?
- **Itgb1 como receptor de IgG3 murino.** IgG3 interage diretamente com Itgb1? Que motivo em IgG3 é reconhecido pela integrina? Os resultados observados *in vitro* teriam algum efeito durante a infecção?
- **Exocitose não-lítica *in vivo*.** Por que as bases fracas e a bafilomicina A1 têm efeitos opostos na exocitose não-lítica? A exocitose não-lítica ocorre em outros órgãos, como no cérebro? Ela tem algum papel na penetração da barreira hemato-encefálica?
- **Autofagia na imunidade contra *C. neoformans*.** O que leva às diferenças observadas entre opsonização por anticorpos e complemento? Qual o mecanismo da atividade antifúngica da autofagia? A autofagia exerce algum papel na apresentação de antígenos de *C. neoformans*?

Além destas perguntas, os resultados descritos neste projeto abriram novas linhas de trabalho. Um exemplo foi descrito no capítulo 2, com a descoberta de que a ligação de 18B7 à cápsula expõe sítios para ligação das dialquilcarbocianinas. Abaixo segue um outro exemplo.

Autofagia na imunidade contra outros fungos patogênicos

Para testar se os resultados obtidos com *C. neoformans* se aplicam a outros fungos patogênicos, foram feitos vários experimentos com *Candida albicans* e um teste piloto com *Aspergillus fumigatus*. Os resultados com *C. albicans* se mostraram semelhantes aos obtidos com *C. neoformans*, porém com algumas diferenças interessantes. LC3 também foi recrutado para os fagossomos contendo *C. albicans*; em contraste com *C. neoformans*, praticamente todos os fungos internalizados eram positivos para LC3 mesmo 15 minutos após a infecção. Testes feitos com as células J774 transfectadas com shRNA contra ATG5 mostraram que a falta de autofagia diminuiu tanto a fagocitose quanto a atividade antifúngica do macrófago. Por fim, os camundongos com nocaute condicional de ATG5 em macrófagos foram significativamente mais susceptíveis à infecção com *C. albicans* por via intravenosa do que os controles. Um único experimento de imunolocalização de LC3 foi feito com células J774 e conídios de *A. fumigatus*. De maneira semelhante a *C. neoformans*, algumas das células fúngicas fagocitadas estavam em fagossomos positivos para LC3. Estes resultados ampliam os obtidos com *C. neoformans* e sugerem que a autofagia possa ser explorada como terapia para outras micoses.

IX – Referências

1. Barnett, J.A., *A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, Cryptococcus neoformans*. Yeast, 2010. **27**(11): p. 875-904.
2. Kwon-Chung, J.K., et al., *Proposal to conserve the name Cryptococcus gattii against C. hondurianus and C. bacillisporus (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae)*. Taxon, 2002. **51**: p. 804-806.
3. Dromer, F., et al., *Individual and environmental factors associated with infection due to Cryptococcus neoformans serotype D. French Cryptococcosis Study Group*. Clin Infect Dis, 1996. **23**(1): p. 91-6.
4. Tortorano, A.M., et al., *Prevalence of serotype D in Cryptococcus neoformans isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy*. Mycoses, 1997. **40**(7-8): p. 297-302.
5. Cherniak, R., et al., *Cryptococcus neoformans chemotyping by quantitative analysis of 1H nuclear magnetic resonance spectra of glucuronoxylomannans with a computer-simulated artificial neural network*. Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(2): p. 146-59.
6. Vaishnav, V.V., et al., *Structural characterization of the galactoxylomannan of Cryptococcus neoformans Cap67*. Carbohydr Res, 1998. **306**(1-2): p. 315-30.
7. Heiss, C., et al., *The structure of Cryptococcus neoformans galactoxylomannan contains beta-D-glucuronic acid*. Carbohydr Res, 2009. **344**(7): p. 915-20.
8. Levitz, S.M. and C.A. Specht, *The molecular basis for the immunogenicity of Cryptococcus neoformans mannoproteins*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(4): p. 513-24.
9. Kozel, T.R., et al., *Role of the capsule in phagocytosis of Cryptococcus neoformans*. Rev Infect Dis, 1988. **10 Suppl 2**: p. S436-9.
10. Vecchiarelli, A., *Fungal capsular polysaccharide and T-cell suppression: the hidden nature of poor immunogenicity*. Crit Rev Immunol, 2007. **27**(6): p. 547-57.
11. Gomez, B.L. and J.D. Nosanchuk, *Melanin and fungi*. Curr Opin Infect Dis, 2003. **16**(2): p. 91-6.
12. Waterman, S.R., et al., *Cell wall targeting of laccase of Cryptococcus neoformans during infection of mice*. Infect Immun, 2007. **75**(2): p. 714-22.
13. Eisenman, H.C., et al., *Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus Cryptococcus neoformans*. Biochemistry, 2005. **44**(10): p. 3683-93.
14. Salas, S.D., et al., *Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of Cryptococcus neoformans*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 377-86.
15. Liu, O.W., et al., *Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans*. Cell, 2008. **135**(1): p. 174-88.
16. Robert, V.A. and A. Casadevall, *Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens*. J Infect Dis, 2009. **200**(10): p. 1623-6.
17. Cox, G.M., et al., *Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 443-8.
18. Cox, G.M., et al., *Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol, 2001. **39**(1): p. 166-75.
19. Shea, J.M., et al., *The cryptococcal enzyme inositol phosphosphingolipid-phospholipase C confers resistance to the antifungal effects of macrophages and promotes fungal dissemination to the central nervous system*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5977-88.
20. Panepinto, J., et al., *Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol, 2009. **71**(5): p. 1165-76.

21. Feldmesser, M., Y. Kress, and A. Casadevall, *Dynamic changes in the morphology of Cryptococcus neoformans during murine pulmonary infection*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 8): p. 2355-65.
22. Yoneda, A. and T.L. Doering, *A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(12): p. 5131-40.
23. Rodrigues, M.L. and J.T. Djordjevic, *Unravelling Secretion in Cryptococcus neoformans: More than One Way to Skin a Cat*. Mycopathologia, 2011.
24. Rodrigues, M.L., et al., *Vesicular polysaccharide export in Cryptococcus neoformans is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(1): p. 48-59.
25. Rodrigues, M.L., et al., *Extracellular vesicles produced by Cryptococcus neoformans contain protein components associated with virulence*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(1): p. 58-67.
26. Albuquerque, P.C., et al., *Vesicular transport in Histoplasma capsulatum: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes*. Cell Microbiol, 2008. **10**(8): p. 1695-710.
27. Oliveira, D.L., et al., *Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis*. PLoS ONE, 2010. **5**(6): p. e11113.
28. Vallejo, M.C., et al., *The pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis exports extracellular vesicles containing highly immunogenic alpha-Galactosyl epitopes*. Eukaryot Cell, 2011. **10**(3): p. 343-51.
29. Prados-Rosales, R., et al., *Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1471-83.
30. Rivera, J., et al., *Bacillus anthracis produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(44): p. 19002-7.
31. Park, B.J., et al., *Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS*. Aids, 2009. **23**(4): p. 525-30.
32. Perfect, J.R., et al., *Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america*. Clin Infect Dis, 2010. **50**(3): p. 291-322.
33. Deray, G., *Amphotericin B nephrotoxicity*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49 Suppl 1**: p. 37-41.
34. Dromer, F., et al., *Cryptococcus neoformans: latency and disease*, in *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*, J. Heitman, et al., Editors. 2011, ASM Press: Washington, DC.
35. Goldman, D.L., et al., *Serologic evidence for Cryptococcus neoformans infection in early childhood*. Pediatrics, 2001. **107**(5): p. E66.
36. Feldmesser, M., et al., *Cryptococcus neoformans is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4225-37.
37. Levitz, S.M., et al., *Cryptococcus neoformans resides in an acidic phagolysosome of human macrophages*. Infect Immun, 1999. **67**(2): p. 885-90.
38. Alanio, A., M. Desnos-Ollivier, and F. Dromer, *Dynamics of Cryptococcus neoformans/macrophages interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans*. mBio, 2011. **In press**.
39. Shao, X., et al., *An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3244-51.
40. Zaragoza, O., et al., *The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary Cryptococcus neoformans infection is associated with pleiotropic differences in the immune response*. Infect Immun, 2007. **75**(6): p. 2729-39.
41. Siddiqui, A.A., R.J. Shattock, and T.S. Harrison, *Role of capsule and interleukin-6 in long-term immune control of Cryptococcus neoformans infection by specifically*

- activated human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*, 2006. **74**(9): p. 5302-10.
42. Vecchiarelli, A., et al., *Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes*. *Infect Immun*, 1995. **63**(8): p. 2919-23.
 43. Levitz, S.M., et al., *Production of tumor necrosis factor alpha in human leukocytes stimulated by Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 1994. **62**(5): p. 1975-81.
 44. Traynor, T.R., et al., *Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity*. *J Immunol*, 2002. **168**(9): p. 4659-66.
 45. Olszewski, M.A., et al., *Regulatory effects of macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 on the development of immunity to Cryptococcus neoformans depend on expression of early inflammatory cytokines*. *Infect Immun*, 2001. **69**(10): p. 6256-63.
 46. He, W., et al., *Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis*. *Infect Immun*, 2003. **71**(2): p. 930-6.
 47. Vecchiarelli, A., et al., *Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in Cryptococcus neoformans infection*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1994. **11**(2): p. 130-7.
 48. Vecchiarelli, A., et al., *Encapsulation of Cryptococcus neoformans regulates fungicidal activity and the antigen presentation process in human alveolar macrophages*. *Clin Exp Immunol*, 1994. **98**(2): p. 217-23.
 49. Vecchiarelli, A., *Cytokines and costimulatory molecules: positive and negative regulation of the immune response to Cryptococcus neoformans*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2000. **48**(6): p. 465-72.
 50. Muller, U., et al., *IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, 2007. **179**(8): p. 5367-77.
 51. Ma, H., et al., *Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages*. *Curr Biol*, 2006. **16**(21): p. 2156-60.
 52. Alvarez, M. and A. Casadevall, *Phagosome extrusion and host-cell survival after Cryptococcus neoformans phagocytosis by macrophages*. *Curr Biol*, 2006. **16**(21): p. 2161-5.
 53. Voelz, K., D.A. Lammas, and R.C. May, *Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 2009. **77**(8): p. 3450-7.
 54. Johnston, S.A. and R.C. May, *The human fungal pathogen Cryptococcus neoformans escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(8).
 55. Chrisman, C.J., M. Alvarez, and A. Casadevall, *Phagocytosis of Cryptococcus neoformans by, and nonlytic exocytosis from, Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*, 2010. **76**(18): p. 6056-62.
 56. Dromer, F., et al., *Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide*. *Infect Immun*, 1987. **55**(3): p. 742-8.
 57. Eckert, T.F. and T.R. Kozel, *Production and characterization of monoclonal antibodies specific for Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide*. *Infect Immun*, 1987. **55**(8): p. 1895-9.
 58. Casadevall, A., et al., *Antibodies elicited by a Cryptococcus neoformans-tetanus toxoid conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection*. *J Infect Dis*, 1992. **165**(6): p. 1086-93.
 59. Fleuridor, R., Z. Zhong, and L. Pirofski, *A human IgM monoclonal antibody prolongs survival of mice with lethal cryptococcosis*. *J Infect Dis*, 1998. **178**(4): p. 1213-6.

60. Casadevall, A., et al., *Characterization of a murine monoclonal antibody to Cryptococcus neoformans polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(6): p. 1437-46.
61. Casadevall, A. and L.A. Pirofski, *Antibody-mediated protection through cross-reactivity introduces a fungal heresy into immunological dogma*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5074-8.
62. Yuan, R., et al., *Isotype switching from IgG3 to IgG1 converts a nonprotective murine antibody to Cryptococcus neoformans into a protective antibody*. J Immunol, 1995. **154**(4): p. 1810-6.
63. Yuan, R.R., et al., *Isotype switching increases efficacy of antibody protection against Cryptococcus neoformans infection in mice*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1057-62.
64. Saylor, C.A., E. Dadachova, and A. Casadevall, *Murine IgG1 and IgG3 isotype switch variants promote phagocytosis of Cryptococcus neoformans through different receptors*. J Immunol, 2010. **184**(1): p. 336-43.
65. Bruhns, P., et al., *Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses*. Blood, 2009. **113**(16): p. 3716-25.
66. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcγ receptors: old friends and new family members*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 19-28.
67. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcγ receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
68. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
69. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
70. Mizushima, N., et al., *In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1101-11.
71. Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin, *Autophagy in immunity and inflammation*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 323-35.
72. Liang, X.H., et al., *Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8586-96.
73. Rich, K.A., C. Burkett, and P. Webster, *Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy*. Cell Microbiol, 2003. **5**(7): p. 455-68.
74. Gutierrez, M.G., et al., *Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages*. Cell, 2004. **119**(6): p. 753-66.
75. Qin, Q.M., et al., *Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of Cryptococcus neoformans*. PLoS Pathog, 2011. **7**(6): p. e1002078.
76. Zaragoza, O., et al., *The capsule of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans*. Adv Appl Microbiol, 2009. **68**: p. 133-216.
77. Hull, C.M. and J. Heitman, *Genetics of Cryptococcus neoformans*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 557-615.
78. Hajjeh, R.A., et al., *Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons*. Cryptococcal Active Surveillance Group. J Infect Dis, 1999. **179**(2): p. 449-54.
79. Chen, S., et al., *Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to Cryptococcus neoformans in Australia and New Zealand*. Australasian Cryptococcal Study Group. Clin Infect Dis, 2000. **31**(2): p. 499-508.
80. Nielsen, K., et al., *Sexual cycle of Cryptococcus neoformans var. grubii and virulence of congeneric α and alpha isolates*. Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 4831-41.
81. Loftus, B.J., et al., *The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen Cryptococcus neoformans*. Science, 2005. **307**(5713): p. 1321-4.
82. Heitman, J., et al., *On the origins of congeneric MAT_α and MAT_a strains of the pathogenic yeast Cryptococcus neoformans*. Fungal Genet Biol, 1999. **28**(1): p. 1-5.

83. Jacobson, E.S., et al., *Genetic and phenotypic characterization of capsule mutants of Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol, 1982. **150**(3): p. 1292-6.
84. Axelrod, D., *Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization*. Biophys J, 1979. **26**(3): p. 557-73.
85. Life Technologies, *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 11 ed2010: Life Technologies.
86. Levitz, S.M., D.J. DiBenedetto, and R.D. Diamond, *A rapid fluorescent assay to distinguish attached from phagocytized yeast particles*. J Immunol Methods, 1987. **101**(1): p. 37-42.
87. Larsen, R.A., et al., *Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(3): p. 952-8.
88. Mukherjee, J., et al., *Protective and nonprotective monoclonal antibodies to Cryptococcus neoformans originating from one B cell*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 405-9.
89. McLean, G.R., et al., *Isotype can affect the fine specificity of an antibody for a polysaccharide antigen*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1379-86.
90. Unkeless, J.C., *Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors*. J Exp Med, 1979. **150**(3): p. 580-96.
91. Tabora, C.P. and A. Casadevall, *CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of Cryptococcus neoformans*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 791-802.
92. Noto, K., et al., *Identification and functional characterization of mouse CD29 with a mAb*. Int Immunol, 1995. **7**(5): p. 835-42.
93. Miyake, S., et al., *Identification of collagen and laminin receptor integrins on murine T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(9): p. 2000-5.
94. Miyake, K., et al., *Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 599-607.
95. Takahashi, K., et al., *A murine very late activation antigen-like extracellular matrix receptor involved in CD2- and lymphocyte function-associated antigen-1-independent killer-target cell interaction*. J Immunol, 1990. **145**(12): p. 4371-9.
96. Ralph, P., J. Prichard, and M. Cohn, *Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity*. J Immunol, 1975. **114**(2 pt 2): p. 898-905.
97. Zhang, X., R. Goncalves, and D.M. Mosser, *The isolation and characterization of murine macrophages*. Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14 1.
98. Wennerberg, K., et al., *Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin*. J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 227-38.
99. Zhao, Z., et al., *Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(5): p. 458-69.
100. Nicola, A.M., S. Frases, and A. Casadevall, *Lipophilic dye staining of Cryptococcus neoformans extracellular vesicles and capsule*. Eukaryot Cell, 2009. **8**(9): p. 1373-80.
101. Eisenman, H.C., et al., *Vesicle-associated melanization in Cryptococcus neoformans*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 12): p. 3860-7.
102. Zaragoza, O. and A. Casadevall, *Experimental modulation of capsule size in Cryptococcus neoformans*. Biol Proced Online, 2004. **6**: p. 10-15.
103. Bryan, R.A., et al., *Radiological studies reveal radial differences in the architecture of the polysaccharide capsule of Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell, 2005. **4**(2): p. 465-75.
104. Rosas, A.L., et al., *Isolation and serological analyses of fungal melanins*. J Immunol Methods, 2000. **244**(1-2): p. 69-80.
105. Gullapalli, R.R., M.C. Demirel, and P.J. Butler, *Molecular dynamics simulations of Dil-C18(3) in a DPPC lipid bilayer*. Phys Chem Chem Phys, 2008. **10**(24): p. 3548-60.

106. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
107. Tolleson, W.H., *Human melanocyte biology, toxicology, and pathology*. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2005. **23**(2): p. 105-61.
108. McClelland, E.E., et al., *Ab binding alters gene expression in Cryptococcus neoformans and directly modulates fungal metabolism*. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1355-61.
109. Macura, N., T. Zhang, and A. Casadevall, *Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1904-15.
110. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
111. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
112. Luo, B., et al., *Highly parallel identification of essential genes in cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20380-5.
113. Root, D.E., et al., *Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library*. Nat Methods, 2006. **3**(9): p. 715-9.
114. Audic, S. and J.M. Claverie, *The significance of digital gene expression profiles*. Genome Res, 1997. **7**(10): p. 986-95.
115. Romualdi, C., et al., *IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments*. Physiol Genomics, 2003. **12**(2): p. 159-62.
116. Trotter, P.J., *The genetics of fatty acid metabolism in Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Nutr, 2001. **21**: p. 97-119.
117. Leitinger, B., et al., *The regulation of integrin function by Ca(2+)*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1498**(2-3): p. 91-8.
118. Gavin, A.L., et al., *Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 20-3.
119. McLean, G.R., et al., *Human and murine immunoglobulin expression vector cassettes*. Mol Immunol, 2000. **37**(14): p. 837-45.
120. Mukherjee, J., A. Casadevall, and M.D. Scharff, *Molecular characterization of the humoral responses to Cryptococcus neoformans infection and glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate immunization*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1105-16.
121. Mukherjee, J., et al., *Therapeutic efficacy of monoclonal antibodies to Cryptococcus neoformans glucuronoxylomannan alone and in combination with amphotericin B*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(3): p. 580-7.
122. Dromer, F. and J. Charreire, *Improved amphotericin B activity by a monoclonal anti-Cryptococcus neoformans antibody: study during murine cryptococcosis and mechanisms of action*. J Infect Dis, 1991. **163**(5): p. 1114-20.
123. Cabodi, S., et al., *Integrins and signal transduction*. Adv Exp Med Biol, 2010. **674**: p. 43-54.
124. Diamond, B. and D.E. Yelton, *A new Fc receptor on mouse macrophages binding IgG3*. J Exp Med, 1981. **153**(3): p. 514-9.
125. Barnes, N., et al., *FcgammaRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses*. Immunity, 2002. **16**(3): p. 379-89.
126. Vukovic, P., et al., *Immunoglobulin G3 antibodies specific for the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of Plasmodium yoelii merozoite surface protein 1 transfer protection to mice deficient in Fc-gammaRI receptors*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 3019-22.
127. Hjelm, F., et al., *IgG3-mediated enhancement of the antibody response is normal in Fc gammaRI-deficient mice*. Scand J Immunol, 2005. **62**(5): p. 453-61.
128. Nicola, A.M., et al., *Nonlytic Exocytosis of Cryptococcus neoformans from Macrophages Occurs In Vivo and Is Influenced by Phagosomal pH*. mBio, 2011. **2**(4).

129. Chaka, W., et al., *Quantitative analysis of phagocytosis and killing of Cryptococcus neoformans by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry*. Clin Diagn Lab Immunol, 1995. **2**(6): p. 753-9.
130. Waterston, R.H., et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 520-62.
131. Del Poeta, M., *Role of phagocytosis in the virulence of Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell, 2004. **3**(5): p. 1067-75.
132. Beauregard, K.E., et al., *pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from Listeria monocytogenes*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1159-63.
133. Miyazawa, N., R.G. Crystal, and P.L. Leopold, *Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1387-400.
134. Santic, M., et al., *Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of Francisella tularensis into the macrophage cytosol*. Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2671-7.
135. Mazzolla, R., et al., *Enhanced resistance to Cryptococcus neoformans infection induced by chloroquine in a murine model of meningoencephalitis*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(4): p. 802-7.
136. Weber, S.M., S.M. Levitz, and T.S. Harrison, *Chloroquine and the fungal phagosome*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(4): p. 349-53.
137. Charlier, C., et al., *Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 120-7.
138. Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-9.
139. Mizushima, N., et al., *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 657-68.
140. Kuma, A., et al., *The role of autophagy during the early neonatal starvation period*. Nature, 2004. **432**(7020): p. 1032-6.
141. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing*. Embo J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
142. Jackson, W.T., et al., *Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses*. PLoS Biol, 2005. **3**(5): p. e156.
143. Raes, G., et al., *Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(4): p. 597-602.
144. Feldmesser, M., S. Tucker, and A. Casadevall, *Intracellular parasitism of macrophages by Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol, 2001. **9**(6): p. 273-8.
145. Gaillard, J.L., et al., *In vitro model of penetration and intracellular growth of Listeria monocytogenes in the human enterocyte-like cell line Caco-2*. Infect Immun, 1987. **55**(11): p. 2822-9.
146. Eissenberg, L.G., W.E. Goldman, and P.H. Schlesinger, *Histoplasma capsulatum modulates the acidification of phagolysosomes*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1605-11.
147. Armstrong, J.A. and P.D. Hart, *Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes*. J Exp Med, 1971. **134**(3 Pt 1): p. 713-40.
148. Sturgill-Koszycki, S., et al., *Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase*. Science, 1994. **263**(5147): p. 678-81.
149. Alonso, S., et al., *Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007.
150. Prentice, E., et al., *Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10136-41.
151. Duran, J.M., et al., *Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes*. J Cell Biol, 2010. **188**(4): p. 527-36.

152. Manjithaya, R., et al., *Unconventional secretion of Pichia pastoris Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation*. J Cell Biol, 2010. **188**(4): p. 537-46.
153. Cabral, M., et al., *Unconventional secretion of AcbA in Dictyostelium discoideum through a vesicular intermediate*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(7): p. 1009-17.
154. Loomis, W.F., et al., *Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21359-65.
155. Takenouchi, T., et al., *The activation of P2X7 receptor impairs lysosomal functions and stimulates the release of autophagolysosomes in microglial cells*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2051-62.
156. Levitz, S.M. and D.J. DiBenedetto, *Differential stimulation of murine resident peritoneal cells by selectively opsonized encapsulated and acapsular Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 1988. **56**(10): p. 2544-51.

X – Anexos

Resumos dos manuscritos publicados ou em preparação associados a esta tese

1. **Artigo publicado:** Nicola, A.M., S. Frases, and A. Casadevall. 2009. Lipophilic dye staining of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles and capsule. *Eukaryot Cell* 8:1373-1380.

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast that causes systemic mycosis in immunosuppressed individuals. Recent studies have determined that this fungus produces vesicles that are released to the extracellular environment both in vivo and in vitro. These vesicles contain assorted cargo that includes several molecules associated with virulence and implicated in host-pathogen interactions, such as capsular polysaccharides, laccase, urease, and other proteins. To date, visualization of extracellular vesicles has relied on transmission electron microscopy, a time-consuming technique. In this work we report the use of fluorescent membrane tracers to stain lipophilic structures in cryptococcal culture supernatants and capsules. Two dialkylcarbocyanine probes with different spectral characteristics were used to visualize purified vesicles by fluorescence microscopy and flow cytometry. Dual staining of vesicles with dialkylcarbocyanine and RNA-selective nucleic acid dyes suggested that a fraction of the vesicle population carried RNA. Use of these dyes to stain whole cells, however, was hampered by their possible direct binding to capsular polysaccharide. A fluorescent phospholipid was used as additional membrane tracer to stain whole cells, revealing punctate structures on the edge of the capsule which are consistent with vesicular trafficking. Lipophilic dyes provide new tools for the study of fungal extracellular vesicles and their content. The finding of hydrophobic regions in the capsule of *C. neoformans* adds to the growing evidence for a structurally complex structure composed of polysaccharide and nonpolysaccharide components.

2. **Artigo publicado:** Eisenman, H.C., S. Frases, A.M. Nicola, M.L. Rodrigues, and A. Casadevall. 2009. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 155:3860-3867.

Recently, several pathogenic fungi were shown to produce extracellular vesicles that contain various components associated with virulence. In the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*, these components included laccase, an enzyme that catalyses melanin synthesis. Spherical melanin granules have been observed in the cell wall of *C. neoformans*. Given that melanin granules have dimensions that are comparable to those of extracellular vesicles, and that metazoan organisms produce melanin in vesicular structures known as melanosomes, we investigated the role of vesicles in cryptococcal melanization. Extracellular vesicles melanized when incubated with the melanin precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). The kinetics of substrate incorporation into cells and vesicles was analysed using radiolabelled L-DOPA. The results indicated that substrate incorporation was different for cells and isolated vesicles. Acid-generated melanin ghosts stained with lipophilic dyes, implying the presence of associated lipid. A model for *C. neoformans* melanization is proposed that accounts for these observations and provides a mechanism for the assembly of melanin into relatively uniform spherical particles stacked in an orderly arrangement in the cell wall.

3. **Artigo publicado:** Rivera, J., R.J. Cordero, A.S. Nakouzi, S. Frases, A. Nicola, and A. Casadevall. 2010. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19002-19007.

Extracellular vesicle production is a ubiquitous process in Gram-negative bacteria, but little is known about such process in Gram-positive bacteria. We report the isolation of extracellular vesicles from the supernatants of *Bacillus anthracis*, a Gram-positive bacillus that is a powerful agent for biological warfare. *B. anthracis* vesicles formed at the outer layer of the bacterial cell had double-membrane spheres and ranged from 50 to 150 nm in diameter. Immunoelectron microscopy with mAbs to protective antigen, lethal factor, edema toxin, and anthrolysin revealed toxin components and anthrolysin in vesicles, with some vesicles containing more than one toxin component. Toxin-containing vesicles were also visualized inside *B. anthracis*-infected macrophages. ELISA and immunoblot analysis of vesicle preparations confirmed the presence of *B. anthracis* toxin components. A mAb to protective antigen protected macrophages against vesicles from an anthrolysin-deficient strain, but not against vesicles from Sterne 34F2 and Sterne δ T strains, consistent with the notion that vesicles delivered both toxin and anthrolysin to host cells. Vesicles were immunogenic in BALB/c mice, which produced a robust IgM response to toxin components. Furthermore, vesicle-immunized mice lived significantly longer than controls after *B. anthracis* challenge. Our results indicate that toxin secretion in *B. anthracis* is, at least, partially vesicle-associated, thus allowing concentrated delivery of toxin components to target host cells, a mechanism that may increase toxin potency. Our observations may have important implications for the design of vaccines, for passive antibody strategies, and provide a previously unexplored system for studying secretory pathways in Gram-positive bacteria.

4. **Artigo publicado:** McClelland, E.E.*, A.M. Nicola*, R. Prados-Rosales, and A. Casadevall. 2010. Ab binding alters gene expression in *Cryptococcus neoformans* and directly modulates fungal metabolism. *J Clin Invest* 120:1355-1361. Erin E. McClelland and André M. Nicola contributed equally to this work.

Abs facilitate humoral immunity via the classical mechanisms of opsonization, complement activation, Ab-dependent cellular cytotoxicity, and toxin/viral neutralization. There is also evidence that some Abs mediate direct antimicrobial effects. For example, Ab binding to the polysaccharide capsule of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* promotes opsonization but also inhibits polysaccharide release and biofilm formation. To investigate whether Ab binding affects *C. neoformans* directly, we analyzed fungal gene expression after binding of protective and nonprotective mAbs. The 2 IgM Abs and 1 IgG1 Ab tested each induced different changes in gene expression. The protective IgG1 mAb upregulated genes encoding proteins involved in fatty acid synthesis, the protective IgM mAb downregulated genes encoding proteins required for protein translation, and the nonprotective IgM mAb had modest effects on gene expression. Differences in gene expression correlated with mAb binding to different locations of the capsule. Of the 3 Abs tested, the protective IgG1 mAb bound to *C. neoformans* closest to the cell wall, produced specific differences in the pattern of phosphorylated proteins, caused changes in lipid metabolism, and resulted in increased susceptibility to the antifungal drug amphotericin B. These results suggest what we believe to be a new mode of action for Ab-mediated immunity and raise the possibility that immunoglobulins mediate cross talk between microbes and hosts through their effects on microbial metabolism.

5. **Manuscripto submetido:** Saylor C.*, Nicola A.M.*, Coelho C., Rusakova V., Holemon H., Yagita H. and A. Casadevall. Integrin beta 1 (CD29) promotes the interaction of murine IgG3 with effector cells. *These authors contributed equally to this work.

Murine IgG3 interacts with effector cells through an Fc receptor that is different from that used by the other IgG isotypes. We searched for this elusive receptor using a pooled lentiviral shRNA library targeting approximately 15,000 mouse genes. shRNAs targeting integrin beta 1 (*Itgb1*) decreased IgG3 binding and IgG3-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* (Cn). Conditional knockout of *Itgb1* in primary macrophages and an *Itgb1*-blocking antibody also affected IgG3 binding and phagocytosis, whereas manganese, an integrin activator, increased binding of IgG3 to macrophages. Remarkably, CHO cells, which lack Fc receptors, bound IgG3 and phagocytosed IgG3-opsonized Cn, demonstrating unsuspected innate phagocytic capability. We conclude that *Itgb1* functions as a receptor, or is part of a receptor complex, for murine IgG3. The interaction between a product of the adaptive immune system and a cell surface integrin to promote phagocytosis has considerable implications for the connectivity and evolution of the immune system.

6. **Capítulo de livro submetido:** Nicola A.M. and A. Casadevall. In Vitro Measurement of Phagocytosis and Killing of *Cryptococcus neoformans* by Macrophages. In Leucocytes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.

Macrophages are pivotal cells in immunity against a wide range of pathogens. Their most important property, as suggested by their name, is to ingest pathogens, leading to their killing, the release of inflammatory mediators and antigen processing. On the other hand, macrophages can also be exploited by microbes as a niche for survival in the host, as exemplified by *Cryptococcus neoformans*. This encapsulated yeast is an important cause of meningoencephalitis in immunocompromised people, particularly those with AIDS. Using culture and microscopy techniques, we present here methods that can be used to quantify phagocytosis of *C. neoformans* and its killing by macrophages, as well as the viability of the phagocyte after interaction.

7. **Artigo publicado:** Nicola, A.M.*, E.J. Robertson*, P. Albuquerque, S. Derengowski Lda, and A. Casadevall. 2011. Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from Macrophages Occurs *In vivo* and Is Influenced by Phagosomal pH. *mBio* 2(4): pii: e00167-11.* A.M.N. and E.J.R. contributed equally to this work.

A unique aspect of the interaction of the fungus *Cryptococcus neoformans* with macrophages is the phenomenon of nonlytic exocytosis, also referred to as "vomocytosis" or phagosome extrusion/expulsion, which involves the escape of fungal cells from the phagocyte with the survival of both cell types. This phenomenon has been observed only *in vitro* using subjective and time-consuming microscopic techniques. In spite of recent advances in our knowledge about its mechanisms, a major question still remaining is whether this phenomenon also occurs *in vivo*. In this study, we describe a novel flow cytometric method that resulted in a substantial gain in throughput for studying phagocytosis and nonlytic exocytosis *in vitro* and used it to explore the occurrence of this phenomenon in a mouse model of infection. Furthermore, we tested the hypothesis that host cell phagosomal pH affected nonlytic exocytosis. The addition of the weak bases ammonium chloride and chloroquine resulted in a significant increase of nonlytic exocytosis events, whereas the vacuolar ATPase inhibitor bafilomycin A1 had the opposite effect. Although all three agents are known to neutralize phagosomal acidity, their disparate effects suggest that phagosomal pH is an important and complex variable in this process. Our experiments established that nonlytic exocytosis occurred *in vivo* with a frequency that is possibly much higher than that observed *in vitro*. These results in turn suggest that nonlytic exocytosis has a potential role in the pathogenesis of cryptococcosis.

8. **Manuscrito em preparação:** Nicola, A.M. et al. Multiple Roles for Macrophage Autophagy in Immunity to *Cryptococcus neoformans*.

Autophagy is a highly conserved cellular mechanism used by eukaryotes to recycle cellular material during times of stress. It is involved in control of a variety of viral, bacterial and protozoan intracellular pathogens. The role of autophagy for the control of fungal pathogens has not been explored. In this study we evaluated the role of macrophage autophagy in the response to *Cryptococcus neoformans*, an encapsulated yeast that causes meningitis in immunocompromised people. The autophagosome marker LC3 was present in *C. neoformans* vacuoles following antibody-mediated opsonization both in J774 cells and primary murine peritoneal macrophages, but not after complement-mediated opsonization. Time-lapse confocal imaging using J774 cells transfected with LC3 coupled to enhanced green fluorescent protein (LC3-EGFP) revealed that this giant autophagosome was formed by sequential fusion of small autophagic vacuoles with the *C. neoformans* vacuole. Disruption of host autophagy by RNA interference against ATG5 decreased the fungistatic activity of J774 macrophage-like cells. This effect was observed both with antibody- and complement-opsonized cells and was also seen in macrophages derived from the bone marrow of ATG5 conditional knockout mice. Interference with autophagy also decreased non-lytic exocytosis of *C. neoformans* and altered the pattern of cytokine secretion by macrophages. Mice with ATG5 conditionally knocked out in myeloid cells showed no difference in survival when infected with *C. neoformans*, but had decreased fungal burden and Th2 cytokines and a different histopathological pattern in their lungs after intratracheal infection. These results demonstrate multiple roles of macrophage autophagy in restricting intracellular parasitism by a fungus and reveal novel connections with pathogen expulsion, humoral immunity and cytokine signaling.